



HAL
open science

Embryologie de la neurofibromatose de type I : morphogenese craniofaciale et regulations du gene NF1 dans la crete neurale

Moussab Alrajeh

► **To cite this version:**

Moussab Alrajeh. Embryologie de la neurofibromatose de type I : morphogenese craniofaciale et regulations du gene NF1 dans la crete neurale. Embryologie et organogenèse. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS471 . tel-01712218

HAL Id: tel-01712218

<https://theses.hal.science/tel-01712218>

Submitted on 19 Feb 2018

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

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

**« EMBRYOLOGIE DE LA NEUROFIBROMATOSE
DE TYPE I:
MORPHOGENESE CRANIOFACIALE
ET REGULATIONS DU GENE NF1 DANS LA
CRETE NEURALE »**

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A "INSTITUT DES NEUROSCIENCES
PARIS-SACLAY (NEURO-PSI)"**

**ECOLE DOCTORALE N° 568 BIOSIGNE |
Signalisations et réseaux intégratifs en biologie**

*Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires
et cellulaires de la biologie*

Thèse Présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette le 19- 12- 2017 Par

M. Moussab ALRAJEH, MD

Composition du Jury :

Mr. VERNIER Philippe	Directeur de l'unité Neuro-PSI	Président
Mme. POLIARD Anne	Professeur des Universités de Paris-V René Descartes	Rapporteur
Mr. DUBAND Jean-Loup	Directeur de recherche IMRB – Inserm U955	Rapporteur
Mr. HADJ-RABIA Smaïl	Professeur des Universités de Paris-V René Descartes Praticien Hospitalier Hôpital universitaire Necker	Examineur
Mme. BRISSAC-De PAILLERETS Brigitte	Praticien des CLCC, Dr, Université Paris- Sud/ Paris Saclay INSERM U1186 Hôpital Gustave ROUSSY	Examinatrice
Mme. CREUZET Sophie	Directrice de recherche, Neuro-PSI	Directrice de thèse

**Titre : « EMBRYOLOGIE DE LA NEUROFIBROMATOSE TYPE I:
MORPHOGENESE CRANIOFACIALE
ET REGULATIONS DU GENE NF1 DANS LA CRETE NEURALE »**

Mots clés : neurofibromatose, crête neurale, silencing du gène, embryon.

Résumé : La neurofibromatose type I (maladie de Von-Rechlinghausen) est une affection autosomique dominante, causée par des mutations polymorphes du gène *NF1*, dont la protéine, la Neurofibromine, agit comme un suppresseur de tumeur en opérant un contrôle négatif des protéines de RAS. D'un point de vue embryologique, cette maladie affecte les dérivés de la crête neurale (CN), une structure embryonnaire pluripotente, capable de générer des dérivés variés tels que des neurones, des cellules gliales, périsvasculaires, squelettiques et pigmentaires. Les cellules de la CN subsistent aussi chez l'adulte, à l'état de cellule souches, pouvant être impliqués dans des processus régénératifs. Toutefois, lorsque leur programme morphogénétique est altéré, elles peuvent générer des processus tumoraux, à l'origine de tumeurs multiples dans la peau, les nerfs (tumeurs bénignes et malignes des gaines nerveuses, neurofibromes,) et le cerveau (50% des cas de tumeurs cérébrales avec un tiers de gliomes des voies optiques sont cancéreuses).

La compréhension des mécanismes de cette maladie est limitée par la faible corrélation qui existe entre génotypes et phénotypes, à savoir l'adéquation entre la nature hautement polymorphe des anomalies génétiques et la diversité des manifestations cliniques. L'objectif de l'étude est d'analyser les conséquences de l'inactivation du gène *NF1* sur le comportement des cellules de la CN (CCN), leur prolifération, leur capacité de migration et leur potentiel de différenciation, chez un modèle expérimental. De plus, nous tentons d'élucider l'impact des modulations épigénétiques de l'activité du *NF1*.

Nous avons développé un système qui permet l'inactivation totale du gène *NF1* dans les cellules de

la CN spécifiquement en utilisant des molécules d'ARN interférent (*silencing*) transfectées par

électroporation bilatérale dans les CCN, au stade précoce de la neurulation, en utilisant l'embryon de poulet comme modèle expérimental.

Suite à l'inactivation du gène *NF1*, nous avons obtenus des déficits multi-systémiques qui consistent principalement en des altérations de la gangliogénèse céphalique, avec des phénotypes gliomateux, mais aussi des défauts périsvasculaires qui affectent tant les parois adventitielles des artères branchiales, que les péricytes des capillaires faciaux et cérébraux, associés des asymétries faciales et des formations néoplasiques intra-cérébrales. Précocement, nous montrons que ces déficits peuvent être corrélés aux altérations du comportement migratoire, prolifératif et apoptotiques des cellules de la CN.

Parallèlement, nous avons cherché à déterminer l'implication des régulations épigénétiques sur l'activité de *NF1*. Nous nous sommes focalisés sur l'activité des Histones Désacétylases (HDAC), qui contrôlent la configuration chromatinienne. Il s'avère que les transcrits de la classe I de famille des HDACs, les HDAC1, 2 et 8, normalement accumulés dans les CCN au cours de leur migration et selon un patron d'expression spatial et temporel similaire à celui de *NF1*, présentent des variations significatives suite au *silencing* de *NF1*. Nous avons testé l'inactivation sélective de ces gènes; Ainsi, nous montrons que l'inactivation de HDAC8 seule, permet de reproduire les altérations des phénotypes vasculaires observés chez les embryons hypomorphes pour *NF1*. Ceci suggère un rôle prépondérant de HDAC8 dans la régulation de la vasculogénèse et de la différenciation des CCN en péricytes. Qui pourrait agir par l'activation ectopique du gène *Sox9* soutenant la transdifférenciation pathologique des péricytes en processus gliomateux ou en calcifications intracérébrales.

Title : ***EMBRYOLOGY OF NEUROFIBROMATOSIS Type I: CRANIOFACIAL MORPHOGENESIS AND NF1 GENE REGULATIONS IN NEURAL CREST.***

Keywords : Von-Rechlinghausen, Embryo, gene silencing, neural crest.

Abstract: The neurofibromatosis-type 1 (NF1) (Von Recklinghausen disease) is an autosomal disorder, which stems from misregulation of Neurofibromin (NF1), a gene encoding a tumour-suppressor protein which acts as a negative regulator of RAS proteins. Mutations of NF1 are causally linked to many types of tumours located in skin, nerves, but also in the brain (intracerebral tumours and gliomas). NF1 patients have a high risk of developing both benign and malignant tumours. The diversity of deficits and the nature of cellular lineages attribute all these tumoral manifestations to deregulation of neural crest cell (NC) derivatives. The NC is a multipotent stem cell population that contributes to a variety of cell types in vertebrate embryo, which include skeletogenic, glial, pigment cells as well as pericytes. In order to understand the pathologic process of this disease, it is essential to analyze the molecular mechanisms involved in the survival, proliferation and differentiation of NC. Our objectives are therefore to gain insights into the molecular cascade responsible for

the diversity of NC derivatives at cephalic level.

We opt for a drastic approach consisting in eradicating *NF1* activity from NC at the beginning of their migration. In our experimental model, we can analyze developmental interactions of NC and the epigenetic regulation of the *NF1* gene, at their level. Especially class1 Histone deacetylases (HDAC) family of molecules. So we have developed a system which allows complete inactivation of the NF1 gene in NC specifically using interfering RNA molecules (silencing) transfected by electroporation in the bilateral NC, during the early stage of neurulation, using the chick embryo as an experimental model.

We show that HDAC8 inactivation can reproduce the alterations of vascular phenotypes observed in *NF1* hypomorphic embryos. Suggesting an important role of *HDAC8* in regulating vasculogenesis and differentiation of pericytes NC. That could be by ectopic activation of *Sox9* gene supporting the pathological transdifférenciation pericytes in gliomateux process or intracerebral calcifications.

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais bien adresser mes remerciements et ma gratitude au docteur Sophie Creuzet, ma directrice de thèse qui m'a encadré, j'ai beaucoup d'admiration pour sa rigueur scientifique dans le travail, ses connaissances, sa vaste expérience et surtout sa gentillesse. Un grand merci pour tout le temps qu'elle m'a consacré. Je souhaiterais vivement que ce travail est à la hauteur de ses espérances. Toute l'expression de ma profonde reconnaissance, Sophie.

Je voudrais bien remercier toutes les ex-membres de l'équipe de Sophie, Soufien, Aurélie, pour leur aide, leurs conseils et leur soutien au quotidien ; et également tous les stagiaires et les étudiants qui sont passés dans cette équipe Florian, Suzana, Fanny, Charlotte, Brigitte et Michaël pour leur sympathie.

Je dédie également ce travail à l'ame de mon père et à ma chère mère, mes sœurs et mon frère, je vous remercie beaucoup pour votre soutien et votre encouragement continu.

En fin, tout mon remerciement et mon amour à ma petite famille, mes enfants et surtout à la partenaire de mon ame, mon amour Najah, tu m'as aidé, encouragé, supporté...Les mots les plus simples sont aussi les plus vrais : je t'aime infiniment.

Liste d'abréviation

AB	Arcs branchiaux
Ac	Anticorps
ADNc	ADN complémentaire
AP	Arcs pharyngés
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribo-Nucléique
ARNi	ARN interférant
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-Indolyphosphate
Bmp	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	<i>Serum Albumine Bovine</i>
CCN	Cellules de la Crête Neurale
CN	Crête Neurale
CNC	Crête neurale céphalique
Dapi	4',6'-diamidino-2-phénylindole
Dlx1	<i>Distal-less gene</i>
Dig	Digoxigénine 1,10 -dioctadecyl- 3,3,30 ,30
dsRNA	<i>double strand RNA</i>
E	Jour embryonnaire (<i>Embryonic day</i>).
EtOH	Alcool éthylique
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
Fgfr	<i>Fibroblast Growth Factor receptor</i>
FSNC	<i>facial skeletogenic neural crest</i>
GAM	<i>Goat-anti-Mouse immunoglobulin</i>
GAR	<i>Goat-anti-Rabbit immunoglobulin</i>
GFP	Green fluorescent protein
GS	<i>Goat Serum</i>
H	Heure
HH	stade de la classification Hamburger-Hamilton
HNK1	<i>Human natural killer 1</i>
Hox	<i>Homo box gene</i>
Ig	Immunoglobuline
j	Jour
LTR	<i>Lyso-Tracker®</i>
min	Minutes
mm	millimètre
Msx1	<i>Msh homobox gene</i>
NBT	nitro-blue tetrazolium
ng	Nanogramme
NF1	La Neurofibromatose
NF1	Le gène de la Neurofibromatose type 1
NF	NeuroFibrome
NTM	solution NaCl-Tris-MgCl ₂
OBNI	objets brillants non identifiés
PBS	<i>Phosphate Buffer Salin</i>
PH3	Phospho-histone 3

Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
ss	somite stage
TCL	Tâches café au lait
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TT	TritonX100
TUB	Anticorps a-Tubuline acétylé
°C	Celsius
µg	Microgramme
µl	Microlitre

Table des figures et tableaux

<i>Titre</i>	<i>Page</i>
Fig. 1 : La gastrulation: mise en place du mésoderme.	2
Fig. 2 : La Formation de la plaque neurale et le tube neural	3
Fig. 3 : le développement de l'extrémité céphalique de l'embryon	5
Fig. 4 : la croissance des vésicules céphaliques chez l'embryon humain	6
Tableau 1 : Région de l'encéphale et nerfs crâniens associés.	7
Fig. 5 : Modes d'ossification du squelette crânio-facial humain	9
Fig. 6 : Morphogenèse des structures faciales de 4 à 8 semaines de développement	10
Fig. 7 : Développement du palais	12
Fig.8 : la neurulation et la formation de la Crête Neurale	17
Fig.9 : la Contribution de la crête neurale céphalique aux structures cranio-faciales.	20
Tableau 2 : Dérivés des cellules de la crête neural	22
Fig.10 : la Contribution de la CNC aux structures vasculaires cranio-faciales	24
Fig.11 : Contribution des CCN au développement de la tête	29
Fig. 12 : Rôle des gènes Six dans le développement céphalique.	36
Tableau 3 : Sous-familles de FGF et leurs ligands correspondants	38
Fig. 13 : Signalisation du Fgf.	38-39
Fig. 14 : Accumulation des transcrits de FgfR1 et de FgfR2.	40
Fig. 15 : Inactivation de FgfR1 cause facial Fentes.	44
Fig. 16 : L'orientation des cils primaires dans les cellules CNC	46
Fig.17 : Role de Lkb1 et de la voie AMPK dans la formation des structures céphaliques.	53
Fig.18 : Signaux moléculaires impliqués dans la morphogenèse cranio-faciale	56
Fig.19 : Exemple d'arbre généalogique d'un NF1.	60
Fig.20 : Schématisation de l'activation de Ras.	65
Fig.21 : Taches « café au lait » (TCL) et les lentigines	68
Fig.22 : Nodules de Lisch	69
Fig.23 : Neurofibromes	72
Fig.24 : Gliome des voies optiques	73
Fig.25 : Les lésions OBNI du corps calleux	75
Fig.26 : Aspect clinique et d'imagerie TDM d'une dysplasie sphéno-orbitaire	76
Tableau 4 : Fréquence des complications des malades atteints de NF1	79-80
Fig.27 : Schéma des différentes marques épigénétiques identifiés sur histone H3	84

Tableau 5 : les caractères de classe I de famille HDACs	87
Tableau 6 : Séries de stades du développement de l'embryon Poulet, Homme	92-93
Fig.28 : Le générateur d'ondes carrées, injection de vecteur et GFP	97
Fig.29 : Alignement de séquences prédites d'acides aminés de neurofibromine humaine et aviaire	98-99
Fig.30 : Alignement de NF1 avec la séquence sous-clonée dans le vecteur pCRII_TOPO_TA.	100
Tableau 7 : La synthèse de l'ARN double brin interférant de NF1 et HDAC8.	103
Tableau 8 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'étude de l'immunofluorescence.	107-108
Tableau 9 : Composition de la solution d'hybride-Mix et rôle de ces composants.	110-111
Tableau 10 : Les amorces spécifiques sens et anti-sens pour les analyses de RT-qPCR ont été synthétisées pour amplifier des séquences de 149-151 pb.	117
Fig. 31 : Patron d'expression NF1 au cours de deux premiers jours de développement.	120
Fig. 32 : L'expression de NF1 avec les CCN migrant. (IF, Hybridation in situ).	120
Fig. 33 : L'expression de NF1 au niveau de dérivés des CNC	121
Fig.34 : Pourcentage de survie des embryons expérimentaux selon la dose des molécules ANRi transfectées	122-123
Fig. 35 : L'efficacité de l'inactivation du gène NF1 après électroporation du dsNF1,	123-124
Fig.36 : les conséquences de dsNF1 sur le comportement des CCN	125
Fig. 37 : Défauts phénotypiques céphaliques, cervicaux, vasculaires. A, B, C et D.	126 127 128
Fig. 38 : A- Effets de l'inactivation de NF1 sur la gangliogenèse crânienne, B- Altération ganglionnaires et cérébrales sur coupes en immunofluorescence	129 130
Fig.39 : La dilatation vasculaire cervicale à l'axe jugulo-carotidien (Immunofluorescence des péricytes par l'AC-SMA).	130
Fig. 40 : La dilatation vasculaire cervicale au niveau des vaisseaux méningés.	131
Fig. 41 : Processus néoplasique et dysplasie des voies optiques.	132
Fig. 42 : les taches pigmentées Café au lait	133

Fig. 43: Quantités relatives des transcrits NF1 et NF2 à 25ss,	136
Fig. 44: Quantités relatives des transcrits HDAC1, HDAC2 et HDAC8 à 25ss,	137
Fig. 45 : Patron d'expression HDAC1	138
Fig. 46 : Patron d'expression HDAC8	138
Fig. 47 : Immunofluorescence montrant les effets de l'inactivation de NF1 sur l'expression de HDAC2	139
Fig. 48: Défauts phénotypiques céphaliques, cervicaux, vasculaires après l'inactivation de HDAC8 par dsHDAC8	140
Fig. 49 : la perte de fonction de HDAC8 montre des dilatations vasculaires au niveau méningé et basicranien	141
Fig. 50 : Quantités relatives des transcrits NF1, NF2, HDAC1, HDAC2 et HDAC8 à 25ss,	142
Fig. 51: Expérience de sauvetage phénotypique par injection et transfection du vecteur d'expression de HDAC8	144- 145
Fig. 52: Accumulation de Sox9 dans les péricytes	146- 147
Fig. 53: Mise en culture des cellules méningées prélevées des embryons contrôles à E8.	156

Table des matières

I-Introduction

I- GASTRULATION ET DEBUT DE LA MORPHOGENESE	1
II- DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE L'EXTREMITÉ CEPHALIQUE	
II. 1. Développement cérébral	4
II. 2. Développement squelettique	7
II. 3. Développement facial	9
II. 4. Contribution respective des différents feuillets germinatifs	12
III- ROLE STRUCTURAL DE LA CRETE NEURALE DANS LA MORPHOGENESE CRANIOFACIALE	
III.1. Découverte et identification de la crête neurale	14
III.2. Formation de la crête neurale au cours de la neurulation	16
IV- CONTROL MOLECULAIRE DU DEVELOPPEMENT CRANIO-FACIAL	25
IV.1. Partition fonctionnelle du squelette craniofacial et gènes à homéodomaine	
• Les Gènes <i>Hox</i>	26
• Les gènes de la famille <i>Distal-less (Dlx)</i>	29
• Les gènes de la famille <i>Muscle segment homeobox (Msh)</i>	31
• Les gènes à homéodomaine de la famille <i>Paired Box (Pax)</i>	33
• Les gènes à homéodomaine <i>Pituitary Homeobox (Pitx)</i>	35
• Les gènes à homéodomaine <i>LIM (Lhx)</i>	35
• Les gènes à homéoboîte <i>Sineoculis homeobox (Six)</i>	35
IV.2. Signalisations et le développement crânio-facial	
• La signalisation <i>Fgf</i>	37
• La signalisation <i>Wnt</i>	47
• La signalisation <i>hedgehog (HH)</i>	49
• La signalisation <i>TGFβ (Bmp)</i>	39
	53
V- LA NEUROFIBROMATOSE	
V. 1. Historique	56
V. 2. Description de la pathologie	57
V. 3. Les différentes formes de neurofibromatoses	58
V. 4. Génétique de la neurofibromatose de type 1	60
V. 5. Identification du gène responsable de la NF1	62

V. 5 -1. Le gène <i>NF1</i>	
5 -1. 1 – Structure	62
5 -1. 2 - ARN messenger du gène <i>NF1</i>	63
5 -1. 3 - Physiopathogénie	66
5 -1. 4 - Rôle tumoral du gène <i>NF1</i>	67
V. 6. Présentation clinique de la neurofibromatose 1	
a) Les signes cliniques majeurs	
• Les tâches café au lait	67
• Les lentigines	68
• Les nodules de Lisch	
• Les neurofibromes (NF)	69
1 - Les neurofibromes cutanés	70
2- Les neurofibromes nodulaires (sous-cutanés)	71
3- Les neurofibromes plexiformes	71
• Le gliome des voies optiques	73
b) Les signes cliniques mineurs	
I- Les lésions crânio-encéphaliques :	74
i)- La macrocéphalie	
ii)- Les lésions dysplasiques	
iii)- Les atteintes osseuses spécifiques :	74
o Les dysplasies des os longs	75
o La dysplasie osseuse du crâne	75
o La dysplasie vertébrale	77
II- les anomalies thoraciques	
III- les xanthogranulomes juvéniles	
IV- Une petite taille	77
V.7. Le diagnostic de la Neurofibromatose 1	77
V.8. Les complications de la Neurofibromatose 1	78
V.9. Le Traitement de la Neurofibromatose 1	80
V.10. Le Diagnostic Génétique de la NF1	81
VI- MODULATION EPIGENETIQUE DE L'ACTIVITE DU GENE <i>NF1</i>	83
* Objectifs spécifiques de l'étude	89
II- Matériels et Méthodes	90
I- MODELE EXPERIMENTAL	91
II –OBTENTION DES EMBRYONS TEMOINS ET EXPERIMENTAUX	
II. 1. Manipulation des embryons in ovo	94
II. 2. Technique de transgénése localisée par électroporation in ovo	94
II. 3. Perte de fonction des gènes par ARN interférent (ARNi)	101
III –METHODES D'ANALYSES PHENOTYPIQUES DES EMBRYONS	

TEMOINS ET EXPERIMENTAUX	104
III. 1. Prélèvement et fixation des embryons	105
III. 2. Immunocytochimie sur embryons entiers	109
III. 3. Hybridation in situ sur embryons entiers	112
III.3'.Synthèse de Ribosonde pour l'hybridation in situ	112
III.4. Immunocytochimie sur coupes	114
III.5. Hybridation in situ sur coupes	115
IV- Coloration en Crésyl violet :	115
V - OBSERVATIONS	115
V - 1. Observation au microscope à fluorescence	115
V - 2. Observation au microscope confocal SP8	116
VI - Transcription Reverse et PCR quantitative (q-PCR)	116
VI -1. Extraction des ARN totaux et transcription reverse	117
VI -2. Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR	117
VII - Analyses statistiques	117
III- RESULTATS	118
1. Cinétique d'expression de NF1 chez l'embryon.	119
2. Mise au point et validation du modèle d'inactivation de NF1 chez l'embryon.	121
3. Analyse des phénotypes anatomiques, histologiques du silencing de <i>NF1</i> chez l'embryon.	124
4. Relation moléculaire entre NF1 & NF2.	135
5. Analyse fonctionnelle du rôle des Histone désacétylases et implication dans la régulation de <i>NF1</i>.	136
6. Expérience de sauvetage de phénotype de NF1 par HDAC8.	143
7. Identification des signalisations en aval de <i>NF1</i> et de <i>HDAC8</i>.	145
IV- Discussion	147
• <i>Les conséquences de l'invalidation du gène NF1 et la validation de notre modèle expérimental</i>	147
• <i>l'impact des modulations épigénétiques de l'activité du NF1.</i>	151
• <i>Implications cliniques.</i>	154
V- Conclusions	155
• Perspectives	156
BIBLIOGRAPHIES	159

Préambule

Avec le développement rapide des outils de diagnostic moléculaire, les communautés de recherche en sciences cliniques et fondamentales deviennent tellement sollicitées pour les recommandations et les thérapies ciblées pour améliorer le diagnostic, la prise en charge des patients et le pronostic. A partir de cela, l'étude de l'embryologie, la morphologie et la génétique clinique restent la base d'approfondir la compréhension des mécanismes par les quels se produit telle ou telle pathologie.

D'autre part, l'analyse des interactions développementales et les régulations génétiques et épigénétiques d'une maladie, comme la neurofibromatose, permet de mettre en évidence les mécanismes essentiels responsables de la plasticité et les potentiels de différenciation d'une structure embryonnaire provisoire comme la crête neurale, étant à l'origine de l'extrémité céphalique chez les vertébrés, en vue de renforcer les recherches fondamentales et de mieux comprendre les rôles développementaux des structures embryologiques.

I-Introduction

I- GASTRULATION ET DEBUT DE LA MORPHOGENESE

Dès le début de leur développement, les embryons des vertébrés présentent une polarité rostrocaudale et une symétrie bilatérale. Au cours de sa troisième semaine de développement, l'embryon humain prend la forme

d'un disque composé de deux ébauches tissulaires superposées, l'épiblaste et l'hypoblaste. Dans ce disque embryonnaire didermique, le premier signe morphologique de l'existence d'une symétrie bilatérale consiste en l'apparition de la ligne primitive au sommet de laquelle se trouve le nœud de Hensen, considéré comme le centre fonctionnel ou « organisateur » de la gastrulation. Dès le stade diblastique, on peut également assigner une polarité dorso-ventrale, au regard de la position relative de l'épiblaste et de l'hypoblaste. Au-delà du disque embryonnaire, ces feuillet se poursuivent et délimitent les vésicules extra-embryonnaires, destinées à former les annexes extra-embryonnaires, l'amnios, et le placenta, situées respectivement au-dessus et en dessous du disque embryonnaire.

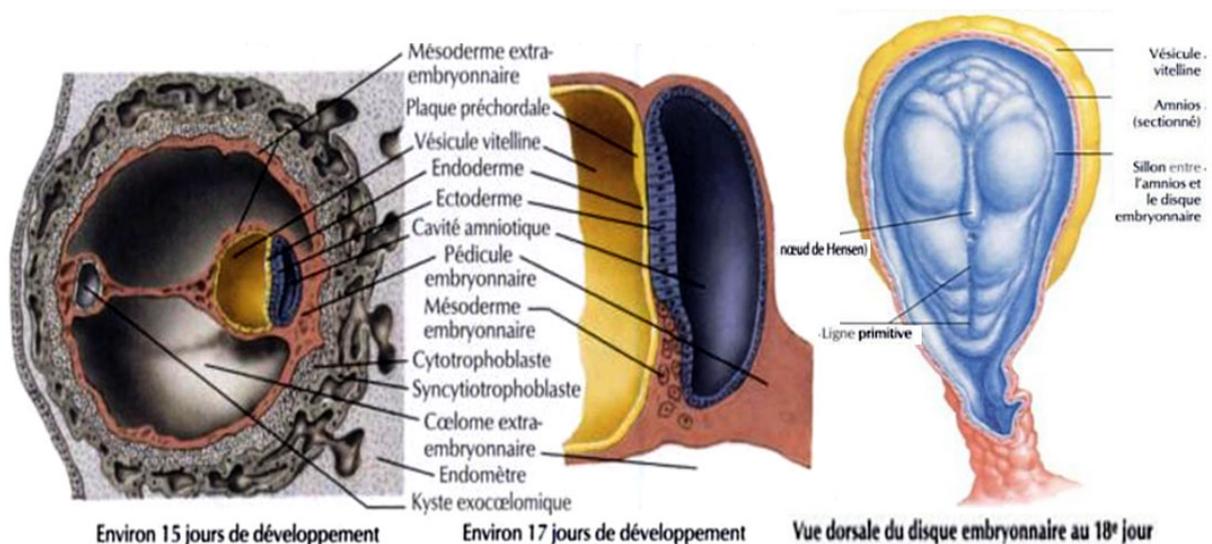


Fig. 1 : La gastrulation: mise en place du mésoderme. A partir de la ligne primitive, des cellules de l'épiblaste (ectoderme, bleu) s'invaginent vers la face ventrale (jaune): qui constituent le troisième feuillet embryonnaire le mésoderme (rouge). (Schéma d'après Netter).

Au cours de cette période essentielle au développement, se met en place le troisième feuillet embryonnaire : le mésoderme. Situé en position

intermédiaire, il complète l'organisation triblastique de l'embryon, à partir de laquelle se développent tous les tissus de l'embryon: l'ectoderme à la face dorsale de l'embryon est à l'origine de la plaque neurale, ébauche du système nerveux central, qui est flanquée latéralement par l'ectoderme de surface, qui va recouvrir tout l'organisme. Ventralement, l'endoderme est destiné à tapisser les cavités viscérales et respiratoires, à sa face ventrale. En position intermédiaire, le mésoderme, dont la contribution mésenchymateuse, principalement conjonctive, musculaire et squelettique, prédomine dans les territoires somatiques et appendiculaires de l'organisme, est particulièrement essentiel au développement hémangioblastique. (Charrier et Creuzet, 2007).

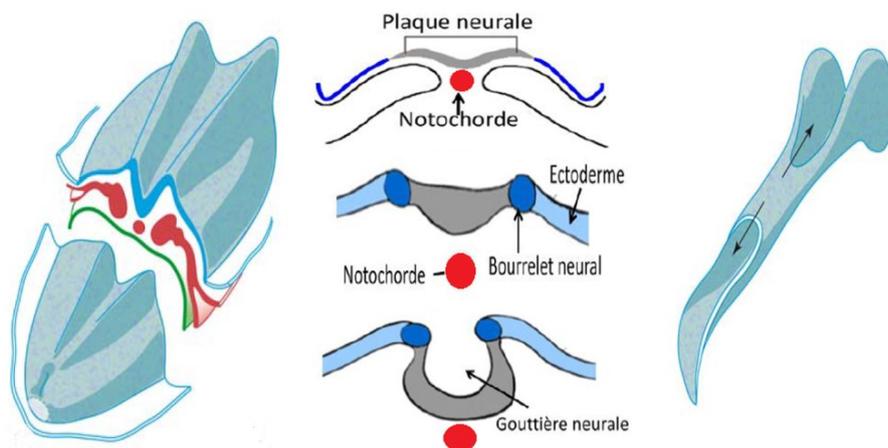


Fig. 2 : La Formation de la plaque neurale et le tube neural vers le 21^{ème} jour, au stade de la neurulation où la plaque neurale est induite à partir de l'épithélium de surface sous l'action de la notochorde (rouge) et du mésoderme para-axial (rouge), l'ectoderme (bleu), l'endoderme (vert). D'après Goldberg et al., 2012).

Au niveau antérieur, le développement craniofacial est un processus complexe qui mobilise des interactions cellulaires et mouvements morphogénétiques complexes entre ces trois feuilletts. Cependant, la morphogénèse craniofaciale sollicite également et de façon essentielle, une

structure transitoire de l'embryon à l'origine d'une population cellulaire considérée comme le « 4^{ème} feuillet germinatif » des vertébrés, la crête neurale (CN). Les cellules de la CN (CCN) sont multipotentes et dotées de propriété migratoire importante. Par la quantité, la diversité des dérivés qu'elles génèrent au niveau céphalique, elles supplantent le feuillet mésodermique, pour la formation des structures mésenchymateuses squelettogénique, et sont à l'origine de la majeure partie du squelette craniofacial (Achilleos et al., 2015).

L'extrémité céphalique de l'embryon, à partir de la quatrième semaine du développement, est le siège d'importantes modifications des dérivés de mésoderme et du mésenchyme intra-embryonnaire lié à la présence du neuro-ectoderme sous-jacent et à la migration des cellules multipotentes (CCN), ces modifications s'accompagnent de phénomènes d'ossification qui vont conduire à la construction du squelette du crâne et de la face.

II- DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE L'EXTREMITE CEPHALIQUE

II. 1. Développement cérébral

Au stade tardif de la gastrulation, un épaississement du feuillet superficiel, l'épiblaste, qui conduit à la formation d'une plaque neurale. Par le processus de neurulation, l'ectoderme neural s'individualise de l'ectoderme superficiel, destiné à former la peau. Le neurectoderme subit ensuite des mouvements complexes d'extension bilatérale et de convergence qui conduisent les deux bords de la plaque à former une gouttière qui se referme progressivement le long de la ligne médiane dorsale. La fermeture du tube neural, qui est initiée au niveau céphalique avant de gagner les niveaux

plus caudaux, fixe l'organisation fondamentale de l'encéphale en trois vésicules: le cerveau postérieur, ou rhombencéphale, moyen, ou mésencéphale, antérieur, ou prosencéphale (Goldberg et al., 2012). Ce dernier se subdivise secondairement en diencéphale, caudalement et en télencéphale, rostralement, à l'origine des hémisphères cérébraux, Fig.3

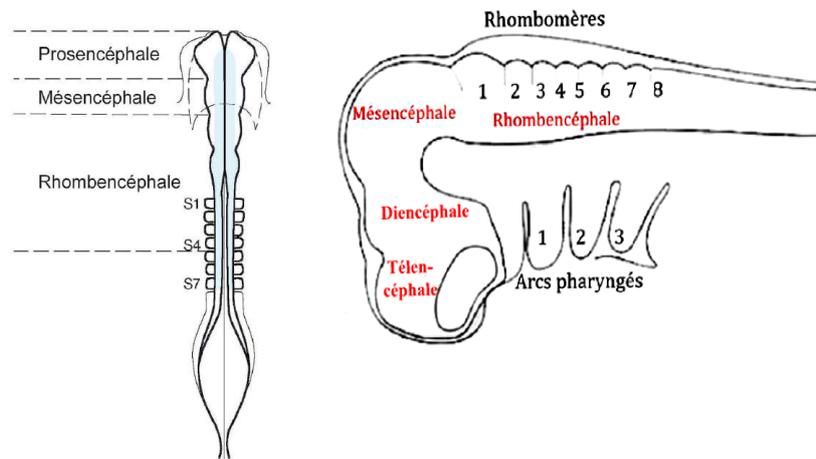


Fig. 3 : Schéma représentant, par une coupe dorsale et l'autre sagittale, le développement de l'extrémité céphalique de l'embryon en trois vésicules puis en cinq à 7 somites puis à 28 somites (D'après Charrier&Creuzet 2007; Sautier, Paris7 10/11).

Le développement embryonnaire du cerveau apparaît comme un facteur déterminant de la morphogenèse cranio-faciale. Sous l'action conjuguée de l'expansion considérable des vésicules céphalique, à partir du tube neural antérieur (pour la formation du cerveau antérieur et moyen) et la croissance différentielle du neuroépithélium céphalique dorsolatéral, les processus faciaux tendent à converger autour du stomodéum et s'organisent en bourgeons faciaux à l'origine des structures de la face supérieure et inférieure (Charrier et al 2007),. Puis, le développement encéphalique se poursuit avec passage du stade de trois à cinq vésicules. Le segment

céphalique du tube neural en épousant la convexité dorsale du pôle crânien de l'embryon, va présenter deux courbures, l'une, mésencéphalique et l'autre, cervicale (voir Fig.4). L'évolution de l'encéphale par l'apparition de la troisième courbure c'est la courbure pontique dans un sens contraire à celui de ces deux courbures précédentes.

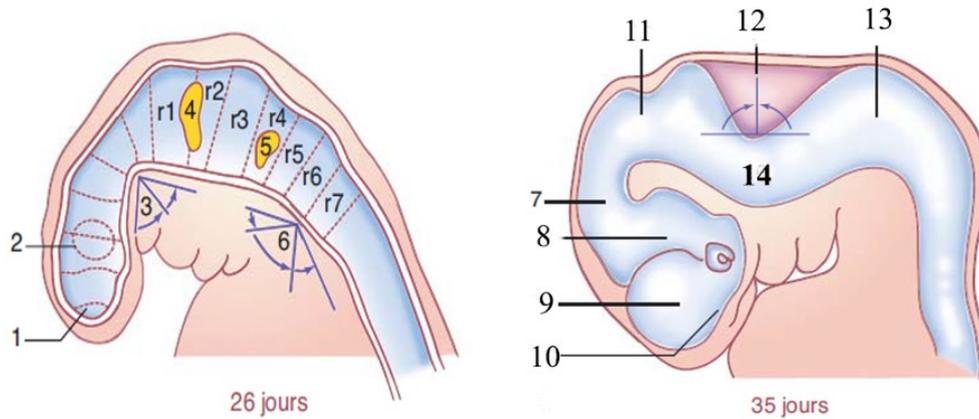


Fig. 4: Représentations schématiques, un plan sagittal (26 jours) et parasagittal (35 jours) de la croissance des vésicules céphaliques chez l'embryon humain et les différentes courbures au niveau de l'isthme et de la flexion pontique. 1. Prosencéphale ; 2.Emplacement du sulcus optique ; **3.Courbure mésencéphalique** ; 4.Ganglion trigéminalé; 5.Ganglion acoustiquo-facial; **6.Courbure cervicale** ; 7.Mésencéphale ; 8.Diencephale ; 9. Héli-sphères cérébraux ; 10. Striatum; 11. Isthme; **12. Flexion (Courbure) pontique** ; 13. Myélenéphale ; 14. Métencéphale. D'après (Goldberg et al.2012).

Outre, les partitions anatomiques des vésicules céphaliques, la morphogenèse cérébrale conditionne l'émergence des nerfs crâniens (tableau 1).

Région du cerveau au stade de trois 3 vésicules	Région du cerveau au stade de cinq 5 vésicules	Nerf crâniens associés
Prosencéphale	Télenéphale	Olfactif (I).
	Diencephale	Optique (II).
Mésencéphale	Mésencéphale	Oculomoteur (III).

Rhombencéphale	Métencéphale	Trochléaire(IV) ; (V) ;Abducens VestibuloCochléaire(VII-VIII).	Trijumeau (VI) ;Facio-
	Myélocéphale	Glossopharyngien (IX) ; Vague (X) ; Accessoire (XI) ; Hypoglosse (XII).	

Tableau 1 : Région de l'encéphale et nerfs crâniens associés.

II. 2. Développement squelettique

Le squelette de la tête est classiquement subdivisé en deux ensembles : le neurocrâne et le viscérocrâne. D'une part, la boîte crânienne, et les capsules sensorielles forment collectivement le *neurocranium*, et, d'autre part, les mâchoires et le squelette hypobranchial, qui composent conjointement le squelette viscéral ou *viscérocranium*, également référencé comme *splanchnocranium*. Cette partition fonctionnelle évoque les fonctions variées auxquelles ses structures squelettiques participent. Celles-ci concernent tant la protection du cerveau, le soutien des organes de sens, que la formation des organes de prédation, et le point d'ancrage des voies digestives et respiratoires supérieures.

Le neurocrâne est composé de deux parties : la base du crâne (ou chondrocrâne) et la voûte du crâne qui entoure entièrement le cerveau, La squelettogenèse cranio-faciale met en jeu deux mécanismes différents, selon le type d'ossification impliqué. Nous pouvons distinguer l'ossification de type enchondrale qui s'opère à partir de massifs cellulaires mésenchymateux qui entourent l'extrémité antérieure de la corde et latéralement de massifs

cellulaires dérivées du sclérotome des somites occipitaux ces cellules sont à l'origine des ébauches cartilagineuses qui, secondairement, s'ossifient et forment le supraoccipital, la base de l'occipital ; et du temporal ; les corps et ailes du sphénoïde et l'ethmoïde (Couly et al., 1993).

Quant aux os qui composent la voûte crânienne leur différenciation résulte d'une ossification de type membraneuse qui est initiée par une formation de lamelles osseuses directement à partir du tissu mésenchymateux sans différenciation préalable cartilagineuse. Ainsi se constituent le frontal, le pariétal et l'écaille du temporal (Couly G. et al., 1993).

Le viscérocrâne est formé des ébauches cartilagineuses des deux premiers arcs branchiaux (AB) qui se fragmentent pour donner naissance aux pièces du squelette.

- Premier arc ou arc mandibulaire est constitué de : une partie, dorsale, ou processus maxillaire qui va former le massif moyen de la face, et l'autre partie ventrale, ou processus mandibulaire centré par le cartilage de Meckel qui forme la mandibule résultant de l'ossification membraneuse du mésenchyme voisin. Quant aux deux osselets de l'oreille moyenne le marteau et l'enclume , ils se développent par l'ossification enchondrale (Rabineau et al. Instit. Cochin.2011).

- Deuxième arc branchial ou arc hyoïdien centré par le cartilage de Reichert donnant naissance à deux portion, l'une dorsale au troisième osselet de l'oreille moyenne c'est l'étrier et au processus styloïde du temporal, et une portion ventrale à l'os hyoïde (sa petite corne et son corps), ces osselets sont les premières structures dont l'ossification s'opère au cours

du quatrième mois de la vie utérine.

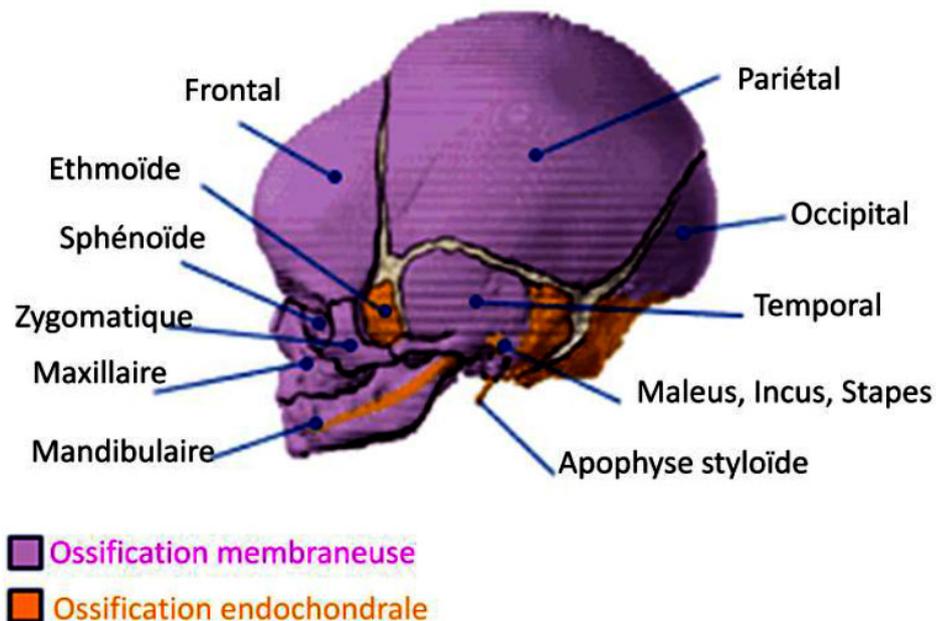


Fig. 5 : Modes d'ossification du squelette crânio-facial humain (*hopkinsmedicine.org*).

II. 3. Développement facial

Les éléments de la face proviennent des massifs recouverts d'ectoderme. L'observation d'un stade précoce du développement embryonnaire humain à 21-22 jours, la région de la face ne présente aucun trait morphologique particulier. Ce n'est que, dans les jours qui suivent, sous l'impulsion conjointe de la prolifération massive des CCN et la déformation concomitante de l'ectoderme de surface, que se dessinent les bourgeons faciaux primordiaux (à partir de 36j, puis au cours des semaines qui suivent). On peut distinguer alors les bourgeons maxillaires et mandibulaires, pairs et symétriques, et le bourgeon nasofrontal médian, flanqué latéralement des bourgeons nasolatéraux (ou nasaux latéraux et médians). Comme évoqué précédemment, la croissance dorsale du tube neural céphalique (le prosencéphale) entraîne la convergence des cinq

bourgeons faciaux, de façon presque simultanée, autour de l'orifice stomodéal limité par la membrane buccopharyngée (Yu lan et al., 2015) Cette dernière se résorbe ensuite permettre la communication entre le tube digestif primitif et la cavité amniotique formant ainsi la bouche primitive.

La croissance et la fusion des contingents nasofrontal, nasolatéraux et maxillaires conduisent à l'organisation de la face supérieure. Pendant la 5ème semaine, les deux bourgeons maxillaires s'accroissent ventralement et médialement autour de deux zones d'épaississement ectodermique, les placodes nasales, destinées à former l'épithélium olfactif des fosses nasales. Le long de la ligne médiane ventrale les bourgeons mandibulaires fusionnent et forment la face inférieure.

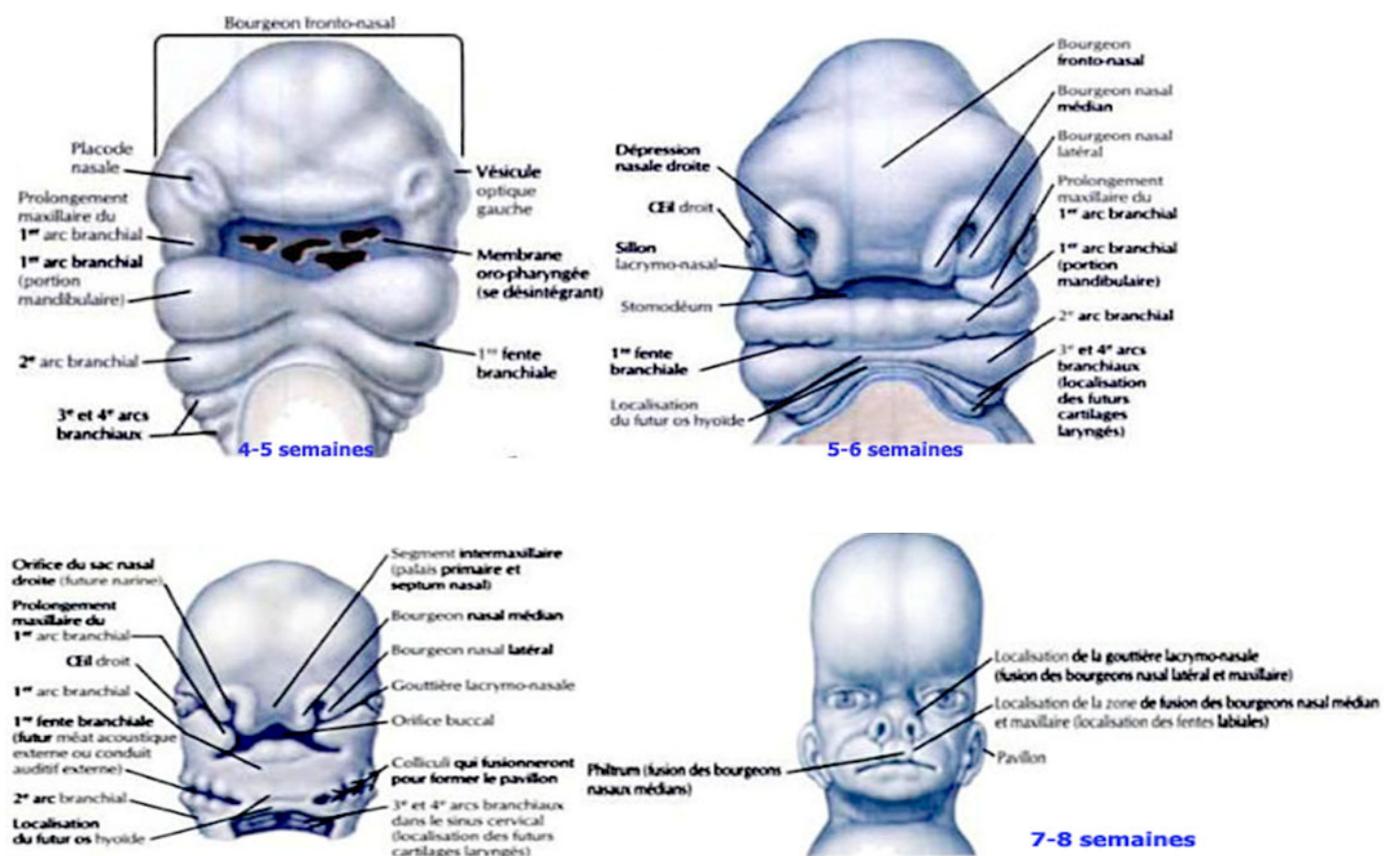


Fig. 6 : Morphogenèse des structures faciales de 4 à 8 semaines de développement

(D'après Netter).

A la fin de la septième semaine chez l'Homme, nous pouvons distinguer: les orifices nasaux, les fosses nasales primaires, le palais primaire antérieur (prémaxillaire), la lèvre supérieure dont l'origine du philtrum, de l'os prémaxillaire et de la columelle avec l'auvent nasal, c'est le bourgeon nasofrontal par les deux processus nasaux médians.

Le palais commence alors à se développer au cours de la cinquième semaine de l'embryogenèse humaine et se subdivise en deux régions (Yu Lan et al.,2015) : le palais primaire est dérivé du processus frontonasal (Dwight et al., 2010). Quant au palais secondaire il se forme à la face interne des bourgeons maxillaires (les lames horizontales du maxillaire), ces deux petites lames avec la lame du palais primaire s'accroissent d'abord verticalement vers le bas, de part et d'autre de la langue qui occupe toute la cavité buconasale. Par la suite ces lames pivotent dans un plan horizontal et tendent à se rejoindre le long de la ligne médiane pour s'unir l'une à l'autre après abaissement lingual entre la septième et dixième semaine (Pavy et al.,1998). (Fig 7).

Le septum nasal provient d'un bourgeonnement qui naît de la face inférieure du bourgeon frontonasal et descend le long de la ligne médiane pour rejoindre les processus palatins. La fusion avec ces processus palatins s'achève à la dixième semaine : ils fusionnent avec le bord postérieur du palais primaire en formant l'épine nasale antérieure. Une ossification membraneuse permet de fixer et d'achever la formation de la voûte du palais.

En arrière du septum il n'y a pas d'ossification du palais, les tissus mous de la voûte du palais forment un bourgeon sur la ligne médiane et qui restera souple, et forme la luette.

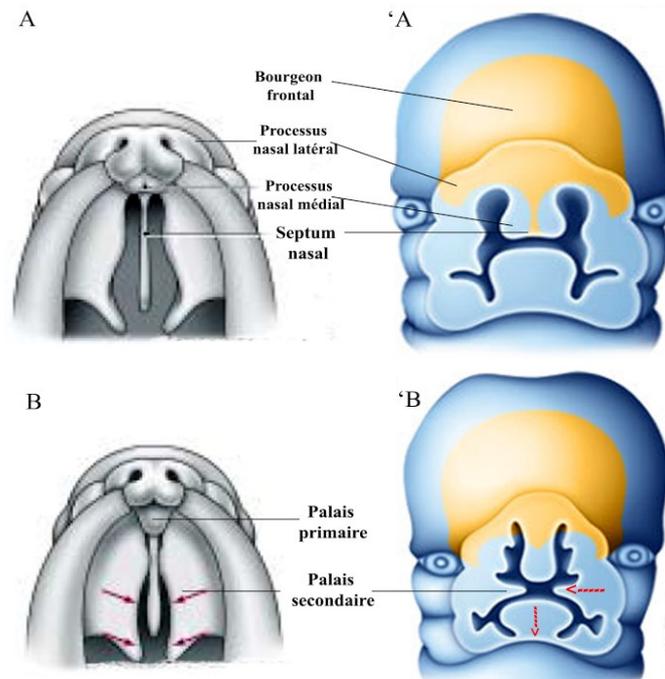


Fig. 7 : Développement du palais : (A : vue axiale, 'A : vue coronale) montrant le prémaxillaire et le auvent nasal. (B : vue axiale, 'B : vue coronale) représentant les processus palatins étant en cours d'avancement au plans horizontal et la langue abaissant. (Bourgeon fronto-nasal en jaune).

II. 4. Contribution respective des différents feuillets germinatifs

Les cellules de l'ectoderme de surface forment le revêtement et la muqueuse de la cavité buccale (et recouvre la partie motile de la langue) et des fosses nasales, En surface l'ectoderme forme l'épiderme kératinisé tapissant l'aspect extérieur du massif nasofrontal.

Les cellules de l'endoderme dans les poches branchiales endodermiques forment, de façon paire et symétrique, par la partie latéral de la première poche branchiale (ou pharyngée). L'invagination du récessus tubotympanique s'allonge pour devenir la trompe auditive et la cavité de

l'oreille moyenne. Dans la partie médiane produit l'épithélium de la thyroïde. L'épithélium pharyngé d'origine endodermique La jonction de l'épithélium pharyngé avec l'épithélium buccal d'origine ectodermique s'opère au niveau de la jonction entre les deux tiers antérieurs et le tiers postérieurs de la langue définitive au niveau du foramen caecum. La deuxième poche fournit l'épithélium des amygdales palatines. Les troisième et quatrième poches participent à la formation de la glande parathyroïde et l'ébauche thymique et thyroïdienne.

Les cellules du mésoderme céphalique sont issues du mésoderme paraxial et du mésoderme somitique des 5 premiers somites. Elles forment l'endothélium des vaisseaux sanguins qui s'étendent des artères des arcs aortiques, jusqu'aux fines ramifications des capillaires qui irriguent la face et la cerveau (Couly et al., 1993 ; Couly et al., 1995). Outre leur contribution vasculaire, ces cellules sont également dotées de propriétés ostéogéniques. Elles sont essentielles à la formation du basicranium et forment, en particulier, celle à la partie de l'os occipital, le sphénoïde dans sa partie postérieure (basipost-sphénoïde) et une partie de la capsule otique, (Couly et al., 1993 ; 1993). Parallèlement, elles fournissent les myoblastes et les myocytes à l'origine des muscles striés squelettiques de la tête, et notamment les muscles masticateurs (Couly et al., 1993). Ces derniers sont plus spécifiquement dérivés du mésoderme somitique Il est important de garder à l'esprit que dans le segment céphalique, le tissu conjonctif de muscles ainsi que leur tendons, sont issues des cellules de la crête neurale qui déterminent leurs points d'insertion squelettique, tant proximal que

distal, définissant ainsi leur orientation et la fonction qu'ils assurent (Couly et al., 1996 ; Koentges and Lumsden, 1996).

III- ROLE STRUCTURAL DE LA CRETE NEURALE DANS LA MORPHOGENESE CRANIOFACIALE

III.1. Découverte et identification de la crête neurale

La première description de la crête neurale (CN) a été réalisée par Wilhelm His en 1868, chez l'embryon de poulet (His, 1868). Tout d'abord telle une « corde intermédiaire » (interposée entre le tube neural, médialement et les somites latéralement) une étude pionnière décrivait surtout la contribution des CCN à la formation des ganglions de la racine dorsale. La démonstration des capacités squelettogéniques de la CN remonte aux travaux menés dans les années 1930 et 1940, et menés chez les amphibiens. (Hörstadius and Sellman (1941,1946) (Le douarin NM, Creuzet SE. 2009). Les premières techniques mises en oeuvre pour suivre la migration de la CN au cours du développement ont été utilisées dans les années 1960 par Weston et Chibon. Elles consistaient à réaliser des marquages radiocatifs à la thymidine tritiée de territoires précis de la CN, puis à suivre par autoradiographie cette radioactivité afin tracer le devenir de ces cellules (Weston, 1963 ; Chibon, 1964). Cette technique a permis de révéler les voies de migration de cellules de la CN (Johnston, 1966). Toutefois, compte-tenu de la courte durée du marquage et sa dilution au cours de cycle de division des cellules marquées, cette approche ne permettait pas de suivre les différenciation de ces cellules et de rendre

compte, de façon exhaustive et à plus long terme, de leurs contribution morphogénétique à la formation de la face.

A la fin de années 1960, la mise au point du modèle des chimères Caille-Poulet par Nicole Le Douarin marqua un tournant décisif pour la connaissance de cette structure et de ses dérivés (Le Douarin, 1969). Ce système de chimère consiste à pratiquer des xénogreffes entre ces deux espèces aviaires, très proches d'un point de vue taxonomique et dont le programme de développement est similaire et synchrone pendant la première moitié de l'incubation. L'avantage de cette approche repose sur une caractéristique unique du noyau interphasique des cellules de caille, dont l'hétérochromatine est densément accumulée au nucléole, alors que chez le poulet, comme dans la plupart des espèces, elle est uniformément répartie au sein du nucléoplasme. Dans les tissus chimères qui combinent les tissus des deux espèces, les cellules de caille peuvent être aisément reconnues après coloration histologique du noyau. Cette technique a bénéficié ensuite de la mise au point d'une anticorps monoclonal spécifiquement dirigé contre les cellules de caille, le QCPN (*Quail non-Chick Perinuclear Antigen* ; Carlson and Carlson, University of Michigan, USA) qui a considérablement facilité l'utilisation de cette approche. Compte-tenu de la stabilité de ce marquage quelque soit l'état de différenciation de cellules et de son caractère héritable étendue à l'ensemble de lignages cellulaires issues des cellules greffées, cette technique s'est avérée extrêmement puissante et fiable pour déterminer le destin des CCN pendant le développement embryonnaire (Le Douarin, 1982 ; Le Douarin and Kalcheim, 1999) Ce modèle a permis de suivre à très long terme le devenir des CCN, d'analyser leurs dérivés ainsi que leurs multiples

interactions cellulaires, et les processus d'induction puis de différenciation qui en découlent, et d'identifier.

III. 2. Formation de la crête neurale au cours de la neurulation

Au stade de la neurulation. La CN apparaît telle une ébauche paire, aux bords de la plaque neurale, sous la forme du bourrelet neural interposé entre l'ectoderme neural et superficiel. Sa formation de la CN coïncide avec le processus de neurulation qui conduit à la formation du système nerveux central. A ce stade, l'embryon est « triblastique » cet-à-dire, composé, comme nous avons vu, de trois feuilletts. Le feuillet superficiel, l'ectoderme, s'épaissit le long de l'axe médian sous l'effet inducteur du mésoderme axial sous-jacent, et s'organise en plaque neurale, dont les parois s'incurvent rapidement pour former la gouttière neurale. Cette dernière est délimitée par deux bourrelets neuraux, qui bordent latéralement l'épithélium neural, et forment la CN. Alors que les deux bourrelets neuraux fusionnent pour permettre la formation du tube neural, les (CCN) se détachent de l'ébauche neurale et subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Le Douarin, 1982 ; Newgreen, 1995 ; Morales et al., 2005) En devenant mésenchymateuses, elles adoptent une configuration cellulaire propice au remodelage tissulaire rapide et acquièrent des propriétés migratoires qui les conduisent à se disperser dans tout l'embryon pour donner des dérivés variés.. Le long de l'axe antéro-postérieur, la formation de la CN suit le processus de neurulation. on distingue classiquement CNS céphaliques

qui s'étendent du niveau du diencéphale moyen jusqu'au rhombomère 8 inclus, et aux CNs troncales qui émergent des niveaux plus caudaux. Une partition plus fine peut être réalisée selon leur niveau d'origine ou selon les fonctions qu'assument leur dérivés (Le Douarin et al., 2004). Au niveau troncal, les CNs caudales apparaissent parallèlement à la subdivision céphalocaudale du mésoderme para-axial en somites. Elles forment des amas cellulaires qui forment les ganglions spinaux enchâssés entre les vertèbres.

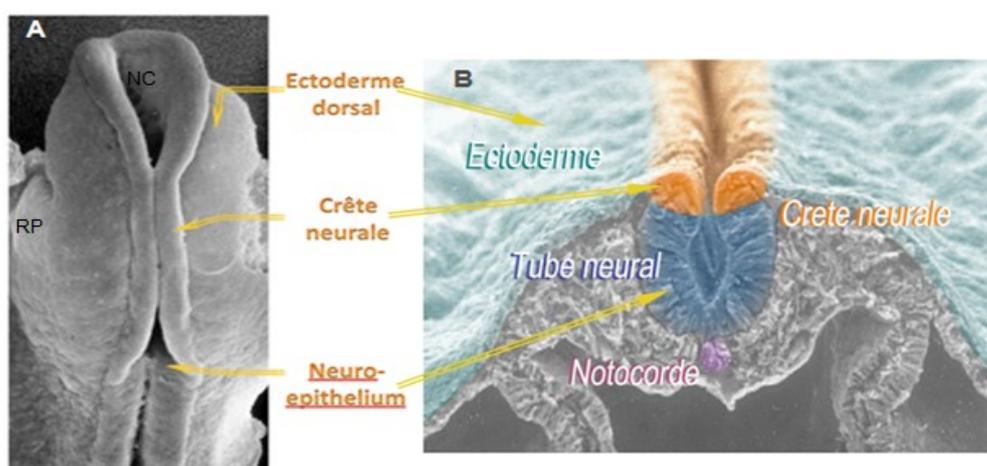


Fig.8 : Vues (A) dorsale et (B) transversale présentant la neurulation : vers le vingtième jour (chez l'homme), les bords latéraux de la plaque neurale apparaissent alors que la plaque s'incurve en gouttière neurale qui fait saillie dans la cavité amniotique. La zone de jonction entre les bords de la gouttière neurale et l'ectoderme de surface s'organise en bourrelets neuraux longitudinaux bilatéraux : il s'agit du territoire présumé des crêtes neurales. NC : neuropore céphalique, RP : renflement péricardiaque (Creuzet et collaborateurs).

Avant la fermeture du tube neural et en absence de repère anatomique intrinsèque, on peut projeter sur la CNC la subdivision des trois vésicules cérébrales initiales, afin de faciliter la cartographie du territoire céphalique de la CN et pouvoir corréliser les niveaux d'origine de ses cellules

aux territoires faciaux qu'elles colonisent (Couly et al, 1996). Les CCN qui migrent du diencéphale postérieur forment l'essentiel du mésenchyme dans le bourgeon nasofrontal (BNF). Le contingent des CCN qui dérivent du niveau mésencéphalique antérieur forme le mésenchyme du bourgeon maxillaire et de la région rétroculaire (Couly et al., 1996 ; Achilleos and Trainor, 2015). Les CCN du niveau mésencéphalique postérieur et de deux premiers rhombomères fournissent les cellules de l'arc mandibulaire. Quant aux cellules de CN issues des rhombomères plus postérieurs, qui forment les huit subdivisions secondaires du rhombencéphale, auxquelles correspondent le développement segmentaires des différents nerfs crâniens, elles forment le mésenchyme des arcs branchiaux (AB) 2, AB3, et plus caudalement, AB4-6, dont le développement est confluent et indivis (Fig. 9I).

Au regard de cette subdivision, les CNs trigéminées sont les plus antérieures. Elles se forment en regard de la partie postérieure du prosencéphale, (c'est-à-dire du diencéphale), migrent dans le bourgeon nasofrontal autour de l'ébauche du cerveau antérieur. Cependant les CNs du mésencéphale et de la partie antérieure du rhombencéphale (rhombomères 1 et 2) migrent vers le premier arc branchial (AB1) et en lui fournissant à des cellules squeletogénique. la plupart de ces CCNs trigéminées migrent dans ce 1er arc pharyngé (AB1) où elles donneront naissance aux os maxillaire et mandibulaire et à la composante mésenchymateuse des dents (dentine et pulpe dentaire), d'autres cellules migrent vers la placode trigéminée pour former un contingent de neurones du ganglion trigéminal (V) (Couly et al., 1996).

Les CNs facio-acoustiques (hyoïdes) se forment en regard de la partie antérieure du myélencéphale (rhombomère 4). Elles sont en relation avec les placodes acoustiques (otiques) et faciales. La plupart des cellules qui les composent migrent dans (AB2) où elles contribuent à la formation de l'os hyoïde. Les autres donneront naissance à des neurones du ganglion facial (VII) (Couly et al., 1996; Koentges and Lumsden, 1996)..

Les CNs glossopharyngo-vagales se forment en regard de la partie postérieure du myélencéphale (rhombomères 6 et 7). Elles se divisent rapidement en CNs glosso-pharyngées et CNs vagales, associées aux placodes éponymes. La plupart des CCNs glosso-pharyngées et vagales migrent dans les arcs branchiaux (AB 3, 4 et 6), certains donneront naissance à des neurones des ganglions des nerfs glossopharyngé (IX) et vagal (X).

D'autres CCNs issues de ce même niveau participeront à la formation du cœur, du tractus sortant du cœur, ou *outflow tracts*, Elles forment également le conotruncus, les coussins endocardiques, le septum aortopulmonaire et des grosses artères pulmonaires. Pour ces raisons, elles sont appelées CNs cardiaques ayant une origine postotique, correspondant aux cellules issues de r6 à r8 Kirby and Stewart, 1983 ; Kirby et al., 1983 ; 1985 ; Epstein, 1996).

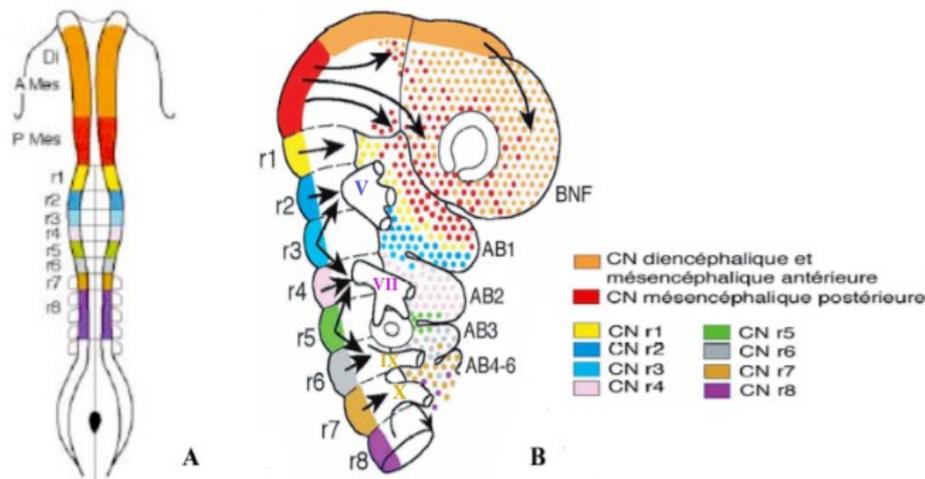


Fig.9 : Schéma représentant la Contribution de la crête neurale céphalique aux structures cranio-faciales. (A) vue dorsale pour les trois groupes de CCN colorés aux bourrelets neuraux chez un embryon de stade 8HH ou 5 somites (5ss). ; (B) vue de profil représentant les voies de migration des cellules de la crête neurale en fonction de leur niveau d'origine. BNF : Bourgeon nasofrontal ; AB : arc branchial ; A Mes, P Mes : antérieur et postérieur mésencéphalique ; r1-r8 les rhombomères ganglion trigéminal (V), ganglion facial (VII), ganglion glossopharyngé (IX) et vagal (X) (Charrier & Creuzet 2007).

Les CCN di-, més-, et rhombencéphaliques migrent ensuite dans tout l'embryon et ont le potentiel de se différencier en cartilage, en os et des myofibroblastes, le derme et le tissu conjonctif des muscles de la face et du cou et aussi des dérivés variés tels que des neurones, des cellules gliales, pigmentaires, endocriniennes, aussi d'autres tissus squelettiques (Landacre, 1921) (Stone, 1926 ; 1929 ; Raven, 1931 ; 1936) (Le Douarin and Kalcheim, 1999 ; (Goldberg M. et al., 2012) (voir Tableau 2).

Systeme nerveux périphérique

I. Sensoriel :

Neurones et cellules gliales des ganglions de nerfs crâniens et des ganglions

rachidiens

II. Autonome :

Neurones et cellules gliales des ganglions et plexus sympathiques et parasymphatiques

III. Entérique :

Neurones et cellules gliales des plexus nerveux intramuraux du tube digestif (plexus Auerbach, Meissner)

IV. Nerfs périphériques :

Cellules de Schwann, cellules gliales

Les cellules endocrines

- Cellules chromaffines adrénomédullaires de la glande surrénale
- Glomus carotidien
- Cellules C à calcitonine des corps ultimobranchiaux et de la glande thyroïde (chez les mammifères)

Les cellules pigmentaires (mélanocytes cutanés)

(de l'iris, à l'exception de la rétine pigmentaire)

Le méssectoderme

- Squelette de la face et du crâne (en partie), os hyoïde
- Dents : dentine et pulpe dentaire
- Derme de la face et du cou (y compris les muscles lisses) et le tissu

adipeux qui lui est associé

- OEil : muscle ciliaire et cornée
- Méninges des hémisphères cérébraux de l'hypothalamus et du thalamus
- Tissu conjonctif associé aux muscles de la tête et aux glandes de la région céphalique et pharyngienne

(hypophyse, glandes lacrymales, salivaires, parathyroïdes, thyroïde, thymus).

- Paroi des vaisseaux : les péricytes (cellules périvasculaires) dans les troncs artériels issus du cœur et des vaisseaux céphaliques (sauf l'endothélium vasculaire).

Tableau 2: *Dérivés des cellules de la crête neural (Charrier & Creuzet 2007).*

De plus, la CN produit le tissu cartilagineux et osseux. La capacité de la CN de fournir des cellules de type mésenchymateux qui se différencient en tissus cartilagineux et osseux, dans la région céphalique a été suggérée dès la fin du XIX^{ème} siècle (Platt, 1893). Depuis, les recherches poursuivies chez l'embryon de Poulet (Johnston, 1966 ; Le Lièvre, 1974 ; Le Lièvre and Le Douarin, 1975; Couly et al., 1993) ont révélées que la plus grande partie du squelette crânien est formée par des cellules issues de la CN. La CN est à l'origine des os et cartilage des mâchoires supérieure (maxillaire) et inférieure (mandibulaire), la capsule naso-frontale, de la capsule nasale, du squelette péri-orbitaire (Le Lièvre, 1978 ; Couly et al., 1993 ; Couly et al., 1996 ; Koentges and Lumsden, 1996), ainsi que les os de la voûte crânienne : le frontal, l'os pariétal, le squamosal (Couly et al., 1993). Chez les mammifères,

sur la base d'études réalisées au moyen de modèles transgéniques, une origine mésodermique para-axial est attribuée à l'écaille de l'occipital, la partie pétreuse du temporal ou rocher, le sphénoïde et tout le pariétal chez l'homme sont d'origine mésodermique para-axial (Jiang et al., 2002 ; Achilloes and Trainor, 2015). En outre, chez les Mammifères, les cellules de la CN sont également à l'origine de la dentine, du ciment et de la pulpe dentaire (Chai et al., 2000).

La transition entre les dérivés de la CN et celles du mésoderme se produit au niveau de l'extrémité rostrale de la notocorde. Une limite claire qui délimite le mésoderme basipost-sphénoïde (para-axial) et basipré-sphénoïde mesectoderme ; ces deux structures, qui abritent ventralement l'adénohypophyse, se réunissent pour former la Selle turcique. Cette structure représente donc un point de repère pour distinguer le squelette de base "chordal" où les dérivés du mésoderme postérieur sont prédominants, du squelette "achordal" où la contribution des dérivés de la CN au squelette craniofacial antérieur est exclusive.

Outre la formation de la boîte crânienne qui fournit une protection squelettique pour le cerveau (comme on a vu précédemment), les CCN sont à l'origine de deux dérivés essentiels pour le cerveau antérieur :

- Elles donnent les méninges du télencéphale et du diencéphale d'une part.
- D'autre part, elles donnent des **péricytes** (Fig.10, C), c'est-à-dire des cellules qui doublent l'endothélium des vaisseaux de la face du prosencéphale, pour former une paroi musculo-conjonctive (Le

Lievre and Le Douarin, 1975; Etchevers et al; 1999; 2001). Les CCN assurent de cette manière un rôle critique pour le développement d'une vascularisation cérébrale fonctionnelle.

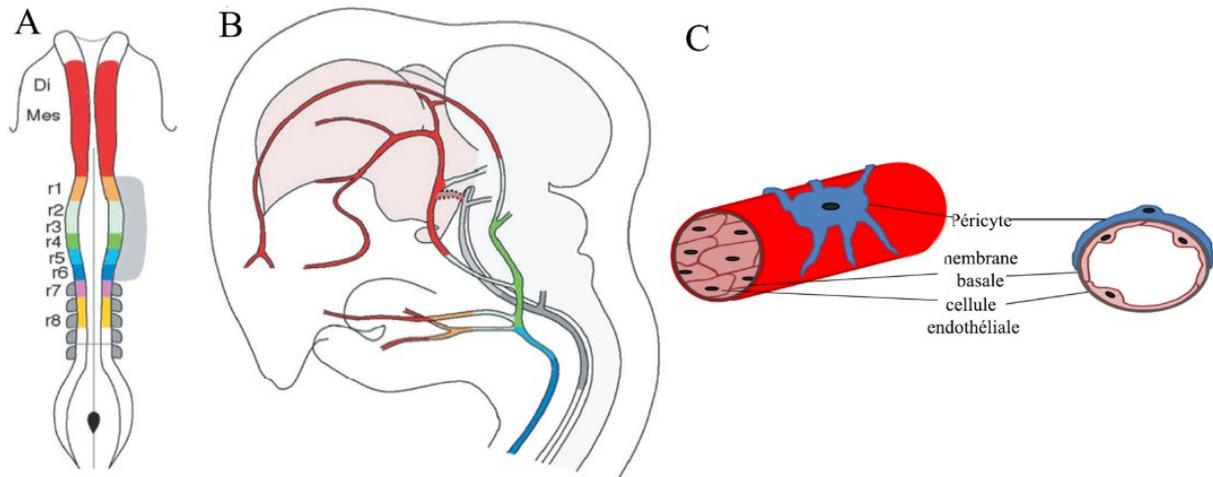


Fig.10 : Schéma représentant la Contribution de la crête neurale céphalique aux structures vasculaires cranio-faciales. (A) : vue dorsale pour les groupes migrant des CCN ; (B) : vascularisation céphalique chez l'embryon de poulet à E7 ; (C) : schéma microscopique des péricytes (Creuzet et al., 2006).

Outre le rôle structurel de la CN dans le développement de la tête, il est important de noter que cette structure exerce également un effet morphogénétique puissant sur le cerveau et les organes sensoriels, comme l'ont montré les travaux de l'équipe (Creuzet et al., 2006 ; Creuzet 2009 ; Cases et al., 2013 ; Garcez et al., 2014 ; Aguiar et al., 2014).

La diversité des nombreux types de cellules différenciées qui dérivent des CCNs, et leur présence dans de multiples organes et tissus où ses cellules assurent des fonctions variées notamment la peau et le système nerveux suggèrent que les dérégulations de leur capacités à migrer, proliférer ou se différencier au cours de processus malformatifs, tumoraux ou infectieux, vont entraîner un spectre très large de manifestations

pathologiques. Ainsi ses pathologies résultant de défauts de développement ou de différenciation des CCNs constituent un ensemble nosologique particulier appelé Neuroscristopathies. On peut citer, à titre d'exemple des défauts de prolifération des CCNs associés au syndrome de Treacher Collins (TCS), alors que syngnathia a pour origine une différenciation défectueuse de ces CCNs (Annita et al., 2015). Cependant, le CN et ses dérivés dans l'étiologie de très nombreuses pathologies telles que : le syndrome de Di George, la maladie de Hirschprung, le Piébaldisme (ou l'albinisme), le syndrome de Waardenburg, la sclérose tubéreuse de Bourneville (STB), les néoplasies endocriniennes multiples et la maladie de Recklinghausen ou la neurofibromatose....etc.

IV. CONTROL MOLECULAIRE DU DEVELOPPEMENT CRANIO-FACIAL

Pour appréhender la morphogenèse du squelette crâniofacial, comprendre comment les processus morphogénétiques complexes sont orchestrés par des mécanismes moléculaires qui mobilisent de façon réciproque, des voies de signalisation est essentiel. Ces mécanismes lient la présence de facteurs extracellulaires, morphogènes et signaux diffusibles, médiés par des récepteurs de surface cellulaire à l'activation de facteurs de transcription qui agissent tels des cofacteurs, activateurs ou répresseurs, et à l'activité d'enzymes modifiant l'état de la chromatine pour conduire l'expression, spatiotemporelle, des gènes qui déterminent le destin des cellules (Gou Y., et al, 2015).

En outre, depuis quelques années, des preuves expérimentales ont souligné un rôle important de régulations épigénétiques comme un mécanisme essentiel du contrôle de l'expression génique à différents stades de développement de la crête neurale (Hu et al, 2014). L'intégration de la régulation transcriptionnelle et épigénétique, par des facteurs de transcription, est une étape centrale à la compréhension du développement craniofaciale.

Alors, avant leur migration, les cellules à l'origine des CCN sont des cellules neurectodermiques, jointives et épithéliales, en contact avec leurs voisines. Lorsqu'elles se détachent du neurectoderme, elles se transforment en cellules migratoires de type mésenchymateux. Des facteurs de transcription et des molécules diffusibles vont plus particulièrement influencer la migration et la différenciation des CCN. Le contrôle de leur destinée est notamment conditionnée par des facteurs environnementaux tels que des molécules de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, la laminine, l'acide hyaluronique ; Duband and Thiery, 1987 ; Perris and Perissinotto, 2000), ou des facteurs diffusibles tels que les facteurs de croissance fibroblastique (*fibroblast growth factors, Fgf*).

IV. 1.Partition fonctionnelle du squelette craniofacial et gènes à homéodomaine

- **Les Gènes *Hox***

Les analyses de la contribution à long terme de différents feuilletts embryonnaires ont révélé des différences dans l'aptitude des cellules de la CNC à former des tissus squelettiques. La formation de cartilage et d'os

endochondral est une capacité partagée par l'ensemble des cellules de la CNC, quelque soit leur niveau d'origine. Par contre, la formation de l'os de membrane est une capacité restreinte à la partie la plus antérieure de la CNC, celle destinée aux bourgeons naso-frontal et latéraux, les processus maxillo-mandibulaires.

Par conséquent, la CNC peut être subdivisée en deux territoires fonctionnels. L'un antérieur, du niveau du diencephale moyen, jusqu'à r2, est à l'origine du squelette facial et crânien. Pour cette raison, cette région de la CNC est considérée comme la « CN faciale » (ou FNC pour *Facial Neural Crest*; Creuzet et al., 2004). L'autre caudale, de r4 à r8 inclus, fournit les cellules à l'origine en grande partie de l'os hyoïde. A l'interface entre ces deux territoires, les cellules de r3 correspond à une zone intermédiaire dont les cellules de CN, participent à AB1, et à AB2 (Couly *et al.*, 1998).

Un aspect essentiel de la division fonctionnelle entre ces deux territoires de la CNC réside dans leur identité moléculaire propre. Alors que les gènes *Hox* jouent un rôle primordial dans l'organisation structurale pour le pharynx et les AB2,3,4-6 et le reste du corps, dans les territoires colonisés par la FNC, les CCNs n'expriment pas les gènes *Hox*, (Hunt et al., 1991 ; Prince and Lumsden, 1994). Ainsi, la division fonctionnelle au sein de la CNC coïncide avec une délimitation moléculaire fondamentale, puisque les CCN qui colonisent les processus faciaux, et notamment les bourgeons mandibulaire et maxillaire, appartiennent à la zone dépourvue d'expression de gènes *Hox* (Hunt et al., 1991 ; Prince and Lumsden, 1994).

Les gènes *Hox* sont organisés en clusters, *Hoxa*, *Hoxb*, *Hoxc*, et *Hoxd*, qui contrôlent l'identité segmentaire le long de corps et du nevraxe. Leurs expressions suivent le principe de colinéarité spatial et temporel similaire (Hunt and Krumlauf, 1991 ; Xu et al, 2015), qui confèrent l'identité spatiale inter-arcs le long de l'axe antéro-postérieur (Minoux and Rijli, 2010).

Par conséquent, le squelette craniofacial et hyoïdien est divisé en deux domaines qui n'ont pas la même aptitude à se différencier en cellules squelettiques. Dans le plus antérieur (formant le squelette frontonasal et maxillo-mandibulaire) où les gènes *Hox* ne sont pas exprimés (*Hox*-négatif), le squelette est constitué de cartilage et d'os de membrane. Dans le domaine postérieur (formant l'os hyoïde) les gènes *Hox* des premiers groupes paralogues sont exprimés par les cellules squelettogéniques (*Hox*-positive) qui ne génèrent que des dérivés cartilagineux.

À cette partition moléculaire correspondent des propriétés squelettogéniques distinctes : alors que ces deux domaines sont tous deux capables de former des dérivés cartilagineux et osseux endochondraux, seul le domaine antérieur, *Hox*-négatif, est impliqué dans les processus d'ossification membraneuse. En outre, ces deux territoires ne peuvent être substitués réciproquement.

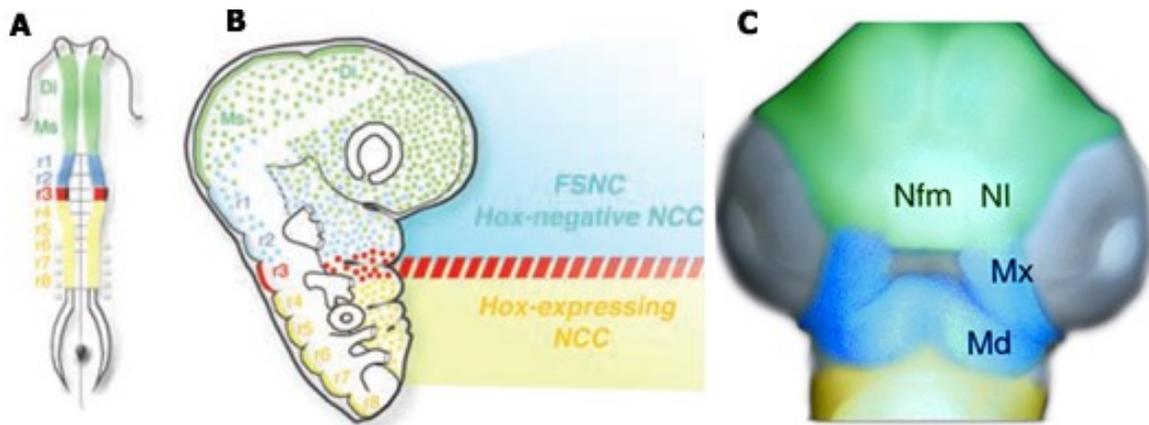


Fig.11 : Contribution des CCN au développement de la tête. (A) Code couleur des CCN au stade de la neurulation, à 5 somites: les CCN du di-et mesencephalique apparaissent en vert, de r1-r2 en bleu, de r3 en rouge, et de r4-r8 en jaune. (B) La colonisation des processus faciaux par les CCN, ici désignées « facial skeletogenic FSNC ». Ces cellules n'expriment pas de gène Hox. Par contre, le reste du domaine des CCN présente une expression de gène Hox orchestrée selon une combinatoire qui définit l'identité de chaque AB. A l'interface entre les domaines Hox+ et Hox-, les CCN de r3 contribuent à former le cartilage hyoïdien. (C) les bourgeons faciaux, Nfm (nasofrontal médian), NI (nasolatéraux), Mx (maxillaire), Md (mandibulaire) Di, diencéphale, Més, mésencéphale, r, rhombomère (D'après le Douarin, Couly, and Creuzet, 2012).

- **Les gènes de la famille *Distal-less* (*Dlx*)**

Les gènes, homologue à *Distal-less* chez la *Drosophila*, constituent une famille des facteurs de transcription, dont le patron d'expression dans la région pharyngée est très conservé chez les vertébrés. Chez les mammifères, six gènes *Dlx* ont été identifiés : ils sont issus d'une duplication en tandem au cours de l'évolution, et sont par conséquent distribués par paire le long des chromosomes (Stock et al., 1996). Leur activation dans les arcs branchiaux s'opère selon un patron d'expression qui suggère un rôle dans l'acquisition d'une identité spatiale par les cellules qui les expriment. Dans chaque AB, on retrouve une expression combinée de

Dlx1/2, puis *Dlx1/2, 5/6*, puis *Dlx1/2, 5/6, 3/4*, suivant un gradient proximo-distal. Ainsi, l'expression d'un tandem de gène va caractériser un segment spécifique au sein de l'AB et suggère que chaque tandem fournit une identité spatiale « intra-arc », le long de l'axe dorso-ventral (Minoux and Rijli, 2010). De sorte que au sein du 1^{er}AB, le contingent mandibulaire exprime l'ensemble de cette combinatoire, et notamment *Dlx1/2, 5/6*, alors que le contingent maxillaire, plus proximal et situé en position rétro-oculaire, exprime seulement *Dlx1/2*. Au-delà de cette simple observation, se posait la question de savoir dans quelle mesure ces gènes confèrent aux cellules mésenchymateuses une information de position, susceptible de déterminer leur destin au sein des ABs. Les expériences de perte-de-fonction simultanée de *Dlx5* et *Dlx6* chez la Souris ont révélé des transformations homéotiques entre ces deux contingents : elles aboutissent à la duplication en miroir du bourgeon mandibulaire en bourgeon maxillaire (Beverdam et al., 2002 ; Depew et al., 2002). Cette transformation intéresse non seulement les dérivés squelettiques, mais également les autres dérivés de la CN : de façon frappante, les vibrisses, qui sont normalement des structures hautement spécialisées issues des interactions entre l'épithélium et le mésenchyme de la CNC au niveau maxillaire, se forment aux dépens du bourgeon mandibulaire, après la double inactivation de *Dlx5* et *Dlx6* (Beverdam et al., 2002 ; Depew et al., 2002). De plus, les CCNs forment le tissu conjonctif et tendineux des fibres musculaires striées squelettiques dans les ABs, et dictent le pattern des muscles masticatoires. Cependant, dans le contexte où les gènes *Dlx5* et *Dlx6* sont inactivés, les perturbations sur l'organisation du tissu musculaire sont également spectaculaires et

s'accompagnent de la perte des muscles masticatoires, montrant ainsi le rôle instructeur de ces deux gènes sur le destin des CCNs mandibulaires (Heude et al., 2010). En revanche, l'inactivation de ce deux gènes affectent peu ou pas la spécification de CCN dans les ABs plus postérieurs (Depew et al., 2005).

- **Les gènes de la famille *Muscle segment homeobox (Msh)***

Initialement identifiée chez la Drosophile, la famille les gènes de *Msx* comprend trois membres indépendants, *Msx1*, -2, -3, chez les vertébrés. L'expression de ces trois gènes débute précocement dans les cellules progénitrices de la CN, se maintient dans les CCNs au cours de leur migration, puis persiste dans les cellules mésenchymateuses de la CN, alors que ces dernières ont colonisé les ABs et participent à la morphogenèse faciale. Plus spécifiquement, *Msx1* semble nécessaire à l'induction des gènes propres à la CN *Snail1*, *Snail2* et *FoxD3* et activer le programme de spécification des CCNs lorsqu'elles initient leur migration (Tribulo et al., 2003).

Comme nous l'avons précédemment évoqué, les gènes *Msx* présentent un site de liaison à l'ADN, toutefois, ils peuvent moduler la transcription de gènes en aval de leur signalisation pour réguler des processus ontogéniques, soit en formant des hétérodimères avec les gènes *Dlx*, soit en formant des complexes avec les histones (Zhang, et al., 1997 ; Lee, et al., 2004).

Au cours du développement maxillo-mandibulaire, *Msx1* et *Msx2* sont induits et régulés, suivant des seuils d'activité distincts, d'une part, par la

molécule diffusible, *Bmp4*, produite par l'ectoderme et l'endoderme (Liu et al., 2005), et d'autre part, par les gènes *Prx1* et *Prx2* (de la famille *Aristaless*), en réponse à un contrôle positif des ligands de la famille des *Fibroblasts growth factors* (*Fgf*) et *Hedgehog* (*Hh*) (Balix et al., 2009). Les régulations suggèrent par conséquent que la fonction respective de ces deux gènes, en dépit de patrons d'expression très similaires, n'est pas totalement redondante.

Dès le milieu des années 1990, le gène *Msx1* a suscité un grand intérêt pour la biologie des structures oro-faciales, puisque des mutations portées par ce gène ont été identifiées dans des formes familiales d'agénésie dentaire chez l'Homme (Vastardis et al., 1996). En outre, ces mutations sont également corrélées à l'absence d'os alvéolaire (Vastardis et al., 1996). Chez la souris transgénique, l'haploinsuffisance de *Msx1* suffit à reproduire ces déficits, et est associé à des fentes faciales et palatines (Hu et al., 1998). De façon intéressante, ces études montrent que c'est le domaine de liaison à l'ADN qui est plus particulièrement touché dans ces processus.

Quant au gène *Msx2*, il partage des mécanismes de liaison similaires à *Msx1* et reconnaît la même séquence consensus. Cependant, son implication physiopathologique au niveau craniofacial, diffère et touche spécifiquement la différenciation des os qui composent la boîte crânienne. L'haploinsuffisance qu'occasionnent différentes sortes de mutations de *Msx2* se traduit par des « lacunes pariétales », c'est-à-dire une diminution d'ossification au niveau de l'os pariétal, plus ou moins drastiques (Wilkie et al., 2000 ; Satokata et al., 2000). De façon inverse, les mutations « faux

sens », en accélérant l'ossification membraneuse, provoquent des phénotypes de gain-de-fonction » et, entraînent des crâniosténoses syndromiques de type Boston (Cohen, 2000). Quant aux souris doubles-mutantes pour *Msx1* et *Msx2*, leur phénotype illustrent la synergie de ces deux gènes au niveau cranial et oro-facial (Cohen, 2000).

- **Les gènes à homéodomaine de la famille *Paired Box (Pax)***

Les gènes Pax ont été initialement identifiés au cours le développement de la Drosophile, pour leur implication au cours du processus de segmentation, et sur la base de leur homologie de séquence d'un domaine très conservé, appelé « *paired* » codant pour 128 acides aminées, ayant la propriété de se lier à l'ADN (Gruss and Walter, 1992). Les gènes codent pour neuf protéines distinctes, *Pax1-9*, ayant en commun le domaine de liaison conservé à l'ADN et un homéodomaine.

Ils sont classiquement sub-divisés en plusieurs sous-groupes selon leur patron d'expression. Ainsi, les gènes *Pax3* et *Pax7* sont apparus essentiels pour l'induction, l'expansion, et la spécification de la CCN. Ces deux gènes sont activés dans les dérivés de la CCN : *Pax3* est exprimé dans les CCN qui émigrent des niveaux mésencéphalique et rhombencéphalique (Bothe and Dietrich, 2006). Secondairement, on retrouve le mésenchyme dérivé de la CCN qui exprime très fortement *Pax3* dans le bourgeon nasofrontal, autour de la placode olfactive, dans la région périoculaire, le stroma iridien (Firneberg and Neubüser, 2002 ; Jensen, 2005), ainsi que dans le complexe maxillo-mandibulaire.

La fonction de ce gène dans la CCN a été révélée par les mutants *Splotch* qui reproduisent les manifestations pigmentaires évocatrices du syndrome de Waardenburg, dont les patients présentent des anomalies de pigmentation de la peau, des cheveux et des iris, ainsi qu'une surdité (Tassabehji et al., 1992). Comme *Pax3* est également exprimé dans le tube neural au niveau troncal, la mutation de ce gène se caractérise par des défauts majeurs de fermeture du tube neural, et notamment des *spina bifida* (Mansouri et al., 2001).

Quant à *Pax7*, il suit un patron d'expression assez similaire à celui de *Pax3*, mais est activé tout le long du névraxe, à la bordure neurale et dans les cellules de CN en formation, avant qu'elles ne débutent leur migration (Basch, et al., 2006; Khudyakov and Bronner-Fraser, 2009). Il constitue l'un des plus précoces marqueurs des CCN. La perte de fonction de ce gène est létale dans les semaines qui suivent la naissance. Les altérations morphogénétiques concernent essentiellement les dérivés des CCN et consistent en une réduction du massif maxillaire, l'absence de la portion inféro-latérale de la capsule nasale.

Un autre gène de la famille *Pax* est également exprimé dans les CCN. Il s'agit de *Pax6*. Son domaine d'expression est restreint aux CCN diencephalique et implique également l'ectoderme placodal et périplacodal destiné à former la capsule nasale et le cristallin. Les déficits provoqué par la perte de fonction de ce gène et qui sont, de façon univoque, reliés aux dérivés de la CNC concerne l'absence d'iris, l'absence de chambre antérieure: la lentille du cristallin reste fusionnée à la cornée. L'aniridie chez l'Homme

peut être causée par des mutations très polymorphes portées sur le gène *PAX6* (Ton et al., 1991; Zumkeller, et al., 2003).

- **Les gènes à homéodomaine *Pituitary Homeobox (Pitx)***

Les gènes de *Pitx* codent pour trois homologues vertébrés, *Pitx1*, *Pitx2* et *Pitx3*. Ils partagent un homéodomaine hautement conservée, responsable de la liaison à l'ADN, Au cours de la formation de la proéminence faciale et des dents, La signalisation BMP4 et FGF8 définissent l'expression de, *Pitx1-Pitx2*, dans le mésenchyme mandibulaire et l'épithélium dentaire. *Pitx2* refoule réciproquement *Fgf8* mais active l'expression de *Bmp4*.

- **Les gènes à homéodomaine *LIM (Lhx)***

Lhx gènes codent pour 12 protéines présentant deux domaines LIM Parmi les protéines de LHX, LHX 2, LHX 6, LHX 7 et *Lhx8* sont impliqués dans la morphogenèse craniofaciale.

Lhx6 et *Lhx7* régulent la formation du squelette du crâne et les dents, *Lhx8* régule la formation du palais secondaire en aval de la signalisation Wnt. (GouXu et al, 2015).

- **Les gènes à homéoboîte *Sineoculis homeobox (Six)***

Les gènes *SIX* chez les vertébrés sont des homologues de 'sine oculis de la drosophile (*so*) gène, qui ont été montré un rôle dans le développement des vertébrés et impliqués dans le maintien de la

différenciation des tissus, récemment l'importance et l'exigence de trois Six gènes, Six1, Six2 et Six4, ont été évoqué pour le développement du cerveau, de la morphogénèse des processus maxillo-mandibulaire et le squelette nasofrontal, et la dérégulation de ces trois Six pourrait entraîner des malformations congénitales sévères crânio-faciales et cérébrales (Fig. 12 ; Garcez et al., 2014).

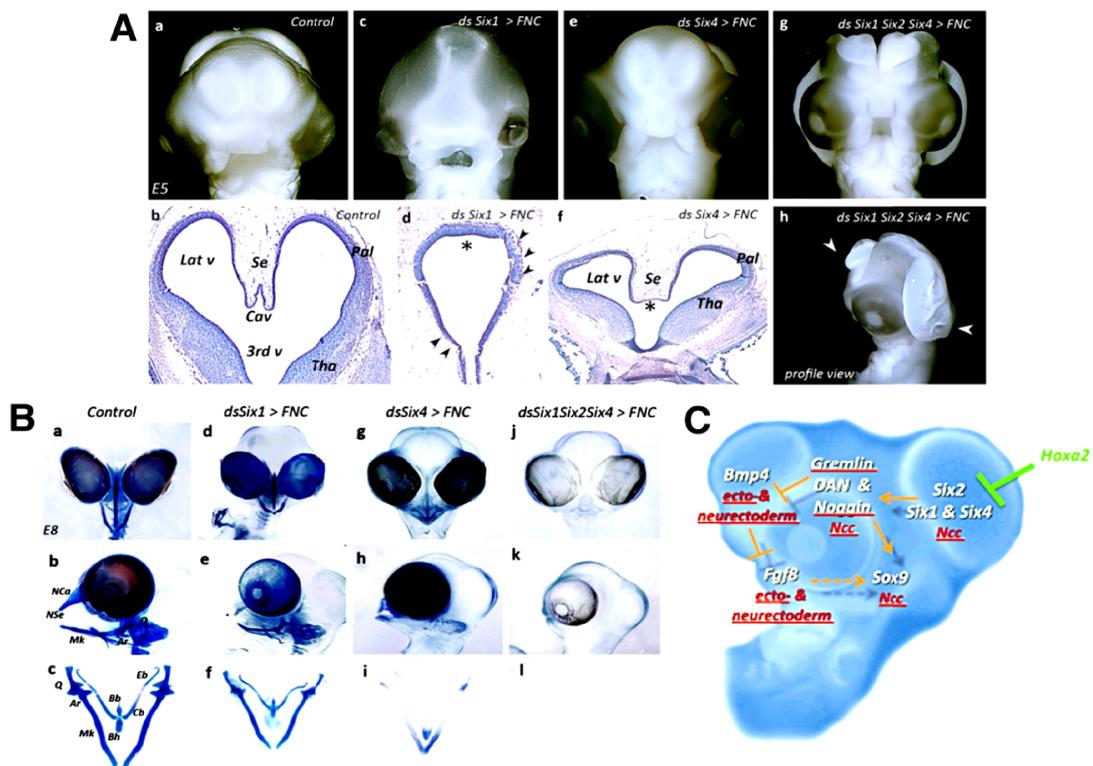


Fig. 12 : Rôle des gènes Six dans le développement céphalique. (A) Les déficits induits à E5 par l'inactivation sélective de Six1, de Six2, de Six4 portent sur le développement des structures médianes de l'encéphale, entraînant des holoprosencéphalies lobaires ou alobaires. Le triple silencing conduit à une anencéphalie étendue. (B) L'inhibition de chaque gène Six conduit à des défauts squelettiques partiels à E8, mais la triple inactivation entraîne l'absence totale de squelette. (C) Modèle d'interactions où les gènes Six1, Six2 et Six4 régulent l'activité de Noggin et Gremlin, pour le développement du cerveau, et, par l'intermédiaire de Sox9, celui du squelette. (D'après Garcez et al. 2014).

IV. 2. Signalisations et le développement crânio-facial

Les molécules morphogènes et facteurs diffusibles qui exercent une action trophique paracrine sur la biologie —prolifération, migration et différenciation— des CCN appartiennent aux quatre grandes familles de morphogènes:

- *Fibroblast growth factors* (Fgf)
- *Hedgehog*
- *Wnt*
- *Transforming growth factors- β* (TGF β) qui englobent la famille des Activines, des *Bone Morphogenic Proteins* (BMP) et des Vg1

Ces molécules ont la propriété de contrôler à distance la physiologie des cellules *i*) tant au niveau de leur activité enzymatique pour permettre la synthèse des facteurs de transcription, impliqués dans le déclenchement et la régulation des cascade morphogénétique, *ii*) que dans l'organisation du cytosquelette requis pour le contrôle et la modulation de la forme, la polarité et la motilité des cellules cibles.

• **La signalisation Fgf (Les facteurs de croissance fibroblastiques)**

Les Fgf comprennent un ensemble de 22 protéines distinctes qui peuvent être générées sous différentes isoformes (Lappi, 1995 ; Ornitz and Itoh, 2001). Chez les vertébrés, on distingue 7 sous-familles de Fgf en fonction de leur homologie de séquence (Itoh et al., 2007).

Sous-familles	FGF-1	FGF-4	FGF-7	FGF-9	FGF-8	FGF-19	FGF-11
Ligands	FGF1	FGF4	FGF3	FGF9	FGF8	FGF19	FGF11
	FGF2	FGF6 FGF5	FGF7 FGF10 FGF22	FGF16 FGF20	FGF17 FGF18	FGF21 FGF23	FGF12 FGF14 FGF13

Tableau 3 : Sous-familles de FGF et leurs ligands correspondants, identifiées chez l'Homme, la Souris et le Poisson-zèbre (D'après Itoh et al., 2007)

En dépit de sa diversité, cette famille se caractérise par la capacité de ses ligands à interagir avec des récepteurs FgfR dont les domaines intracellulaires activent une Tyrosine kinase (Dorey and Amaya, 2010). Le mécanisme d'action des Fgfs sur leurs cellules cibles passe par leur liaison à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules, la famille des FgfRs, dont on dénombre quatre gènes *Fgfr1*, *-R2*, *-R3*, *-R4*. La signalisation de Fgf est déclenchée par la dimérisation du récepteur, dépendante de l'interaction directe avec le ligand, et qui conduit à la phosphorylation de la tyrosine située dans le domaine intracellulaire (Fig. 13).

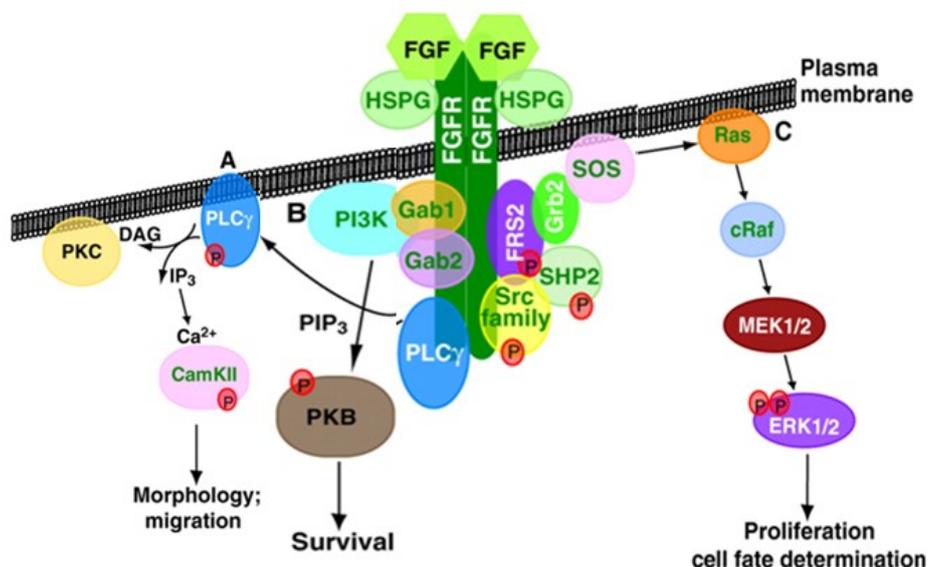


Fig. 13 : Signalisation du Fgf : initiée par dimérisation ligand-dépendante du FgfR, elle conduit à la phosphorylation (P) croisée sur plusieurs protéines de transduction des signaux intracellulaires, parmi lesquels PLC γ , FRS2 et la famille Src (Sarcome proto-oncogène tyrosine kinase). Ceux-ci activent plusieurs voies de signalisation intracellulaires, y compris celles de (A) PLC γ , (B) PI3K/PKB et (C) Ras / ERK. Abréviations : CAMKII, protéine kinase II dépendante de la calmoduline ; DAG, diacylglycérol; ERK, kinase associée au signal extracellulaire; FRS2, substrat de récepteur FGF ; Gab, protéine associée à Grb2; Grb2, facteur de croissance des protéines liée au récepteur 2; HSPG, héparane sulfate protéoglycanes; IP3 Inositol triphosphate; MEK, protéine kinase requis pour la mitogénèse (également connu sous le nom MAP2K); PI3K, Phospho-inositide 3-kinase; PIP3, Phosphotidyl-inositol (3,4,5)-triphosphate; PKB, protéine kinase B; PKC, protéine kinase C; PLC γ , phospholipase C γ ; CRAF, v-raf-leucémie homologue viral de l'oncogène 1 (également connu sous le nom RAF1); Ras, Rat sarcome; SHP2, domaine SH2 Tyrosine phosphatase 2 contenant un domaine d'homologie pour la protéine Src (également connu sous le nom PTPN11); SOS, Son of sevenless; Src, tyrosine kinase du sarcome (D'après Dorey, 2010).

Les FgfRs, qui relayent l'action biologique des Fgfs sont exprimés de façon extrêmement dynamique dans les CCN au moment de leur transition épithélio-mésenchymateuse, puis cessent d'être exprimés pendant leur migration vers les bourgeons faciaux, avant d'être réactivés au site de leur différenciation (Neubüser et al., 1997 ; Alrajeh et al., 2016 ; Fig 14).

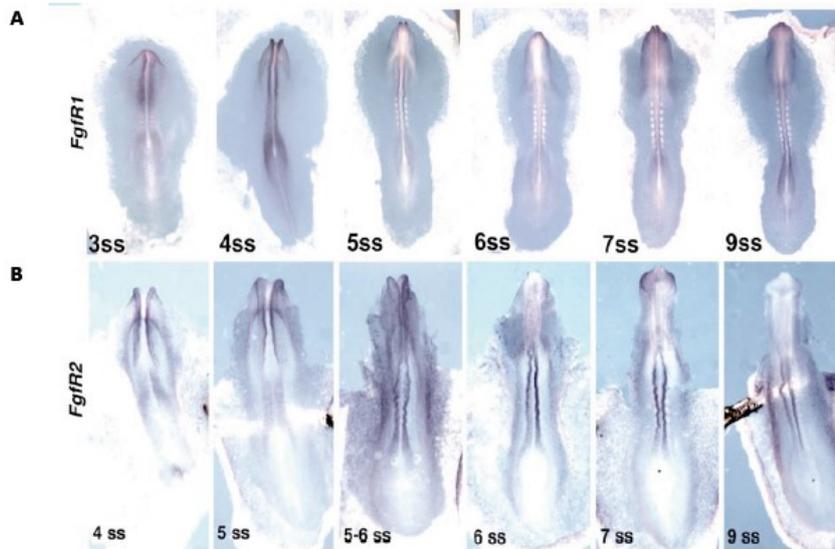


Fig. 14 : Accumulation des transcrits de *FgfR1* (ligne du haut) et de *FgfR2* (ligne du bas) au cours des stades précoces de la neurulation chez l'embryon de poulet. (D'après Alrajeh et al. 2016)

Au cours de l'embryogenèse, la signalisation Fgf joue un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la migration et de la différenciation cellulaire (Karapagli et al., 2002), notamment pour l'induction du mésoderme et la formation des CCN (Hill et al, 2015), mais également dans l'induction du neuroectoderme, le contrôle des mouvements morphogénétiques, le *patterning* antéro-postérieur, la somitogénèse, et, plus tardivement, dans l'organogenèse de divers systèmes. Selon les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués, les molécules FGF peuvent présenter une certaine redondance fonctionnelle. Toutefois, dans les étapes précoces du développement, qu'il s'agisse de la gastrulation, de la spécification de la bordure neurale, des placodes cristalliniennes et olfactives, des centres organisateurs, prosencéphalique et isthmique, ou de la formation des arcs branchiaux, des bourgeons de membres, le facteur *Fgf8* est un acteur prépondérant de la morphogénèse.

Plusieurs membres de la famille des facteurs de croissance fibroblastiques, dont Fgf2 et Fgf8, influencent la migration des CCN. In vivo, l'activité de Fgf2 est prédominante dans les régions-cibles des CCN mésencéphaliques et rhombencéphaliques antérieures, plus particulièrement dans le mésenchyme mandibulaire selon un gradient de concentration disto-proximal. Cette localisation préférentielle suggère un guidage des CCN par le Fgf2. Ce chimiotactisme a également été documenté sur des modèles in vitro, où la supplémentation par le Fgf2 de cultures de cellules mésenchymateuses extraites des arcs pharyngés de souris montre que ce facteur attire les CCN mésencéphaliques.

Par ailleurs, le Fgf8 est produit par l'ectoderme oral des bourgeons mandibulaires (Crosseley et al., 1996). En diffusant dans le mésenchyme, il stimule l'expression de Fgf2 et favorise ainsi la migration des CCN dans les bourgeons mandibulaires (Abu-Issa et al.2002). Si bien que les domaines d'expression de Fgf8 permettent également d'orienter la migration polarisée des CCN. Au cours de leur migration, les CCN expriment le récepteur de type1 (i.e. FgfR1), et les souris mutantes invalidées pour FgfR1 présentent, une hypoplasie du développement crânio-facial qui est la conséquence d'un défaut de migration des CCN.

Chez les souris déficientes en Fgf8, les embryons présentent une insuffisance de développement des 1er et 2ème arcs pharyngés (Farge, 2011). Plus spécifiquement, il a été montré que l'inactivation conditionnelle du Fgf8 dans ectoderme du AB1 induit une apoptose massive des CCN, qui aboutit à l'absence de la majeure partie des éléments du squelette

mandibulaire (Trumpp et al., 1999 ; Minoux and Rijli, 2010). Cette perte de fonction sélective chez la souris reproduit une malformation congénitale humaine, l'otocéphalie, qui se caractérise par l'absence totale des structures de 1^{er} arc, et la fusion médiale des ébauches otiques (Trumpp et al., 1999).

Les travaux de l'équipe ont montré qu'il existe une relation inter-dépendante entre la CN et l'expression du morphogène Fgf8, essentielle pour la squelettogenèse céphalique (Creuzet et al., 2004). L'ablation chirurgicale de la CN provoque l'absence des structures faciales et une perte d'expression du morphogène Fgf8 dans l'ectoderme de l'arc branchial 1 (AB1) et du bourrelet neural antérieur (Creuzet et al., 2004; 2006 ; Creuzet, 2009). Dans ce contexte, les travaux de notre équipe ont permis de mettre en évidence une interaction fonctionnelle par laquelle la production du signal trophique Fgf8 par l'ectoderme de surface permet la survie, la migration et la différenciation squelettogénique des cellules mésenchymateuses de la CN (Creuzet et al. 2004). Réciproquement, les CCN au cours de leur migration contrôlent l'expression du signal Fgf8 dans l'ectoderme superficiel et neural (Creuzet et al. 2009). A travers ce mécanisme, la CN façonne précocement la morphogenèse de la face et du cerveau, et participe au maintien de l'activité du Fgf8, signal nécessaire à sa survie et sa différenciation. Le dialogue morphogénétique épithélio-mésenchymateux entre l'ectoderme et la CN céphalique est donc absolument requis pour la formation de structures squelettiques faciales, mais aussi neurales et sensorielles. Les travaux de l'équipe ont également pu montré que pendant ces phases très précoces où les CCN sont indispensables à la croissance du cerveau antérieur,

l'intégration du signal Fgf8 à leur niveau s'opère via un récepteur multiligand, Cubiline, qui capture le Fgf8 et favorise son enrichissement à la surface des CCN, de façon à permettre une interaction fonctionnelle privilégiée au sein de vésicules d'endocytose, dans le cytoplasme de ces cellules avec le récepteur FgfR3 (Cases et al., 2013).

L'ensemble de ces notions m'a encouragé à analyser plus spécifiquement le rôle de la signalisation Fgf, dans la morphogénèse des bourgeons faciaux. Au cours mon stage de Master II au sein de l'équipe, j'ai pu réaliser un blocage sélectif de certains récepteurs notamment *FgfR1*, et *FgfR2* dans les CCN au moyen de molécules d'ARN interférant (*dsFgfR1*, *dsFgfR2*) ciblé dans les CCN par transgénése localisée, juste avant qu'elles ne débutent leur migration.

Les résultats de ces expériences ont montré que l'inactivation sélective du *FgfR1* perturbe la dynamique de croissance et de convergence des processus faciaux, et entraîne la survenue de fentes faciales bilatérales, alors que l'inactivation du *FgfR2* n'affecte en rien la croissance et de fusion des bourgeons faciaux, n'occasionne aucune malformation faciale, et n'est en aucun cas associé à la survenue de fente faciale et/ou palatine (Alrajeh et al., 2016 ; manuscrit sous presse, joint à ce mémoire ; Fig 15).

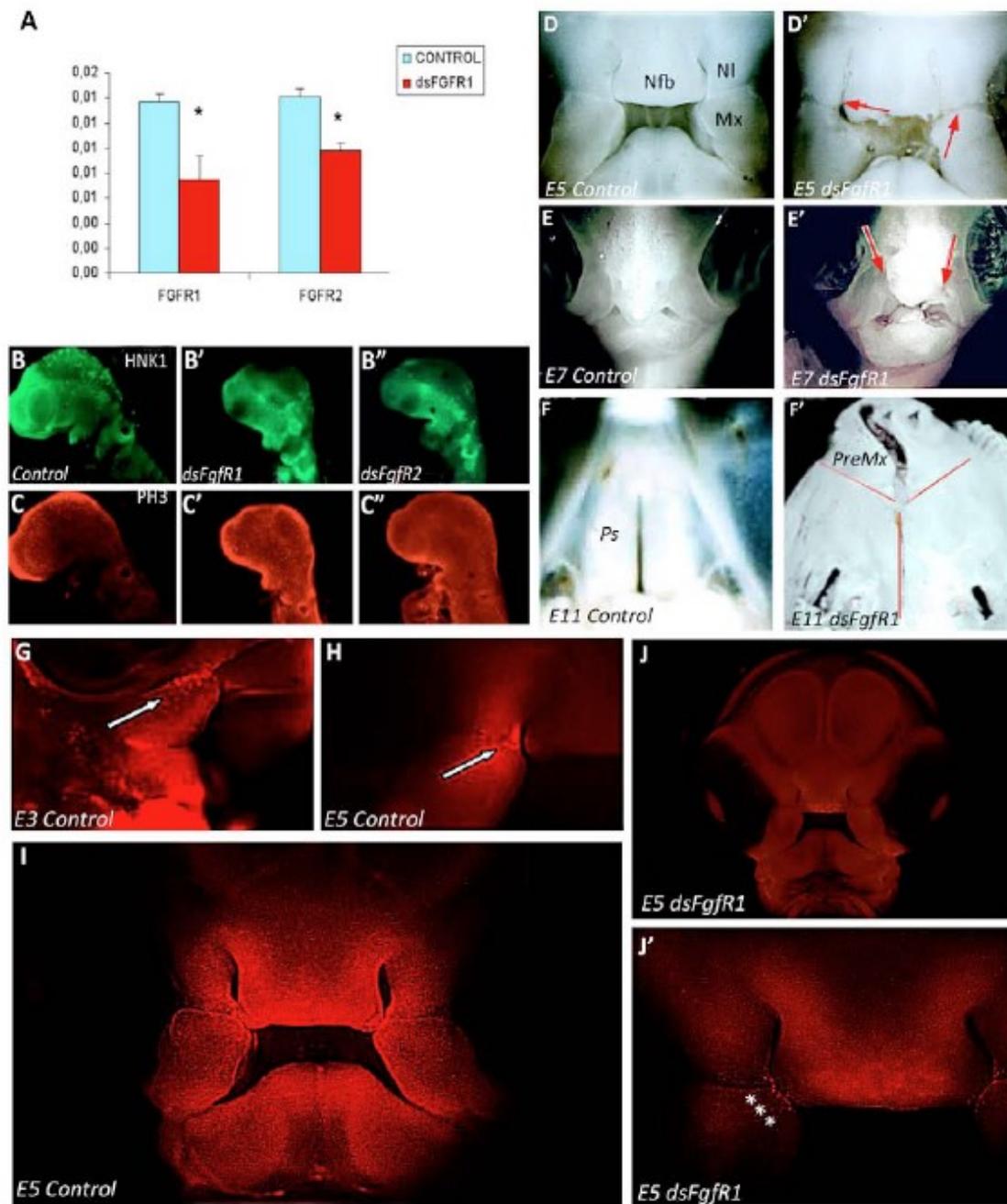


Fig. 15 : Inactivation de *FgfR1* conduit à la formation des fentes faciales. (A) Analyse moléculaire par qPCR de l'expression des gènes *Fgfr1* et *Fgfr2* dans des embryons transfecté *dsFgfr1* et contrôles. (les transcrits de *Fgfr1*, et *Fgfr2* relatif à GAPDH gène transcription; * = $P < 0,001$). (B - C) suivi par immunomarquage de la migration (B - B''; Ab HNK1, Alexa - 488) et de la prolifération (C - C''; PH3, Alexa - 594) des cellules de CNC dans contrôle (B, C), et les embryons transfectés par *dsFgfr1*- (B'-C') et *dsFgfr2*-- (B''-C''). (D, D') Vue Frontale d'un embryon contrôle à E5 (D) et d'un embryon transfecté par *dsFgfr1* (D'). La mise en silence de *FgfR1* dans les cellules de CNC produit des fentes faciales bilatérales: les flèches rouge indiquent les fentes

formées entre les bourgeons nasolatéraux et naso-frontaux et entre le processus maxillaire nasolatéral. (E, E') Vue frontale de E7 contrôle (E) et embryons Transfecté par *dsFgfR1* (E'), montrant les fentes bilatérales (flèches dans E'). (F, F') vue axiale du palais en cour de formation dans E11 contrôle (F) et embryons Transfectés par *dsFgfR1* (F'). Dans l'embryon expérimental, la fusion entre le prémaxillaire (PreMx), le processus interne du processus frontonasal existant derrière le bourgeon nasomédial, est entravé et formes de fentes du palais bilatéral (lignes rouge). (G- I) Morphologie Externe et mort cellulaire dans des embryons contrôles à E3 (G) et E5 (H,I). la Mort cellulaire (Lysotracker coloration; blanc flèches) normalement affecte la tiers moyenne du visage à E3.5. À E5 sur latérales (H) et frontales (I), des foyers des cellules mortes sont présents au niveau de la région de contact où le bourgeon maxillaire et nasolatéral se rejoignent et commencent à fusionner (J, J'). Par contraste, quand *FgfR1* est inactivé dans les CCN, la mort cellulaire est drastiquement diminuée dans les bourgeons faciaux et par conséquent impacte négativement leur fusion (étoiles dans J'). Nfb, bourgeon naso-frontal; Nl, bourgeon nasolatéral; Mx, bourgeon maxillaire; Md, bourgeon mandibulaire; PreMax: premaxillaire ; Ps: lames palatines. (D'après Alrajeh et al. 2016).

Cela nous a conduit à considérer le *FgfR1* comme une molécule clef dans l'intégration de la signalisation Fgf et le contrôle de la polarité des CCN, pour réguler la dynamique de processus maxillaire et naso-latéro-médian. Au cours de cette étude nous avons pu mettre en évidence, de façon intéressante, l'implication de la polarité cellulaire au cours de ces processus malformatifs. Dans nos différentes séries expérimentales, en caractérisant l'orientation du cil primaire des CCN au cours de leur migration et lors de la colonisation, nous avons pu montrer qu'une organisation anarchique du tissu mésenchymateux issu des CCN dans le bourgeon maxillaire, consécutive à l'inactivation de *FgfR1*, empêche la fusion des processus faciaux et précède la formation de fentes chez l'embryon (Alrajeh et al., 2016; Fig 16).

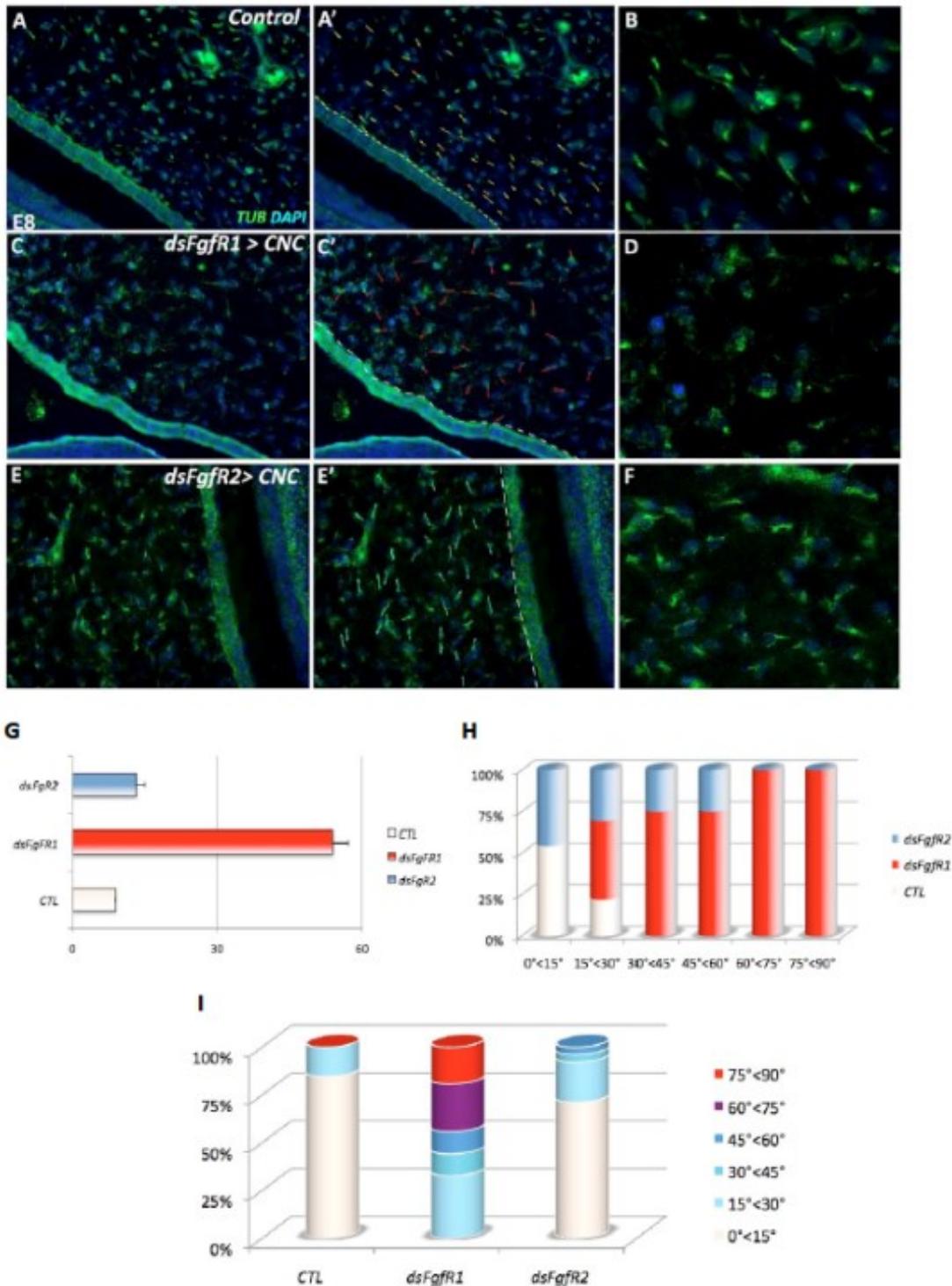


Fig. 16 : L'orientation des cils primaires dans les cellules CNC est mise en évidence par l'utilisation de la α -tubuline acétylée (TUB), dans le contrôle E8 (A - B), dans les embryons transfectés par le dsFgfR1 - (C - D) et le dsFgfR2 - (E - F). (A', C', E') Les mêmes images sur lesquelles les flèches individuelles indiquent l'orientation de chaque cil par rapport à l'axe de la lame basale (pointillé) de l'ectoderme de surface, dans chaque série. (B, D, F). (G) Variation moyenne de l'orientation des cils des

cellules CNC par rapport à l'ectoderme de surface. (H) Répartition des cils / de l'angle de l'ectoderme de surface dans le contrôle par rapport aux séries expérimentales. Dans le développement normal, l'orientation des cellules CNC est pratiquement parallèle à l'ectoderme de surface. Lorsque *FgfR1* est inactivé, l'orientation des cellules CNC est randomisée. (I) Orientation des cils primaires de la cellule CNC par rapport à l'ectoderme de surface, dans des embryons transfectés par *dsFgfR1* et *dsFgfR2* témoins. L'orientation des cellules CNC est sévèrement perturbée lorsque *Fgfr1* est inhibé dans le mésenchyme facial dérivé des CNC, tandis que l'inhibition de *FgfR2* entraîne des changements mineurs par rapport au témoin. (D'après Alrajeh et al. 2016).

- **La signalisation Wnt**

Les gènes Wnts, sont les homologues de gènes identifiés chez la *Drosophila drosophila* (*Wingless*), la famille de Wnts comporte plus de 19 gènes avec 15 récepteurs et co-récepteurs différents (Cynthia et al, 2015).

L'intérêt des signaux *Wnt* pour le développement embryonnaire des Vertébrés a été suscité par les malformations résultantes de la mutation du gène *Wnt1*. Initialement identifié dans les tumeurs mammaires chez la souris, le gène *Wnt1* est exprimé précocement au cours de la morphogenèse cérébrale le long de la ligne médiane dorsale du mésencéphale ainsi qu'à la jonction entre le mésencéphale et le rhombencéphale ; la distribution de son transcrite suggérant un rôle important dans l'ontogenèse du cerveau moyen. Les expériences de mutation réalisées chez la souris ont avéré le rôle essentiel qu'exerce le gène *Wnt1* pour le développement du cerveau et plus spécifiquement pour l'induction du mésencéphale et du cervelet (McMahon et Bradley, 1990).

Plusieurs expériences ont montré le rôle de *Wnt* dans l'induction de l'hippocampe. Des souris exprimant un dominant négatif d'un facteur de transcription activé par *Wnt1* appelé *Left1* ne développent pas d'hippocampe. Inversement, une expression ectopique de β -caténine utilisant un promoteur transgénique actif dans le néocortex induit les cellules à devenir des cellules de l'hippocampe. D'autres expériences sur ce même promoteur ont montré que *Wnt* doit agir comme un morphogène qui permet de contrôler la différenciation des cellules suivant l'intensité du signal. La molécule de la famille de *Wnt* qui s'exprime le plus précocement dans l'hémisphère cortical est *Wnt3a*. Il a été montré que ce ligand est plus indispensable à la prolifération de précurseurs neuraux du pallium médian qu'à l'induction de l'hippocampe.

Depuis il a été montré que les molécules de *Wnt* exercent un rôle important dans l'induction neurale et plus spécifiquement au niveau de la plaque neurale. Le signal inducteur est stimulé par des facteurs de croissance *Fgf* et est inhibé, entre autre, par les différentes molécules de *Wnt*. Peu après que l'induction neurale commence, la région rostrale de la plaque neurale correspondant à la « bordure neurale antérieure », et l'ectoderme non neural commence à exprimer *Fgf8*. Les transcrits de *Fgf8* sont régulés par un signal qui provient du mésoderme axial qui nécessite l'expression de *Wnt* produit par le mésoderme latéral ventral et de l'ectoderme postérieur. Ces derniers vont inhiber temporairement et spatialement l'expression de *Fgf8* au niveau rostral où le signal de *Fgf8* est responsable de l'induction du prosencéphale au niveau du neurectoderme

antérieur. Certaines molécules comme l'acide rétinoïque restreignent l'activité de *Wnt1* dorsalement afin de permettre le maintien de l'identité neurale antérieure (Hoch et al., 2009).

La combinatoire de la signalisation Wnt n'est pas encore tout à fait clair dans le squelette, mais les études génétiques chez l'Homme ont montrées l'importance de chacun des gène Wnts, ses recepteurs et corécepteurs dans la régulation du développement du complexe craniofacial et notamment au niveau des lèvres, l'absence de *Wnt3* conduite une malformation complètes dans les quatre lèvres et c'est moins sévère pour le déficit de *Wnt7* (Cynthia et al, 2015).

La voie Wnt / β -caténine est également nécessaire pour empêcher la différenciation des chondrocytes et permettre la formation des ostéoblastes lors de l'ossification membraneuse et endochondrale (GouXu et al., 2015).

- **La signalisation *hedgehog* (Hh)**

Hh est un morphogène en structuration chez la drosophile, Les mammifères ont trois homologues Hh : *Desert hedgehog (DHH)*; *Indian hedgehog (IHH)* et *Sonic hedgehog (SHH)*.

SHH fait partie de la famille de molécules de signalisation Hedgehog (HH). SHH se lie au récepteur membranaire *Patched (Ptc)*, gène suppresseur de tumeur, qui exerce un effet répresseur sur le proto-oncogène *smoothened (Smo)*, en l'absence de SHH. Lorsque SHH lie Ptc, SMO active les

facteurs de transcription *Gli1*, *Gli2* et *Gli3* (Hooper et al, 2005). En l'absence de SHH, une autre cascade de signalisation aboutissant à la mort cellulaire se produit : dans ce cas, Ptc est clivé par la caspase 3, libérant un site pro-apoptotique (Thibert et al, 2003).

Chez l'adulte SHH est responsable de la maintenance de certaines cellules souches et de progéniteurs neuraux et épidermiques (Hooper et al, 2005). De plus, l'augmentation de la signalisation de HH est impliquée dans les processus de cancérisation de la peau, du cervelet, du muscle, de l'intestin, du pancréas et de la prostate (Pasca et al, 2003). Au cours du développement, le morphogène SHH participe à la formation de nombreux organes et tissus, notamment le système nerveux et le squelette appendiculaire. La mutation de *Shh* chez la souris ou chez l'homme est responsable de cyclopie, holoprosencéphalie, et absence du squelette facial (Chiang et al., 1996 ; Roessler et al, 1996 ; Belloni et al, 1996). L'apoptose massive des cellules de la CN explique en partie ce phénotype (Ahlgren et Bronner-Fraser, 1999 ; Jeong et al., 2004), toutefois, on ignore la nature des progéniteurs touchés par cette mutation et le rôle exacte de SHH dans la régulation de la squelettogenèse crâniofaciale.

SHH est présent dans l'environnement des cellules de la CN céphalique en migration, et notamment dans l'endoderme du pharynx. Les travaux antérieurs de l'équipe ont montré que l'endoderme joue un rôle majeur dans le développement du squelette maxillo-mandibulaire dérivé de AB1 (Couly et al., 2002). Il a été montré notamment que l'absence de SHH dérivé de l'endoderme entraîne l'induction des gènes *Shh*, *Bmp4*, *Fgf8* et

Pitx1 dans BA1 et l'absence des dérivés squelettiques. De plus, on constate une mort cellulaire massive des cellules de la CN. L'application de la protéine SHH recombinante permet de maintenir la survie des cellules de la CN, de restaurer le patron normal d'expression génique dans AB1 et la différenciation squelettogénique (Brito et al., 2006).

De plus, *SHH* régule, de façon dose-dépendante, la morphogenèse des structures de ligne médiane de la face, la perturbation de sa signalisation provoque un large spectre d'anomalies cranio-faciales (Huang and Helms, 1999). A la face dorsale, *SHH* contrôle également l'ossification membraneuse et la formation de sutures crâniennes en coopération avec l'IHH. Par cette action synergique, SHH augmente la prolifération mésenchymateuses et empêche la fusion des sutures, alors que *IHH* favorise l'ossification des ébauches calvariales, la progression des sutures et leur fusion (GouXu et al., 2015).

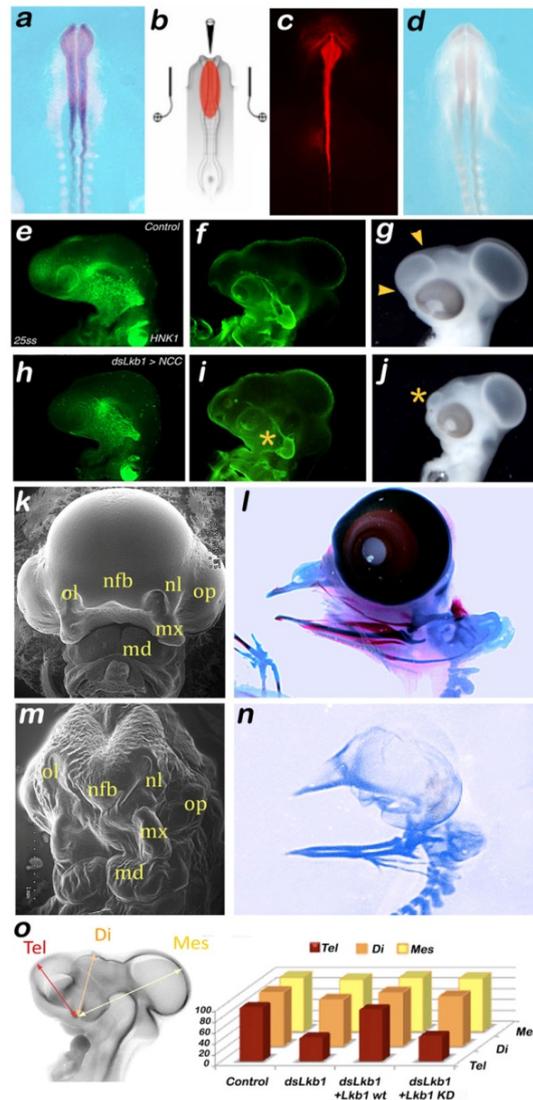
Plus récemment, les travaux de l'équipe ont porté sur une partie de la signalisation SHH non canonique et qui repose sur l'activation de l'AMPK. Nous avons focalisé notre attention sur l'étude d'une kinase, suppresseur de tumeur, *Lkb1*. L'intérêt pour ce gène est motivée par le fait que l'inactivation de *Lkb1* chez la souris produit un phénotype remarquable de notre point de vue car les souris nullizygotés montrent une absence de fermeture du tube neural et l'absence des dérivés de AB1, déficits qui phénocopient ceux engendrés par l'ablation chirurgicale de la CNC (Ylikorkala et al., 2001).

Chez l'Homme, les mutations du gène suppresseur de tumeur *Lkb1* sont responsables d'une maladie héréditaire, le syndrome de Peutz-Jeghers, caractérisé par une polypose intestinale, des anomalies de la pigmentation et une incidence élevée de cancers épithéliaux. Chez l'embryon, *Lkb1* et *l'AMPK* sont activés dans les cellules de la CN faciale avant le début de leur migration, selon patron d'expression très dynamique qui suit la cinétique de fermeture du tube neural. L'inactivation de *LkB1* et *d'AMPK* par RNAi avant l'émigration des CCN est rapidement suivit par une hypoplasie maxillo-mandibulaire et nasofrontale, associée à des défauts de la gangliogénèse crânienne, particulièrement visibles au niveau du ganglion de Gasser. Dix-jours après l'opération, la différenciation du squelette est sévèrement altérée : l'ossification est complètement inhibée (Fig. 17; Creuzet et al., 2016. Manuscrit joint à ce mémoire).

Ces déficits morphologiques sont précocement associés à une réduction de la quantité de CCN (*Hnk1*, *AP2*, *Snail2*, ...) qui subissent la TEM. L'expression de la N-cadhérine à la jonction apico-latérale du neurépithélium qui normalement diminue pour favoriser la TEM, reste élevée chez l'embryon expérimental et empêche la délamination des CCN faciales. Les altérations phénotypiques sont les conséquences d'une dérégulation de la voie non canonique de SHH, sur l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire au cours de la migration directionnelle des CCN (Creuzet et al., 2016).

Fig. 17 : Role de Lkb1 et de la voie AMPK dans la formation des structures céphaliques.

(a) Expression du transcrite de *Lkb1* dans le CNC. (b) Schéma expérimental de la transfection bilatérale de la CNC par le dsRNA dirigé contre le transcrite de *Lkb1*. (c) Electroporation avec un marqueur fluorescent, et (d) inhibition de la transcription 2 heures après électroporation. (e,f,h,i) Défauts de migration des cellules de la CNC après invalidation de *Lkb1* et malformation des ganglions crâniens. (g,j) Microcéphalie des embryons expérimentaux par rapport aux témoins. (k-n) Hypoplasie des structures faciales (k,m) chez les embryons hypomorphes pour *Lkb1* s'accompagne d'une inhibition de l'ossification (l,n). (o) Analyse morphométrique du développement cérébral montrant des défauts de croissance du télencéphale très sévères. Di, diencephale; md, mandibulaire; Me, mésencéphale; mx, maxillaire; nfb, nasofrontal; nl, nasolateral; op, vésicule optique; Tel, télencéphale. (D'après Creuzet et al., 2016)



- **La signalisation TGFβ (Transforming Growth Factor Beta superfamily)**

La superfamille TGF-β regroupe plus de 30 protéines sécrétées, structurellement apparentées et qui sont impliquées dans la régulation de quasiment tous les aspects du développement. Cette superfamille englobe les TGFβs, les signaux de la voie Nodal et les activines, les facteurs de croissance et de différenciation (GDFs) et les **BMPs**.

Les mBMPs constituent un groupe de facteurs de croissance, de type cytokines, (Reddi H, A , 2009) caractérisé par un motif conservé riche en Cystéine jouent un rôle d'induire la formation de l'os et du cartilage .

La **molécule BMP4** exprimée par les cellules neurectodermiques peut provoquer la migration des CCN et exerce également des fonctions importantes dans la morphogénèse maxillaire et mandibulaire. Plus spécifiquement, cette molécule permet de contrôler la croissance des bourgeons maxillaires qui fusionnent le long de la ligne médiane pour former les lames palatines. (Hill et al., 2015).

En ce qui concerne le développement de la face supérieure, les travaux de l'équipe ont montré que **l'activité de BMP7** dans la plaque préchordale est régulée par les CCN, lorsque ces dernières débutent leur migration. Lorsque la CCN est absente ou que ses signaux sont dérégulés, on observe à brève échéance, une surexpression de Bmp7 au niveau de la plaque préchordale. Cette surexpression s'avère très rapidement délétère pour la croissance du cerveau antérieur sus-jacent, mais également pour tout le massif nasofrontal et la différenciation des structures craniofaciales : dans ces conditions, les défauts de croissance dans la partie nasofrontale dégénèrent en cyclopie (Creuzet, 2009).

BMP2 exerce également des fonctions bien documentées à la ligne médiane, mais au niveau dorsale : ce facteur est impliqué dans la croissance calvariale et ses dérégulations dans les craniosténoses (Ishii et al, 2015).

Le gène *Bmp4* exerce également des fonctions importantes pour la morphogénèse maxillaire et mandibulaire. Ce dernier s'exprime aussi dans l'ectoderme où son activité morphogénétique permet notamment de délimiter le domaine d'expression de *Fgf8*. Ensemble, *Fgf8* et *BMP4* vont induire l'expression de gènes spécifiques caractéristique du mésenchyme. Si on inhibe l'expression ectodermique de *Fgf8* en exprimant de façon ectopique *Bmp4*, nous observons une perte totale de la mâchoire. Les *BMPs* ont également un rôle intrinsèque important pour la spécialisation des structures de la face. La croissance des bourgeons maxillaires qui fusionnent le long de la ligne médiane pour former les lames palatines sont contrôlées par l'expression de *BMP4* ; les dérégulations de la signalisation *Bmp* à ce niveau entraînent des malformations faciales de type fentes palatines. Les *Bmps* sont également responsable de la différenciation des cartilages et d'os mais à un stade plus tardif. Ils jouent aussi un rôle de régulateur de l'activité des gènes aux fonctions parfois opposées tels que les gènes *Msx1* et *2*, régulateurs négatifs de la différenciation, impliqués dans les processus d'apoptose, et le gène *Sox9*, connu pour son rôle dans l'induction de la différenciation du cartilage (Santagati and Rijli, 2003).

Ensemble, *Bmp4* et *Fgf8* jouent aussi un rôle de régulateur de l'activité des gènes *Msx1* et *2*, impliqués dans le développement crâniofacial et l'odontogénèse. En outre, diverses études montrent que des mutations dans le gène *Msx1* peuvent être associées à la pathogénèse de la fente labiale et palatine. (Jezewski et al., 2003; Santagati and Rijli, 2003 ; Dixon et al., 2011).

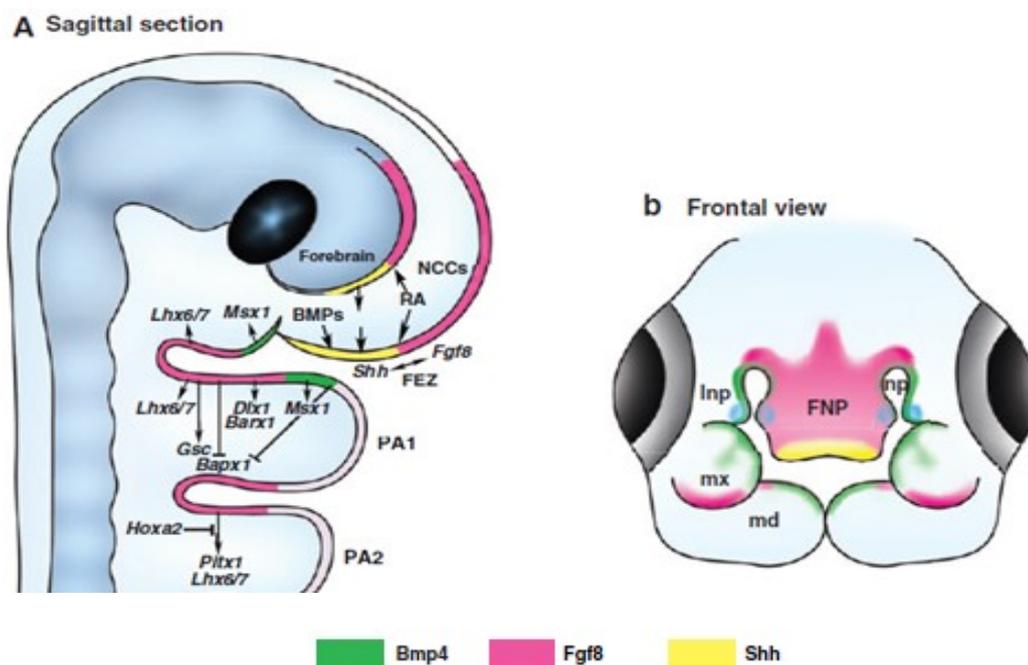


Fig.18 : Signaux moléculaires impliqués dans la morphogénèse cranio-faciale. (A) coupe schématique d'un embryon de vertébré le long d'un plan sagittal médian au niveau du processus fronto-nasal (FNP), et le long d'un plan sagittale au niveau des premier et deuxième arcs pharyngiens (PA1 et PA2, respectivement), Les interactions génétiques indiquées sont représentatives des données souris, poulet et poisson zèbre. Les flèches représentent les régulations positives. La juxtaposition de Fgf8 (facteur de croissance des fibroblastes 8, rose), Shh (sonic hedgehog, jaune), Bmp4 (os protéine morphogénétique 4, vert).CNC, cellules de la crête neurale, RA (Acide Rétinoïque). (b) une vue frontale. En plus de la FEZ (Fronto-Nasal ectoderm Zone), représentant les domaines d'expression des différents signaux formant la face. (D'après Minoux and Rijli, 2010).

V- LA NEUROFIBROMATOSE :

V. 1. Historique

Le terme de neurofibrome avait été introduit pour la première fois en 1803 par Odier dans son « Manuel de médecine pratique » publié à Genève. En 1829, William Wood, membre du « Royal College of Surgeons » avait mentionné les caractéristiques anatomo-cliniques des neurofibromes

chez 24 patients et ensuite en 1849, Robert Smith, professeur de chirurgie à la « *Dublin Medical School* », avait décrit deux cas de « neurofibromes multiples ». Rudolph Virchow avait été le premier à proposer en 1863 une classification histologique de ces tumeurs. Son élève, **Friedrich Von Recklinghausen** un pathologiste allemand (1833-1910) avait par la suite décrit en 1882 un syndrome de tumeurs cutanées et sous-cutanées. Il avait fourni une description clinique des personnes atteintes de ce trouble, et a laissé entendre sa connexion avec le système nerveux

Depuis, la NF est devenue plus connue sous le nom de maladie de **Recklinghausen**. Son caractère héréditaire à transmission autosomique dominante a été démontré en 1918 par Preiser et Davenport (Garabédian EN et al., 1996). En 1981, Riccardi a évoqué l'existence de deux entités distinctes : la maladie de Recklinghausen ou NF périphérique (NF 1) et la NF acoustique ou centrale (NF 2) (Li Y et al, 1995). En 1993, une base de données internationale a été inaugurée ayant pour but de collecter les caractéristiques cliniques des patients atteints de NF1 et d'organiser une prise en charge multi-disciplinaire (Friedman et al. 1993). Celle-ci est toujours utilisée à ce jour.

V. 2. Description de la pathologie

La neurofibromatose de Von Recklinghausen ou neurofibromatose Type1 (NF1) est une maladie génétique fréquente qui touche de 1/4000 à 1/3000 individus. Sa répartition mondiale est homogène et son incidence est estimée à 1/2500 naissances.

Il est important de ne pas confondre la NF1 avec la maladie de Joseph Merrick qui est connu sous le surnom « elephant-man » ou le syndrome de Protée (Lindhurst et al., 2011), causé par une mutation activatrice dans AKT1, qui appartient à la famille des protéines kinases impliqué dans la voie de signalisation de la survie cellulaire, en inhibant l'apoptose. Cette confusion est encore très présente dans la formation médical, la presse écrite et sur internet ; et peut avoir un impact sur la qualité de vie des patients NF1 (Legendre C-M et al., 2011).

La neurofibromatose 1 a une expression clinique très variable. De plus, celle-ci évolue de façon imprévisible avec l'âge de patient imposant un suivi régulier des sujets NF1. L'origine embryologique des cellules tumorales est suggérée car les tissus dérivés des crêtes neurales sont atteints de façon privilégiée. On retrouve effectivement les principales tumeurs au niveau des cellules migratrices des crêtes neurales comme les cellules de Schwann par exemple. C'est une affection autosomique dominante dont la pénétrance est quasi complète. Elle est provoquée par mutation du gène NF1 localisé sur le bras long du chromosome 17 en 17q11.2. Ces mutations sont réparties sur l'ensemble du gène et sont généralement spécifiques de chaque famille.

V. 3. Les différentes formes de neurofibromatoses

Riccardi, en 1982, a proposé une classification des neurofibromatoses en sept types plus une catégorie annexe pour les neurofibromatoses « mal spécifiées » ou NF-NOS (*Not Otherwise Specified*).

Les deux principales formes de neurofibromatose sont **la NF1 ou neurofibromatose de type 1 périphérique** et **la NF2 ou neurofibromatose de type 2 centrale** ou neurinome de l'acoustique (schwannomes vestibulaires bilatéraux) (Jebblaoui Y. et al.,2006), son incidence est de 1 pour 37000. Les autres types regroupent:

- La NF3 ou type mixte : cas exceptionnel d'association NF1-NF2.
- La NF4 permet de classer les formes variantes.
- La NF5 est une forme segmentaire, touchant un seul segment corporel.
Elle serait due à une mutation post-zygotique, avec une incidence de 0,001%.
- La NF6 se manifeste uniquement par des tâches café au lait (TCL).
- La NF7 est d'apparition tardive, après la troisième décennie. (McKenna KX et al, 1991)(Jebblaoui Y. et al.,2006)

Il ne faut pas confondre cette pathologie avec d'autres syndromes comme ceux de Noonan (nanisme, cardiopathie congénitale et anomalies de la coagulation sanguine); syndrome McCune Albright (puberté précoce et dysplasie fibreuse des os) et syndrome de Leopard (anomalies génitales, lentigines multiples, cardiopathie congénitale et surdité) qui comprennent aussi des tâches café cutanées ainsi que les signes propres précédents. Il existe aussi le syndrome de Legius (tâches café au lait et lentigines axillaires) est du à une mutation de gène *SPRED1*, *Sprouty-related EVH1 domain-containing protein 1*. (Jouhilahti. et al., 2011).

V. 4. Génétique de la neurofibromatose de type 1

La neurofibromatose 1 est une maladie autosomique dominante. Un malade peut donc transmettre la maladie à chacun de ses enfants avec un risque de 50 % quel que soit le sexe.

La grande variabilité phénotypique de la NF1 peut faire méconnaître la présence d'antécédent familial et sa recherche se fait grâce à un interrogatoire rigoureux et par la pratique d'un examen clinique des parents et/ou de la fratrie. Les informations seront reportées sur un arbre généalogique qui résumera l'enquête génétique familiale, par exemple, L'étude des arbres généalogiques des familles atteintes de la maladie de Von Recklinghausen montre que Nf1 se transmet de façon dominante. L'héritage d'une copie mutée du gène transmet la maladie. La descendance de deux sujets, dont l'un est atteint, comportera 50% de sujets atteints. La pénétrance du gène est complète (100%).

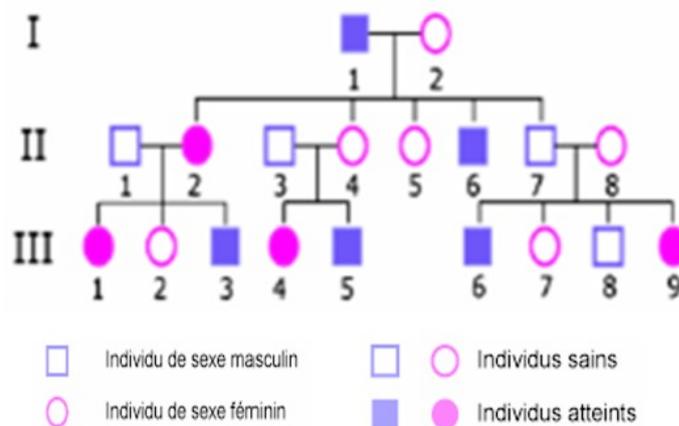


Fig.19: Exemple d'arbre généalogique d'un NF1. Dans cette famille, le père (I-1) a transmis l'allèle muté à 4 de ses 5 enfants alors que deux seulement semblent atteints. Sa fille (II-4) et son fils (II-7) ont "transmis" la maladie à leur descendance bien qu'ils ne présentent que des symptômes bénins. La maladie semble ainsi sauter une génération ce qui confirme la mode autosomique dominant avec expressivité variable de la maladie. (Orphaschool/Orpha.net).

Outre les « formes familiales », la maladie peut être provoquée par des mutations spontanées au niveau du gène d'un des deux parents dans environ la moitié des cas de cette maladie. Actuellement environ 500 mutations sont référencées dans la base de données du consortium.

Il existe également des cas « sporadiques », environ 50% des cas, c'est-à-dire que les parents ne présentent pas d'anomalie génétique. Ces formes sporadiques sont dues à des problèmes d'expression du gène *NF1* lors du développement foetal, il s'agit d'une néomutation survenue chez la personne atteinte. Les mécanismes par lesquels elles apparaissent et les processus embryologiques qui président à la survenue des signes cliniques restent aujourd'hui à élucider.

Il y a encore quelques rares cas de « mosaïque ». Les mosaïques somatiques et germinales correspondent à la présence chez un même individu de deux ou de plusieurs populations cellulaires différentes à la suite d'une anomalie génétique survenue après la fécondation. Le pourcentage de cellules en cause est corrélé avec le moment d'apparition de la mutation au cours de l'embryogenèse. La mosaïque germinale (gonadique) est une forme rare de mosaïcisme la mutation est présente seulement dans les gonades, et il peut être suspectée si deux ou plusieurs enfants de parents non affectés ont NF1 (Jouhilahti. et al. 2011).

V. 5. Identification du gène responsable de la NF1

L'utilisation de techniques de biologie moléculaire et de cytogénétique a permis de localiser le gène responsable de la

neurofibromatose de type 1. Celui-ci se situerait sur le bras long du chromosome 17 en position 17q11.2. Ces recherches ont notamment démontré l'indépendance des types 1 et 2. Les gènes responsables étant situés sur 2 chromosomes différents : 17 pour NF1 et 22 pour NF2.

V. 5 -1. Le gène *NF1*

5 -1. 1 – Structure

Le gène de la neurofibromatose de type 1 est un gène complexe. Il couvre une région de génome de plus de 280kb (Jouhilahti EM. et al 2011). Sa région codante comprend au moins 60 exons séparés par des introns dont la taille varie de 60 paires de base (pb) à plus de 40000 pb. Les exons ont une taille comprise en moyenne entre 100 et 200 pb. Trois au moins présentent un épissage alternatif. L'exon 49 contient le codon stop et le gène se termine par une région 3' non traduite de 3,5 kb contenant de nombreux sites de polyadénylation.

5 -1. 2 - ARN messager du gène *NF1*

Le gène NF1 code pour des ARN messagers (ARNm) qui ont une expression ubiquitaire. Leur taille est comprise entre 11 et 13kb. Leur expression est spécifique de certains tissus et semble évoluer au cours du développement.

Ces ARNm subissent un phénomène d'édition. Ce mécanisme post-traductionnel permet un changement de la séquence codante de l'ARNm par rapport à la séquence prévue de l'ADN. Il peut s'agir d'une délétion, insertion ou de la substitution de certaines bases.

La variabilité phénotypique dans la NF1 est actuellement mal expliquée et, en particulier aucune corrélation génotype/phénotype n'a encore pu être démontrée. A l'heure actuelle on pense que la quantité de cet ARNm normal ou modifié par l'édition serait comparable dans les tissus sains des sujets atteints de NF1 et des sujets sains. En revanche, ce taux serait plus élevé dans les tumeurs de patient NF1 avec un taux encore majoré dans les tumeurs malignes et un taux intermédiaire dans les névromes plexiformes (Pinson et Wolkenstein 2004). La présence d'ARNm modifié semble être un facteur intervenant dans la tumorigenèse chez les patients (Mukhopadhyay et al. 2002). L'édition pourrait avoir une fonction d'inactivation du gène NF1 et pourrait être une des explications majeures à la grande variabilité d'expression de la neurofibromatose (Skuse et al 1997).

5 -1. 3 - Physiopathogénie

Le cadre de lecture de l'ARNm du gène NF1 comprend 8457 pb. Il est traduit en une protéine de 2818 acides aminés (Wolkenstien P.2001) et sa masse moléculaire est environ de 350 kDa, c'est une grosse protéine intracytoplasmique, dénommée la neurofibromine qui appartient à la famille des protéines GAP (*GTPase-activating protein*) car elle possède une région nommée *NF1-(GAP related domain)* ou NF1-GRD, qui intervient comme régulateur négatif sur cette voie de l'oncogène Ras (*Rat sarcomas*) (Jouhilahti. et al. 2011) (Kevin. et al. 2009). Les protéines GAP stimulent la conversion de la forme active de la p21 RAS liée au GTP en sa forme inactive liée au GDP. Cela engendre un changement de la conformation spatiale de la p21 RAS qui ne peut plus activer ses effecteurs et par réaction en chaîne,

l'ensemble de la voie RAS. La neurofibromine a donc un rôle inhibant sur cette voie RAS qui stimule la prolifération et la différenciation cellulaire,

Les mutations de *NF1*, responsables d'une perte de fonction du gène, aboutissent au maintien de Ras sous sa forme liée au GTP et, via Raf, à l'activation de la voie des MAP kinases, Mitogen-activated protein kinases (MAPK). Cette cascade d'événements entraîne une dérégulation de la croissance et/ou de la différenciation cellulaire,

Dans les tumeurs des patients atteints de NF1, la neurofibromine ne joue pas son rôle normalement. Dans ces tumeurs (neurofibrosarcomes, schwannomes,...) l'activité de la neurofibromine est diminuée. Les analyses montrent des taux augmentés de RAS-GTP et une activité GAP cellulaire totale diminuée (Wolkenstien P. 2001).

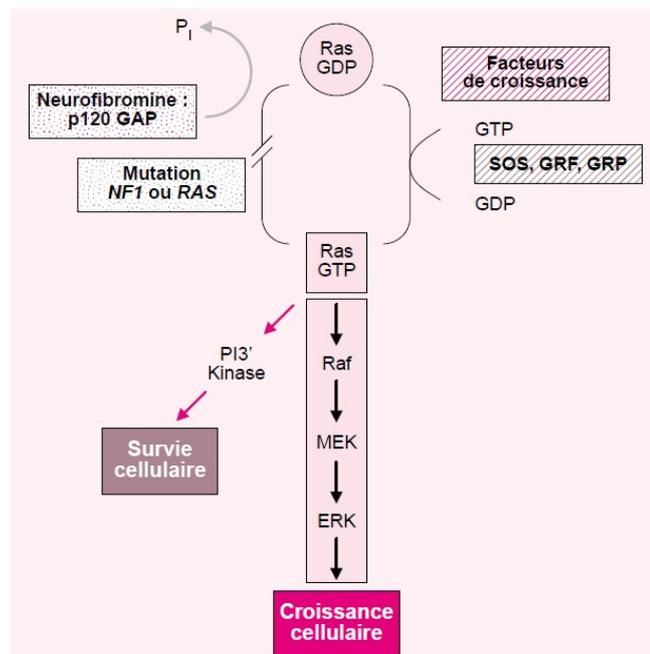


Fig. 20 : Schématisation de l'activation de Ras. La production de Ras est finement réglée par un cycle entre une conformation active porteuse de GTP et une

conformation inactive porteuse de GDP. Ras a une activité intrinsèque GTPasique lente, augmentée par GAP. Les protéines Ras contrôlent la mort cellulaire en conduisant un signal de la membrane jusqu'au noyau au travers d'une série d'effecteurs en cascade. Ras GTP recrute la Raf kinase à la membrane où son activité kinase est effective. Raf, en retour, active une cascade de kinases impliquant la MEK et les isoformes Erk1 et Erk2 de la MAP kinase. L'état d'activation de la phosphoinositol-3'-kinase (PI3K) est aussi réglé par Ras GTP dans de nombreux types cellulaires. La neurofibromine possède un domaine comparable à GAP. (D'après Wolkenstien P. 2001)

Le déficit en neurofibromine induit une augmentation des signaux mitogènes (par la voie Ras) transmis aux noyaux cellulaires, expliquant en partie la prédisposition aux tumeurs des patients atteints de NF1. Le principal site de production de la neurofibromine est le système nerveux central suggérant son implication dans les troubles de l'apprentissage et dans la survenue de tumeurs intracrâniennes (Nordlund Met al.1993).

Du point de vue embryologique, le déficit en neurofibromine touche les trois feuillets (Caron. et al. 2004):

- L'atteinte neuroectodermique est à l'origine des lésions cutanées et neurologiques
- L'atteinte mésodermique est à l'origine des anomalies osseuses.
- L'atteinte endodermique, plus rare, provoque les lésions des autres organes (les tumeurs de l'appareil digestif ou de la vessie).

D'autre part, des analyses faites sur des tumeurs de patients non atteints mais qui sont fréquemment rencontrées chez les patients NF1 suggèrent que la perte de fonction du gène *NF1* serait un facteur de prédisposition au développement de certains cancers (tumeurs

malignes des gaines nerveuses, neurofibrosarcome, ainsi que leucémie). Ceci semble s'appliquer plus particulièrement aux tumeurs dérivées des cellules de la crête neurale.

5 -1. 4 - Rôle tumoral du gène NF1

Le gène NF1 est un gène suppresseur de tumeur. Un ensemble d'argument plaide en faveur de cette hypothèse :

- Le phénotype de la NF1 est caractérisé par l'existence d'une prolifération cellulaire de certains tissus (peau, système nerveux, os, vaisseaux..) et par une augmentation du risque de tumeurs malignes.
- La structure de la neurofibromine contient une région présentant une importante homologie avec les protéines GAP, comme évoqué précédemment. Ces protéines jouent un rôle de régulation négative du proto-oncogène RAS (régulateurs positifs de la prolifération cellulaire).
- L'étude de tumeurs et des mutations somatiques chez les patients NF1 montre l'existence de perte d'hétérozygotie dans les tumeurs bénignes ou malignes (*Wolkenstien P. 2001*). La recherche de la perte d'hétérozygotie est un moyen fréquemment utilisé pour étudier les tumeurs dans la NF1.

Selon le modèle de Knudson, deux mutations sont nécessaires à l'apparition de tumeurs malignes. La première mutation héritée d'un gène suppresseur de tumeur est souvent une mutation ponctuelle ou une altération minime. En revanche la seconde survient secondairement au sein de la cellule à partir de laquelle se développera la tumeur (Pinson et Wolkenstien 2004).

V. 6. Présentation clinique de la neurofibromatose 1

Nous pouvons distinguer dans la NF1 :

- Les signes cliniques majeurs.
- Les signes cliniques mineurs.

a) Les signes cliniques majeurs

Ils constituent des critères diagnostiques de la NF1 :

- **Les tâches café au lait**

Les taches café au lait (TCL) sont parmi les premières manifestations de la NF1. Elles sont des macules pigmentées bien circonscrites, Leur répartition est aléatoire, retrouvées sur l'ensemble du corps à l'exception des paumes de mains, des plantes de pieds et des organes génitaux, la lésion classique est bien délimitée avec des frontières lisses et homogènes et leurs teintes est marron plus ou moins foncées parfois à la limite de la visibilité. Leur diamètre est de 0,5 à 50 cm. Elles peuvent être présentes dès la naissance ou apparaître au cours des deux premières années, elles sont présentes chez 80% des patients avant l'âge d'un an (Meucke et al 1994). Elles deviennent, au cours de la vie, souvent plus pâles jusqu'à disparaître pour certaines.

Les pigments des TCL proviennent des mélanocytes, qui dérivent de la CN, dont la concentration en mélanine et en macro-mélanosomes est augmentée. Toutefois le nombre de mélanocytes n'est pas plus important au niveau des TCL qu'au niveau du reste de la peau.

Les TCL ne sont pas spécifiques de la NF1 et sont retrouvées assez fréquemment au nombre de une à trois lors de l'examen clinique d'enfants dans la population générale. Elles s'intègrent également dans le tableau clinique d'autres syndromes tels que les syndrome de MacCune Albright, syndrome de Watson, syndrome des TCL familiales (Greinwald et al., 1996 ; Heuze et al., 2002). La taille et le nombre de TCL sont donc des paramètres importants à considérer, car ces tâches constituent un des meilleurs signes diagnostiques de NF1.



Fig. 21 : Taches « café au lait » (TCL) et les lentigines au niveau du pli axillaire. (Wolkenstein 2001).

- **Les lentigines**

Les lentigines ou « *éphélides* » désignent des TCL de petite taille qui siègent électivement dans les plis axillaires, dans les plis inguinaux et sous-mammaires. Nous les retrouvons aussi dans le cou. Rarement présentes avant l'âge de deux ans, leur prévalence est d'environ 80 % à l'âge de six ans (Gutmann et al., 1997 ; Pinson S. et al., 2002). Elles permettent souvent dans l'enfance de poser le diagnostic chez un jeune enfant porteur de nombreuses TCL.

- **Les nodules de Lisch**

Les nodules de Lisch sont de petits hamartomes iriens qui n'entraînent aucun trouble de la fonction visuelle. Ils apparaissent avec l'âge et sont trouvés chez la majorité des patients : ils sont trouvés chez seulement 10 % des sujets avant 6 ans et sont présents dans plus de 90 % des cas, après 16 ans. Leur taille et leur nombre augmentent avec l'âge. Leur présence est quasi pathognomonique de la NF1 (Wolkenstein et al. 1998; Ruggieri et al.,1999), et leur détection nécessite un examen minutieux à la lampe à fente fait par un ophtalmologiste.

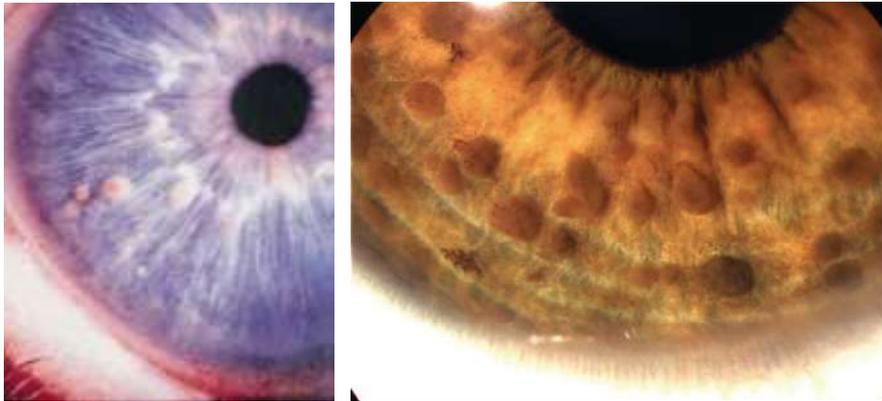


Fig. 22 : Nodules de Lisch (Pinson et al.2001) ; (Cackett et al.2004).

- **Les neurofibromes (NF)**

Ce sont des tumeurs bénignes composées d'un mélange de divers types cellulaires : les cellules de Schwann, les axones, les fibroblastes, les mastocytes, les cellules endothéliales et les cellules péri-neurales. Il y a donc ici implication de cellules dérivant des CN, aussi ces tumeurs s'appellent les tumeurs de gaines des nerfs périphériques (Shyra et al., 2009). Presque tous les patients porteurs de NF1 développent des neurofibromes durant leurs vies, mais le nombre, la taille et l'âge auquel débutent ces tumeurs sont totalement imprévisibles (Jebblaoui et al. 2006).

1 - Les neurofibromes cutanés

IL s'agit de tumeurs bénignes. Elles sont rares dans la petite enfance, apparaissent généralement pendant la pré-adolescence et sont exceptionnellement absents à l'âge adulte : 95 % des adultes atteints de NF1 en sont porteurs. Ces tumeurs peuvent représenter la manifestation la plus visible de la maladie mais ne se transforment pas en tumeurs malignes. À l'examen clinique, ce sont des petites tumeurs molles, en forme de dôme, mobiles avec la peau, douces, charnues et de couleur de peau légèrement hyperpigmentée (Kevin et al. 2009). Lorsque ces neurofibromes sont peu nombreux ou atypiques, un examen histopathologique peut aider au diagnostic. La grossesse correspond parfois à une période évolutive de la maladie où les neurofibromes cutanés ont tendance à augmenter en taille et en nombre.

2- Les neurofibromes nodulaires (sous-cutanés)

Les neurofibromes nodulaires périphériques ou neurofibromes sous-cutanés qui sont plus fermes, plus élastiques et peuvent être tendus et douloureux (Wolkenstein et al.1998). Ils sont présents à l'âge adulte chez environ 20 % des malades. Ils apparaissent rarement avant la seconde enfance et se développent à partir de troncs nerveux plus importants que les neurofibromes cutanés. Ils sont plus palpables que visibles, bombant sous la peau, sphériques ou ovoïdes, isolés ou en chapelet, fermes, toujours sensibles ou douloureux à la pression. Ils sont à plus grand risque de transformation maligne (Orpha.net NF1/pdf 2006).

3 - Les neurofibromes plexiformes

Il s'agit de tuméfactions mixtes cutanées et sous-cutanées de taille très variable pouvant varier de quelques centimètres à plusieurs dizaines, voire s'étendre à tout un segment corporel). La peau en regard est toujours anormale, mélange d'hypertrophie, d'hypertrichose et de pigmentation marron parfois rosée angiomateuse. Ces neurofibromes plexiformes sont le plus souvent mous, de texture irrégulière. Ils sont généralement présents à la naissance puis tendent à se développer à partir de l'adolescence, et habituellement d'un seul côté. Une transformation maligne de ces tumeurs est possible. Elles sont retrouvées chez 20 à 25 % des malades.

Certains neurofibromes plexiformes qualifiés de nodulaires ont l'aspect de multiples neurofibromes sous-cutanés, regroupés en grappe, en cordons disposés le long de tronc nerveux entraînant une tuméfaction sur le trajet des nerfs crâniens V, VII, IX et XII ainsi que du sympathique cervical, et associé à une ptose réactionnelle des tissus mous adjacents, il y a d'autres classements cliniques de ces neurofibromes (voir Fig. 18I).



Fig.23: Neurofibromes :A)- Neurofibrome plexiforme avec déformation des structures osseuses (Wolkenstein et al.1997) ; B) – Neurofibrome plexiforme cranio-orbitaire (Bharat et Karamvir.2013) ; C) - neurofibrome cervical (Bachelet et al.2015).

Ils sont fermes, sensible, (voire douloureux) comme les simples neurofibromes sous-cutanés isolés dont ils constituent les formes majeures. À la palpation, on retrouve typiquement des cordons durs, élastiques, indolores représentant l'épaississement des rameaux nerveux inclus dans une matrice extracellulaire de collagène (Jeblaoui Y. et al., 2006). Développés en réseau sous-cutané à partir des racines nerveuses, ces neurofibromes plexiformes nodulaires peuvent être superficiels ou profonds, avec un risque de compressions sévères selon leurs localisations (neurofibrome intradural et compression médullaire, médiastinale...). Localisés près des structures osseuses, ils peuvent entraîner des anomalies de la croissance des os longs ou une ostéolyse en regard de la tumeur. Par conséquent, ils peuvent avoir des conséquences fonctionnelles et esthétiques non négligeables (Friedman JM. et al.,1997 ; DeBella K. et al., 2000).

□ **Le gliome des voies optiques**

Le gliome des voies optiques est la tumeur intracérébrale la plus fréquente au cours de la NF1. Histologiquement, il s'agit d'un astrocytome pilocytique. Il touche principalement les nerfs et/ou le chiasma optique et peut s'étendre le long des voies optiques rétro-chiasmatiques.

Cette complication s'exprime cliniquement chez le jeune enfant, vers l'âge de six ans en moyenne. L'incidence estimée des gliomes des voies optiques chez les patients NF1, asymptomatiques et symptomatiques, est proche de 15%. La découverte d'un gliome des voies optiques commande une enquête diagnostique NF1 car 25 à 50 % des gliomes des voies optiques sont associés à une NF1 (Nf1.orpha.net 2).

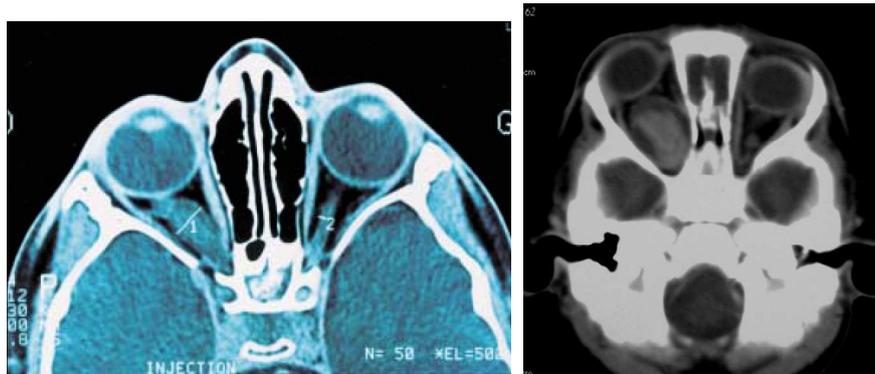


Fig. 24 : Gliome des voies optiques (Pinson et al.2001) ;(Wolkenstein .2001).

b) Les signes cliniques mineurs

Des signes cliniques mineurs peuvent être associés de façon significative à la NF1 mais ne sont pas indispensables au diagnostic (Reccardi VM. et al., 1992). Parmi eux, on distingue :

I- Les lésions crânio-encéphaliques :

- i)- ***La macrocéphalie*** : se traduit par une augmentation globale du volume de la substance blanche (**mégalencéphalie**), le cerveau étant normal par ailleurs. Définie cliniquement par un périmètre crânien supérieur au 75^{ème} percentile, la macrocéphalie peut être symétrique ou asymétrique. La signification pathologique reste débattue. Elle est mise en relation avec des troubles de l'apprentissage.

- ii)- ***Les lésions dysplasiques intra-parenchymateuses*** : elles sont retrouvées chez 50 à 70% des enfants et adultes jeunes atteints de NF1. Encore appelés OBNI (objets brillants non identifiés), il s'agit d'hamartomes, bien circonscrits, ronds ou ovalaires, et asymétriques. Ils forment des zones d'hypersignal par rapport au parenchyme cérébral adjacent sur les séquences en pondération T2. Elles peuvent se situer au niveau des noyaux gris centraux, de la capsule interne, du thalamus, du cervelet et du tronc cérébral. Ces OBNI disparaissent habituellement avec l'âge et sont rarement observés après 30 ans (Rosenbaum et al., 1999) Leur signification reste mal connue, leur nombre et leur localisation ne sont pas corrélés aux troubles des apprentissages et les troubles cognitifs observés chez 40% des enfants atteints de NF1 (Encyclopédie Orphanet, 2006), les **OBNI** seraient plus fréquents en présence d'une tumeur des voies optiques, et parfois elles posent des difficultés de diagnostic avec une tumeur (Fig 25).

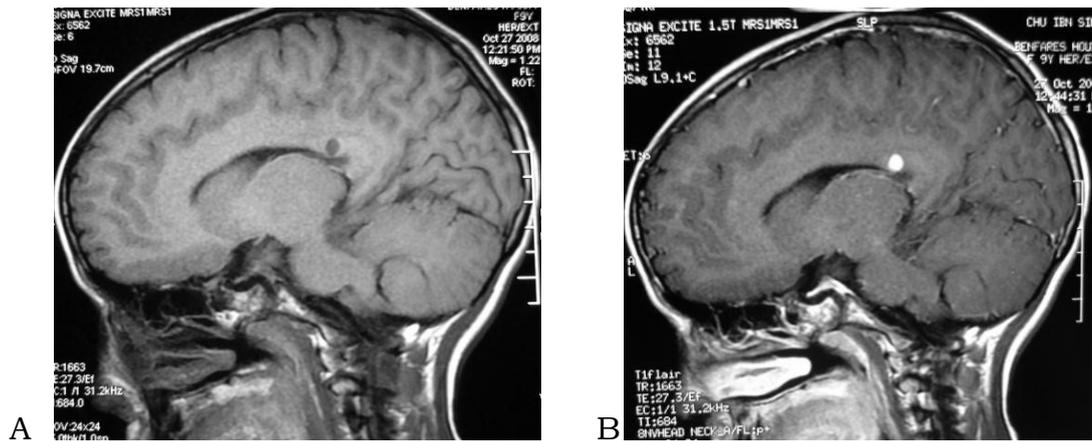


Fig.25: Les lésions **OBNI** du corps calleux en hypo signal T1 (A), rehaussé après injection (B). (BENCHAKROUN et DAFIRI « NF1 de la tête au pied » Service de radiologie HEM, MAROC) fichier .pdf disponible gratuitement en ligne.

➤ iii)- **Les atteintes osseuses spécifiques :**

1. Les dysplasies des os longs

La dysplasie des os longs existe à la naissance et se détecte avec l'apparition d'une déformation de l'os au cours de la croissance (Pinson et Wolkenstein. 2005). Elle atteint préférentiellement le tibia ou du radius. Les manifestations cliniques peuvent être précoces (courbure congénitale d'une jambe) ou n'apparaître qu'à la marche. Ces dysplasies sont souvent révélées par des fractures avec pseudarthroses secondaires.

2. La dysplasie osseuse du crâne comprend :

a-Les lacunes de la voûte qui sont des plages d'ostéolyse bien limitées, d'origine dysplasique.

b-L'hypoplasie de la grande aile du sphénoïde est une découverte non spécifique mais très suggestive de NF1. Elle cause un déficit dans la paroi orbitaire postérieure, avec possibilité d'une hernie du lobe temporal dans l'orbite. Cliniquement, on peut observer une exophtalmie pulsatile, un ptosis

plus ou moins important, une baisse d'acuité visuelle voire une cécité (Muecke M. et al 1994) En tomodynamométrie TDM, Un défaut de la grande aile du sphénoïde s'associe à un élargissement antéro-postérieur de la fosse crânienne moyenne. Nous retrouvons parfois une *hémihypertrophie* homolatérale *du crâne* alors que les cellules ethmoïdales et le sinus maxillaire homolatéraux sont hypoplasiques. La selle turcique peut être élargie également, et inclinée du côté de la dysplasie sphénoïdale, sans pathologie hypophysaire associée. Les dysplasies des ailes sphénoïdes sont congénitales. En général, elles sont unilatérales et non évolutives, mais sont souvent accompagnées d'un neurofibrome plexiforme orbitaire. Bien qu'elles soient rares (moins de 1 % des cas de NF1), elles sont très évocatrices. Dans le même contexte, au niveau de la fosse crânienne moyenne, la dysplasie osseuse du rocher associée à un élargissement du conduit auditif interne sur l'IRM est évoqué même sans schwannome vestibulaire ni ectasie durale associés (Kitamura et al. 1989).

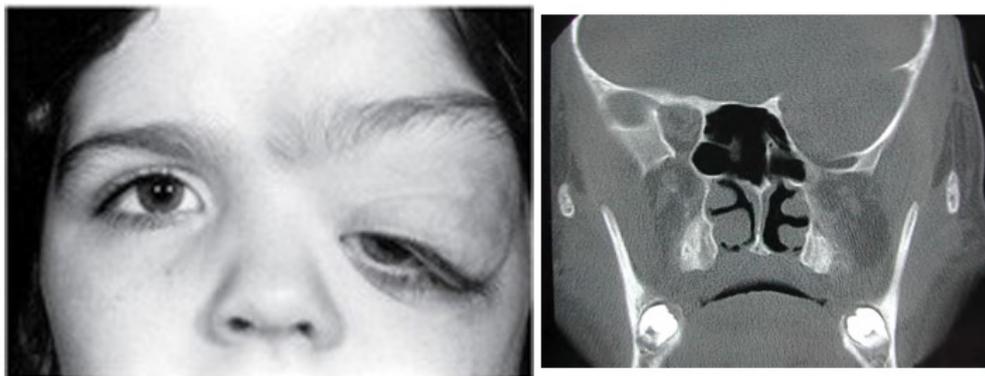


Fig.26: Aspect clinique et d'imagerie TDM d'une dysplasie sphéno-orbitaire (Meucke et Amedee. 1997).

3. La dysplasie vertébrale

Les dysplasies vertébrales les plus caractéristiques sont l'accentuation de la concavité postérieure (ou antérieure) de certains corps vertébraux aboutissant à une cypho-scoliose, avec un amincissement des pédicules, et un élargissement des trous de conjugaison. C'est un signe très évocateur de NF1 (Pinson et Wolkenstein.2005)

II- les anomalies thoraciques : pectus excavatum , pectus carinatum (20-30% des cas) ;

III- les xanthogranulomes juvéniles ;

IV- Une petite taille avec un bilan endocrinologique normal (dans 30% des cas), ou des manifestations représentées par le phéochromocytome (tumeur des glandes surrénales) conduisant à une hypertension artérielle.

V.7. Le diagnostic de la Neurofibromatose 1

Selon les critères diagnostiques du consensus du *National Institute of Health* (NIH) définis lors de la conférence de consensus de Bethesda aux USA en 1988 :

- 1 - Atteinte d'un apparenté du premier degré
- 2 - Au moins six taches café au lait :>15 mm après la puberté
> 5 mm avant la puberté
- 3 - Lentigines : axillaires ou inguinales
- 4 - Au moins un neurofibrome plexiforme,
ou deux neurofibromes quel que soit le type

- 5 - Gliome du nerf optique
- 6 - Au moins deux nodules de Lisch (hamartome irien)
- 7 - Une lésion osseuse caractéristique : pseudarthrose, dysplasie du sphénoïde, amincissement de la corticale des os longs

Le diagnostic de NF1 est retenu s'il y a association d'au moins deux de ces sept critères.

V.8. Les complications de la Neurofibromatose 1

De nombreuses complications sont retrouvées dans la neurofibromatose de Von Recklinghausen. Elles peuvent être neurologiques, ophtalmologiques, cutanées, orthopédiques, cardiovasculaires, viscérales ou encore tumorales. Dans 50 % des cas, ces tumeurs correspondent à des tumeurs du système nerveux central de type varié, à savoir, épendymome, astrocytome, médulloblastome, méningiome, gliome, mais dont un tiers sont des gliomes des voies optiques.

- Les troubles des apprentissages sont les complications les plus fréquentes, Il s'agit de difficultés de concentration et le retard de parole et de langage.
- Les complications des NF plexiformes sont les plus fréquentes, après les complications cognitives, et sont responsables de la gravité de la NF1. Ils ont un risque de dégénérescence sarcomateuse (Upadhyahya et al 1998).
- Les complications osseuses sont parfois révélatrices de la NF1 et se révèlent par des fractures à répétition et par une pseudarthrose (Crossett et al. 2005).

- Les complications endocrinologiques peuvent survenir telle une puberté précoce, en particulier chez les malades présentant un gliome du chiasma optique.

- Les complications vasculaires comprennent soit des sténoses, soit des anévrismes pouvant induire des hémorragies sub-arachnoïdiennes, des dysplasies artérielles pariétales fibro-musculaires étant fréquentes et peuvent toucher l'aorte, les artères cérébrales, digestives-mésentériques, pulmonaires et rénales (Pinson et al. 2002).

- Les tumeurs cancéreuses au cours de la NF1 sont rares mais graves et plus souvent après l'âge de 10 ans. Les tumeurs malignes des gaines nerveuses (anciennement neurofibrosarcome) constituent la principale complication de la NF1 à l'âge adulte. Elles se développent à partir de neurofibromes nodulaires isolés ou plexiformes. D'autres cancers tels que les glioblastomes, les leucémies, le rhabdomyosarcome, la tumeur carcinoïde du duodénum, le phéochromocytome malin, le neuroblastome, le néphroblastome (tumeur de Wilms), l'ostéosarcome peuvent se développer sur un terrain de la NF1.

Complications	%	Âge
Peau <ul style="list-style-type: none"> • Neurofibromes plexiformes • Xanthogranulome juvénile 	30 à 39 1 à 2	< 5 ans enfance
Œil <ul style="list-style-type: none"> • Gliome des voies optiques (Symptomatiques) 	15 2 à 4	petite enfance
Squelette <ul style="list-style-type: none"> • Pseudarthrose 	3 à 4	Enfance

• Scoliose nécessitant chirurgie	2 à 4,4	Enfance, adolescence
Systeme nerveux		
• Difficultés d'apprentissage	33 à 70	Enfance
• Épilepsie	6 à 7	Enfance
• Hydrocéphalie	1,5 à 2,6	Enfance
Cancers		
• Neurofibrosarcome	3 à 4	adolescence, adulte
• Leucémie	< 0,1	
• Tumeur carcinoïde	0,6 à 1,5	
Phéochromocytome	< 1	adulte

Tableau 4: Fréquence des complications des malades atteints de NF1 en fonction de l'âge. (Pinson et Wolkenstein. 2005)

V.9. Le Traitement de la Neurofibromatose 1

Il n'existe pas de traitement spécifique de cette maladie et ni de moyens pour empêcher l'apparition des manifestations cliniques chez les personnes porteuses de mutations du gène. L'apparition de complications doit faire l'objet d'une surveillance attentive afin de les traiter dans la mesure de possible, soit chirurgicalement, soit par chimiothérapie pour les gliomes optiques, soit par laser dans le cas des neurofibromes cutanés. Il convient d'établir une surveillance clinique régulière pour les dépister, selon une périodicité qui est fonction de l'âge du malade. L'approche clinique a été recommandée lors de la Conférence de Consensus de *National Institute of Health* (NIH). Par contre le dépistage paraclinique systématique quand il vise des malades asymptomatiques, tel que la tomodensitométrie et l'imagerie par

résonance magnétique cérébrale, l'électroencéphalogramme, et les potentiels évoqués a peu de valeur.

Concernant la chirurgie des neurofibromes plexiformes, la majorité des chirurgiens admet la difficulté de cette chirurgie devant la difficulté de la dissection, l'importance du risque hémorragique (tout geste chirurgical s'expose à un saignement important, surtout lorsque le neurofibrome est volumineux). Le problème est de contrôler ce saignement péri-opératoire et une anémie aigue secondaire. En outre, du fait de la fréquence des récives, les résultats sont souvent décevants et instables. Il n'existe pas de conduite à tenir claire quant au moment de la chirurgie (Jeblaoui et al. 2006). De plus, ses résultats peuvent avoir un retentissement esthétique important et altérer considérablement la qualité de vie des malades.

V.10. Le Diagnostic Génétique de la NF1

Une analyse génétique peut être réalisée sur les chromosomes de l'embryon durant la vie utérine. Ce diagnostic prénatal est possible si on suspecte chez le fœtus, une mutation identifiée chez le parent atteint. Sinon c'est la méthode indirecte par l'analyse de biologie moléculaire qui s'effectue sur les membres de la famille, pour les formes familiales. Quant aux cas sporadiques, la néomutation ne peut être avérée que si les deux parents sont soumis à un examen clinique soigneux afin d'éliminer même les formes mineures.

Le test génétique prénatal est réalisé après soit une biopsie du trophoblaste à 12 semaines d'aménorrhée, soit par prélèvement des cellules amniotiques à travers l'amniocentèse à 16 semaines.

L'autre possibilité de diagnostic, surtout chez les embryons obtenus par fécondation *in vitro*, est réalisée avant implantation dans l'utérus. Pour ce diagnostic préimplantatoire les analyses de biologie moléculaire ou de cytogénétique sont réalisées sur une à trois cellules prélevées chez l'embryon de trois jours.

Les deux techniques de diagnostic évoquées précédemment, permettent uniquement de dire si le fœtus a reçu ou non le gène muté. Cependant, dans la pratique, les manifestations cliniques de la neurofibromatose de type 1 sont très variables, y compris au sein de la même famille. Actuellement, seules les délétions contenant l'ensemble du gène *NF1* et la région adjacente du génome semblent être corrélées avec un tableau clinique particulièrement sévère : dysmorphie faciale, nombreux neurofibromes cutanés d'apparition précoce, troubles de l'apprentissage et/ou retard mental (Jouhilahti et al. 2011). À l'exception de ces grandes délétions, il est impossible actuellement de prédire à l'avance la gravité de cette maladie.

Comme nous avons précédemment vu qu'il n'existe pas, ou il y a un très peu, de corrélation phénotype-génotype pour caractériser la gravité et la diversité des manifestations, d'une part, et la nature des anomalies génétiques de ce gène, de l'autre. Par conséquent, il n'est pas exclu que ces variabilités phénotypiques puissent être dues à des gènes

modificateurs ou des régulations épigénétiques qui pourraient intervenir dans le déclenchement de la pathologie de la NF1 (Pasment et al. 2012).

VI- MODULATION EPIGENETIQUE DE L'ACTIVITE DU GENE

NF1

Au cours de développement embryonnaire, l'activité de facteurs trophiques ou transcriptionnels essentiels à la différenciation de cellules de la CN (CCN) peut faire l'objet de régulations épigénétiques. Durant ces dernières années, des preuves croissantes se sont accumulées en faveur d'un rôle important de ces molécules de régulations épigénétiques comme un mécanisme supplémentaire qui assure un contrôle spatio-temporel de l'expression des gènes à différents stades de développement des CCN. Ces régulations s'opèrent sans modifier la séquence sous-jacente de l'ADN, à travers de processus régulant la conformation de la chromatine et impliquent des modifications des histones.

En fonction du type de régulation, son rôle peut conduire soit à l'activation du gène, en permettant l'accès à l'ADN pour les facteurs de transcription, soit à la répression des gènes lorsque la configuration de la chromatine rend l'ADN inaccessible aux régulateurs de transcription. Les modificateurs épigénétiques, tant les «*Writers*» que «*Eracers*» établissent un code épigénétique, et constituent des régulateurs cruciaux tant pour les événements de développement normal que dans de nombreux types de cancers et d'états pathologiques (Hu et al., 2014).

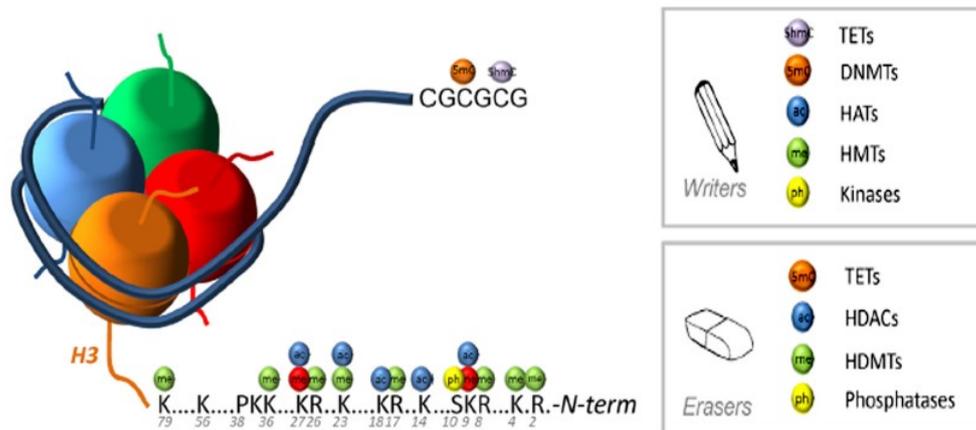


Fig.27: Schéma des différentes marques épigénétiques identifiés sur histone H3 (contenu dans le nucléosome~146 bp) et de l'ADN : TETs: Ten-Eleven translocation enzymes; DNMTs :DNA-methyltransferases; HATs: histone acetyl-transferases; HDACs: histone deacetylases; HMTs: histone methyltransferases; and HDMTs: histone demethylases (Hu et al., 2014).

Les Histone Désacétylases (HDACs) sont parmi ces régulateurs épigénétiques. Il s'agit d'enzymes régulant le statut d'acétylation de l'histone, à travers l'altération de l'architecture de la chromatine. Ainsi elles jouent un rôle essentiel dans la différenciation et la morphogenèse (Murko et al., 2010), mais aussi dans la régulation de migration des CCN (Hu et al., 2014). L'action des (HDACs) s'oppose à l'action des molécules de l'Histone transferases (HATs). L'acétylation réversible des histones est un processus dynamique qui régule l'affinité des histones pour l'ADN. L'enjeu de cette réaction biochimique est de contrôler la répartition des charges à la surface de histones, et leur conformation tertiaire. L'addition d'un fragment « acétyle » à l'extrémité N-terminale de l'histone, réduit son affinité pour l'ADN, favorise ainsi l'accès des facteurs de transcription et des ARN polymérase. Les HDACs en supprimant les fragments d'acétyle à l'extrémité de l'histone, entraînant une réduction globale de la transcription, alors que

les HATs ont pour résultat d'augmenter l'accessibilité des facteurs de transcription et des ARN polymérase. Cet équilibre entre activation et répression est contrôlé par les actions antagonistes de ces deux grandes familles des enzymes, les HDACs, d'une part, et les HATs, d'autre part. Ainsi les HATs sont généralement identifiées comme co-activateurs transcriptionnels. Par contre, les HDACs ont été identifiés comme co-répresseurs de la transcription (Murko et al., 2010 ; Hu et al., 2014).

Il existe 18 HDACs, elles sont classées en quatre groupes en fonction de leur homologie avec les protéines de levure (Murko M. et al., 2010). Les HDAC de classe I sont principalement localisées dans le noyau tandis que les HDACs de classe II se déplacent entre le noyau et le cytoplasme. L'analyse de perte-de-fonction indique que les HDAC de classe I joue un rôle prédominant dans la survie et la prolifération cellulaire, alors que les HDAC de classe II peuvent exercer des rôles plus spécifiques selon les tissus où elles sont activées (Dokmanovic et al., 2007).

Les HDACs de classe I et II fonctionnent comme un complexe multiprotéique qui n'agit pas directement sur l'ADN. Ce complexe comprend des facteurs de transcription aux fonctions diverses, y compris des co-répresseurs comme Sin3, co-répresseur des récepteurs nucléaires N-CoR, médiateur de mise en silence pour l'acide rétinoïque et les récepteurs de l'hormone thyroïde et des protéines de ré-modulation de la chromatine. (Dokmanovic et al. 2007).

La famille de HDACs de classe I comporte les molécules suivantes : HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8. L'inactivation

sélective de chaque membre de cette classe conduit à la létalité dans tous les cas, ce qui suggère les rôles essentiels de chaque HDAC pour initier ou contrôler des programmes ontogéniques vitaux (Murko et al. 2010).

Dans les souris transgéniques où le gène *HDAC1* est muté, les embryons meurent avant le jour embryonnaire E10.5, en raison de défauts de prolifération graves et un retard de croissance générale. L'importance de cette molécule pour le développement des dérivés de la CN a été plus particulièrement illustrée chez le poisson zèbre, où la mutation de *HDAC1* entraîne une réduction sévère du nombre de mélanoblastes, ainsi que des défauts majeurs de la chondrogenèse au niveau craniofacial et au niveau des ABs (Ignatius et al., 2013). De plus, des perturbations du système nerveux périphérique et notamment de la différenciation neuronale dans les ganglions entériques et sympathiques sont également observées (Ignatius et al., 2013).

L'inactivation du gène *HDAC2* chez la souris entraîne la mort des souriceaux dans le premier jour qui suit la naissance en raison de malformations cardiaques graves, associées à un excès en prolifération des cardiomyocytes ventriculaires (Murko et al. 2010);

L'inactivation du gène *HDAC3* provoque une létalité embryonnaire dès E9.5, chez la souris, en raison de défauts de gastrulation (Knutson et al. 2008);

L'inactivation du gène *HDAC8* conduit à des déficits très spécifiques des cellules de la CN, et notamment de la voute crânienne. Cette

mutation entraîne la mort périnatale en raison de traumatismes crâniens causés par l'instabilité du crâne (Hu et al., 2014) ; (Jacob C. et al., 2014).

Classe I				
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8
Taille en acides aminés (aa)	483	488	428	377
Localisation sur les chromosomes	1p34.1	6q21	5q31	Xq13
Phénotypes des souris « Knock-out »	.Défauts - mélanoblastes -craniofaciales - glie&neurones périphériques .Augmentation en P21, p27	.Défauts cardiaques .	.Malformations associées à la gastrulation	.Malformations crânio-faciales graves

Tableau 5: les caractères de classe I de famille HDACs (Dokmanovic et al. 2007) ; (Murko et al. 2010).

Quant aux rôles des HDAC de classe II dans la biologie de la CN, on peut mentionner le rôle important qu'exerce HDAC4 chez le poisson zèbre. Ce gène est normalement activé de façon prépondérante dans

les CCNs, et son inactivation génère des fentes faciales et palatines, associées à l'absence ou une sévère réduction de l'éthmoïde (DeLaurier et al., 2012).

Par conséquent, les HDACs effectuent des fonctions importantes dans le contrôle de l'expression des gènes. Leur activité affecte de nombreux aspects du développement des CCN allant des étapes précoces de leur migration à leur différenciation tardive. Or, comme nous l'avons vu précédemment, le gène *NF1* a un rôle inhibiteur de la voie RAS qui exerce une régulation importante sur le développement en stimulant la prolifération cellulaire. De plus, le gène *NF1* exerce un rôle important dans la mise en place de nombreux types cellulaires et tissus (Daston et al., 1992). Cependant les données acquises en pathologie humaine soulignent une implication quasi exclusive dans la biologie des CCN. Nous avons donc cherché à comprendre les bases embryologiques des altérations phénotypiques dans les cellules dérivées de la CN, qui résultent de l'inactivation de *NF1* afin de tenter d'éclairer les mécanismes de cette pathologie. Au moyen d'un modèle expérimental, nous avons souhaité comprendre comment l'intégration des différents processus morphogénétiques et des régulations épigénétiques peut affecter le comportement migratoire ainsi que le maintien et/ou la restriction de la pluripotentialité des CCN pour finalement générer les manifestations cliniques de cette maladie.

Objectifs spécifiques de l'étude

Bien que cette maladie de NF1 soit largement étudiée dans son contexte génomique, les mécanismes par lesquels les différents types de tumeurs apparaissent restent à élucider. L'analyse des signaux moléculaires impliqués dans la survie, la prolifération et la différenciation des CCN est crucial pour appréhender les dérives tumorales de ces cellules et les processus pathologiques de cette maladie.

La problématique de la NF1 est, comme on l'a dit, qu'il n'existe pas (ou peu) de corrélation Phénotype-Génotype entre la gravité des manifestations cliniques et les anomalies génétiques. Dès lors, les diversités phénotypiques observées pourraient être dues à la présence de gènes modificateurs et/ou à des régulations épigénétiques qui interviendraient dans le déclenchement de la maladie (Pasement et al. 2012).

Notre projet a consisté à approfondir la compréhension des bases embryologiques de cette pathologie. Nous avons pour cela mis au point un modèle expérimental original dans lequel nous pouvons analyser des interactions développementales et les régulations épigénétiques du gène *NF1*, notamment les (HDACs), dans les CCN de façon très spécifique. En effet, nos expériences ont reposé sur l'utilisation des embryons aviaires. Ce modèle, de part son accessibilité à tous les stades du développement, nous permet de :

I- Analyser **les conséquences de l'invalidation du gène *NF1* par silencing** (par l'ARN interférant) sur

- le **comportement des cellules de la CN**, leur prolifération, leur capacité de migration et leur potentiel de différenciation

- leur réponse aux **signaux morphogénétiques**

II- Vérifier **la compatibilité de l'embryon de poulet** comme modèle expérimental produisant des manifestations pathologiques de la *NF1* dès les **précoces stades de développement**

III- Etudier **le rapport moléculaire** entre **la *NF1* et les autres types de la Neurofibromatose**.

IV- Analyser **l'impact des modulations épigénétiques de l'activité du *NF1***.

II- Matériels et Méthodes

Le programme de recherche, que j'ai développé au cours de ma thèse, a reposé sur l'utilisation de l'embryon de poulet comme modèle expérimental. Ce modèle permet, d'une part, l'accessibilité à l'embryon à tous les stades du développement, et, d'autre part, la combinaison d'approches expérimentales telles que celle de l'embryologie classique utilisant la microchirurgie *in ovo* (pour des expériences d'ablations ou de greffes), de traçage des lignages cellulaires (chimères embryonnaires) et de transgénèse localisée dans un tissu donné et contrôlée spatio-

temporellement (par électroporation *in ovo* des séquences nucléiques exogènes).

Au cours de mon étude, j'ai plus particulièrement utilisé cette dernière technique, afin de réaliser des expériences de perte de fonction des gènes d'intérêt, notamment les gènes *NF1* et *HDAC8* en injectant de l'ARN interférant dirigé contre le transcrite de ces gènes dans la gouttière neurale, lors de formation des CCN, ensuite en utilisant l'électroporation bilatérale (Pekarik et al., 2003), puis de suivre les conséquences de cette perte de fonction sur le développement de l'embryon.

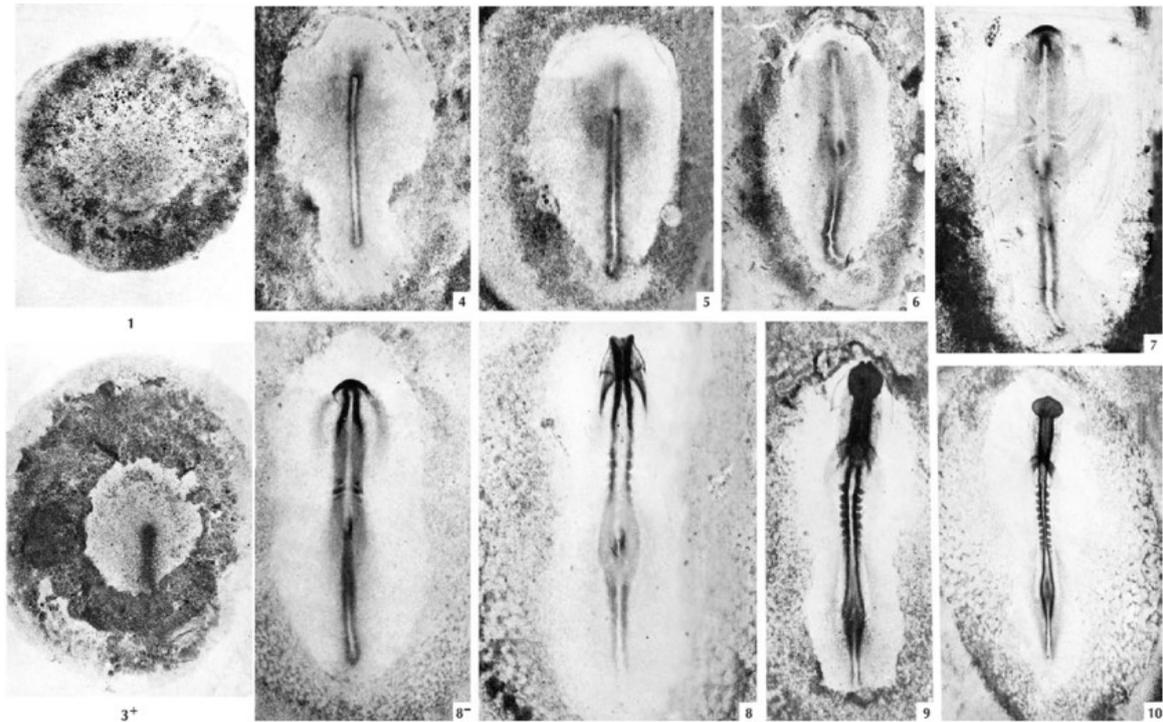
En fait, l'analyse de perte de fonction dans des modèles animaux (essentiellement aviaires embryons, *Xenopus* et zebrafish) ont établi un réseau de gènes régulateurs de la crête neurale chez les vertébrés (*gene regulatory network, GRN*) (Sauka-Spengler et Bronner-Fraser. 2008) dans laquelle l'inhibition des composants individuels de la transcription dans les CCN induites conduit à des phénotypes sévères. De manière surprenante, les souris mutantes –pour les mêmes gènes- ne présentent souvent les phénotypes comparables, au moins dans les premiers stades de développement de la crête neurale (Barriga et al. 2015).

Par ailleurs, l'ARN interférant transfectés chez les mammifères entraîne souvent un blocage non-spécifique de la synthèse de protéine (Wianny et al. 1999), alors que, chez le poulet, l'ARNi conduit à une inactivation hautement spécifique (Pekarik et al. 2003).

I - MODELE EXPERIMENTAL

Pour toutes les manipulations, nous avons utilisé des embryons de poulet de souche JA57 fournis chaque semaine par un couvoir spécialisé dans la production d'œufs embryonnés, et agréé par les services vétérinaires pour la recherche avicole (Ets Morizeau-Les Bruyeres, Eure et Loire).

Les œufs embryonnés sont placés en incubation dans une couveuse (SMA, Coudelou) à $38^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ et en atmosphère humide 60-70% de façon à maintenir leur développement, jusqu'aux stades requis pour l'expérimentation. Le stade de développement des embryons est déterminé en fonction des critères définis par Hamburger et Hamilton (HH ; Hamburger et Hamilton, 1951, Tableau 6), auxquels correspond un temps de développement exprimé en heures ou en jours d'incubation. Pour plus de précision aux stades précoces de l'ontogenèse, et plus particulièrement dès lors des premières étapes de la neurulation, l'état de développement d'un embryon est déterminé en fonction du nombre de paires de somites (stade somitique, ss) visibles de part et d'autre du névraxe.



Poulet <i>Stades de Hamburger et Hamilton</i>			Homme <i>Stades de Carnegie</i>
Stade H-H	Temps	Somites	
3+	13-15 heures	0	
5	19-22	0	
7	23-26	1	
8	26-31	4	
9	29-33	7	
10	33-38	10	
11	40-45	13	
12	45-49	16	13
13-14	48-53 E2	19-22	(28-30
15-16	50-56	24-28	jours)*
16-18	51-68 E2,5	26-36	
19-20	68-72 E3	37-43	14-15
21-22	3,5- 4 jours	44	(31-33 j)
23-24	4 -4,5 j E4		16
25	4,5 - 5j		(37 j)
26	5j E5		17-18
			(41-44 j)
30-31	7-7,5 j E7		20
			(50 j)
35	8,5- 9 j		22

			(54 j)
36-37	10-11 E10	j	23 (56 j)
40	14 E14	j	
46	20-21 E20,5	j	

Tableau 6: Séries de stades du développement de l'embryon de poulet de la gastrulation à la neurulation, suivant la table de Hamburger et Hamilton (1951), Tableau montrant le développement en somites, heures et les stades correspondant chez l'embryon humain (*jours postovulatoire) d'après la table de Carnegie.

II – OBTENTION DES EMBRYONS TEMOINS ET EXPERIMENTAUX

II. 1. Manipulation des embryons *in ovo*

Pour réaliser les expériences chez les embryons aviaires, la coquille de l'œuf est percée à l'aide de ciseaux fins et courbes sur l'extrémité large de l'œuf où se trouve la poche d'air, puis secondairement, une ouverture circulaire est pratiquée sur la coquille à sa partie supérieure afin de réaliser une ouverture suffisante pour pouvoir manipuler l'embryon. Après l'ouverture de la coquille et avant toute manipulation, quelques gouttes d'une solution saline de tampon phosphate équilibré (PBS, *Phosphate buffer saline* ; Invitrogen) additionnée d'antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine ; Sigma) sont déposées sur la membrane vitelline afin de préserver l'embryon du dessèchement et de la contamination par des bactéries.

II. 2. Technique de transgénèse localisée par électroporation in ovo

A la différence de modèles mammifères, où la transgénèse est systémique et portée à l'échelle de l'embryon entier, les approches fonctionnelles chez l'oiseau requièrent la mise en œuvre d'une transgénèse localisée « tissu et stade spécifique ». Dans ce modèle, la transfection des cellules et la manipulation de l'expression des gènes peuvent être réalisées à un stade choisi et ciblé dans un territoire embryonnaire précis. Elle repose sur la technique d'électroporation in vivo, qui consiste à pratiquer un transfert de séquences nucléiques exogènes dans un tissu épithélial déterminé. Cette stratégie permet de contrôler spatio-temporellement soit un gain de fonction, par la surexpression ou l'expression hétérotopique et/ou hétérochronique d'un gène donné, soit d'une perte de fonction par l'inactivation des produits d'expression du gène ciblé.

L'électroporation in vivo est une technique qui utilise des chocs électriques itératifs de faible amplitude pour perméabiliser des cellules dans le contexte d'un organisme vivant. En outre, en créant un champ électrique autour des cellules ciblées, l'électroporation favorise le déplacement polarisé des acides nucléiques (ADN ou ARN) qui, comme la plupart des molécules biologiques, sont globalement chargées négativement. En combinant ces deux effets, l'électroporation permet de transférer de façon très précise un groupe de cellules dans un tissu donné, à un stade défini par l'expérimentation (Muramatsu et al., 1997 ; Sakamoto et al., 1998). À l'arrêt des chocs électriques, les cellules interposées entre les électrodes positive et négative recouvrent leur intégrité, et les molécules d'acides nucléiques qui se

sont déplacées, attirées par l'anode se trouvent alors piégées dans le cytoplasme des cellules ciblées. En introduisant, de cette manière, des molécules d'ARN interférent, un blocage complet de la transcription du gène d'intérêt survient dans les 2 heures qui suivent l'électroporation (Creuzet, 2009 ; Garcez et al., 2014 ; Aguiar et al., 2014).

Pour ce faire, nous utilisons un électroporateur (BTX ECM830, Harvard Apparatus) qui délivre une série d'ondes carrées à la surface des structures embryonnaires. Cependant, la transfection des cellules de la CN doit être pratiquée bilatéralement pour être efficace : En effet, lors de leur transition épithélio-mésenchymateuse, les cellules de la CN issues de chaque côté de la plaque neurale se mélangent le long de la ligne médiane, avant de débiter leur migration Si l'ARNi n'est transfecté que d'un seul côté, la perte de fonction sera compensée par les cellules non transfectées issues du côté controlatéral et aucun phénotype ne peut être mis en évidence. Pour contourner cette difficulté, le générateur est connecté à trois électrodes: (deux électrodes positives latérales, situées de part et d'autre de la tête de l'embryon, et une électrode négative au centre, en regard du futur neuropore antérieur (Creuzet et al., 2002). Ceci permet de créer un champ triangulaire qui entraîne un transfert bilatéral des molécules d'ARNi ou des vecteurs d'expression (fig. 28).

Les molécules d'acides nucléiques exogènes sont injectées dans la gouttière neurale au stade de 5-6ss (8HH, soit 40 heures d'incubation) au moyen de micropipettes de verre, préalablement étirées à la flamme. Les solutions d'acides nucléiques injectées sont contrastées avec du *Fast-Green*

(Sigma) pour bien visualiser le site d'injection. Une série de 5 impulsions de 25 Volts et chacune d'une durée de 50ms et séparée d'intervalle de 500ms perméabilise les membranes pour permettre l'introduction de molécules d'acides nucléiques exogènes dans les cellules ciblées. Une fois la transfection réalisée l'œuf est refermé à l'aide de ruban adhésif (Scotch) et replacé en couveuse, en atmosphère humide à 38°C +/- 0,5°C afin qu'il puisse poursuivre son développement jusqu'au stade choisi pour le prélèvement.

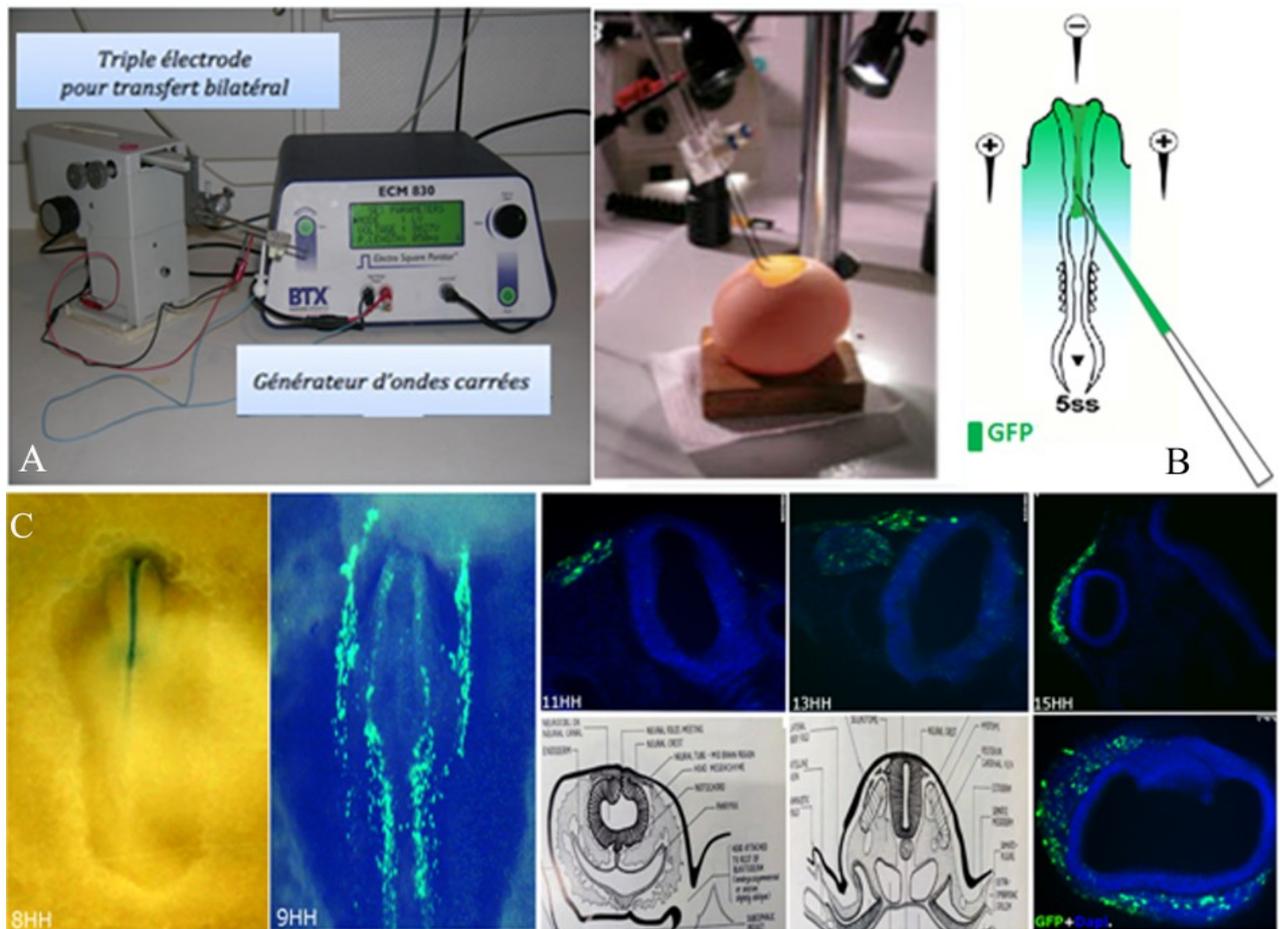


Fig.28: (A) Le générateur d'ondes carrées relié aux trois électrodes sous la loupe binoculaire. (B) Représentation schématique d'une injection de vecteur au stade de 5ss. (C) Dispositif expérimental montrant l'injection du GFP dans la gouttière neurale et les CCN migrant dans le mésenchyme sans affecter le neuroépithélium.

Une fois que nous avons validé le dispositif et l'efficacité expérimentale de l'injection de GFP dans la gouttière neurale, nous avons analysé le pourcentage d'homologie dans la composition en acides aminés entre le gène du poulet et le gène humain.

L'alignement des séquences qui a été effectué à l'aide du site (*UniProt Consortium*, Fig.29) montre que cette composition présente plus de 95% d'homologie.

```

1  MAAHRPVEWVQAVVSRFDEQLPIKTGQONHTKRVSTEHKNECLINISKYKFSLVISGLTT 60 NF1 HUMAN
1  MAAHKPVEWVQAVVNRFDQLPIKASQONHTKRVSTEHKNECLINISKYKFSLVISGLTN 60 E1C9F6 CHICK
61  ILKNVNNMRIFGEAAEKNLYLSQLIILDLTLEKCLAGQPKDTMRLDETMLVKQLLPEICHF 120 NF1 HUMAN
61  ILKNVNNMRIFGETAEKNLYLSQLIILDLTLEKCLAGQPKDTMRLDETMLVKQLLPEICHF 120 E1C9F6 CHICK
121 LHTCREGNQHAAELRNSASGVFLSLSLSCNNFNNAVFSRISTRQLQELTVCSEDNVDVHDIELL 180 NF1 HUMAN
121 IHTYREGNQHAAELRNSASGVFLSLSLSCNNFNNAVFSRISTRQLQELTVCSEDNADVHDIELL 180 E1C9F6 CHICK
181 QYINVDCAKLKRLLKETAFKFKALKKVAQLAVINSLEKAFWNWVENYPDEFTKLYQIPQT 240 NF1 HUMAN
181 QYISVDCSKLKRLLQETVFKFKALKKVAQLAVINSLEKAFWNWVENYPDEFTKLYQTPQT 240 E1C9F6 CHICK
241 DMAECAEKLFDLVDGFAESTKRKAADVWPLQIILLILCPEIIQDISKDVVDENNMNKKLFL 300 NF1 HUMAN
241 DMADCAEKLFDLVDGFAESTKRKAADVWPLQIILLVLCPEIIQDIADKDVVEETKMNKKLFL 300 E1C9F6 CHICK
301 DSLRKALAGHGGSRQLTESAAIACVKLCKASTYINWEDNSVIFLLVQSMVVDLKNLLFNP 360 NF1 HUMAN
301 DNLRKALAGHSGSRQLTESAAIACVKLCKASTYINWEDNSVIFLLVQSMVVDLKNLLFNP 360 E1C9F6 CHICK
361 SKPFSRGSQPADVDMIDCLVSCFRISPHNNQHFKICLAQNSPSTFHYVLVNSLHRIITN 420 NF1 HUMAN
361 SKPFSRSNQADVDLMDCLVSCFRINPHNNQHFKICLAQNSPSTFHYVLVNSLHRIITN 420 E1C9F6 CHICK
421 SALDWWPKIDAVYCHSVELRNMFGETLHKAVQCGGAHPAIRMAPSLTFKEKVTSLKFKEK 480 NF1 HUMAN
421 SALDWWPRIDAVYCHSVELRSMFSETLHKAIQCGGAHPAIRMTPLTFKEKMTSLKFKEK 480 E1C9F6 CHICK
481 PTDLETYSYKYLKLLSMVKLIHADPKLLLCNPRKQGPETQGSTAELITGLVQLVLPQSHMPE 540 NF1 HUMAN
481 PTDLETYSYKYLKLLSLVKLIHADPKLLLCNPRKQGPETQGSTAELITGLVQLVLPQSSMPD 540 E1C9F6 CHICK
541 IAQEAMEALLVLHQLDSIDLWNPDAVETFWIEISSQMLFYICKKLTSHQMLSSTEILKWL 600 NF1 HUMAN
541 IAQEAMEALLVLHQLDSIDLWNPDAPIETFWIEISSQMLFYICKKLTSHQMLSSTEILKWL 600 E1C9F6 CHICK

900  SLMVCNHEKVLQIRTNVKDLVGLLELSPALYPMLFNKLNKNTISKFFDSQGVLLTDTNTQ 959 NF1 HUMAN
895  TLMVCNHEKVLQIRTNIKDLVGLLELSPALYPMLFNKLNKNTISKFFDSQGVLLTETNTQ 954 E1C9F6 CHICK
960  FVEQTIAIMKNLLDNHTEGSSEHLGQASIEETMMLNLVRYVRVLGNMVAHQIKTKLCQLV 1019 NF1 HUMAN
955  FVEQTIAIMKNLLDNHTEGSSEHLGQASIEETMMLNLVRYVRVLGNLVHAIQIKTKLCQLV 1014 E1C9F6 CHICK
1020  EVMMARDDLSFCQEMKFRNKMVEYLTDWVMGTSNQAADDVKCLTRDLQASMEAVVSL 1079 NF1 HUMAN
1015  EVMMERDDLSFCQEMKFRNKMVEYLTDWVMGTSNQAATDEDVKCLTRDLQASMEAVVSL 1074 E1C9F6 CHICK
1080  LAGLPLQPEEGDGVLEMEAKSQLFLKYFTLFMNLNDCSEVEDESAQTGGRKRGMRSRRLA 1139 NF1 HUMAN
1075  LAGLPLQPEEGDGVLEMEAKSQLFLKYFTLFMNLNDCSEVEDESAQTGGRKRGMRSRRLA 1134 E1C9F6 CHICK
1140  SLRHCTVLAMSNLLNANVDSGLMHSIGLGYHKDLQTRATFMEVLTKILQQGTEFDTLAET 1199 NF1 HUMAN
1135  SLRHCTVLAMSNLLNANVDSGLMHSIGLGYHKDLQTRATFMEVLTKILQQGTEFDTLAET 1194 E1C9F6 CHICK
1200  VLADRFERLVELVTMMGDQGELPIAMALANVPCSQWDELARVLVTLFDSRHLLYQLLWN 1259 NF1 HUMAN
1195  VLADRFERLVELVTMMGDQGELPIAMALANVPCSQWDELARVLVTLFDSRHLLYQLLWN 1254 E1C9F6 CHICK

1500  SDGNVALHRLLLWNNQEKIGQYLSSNRDHKAVGRRPFDKMATLLAYLGPPEHKPVADTHW 1559 NF1 HUMAN
1495  SDGNVALHRLLLWNNQEKIGQYLSSNRDHKAVGRRPFDKMATLLAYLGPPEHKPVADTHW 1554 E1C9F6 CHICK
1560  SSLNLTSSKFEFMTRHQVHEKEEFKALKTSLIFYQAGTSKAGNPIFYVARREFTGQIN 1619 NF1 HUMAN
1555  SSLNLTSSKFEFMTRHQVHEKEEFKALKTSLIFYQAGTSKAGNPVFIYIARREFTGQIN 1614 E1C9F6 CHICK
1620  GDLLIYHVLLTLKPYAKPYEIVVDLTHGSPNRFKTDFLSKWFVFPFAYDNVSAVYI 1679 NF1 HUMAN
1615  GDLLIYHVLLTLKPYAKPYEIVVDLTHAGSPNRFKTDFLSKWFVFPFAYENVSAVFI 1674 E1C9F6 CHICK
1680  YNCNSWVREYTKYHERLLTGLKGSKRLVFDICPGKLAHEHIEHQKLPAAATLAEEDLKV 1739 NF1 HUMAN
1675  YNCNSWVREYTKYHERLLTGLKGSKRLIFIDSPGKLAHEHIEHQKLPAAATLAEEDLKV 1734 E1C9F6 CHICK
1740  FHNALKLAHKDTKVSIVGSAVQVTSARTKVLGQSVFLNDIYYASEIEIEICLVDENQF 1799 NF1 HUMAN
1735  FHNALKLAHKDTKVSIVGSAVQVTSARTRVLGQTVFLNDIYYASEIEIEICLVDENQF 1794 E1C9F6 CHICK

```

1800 TLTIANQGTPLTFMHQECEAIVQSIHIRTWRWELSQPDSIPQHTKIRPKDVPGTLLNIAL 1859 NF1 HUMAN
 1795 TLTIANQGTPLTFMHQECEAIVRSIHIRTRWELSQPDSIPQHTKIRPKDVPGTLLNIAL 1854 E1C9F6 CHICK
 1860 LNLGSSDPSLRSAAYNLLCALCTCFNLKIEGQLETSGLCIPANNTLFIVSISKTLAANE 1919 NF1 HUMAN
 1855 LNLGSSDPSLRSAAYNLLCALCTCFNLKIEGQLETSGLCIPANNTLFIVSISKTLAANE 1914 E1C9F6 CHICK
 1920 PHLTLEFLEECISGFSKSSIELKHLCLEYMPWLSNLVRFCKHNDDAKRQRVTAILDKLI 1979 NF1 HUMAN
 1915 PHLTLEFLEECISGFSKSSIELKHLCLEYMPWLSNLVRFCKHNDDAKRQRVTAILDKLI 1974 E1C9F6 CHICK
 1980 TMTINEKQMYPSIQAKIWGSLGQITDLLDVVLDSEFIKTSATGGLGSIKAEVMADTAVALA 2039 NF1 HUMAN
 1975 TMTINEKQMYPSIQAKIWGSLGQITDLLDVVLDSEFIKTSATGGLGSIKAEVMADTAVALA 2034 E1C9F6 CHICK
 2040 SGNVKLVSSKVIIGRMCKIIDKTCLSPTPTLEQHLMWDDIAILARYMLMLSFNNSLDVAAH 2099 NF1 HUMAN
 2035 SGNVKLVSSKVIIGRMCKIIDKTCLSPTPTLEQHLMWDDIAILARYMLMLSFNNSLDVAAH 2094 E1C9F6 CHICK

 2578 EMETQRISSSQQHPLHRKVSVSESNVLLDEEVLTDPKIQALLLTVLATLVKYTTDEFDQR 2637 NF1 HUMAN
 2575 EMETQRIS-PQQHPLHRKVSVSESNVLLDEEVLTDPKIQALLLTVLATLVKYTTDEFDQR 2633 E1C9F6 CHICK
 2638 ILYEYLAEASVVFVKVFPVHNLLDSKINTLLSLCQDPNLLNPIHGIVQSVVYHEESPPQ 2697 NF1 HUMAN
 2634 ILYEYLAEASVVFVKVFPVHNLLDSKINTLLSLCQDPNLLNPIHGIVQSVVYHEESPPQ 2693 E1C9F6 CHICK
 2698 YQTSYLQSFNGLWRFAGPFSKQTQIPDYAELIVKFLDALIDTYLPGIDEETSEESLLT 2757 NF1 HUMAN
 2694 YQTSYLQSFNGLWRFAGPFSKQTQIPDYAELIVKFLDALIDTYLPGIDEETSEESLLT 2753 E1C9F6 CHICK
 2758 PTSPYPPALQSQLSITANLNLNSMSTSLATSQHSPGIDKENVELSPTTGHCNSGRTRHGS 2817 NF1 HUMAN
 2754 PTSPYPPAVQSQLSITANLNLNSMSTSLATSQHSPGIDKENVELSPTTGHTNSGRMRHGS 2813 E1C9F6 CHICK

 2818 ASQVQKQRSAGSFKRNSIKKIV 2839 NF1 HUMAN
 2814 ASQVQKQRSAGSLKRHSIKKIV 2835 E1C9F6 CHICK.

Fig.29 : *Alignement de séquences prédites d'acides aminés de neurofibromine humaine et aviaire, Le pourcentage d'acides aminés identiques entre les deux séquences est 95,12%. (UniProt Consortium).*

Sur la base de cette étude comparative, nous avons sous-cloné l'ADN complémentaire du gène NF1 de l'oiseau et préparé un vecteur pour la synthèse des sondes sens et anti-sens afin de permettre l'analyse des transcrits de ce gène.

L'amplification du 1,5kb du NF1 (Fig.30) a été réalisée avec la polymérase à haute-fidélité PFX (Invitrogen). Ce produit d'amplification a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pCRII_TOPO_TA avec l'aide du kit TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen). La séquence sous-clonée a été validée par séquençage. Une purification de type « High -Copy plasmide DNA purification (Maxi) » a ensuite été réalisée avec le kit « NucleoBond Xtra Maxi » (Macherey-Nagel), sa **Concentration** (absorbance mesuré avec le NanoDrop2000C) **3,5µg/µl** (Tefor infrastructure, plateforme d'imagif).

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
t7    TGNNGCTCGAGCGGCCGCCANNGTGATGGATATCGCATAAATCGCCCTTGCAGGAACTGACTGTTTGGCTCAGAGATAATGCCGATGTCACGACATTGAACCTTACAGTACATCAGNGTGGATTGT
NF1sonde sp6    TGCAGGAACTGACTGTTTGGCTCAGAGATAATGCCGATGTCACGACATTGAACCTTACAGTACATCAGNGTGGATTGT
Consensus    .....tgcaggaactgactglttgcagagaataatgccgatgttcacgacattgaaactctacagacatcag_gtggattgt

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
t7    TCARAAGTAAAAGACTCTTGCARAGAGACTGATTCAGGTTTAAAGCCCTTAGAARAGTAGCTCAGTTAGCTGTTATCACAGCTTGAAAAGGCCATTTGGAACTGGGTGGAAARACTATCCTGATGAAT
NF1sonde sp6    TCARAAGTAAAAGACTCTTGCARAGAGACTGATTCAGGTTTAAAGCCCTTAGAARAGTAGCTCAGTTAGCTGTTATCACAGCTTGAAAAGGCCATTTGGAACTGGGTGGAAARACTATCCTGATGAAT
Consensus    tcaaaagctaaaaagactccttcaagagactgtatcaagtttaaaagcccttaagaaagtagctcagttagctgttatcaacagctcttgaaaagccatttggaaactgggtgaaaactatcctgatgaat

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
t7    TCACAAGCTGATCAACACCACAGACTGATATGGCCGATTGTGCANAGAAAGTGTGTTGACTTAGTGGATGGCTTTCAGAGAGCACAARACCTAARAGCAGCGGTGTGGCCACTACAARACTACTCTCT
NF1sonde sp6    TCACAAGCTGATCAACACCACAGACTGATATGGCCGATTGTGCANAGAAAGTGTGTTGACTTAGTGGATGGCTTTCAGAGAGCACAARACCTAARAGCAGCGGTGTGGCCACTACAARACTACTCTCT
Consensus    tcacaagctglatcaaacaccacagactgalatggccgattgtgca_agaagttgllgacttagtggatggcttgcagagagcacaaaagctaaagcagcggtgtggccactacaatcatalactcct

391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
t7    GGTCTGTGTCCAGAGATATTCAGATATAGCAAGGATGTAGTAGGAGAACTAARATGACAGAACTGTTCTGGACATCTCAGGAAGCACTTCAGGCCACAGTGGGAGCAGGCGACTGACT
NF1sonde sp6    GGTCTGTGTCCAGAGATATTCAGATATAGCAAGGATGTAGTAGGAGAACTAARATGACAGAACTGTTCTGGACATCTCAGGAAGCACTTCAGGCCACAGTGGGAGCAGGCGACTGACT
Consensus    ggtcctgtgtccagagatattcaagatatagcaaaagtagtagtaggaaactaaaataaacaagaaactgttctggacaactcaggaagcaacttcagggccacagtgggagcagcgactgact

521    530    540    550    560    570    580    590    600    610    620    630    640    650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
t7    GAAAGCGCTGCTATGCTTGTGTTAACTGTGCAAAAGCATCTACCTACATCAACTGGGAGGATAATCTGTCATTTTCTACTAGTCAGTCC-ATGGTAGTAGATCTT-AGAA-TTTGTGTTTAACT
NF1sonde sp6    GAAAGCGCTGCTATGCTTGTGTTAACTGTGCAAAAGCATCTACCTACATCAACTGGGAGGATAATCTGTCATTTTCTACTAGTCAGTCC-ATGGTAGTAGATCTT-AGAA-TTTGTGTTTAACT
Consensus    gaaagcgtgctatgcttgtgtaaaactgtcaaaagcatctactacatcaactgggaggataatctgtcatlltctactagtcagttcc_atggtagtagatctt_agaa_tttgctgtttaatc

651    660    670    680    690    700    710    720    730    740    750    760    770    780
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
t7    CG-AGCAAACTTTT-TCARAGGCAATCA-GAATGCAGATGTAGACCTTATGATCGACTGCTTAGTTTTCATGCTCCGCATAAACCCGCATAAATACCAACACTTTAAGATCTGCTTGGCACAGAGTTC
NF1sonde sp6    CG-AGCAAACTTTT-TCARAGGCAATCA-GAATGCAGATGTAGACCTTATGATCGACTGCTTAGTTTTCATGCTCCGCATAAACCCGCATAAATACCAACACTTTAAGATCTGCTTGGCACAGAGTTC
Consensus    cgnnagcaaacnntntcagaaagcaatcagaaatgcagatgtagaccttatgatcgactgcttagtttcatgctccgcataaacccgcataaataaccacacttttagatctgcttggcacagagttc
g_agcaaacctt_ttcaraagcraatca_gaatgcagatgtagaccttatgatcgactgcttagtttcatgctccgcataaacccgcataaataaccacacttttagatctgcttggcacagagttc

781    790    800    810    820    830    840    850    860    870    880    890    900    910
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
t7    CCCATCACAATTTTATTATGACTAGTAAATCACTCCACCAGATATCAAAATCTGCATTGGACTGGTGGCCAGGATTGATGCTGTGACTGCCATCCCGTGGAGCTTCGACGATGTTTAGTGAG
NF1sonde sp6    CCCATCACAATTTTATTATGACTAGTAAATCACTCCACCAGATATCAAAATCTGCATTGGACTGGTGGCCAGGATTGATGCTGTGACTGCCATCCCGTGGAGCTTCGACGATGTTTAGTGAG
Consensus    CCCATCACAATTTTATTATGACTAGTAAATCACTCCACCAGATATCAAAATCTGCATTGGACTGGTGGCCAGGATTGATGCTGTGACTGCCATCCCGTGGAGCTTCGACGATGTTTAGTGAG

911    920    930    940    950    960    970    980    990    1000   1010   1020   1030   1040
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
t7    ACACCTTCAARAAGCTATTACAGGCTGTGGGGCACATCCAGCAATTCGATGACTCCGAGCTGACATTTAAGAGAAATGACAGCCCTAATTTAAGAAAGCCACTACTGACTGGAAACCAARAAGCT
NF1sonde sp6    ACACCTTCAARAAGCTATTACAGGCTGTGGGGCACATCCAGCAATTCGATGACTCCGAGCTGACATTTAAGAGAAATGACAGCCCTAATTTAAGAAAGCCACTACTACTGGAAACCAARAAGCT
Consensus    ACACCTTCAARAAGCTATTACAGGCTGTGGGGCACATCCAGCAATTCGATGACTCCGAGCTGACATTTAAGAGAAATGACAGCCCTAATTTAAGAAAGCCACTACTGACTGGAAACCAARAAGCT

1041   1050   1060   1070   1080   1090   1100   1110   1120   1130   1140   1150   1160   1170
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
t7    ACAAGTTCNNNGCTGTTATCTTGNNAARAACTGATCCANNCTGATCCAAAGCTTTTNGCTG
NF1sonde sp6    ACAAGTTCCT-GCTGTTATCCTTGGTAAA-CTGATCCAT-GCTGATCCAAAGCTTTT-GCTGTGTAATCCAGGAGCAGGGCCCTGAGACACAGGCGAGCTGCTGAATTAATACAGGCCCTGTAC
Consensus    ACAAGTTCCT_gctgttatccttggtaaaa_ctgatccat_gctgatccaaagctttt_gctgtgtaatccaggaagcagggccctgagacacagggcagcactgctgaattaatacaggcctgtac

1171   1180   1190   1200   1210   1220   1230   1240   1250   1260   1270   1280   1290   1300
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
t7    AACTCGTCCACAACTCCAGATGCCAGATATAGCACAGAGCCATGGAGGCCCTGCTAGTCTTCCACAGTTAGACAGCATTGACTTATGGAACTCCTGATGCACCTATAGAACTTTCTGGAAATAG
NF1sonde sp6    AACTCGTCCACAACTCCAGATGCCAGATATAGCACAGAGCCATGGAGGCCCTGCTAGTCTTCCACAGTTAGACAGCATTGACTTATGGAACTCCTGATGCACCTATAGAACTTTCTGGAAATAG
Consensus    aactcgttccacaactccagatgccagatatagcacaagaagccatggaggcctgctagttctccaccagttagacagcattgactatggaactcctgatgcacctatagaacttctggaaatag

1301   1310   1320   1330   1340   1350   1360   1370   1380   1390   1400   1410   1420   1430
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
t7    TTCACAATGCTTTTTATATCTGCAGAAATTAACAGTATCAGATGCTCAGCAGTACAGAACTCCTCAAGTGGCTGCGAGAGATTCATCTGTAGGAAATAAATTTCTTAAAAAATAAACATCA
NF1sonde sp6    TTCACAATGCTTTTTATATCTGCAGAAATTAACAGTATCAGATGCTCAGCAGTACAGAACTCCTCAAGTGGCTGCGAGAGATTCATCTGTAGGAAATAAATTTCTTAAAAAATAAACATCA
Consensus    ttcacaatgctttttatatactgcagaaatataacagatcagatgctcagcagtacagaaactcctcaagtggctgcgagagattctatctgtaggaaataaatttcttaaaaataaacatca

1431   1440   1450   1460   1470   1480   1490   1500   1518|2
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
t7    GACAGAACTTCTGTCACTTTCTCTCTTTATGATGCTCTGGAGGTGGAGC
NF1sonde sp6    GACAGAACTTCTGTCACTTTCTCTCTTTATGATGCTCTNNGGGGGGAGGAGCAGGGCGAATTCAGCACACNGGGCGCCG
Consensus    gacagaacttctgtcactttctctctttatgatgct...gg_gg_ggagc.....

```

Fig.30: Aligement de NF1 avec la séquence sous-clonée dans le vecteur *pCRII_TOPO_TA*.

II. 3. Perte de fonction des gènes par ARN interférent (ARNi)

La perte de fonction est obtenue par la réaction d'interférence avec l'ARN. Pour cela on génère des outils moléculaires qui bloquent spécifiquement l'activité du gène d'intérêt en stoppant les mécanismes post-transcriptionnels. Cette stratégie de perte de fonction implique la mise en silence du gène (*gene silencing*) par l'ARN interférent (ARNi). Elle consiste à bloquer l'activité du gène d'intérêt en induisant la dégradation de son ARN messager (ARNm).

Pour cela, on introduit dans les cellules cibles, une molécule double-brin d'ARN exogène, synthétisée à partir de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène cible (Pekarik et al., 2003). Une fois dans les cellules, la molécule d'ARNi va former un « complexe » avec la molécule d'ARNm endogène, spécifiquement reconnu par la ribonucléase, une enzyme qui provoque la dégradation de l'ARNm. En stoppant l'activité du gène au niveau post-transcriptionnel, cette dégradation entraîne la mise en silence ou « silencing » du gène ciblé.

La synthèse des ARN double brin requis pour la préparation de ARNi contre l'activité des gènes du poulet codant pour *NF1* et *HDAC8* est réalisé à parti des ADNc pour chacun des gènes d'intérêt (Wilkie et al. 1997), Les séquences sont insérées dans des vecteurs de sous-clonage, pCRII TOPO TA-NF1 (Tefor-Imagif) et psiCHECK2-HDAC8, HDAC2 et HDAC1 (Oliver Pusch's lab.)

L'ARN simple brin est obtenu par amplification de la séquence d'intérêt dans le vecteur de sous-clonage : l'ARN spécifique de *NF1* est obtenu à partir de 2 amorces (primers) sens et anti-sens, qui flanquent la séquence à amplifier avec le système de thermo-cycler Techne (TC-3000) conformément au protocole fourni par le fournisseur Go Taq DNA_Polymerase (Promega). Une fois l'insert au plasmide amplifié, les brins d'ARN sens et anti-sens sont synthétisés séparément.

Cette synthèse est réalisée en présence de l'enzyme ARN polymérase (T7 pour le brin sens et T3 pour synthétiser le brin anti-sens), de DTT 0.1M et un mélange équimolaire de chaque acide ribonucléique GTP, ATP, CTP, UTP, auquel on ajoute de l'ARNsine (dirigé contre l'ARNase), pendant 3 heures à 37°C afin de synthétiser les deux brins. L'ADN linéarisé est ensuite éliminé de la préparation après digestion par l'ADNaseI pendant 45min à 37°C.

L'ARN synthétisé est extrait par précipitation dans une solution tamponnée de Tris-EDTA 10mM pH 7,5 et Chlorure de Lithium 4M, et complété d'EtOH 100%, pendant toute la nuit à -20°C, afin de le séparer des nucléotides non incorporés. Après centrifugation à 12000g à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot lavé dans l'EtOH 70%, puis séché pendant 10 min.

La stœchiométrie des brins sens et anti-sens est ajustée afin de réaliser un mélange équimolaire, après mesure de la concentration de chaque solution par spectrométrie sur Nandrop® (Nanovue sn : 109339), grâce à laquelle on obtient de la concentration de la molécule en ng/μl. La valeur normale conseillée varie entre 200 et 500 ng/μl. Les deux molécules sont ensuite assemblées par une étape d'«annealing» : les structures secondaires de chaque brin d'ARN sont temporairement déstabilisées pendant 5 min à 95°C, puis hybridés l'un avec l'autre lors du retour à température ambiante. On dispose alors d'une molécule d'ARN double-brin (*double-strand RNA, dsRNA*) qui peut être conservé à -20°C, avant son utilisation *in vivo*. La concentration de la solution d'ARNi doit être ajustée entre 200-500 ng/μl pour une inactivation efficace du gène cible *in vivo*.

En ce qui concerne la synthèse de l'ARN double brin interférant de *HDAC8*, on procède de même. Cependant, pour la linéarisation les deux enzymes de restriction et leurs solutions tampons correspondantes, ainsi que les étapes de transcription, on utilise les molécules suivantes (Tableau 7) :

	<i>NF1</i>		<i>HDAC8</i>	
	brin sens	brin anti-sens	brin sens	brin anti-sens
Amplification (Go-Taq au <i>Thermo-cycler</i>)	ARNsens T7 sonde sens	ARN anti-sens SP6 sonde antisens	ARNsens 440ng/μl (Imagif)	ARN anti-sens 463ng/μl (Imagif)
Transcription (Polymérisation)	T7 (Proméga)	T3 (Proméga)	T7 (Proméga)	T3 (Proméga)

Tableau 7 : La synthèse de l'ARN double brin interférant de *NF1* et *HDAC8*.

La qualité et la concentration de nos molécules *dsRNA*, est là encore mesurée par la quantification en spectrométrie sur Nanodrop[®] (Nanovue sn : 109339).

III – METHODES D'ANALYSES PHENOTYPIQUES DES EMBRYONS TEMOINS ET EXPERIMENTAUX

III. 1. Prélèvement et fixation des embryons

Les embryons destinés à l'analyse par hybridation et immunocytochimie sont prélevés dans du PBS 1x et fixés. Cette étape vise à révéler la présence respective d'ARNm ou de protéines.

Préalablement à la fixation, les embryons prélevés sont colorés dans une solution de LysoTracker[®] Red (ou LTR ; Invitrogen). Cette molécule fluorophore a été initialement mise au point pour révéler le trafic vésiculaire, à l'échelle cellulaire. La molécule, faiblement basique, est affine pour les organites acides et marque plus spécifiquement les lysosomes. Dans les cellules qui entrent en apoptose, le marquage de la cellule coïncide de la perméabilisation des membranes lysosomiales et de la fuite d'hydrolases et de cathepsines dans le cytoplasme qui, ensemble, concourent à l'activation des caspases (Johansson et al., 2010 ; Fogel et al., 2012). A l'échelle anatomique de l'embryon entier, on exploite le marquage LTR pour mettre en évidence de remodelage morphogénétique par apoptose.

Pour réaliser les prélèvements, la fenêtre de ruban adhésif sur la coquille de l'œuf est ouverte, puis, à l'aide de ciseaux de Pascheff, on pratique des incisions dans l'aire opaque autour de l'embryon. L'ajout de

PBS permet de dégager l'embryon et de le nettoyer du vitellus. Ce dernier est collecté avec une cuillère à prélèvement et rincé dans une coupelle stérile remplie de PBS. Il est ensuite transféré dans un tube Eppendorf de 2ml et incubé dans une solution de LTR diluée à 1:400 dans le PBS (LysoTracker Red DND99 **LTR**, Invitrogen). Pourquoi ce marquage au lysotracker ? L'incubation se déroule pendant 20min à température ambiante sous agitation modérée en utilisant un roller, mais protégée de la lumière pour préserver la solution fluorescente. Après un rapide rinçage au PBS, on procède à la fixation des embryons avec une solution de PBS-Formaldéhyde 4% (Prolabo) pendant 2h sous agitation. Après fixation, les embryons peuvent être utilisés pour l'hybridation ou l'immunocytochimie.

III. 2. Immunocytochimie sur embryons entiers

Il s'agit d'une réaction antigène/anticorps où un complexe est formé entre un anticorps (Ac) dirigé contre épitope spécifique d'une protéine que l'on souhaite mettre en évidence dans l'embryon. Un Ac secondaire dirigé contre l'anticorps primaire marqué avec des fluorochromes (dérivés cuivrés Alexa-Fluor®, Invitrogen) va permettre de révéler cette réaction, et d'observer au microscope les sites où la protéine d'intérêt est accumulée.

Les embryons sont fixés dans une solution de formaldéhyde 4% et de PBS. Ils sont ensuite rincés dans une solution de PBS1x et Tween20 0,1% (PBS-TW; Sigma) pendant 2x10min sur un roller, puis déshydratés dans des bains de Méthanol à concentration croissante. Une fois dans le Méthanol 100%, les embryons subissent un choc à froid pendant 45 min à -

20°C de façon à perméabiliser des membranes cellulaires. Les embryons sont ensuite progressivement réhydratés dans une solution de de PBS-T TritonX100 (PBS-TT) 0,5%, puis pré-incubés en présence de BSA 0,2% pendant 2 fois 15 min à température ambiante et sous agitation. C'est une étape qui permet d'éviter les fixations non spécifiques de l'Ac utilisé dans l'étape suivante. Les embryons sont incubés avec les anticorps primaires pendant 24 à 48 heures à 4°C sous agitation.

Les embryons sont ensuite abondamment rincés, puis incubés avec les Ac secondaires dans PBS-TT 0,5%-BSA 0,2%-GS (sérum de chèvre) 5% toute la nuit à l'obscurité sous agitation à 4°C. On rince ensuite avec une solution de PBS-TT-BSA 0,2%, avant l'observation à la loupe à fluorescence.

Les Ac primaires utilisés pour notre étude sont les suivants :

- L'Anticorps anti-HNK1 (Ac HNK1) permet de mettre en évidence les cellules de la crête neurale au cours de leur migration, puis de leur différenciation en cellules gliales.
- L'Anticorps anti-pH3 (Ac PH3) dirigé contre la phospho-histone H3 pour mettre en évidence les cellules en prolifération.
- L'Anticorps anti-TUJ-1 (Ac TUJ-1) dirigé contre la β -Tubuline-III pour mettre en évidence le prolongement axonal des cellules nerveuses dans le système nerveux central et périphérique au cours de développement.
- L'Anticorps anti-aSMA (Ac-aSMA) pour montrer les cellules périvasculaires dérivées de la CN, à savoir (les cellules murales

d'artères issues des arcs branchiaux et les péricytes qui doublent l'endothélium des capillaires qui irriguent la face et le cerveau).

- L'anticorps anti-MelEM (Ac melEM) contre les mélanoblastes et mélanocytes notamment au niveau de la peau.
- Les Anticorps anti-NF1, Anti-NF2 (Ac NF, Ac NF2) permettent de visualiser les cellules s'exprimant en activité ces deux gènes (respectivement).
- Les anticorps (Anti-acéH3K27, Anti-métH3K36) dirigé contre les activités déacétylation et méthylation de l'histone H3 dans l'ADN.
- Les Anticorps (Anti-HDAC1, Anti-HDAC2 et Anti-HDAC8) sont utilisés pour mettre en évidence les Histone Désacétylases dans les cellules.

Les embryons sont ensuite incubés avec les Ac secondaires toute la nuit à l'obscurité sous agitation à 4°C. Ceux-ci sont conjugués à des molécules fluorophore (Alexa-Fluor†® ; Invitrogen), dérivées cuivrés qui, excités à une longueur d'onde donnée, émettent une lumière fluorescente d'une longueur d'onde définie: rouge pour l'AlexaFluor® 594, verte pour l'Alexa Fluor® 488.

Ac primaire	Producteur®	Ac secondaire	Fluorophore
Anti-HNK1	<i>(Santa Cruz biotechnology)</i> ®	Goat-Anti-Mouse IgM (GAM)	AlexaFluor® 488/594

Anti-pH3	SIGMA-ALDRICH®	Goat-Anti-Rabbit IgTotal (GAR)	Alexa Fluor® 594/488
Anti-TUJ-1	(Santa Cruz biotechnology)®	Goat-Anti-Mouse IgG2	Alexa Fluor® 594/488
Anti-αSMA	SIGMA-ALDRICH®	Goat-Anti-Mouse IgG1	Alexa Fluor® 594/488
Anti-NF1	(Santa Cruz biotechnology)®	Goat-Anti-Rabbit Polyclonal IgG	Alexa Fluor® 594
Anti-NF2	(Santa Cruz biotechnology)®	Goat-Anti-Rabbit Polyclonal IgG	Alexa Fluor® 594
Anti-HDAC1, 2	(Santa Cruz biotechnology)®	Goat-Anti-Rabbit Polyclonal IgG	Alexa Fluor® 594
Anti-HDAC 8	(Santa Cruz biotechnology)®	Goat-Anti-Mouse IgG1	Alexa Fluor® 594/488
Anti-acéH3K27	abcam®	Goat-Anti-Rabbit Polyclonal IgG	Alexa Fluor® 594/488
Anti-métH3K36	abcam®	Goat-Anti-Rabbit Polyclonal IgG	Alexa Fluor® 594/488
Anti-meEM	Institut® d'Embryologie Nogent-sur-Marne	Goat-Anti-Mouse IgG	Alexa Fluor® 488
Anti-SOX 9	R&D SYSTEMS®	Goat-Anti-Rabbit Polyclonal IgG	Alexa Fluor® 594

Tableau 8 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'étude en l'immunofluorescen.

III. 3. Hybridation in situ sur embryons entiers

Par cette technique, on cherche à mettre en évidence l'ARNm d'un gène d'intérêt, et déterminer la dynamique spatio-temporelle de son patron d'expression. Pour cela, on utilise une ribosonde complémentaire et antiparallèle de l'ARNm étudié.

La ribosonde est composée des quatre bases ribonucléotidiques. Cependant, dans une proportion d'un tiers, l'uridine est marquée par une protéine Digoxigénine (Dig-UTP ; Roche). Cette molécule est secondairement reconnue par le fragment Fab d'un anticorps spécifique, qui est lui-même associé à une protéine enzymatique, la phosphatase Alcaline (Fab-anti-Dig, Roche). Cette dernière à pH 9,5 catalyse la transformation des substrats NBT (nitro-blue tetrazolium) et BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-Indolyphosphate ; Roche) : le BCIP libère une fonction réductrice indol instable qui fait se lier deux molécules du réactif et réduit le NBT, en provoquant un précipité bleu. Ainsi, la formation de ce précipité dans l'embryon matérialise l'hybridation de la sonde avec l'ARNm et permet de visualiser l'activité du gène étudié.

Les embryons préalablement fixés et déhydratés, ont été soumis à un choc à froid, dans la Méthanol. Ils sont ensuite progressivement réhydratés dans le PBT. Les embryons subissent alors une digestion enzymatique de façon à favoriser la diffusion de la sonde. On procède en plaçant les

embryons dans une solution de PBT et de Protéinase K 20µg/ml. Puis on refixe les embryons au milieu de (PBS-WT+ Glutaraldéhyde 0,1% +Formaldéhyde 4%) pendant 20 minutes étape suivie de deux rinçages au PBT à 5 minutes.

Les embryons sont ensuite pré-incubés dans la solution d'hybridation, « l'HybridMix (tableau 9) » pendant 1h à 70°C et on fait de même puis, on procède à l'hybridation avec la sonde les embryons sont incubés dans la sonde diluée à 1% dans l'HybridMix pendant 1 nuit à 70°C.

Composés	Volume	Concentration	Rôle
Formamide (Prolabo)	50mL		Déstabilise les molécules d'acides nucléiques doubles brins et abaisse la température d'hybridation
SSC20 pH5 1,3x	7,5mL		Tampon pour maintenir un pH optimal pour la liaison des ARNms
EDTA 500mM ph8	1mL		Chélateur d'ions
Yeast RNA 20mg/mL	250µL		ARNt pour saturer le milieu en ARN et éviter les liaisons avec l'ADN
Tween20	400µL		Détergeant qui perméabilise la membrane
CHAPS 10% (3-Cholamidopropyl-diméthylammonio-1-propanesulfonate)	5mL		Solubilise les protéines membranaires
Héparine 50mg/mL	200µL		Eau distillée RNase free

Tableau 9: Composition de la solution d'hybride-Mix et rôle de ces composants.

Après hybridation, les embryons sont rincés dans l'HybridMix pendant 5min à 70°C, puis 2x 45min à 70°C. Ils sont ensuite lavés dans une solution tampon MABT pH7,5, sous agitation, pendant 2x30min. La solution de MABT est préparée, par l'addition d'une solution de NaCl (Prolabo) 5M et une solution d'acide malique (Sigma, Reagent Plus) 1M ajustée à un pH de NaOH 10M, enfin, la solution de MABT est obtenue en ajoutant à du Tween20 (Sigma) 0,1%.

Les embryons sont alors préparés pour la détection immunocytochimique de la sonde. Les embryons sont pré-incubés dans une solution de MABT-Blocking Reagent 2%-Sérum 20% (MABT 3 volumes, Blocking Reagent 10% 1 volume, Sérum 1 volume), pendant 1h sur un roller. Puis, on l'incube une nuit à température ambiante en ajoutant à la solution précédente un anticorps primaire Fab-Anti-Dig (Roche) dilué à 1:1000.

Les embryons sont ensuite rincés 3x 1h dans la solution de MABT sur un roller, puis leur pH est ajusté à 9,5 dans une solution de NTM (NaCl, Tris pH9.5, MgCl₂). On profite de cette étape pour ouvrir les vésicules céphaliques en effectuant deux incisions (l'une dans le télencéphale, l'autre dans le mésencéphale) afin que le précipité bleu obtenu après révélation de l'anticorps ne s'accumule pas dans l'encéphale. On incube ensuite les embryons dans une solution de NTM et NBT-BCIP (20µl/ml, Roche) dans un bain marie à 37,5°C. La réaction est arrêtée dans une solution de PBS à 4°C.

III. 3'. Synthèse de Ribosonde pour l'hybridation in situ

Pour la synthèse de ribosonde pour l'étude de niveau d'expression de certains gènes ainsi que leur distribution tissulaire, nous utilisons le même protocole utilisé dans la synthèse d'ARN interférent jusqu'à la purification de sonde. La seule différence se présente au niveau de la nature d'UTP qui est fusionné à la Digoxigénine, l'UTP-Dig (Roche), (Dig : Digoxigénine) pour la synthèse de sonde.

III. 4. Immunocytochimie sur coupes

Cette approche a pour but de préciser l'organisation histologique des tissus céphaliques issus d'embryons témoins et expérimentaux et de réaliser des marquages immunocytochimiques. On effectue des coupes selon un plan transversal frontal de l'embryon préalablement inclus dans la paraffine ou dans l'agarose en fonction de l'épaisseur des coupes désirée.

Pour l'inclusion dans Agarose, les embryons sont fixés dans une solution de formaldéhyde 4% dans du PBS. Ils sont ensuite incubés dans une solution d'inclusion composée d'un tampon TAE (Tris acétate EDTA) additionné d'Agarose 4% préalablement dissout et homogénéisé par chauffage au microonde. Une fois à température ambiante, les têtes de embryons sont alors incluses dans ce milieu semi-solide. Les embryons peuvent alors être coupés au vibratome (Lieca) à 20µm d'épaisseur, à une vitesse d'avancement de 7-8 (unité) et une fréquence de 5-6hz. Les coupes sont récupérées au pinceau sur lames Superfrost® (Thermo Scientific).

Pour l'inclusion en paraffine, les embryons, dès le prélèvement, sont fixés dans une solution d'Acide acétique 10%, Ethanol 60%, Formaldéhyde 10%, puis rincé 2 fois pendant 1h dans l'Ethanol 100% (Prolabo). Ils sont ensuite imprégnés de Toluène (Fisher) par 2 bains successifs dont la durée est fonction du stade de développement : à mesure qu'ils se chargent en Toluène, les embryons tombent au fond du tube. Le Toluène va permettre à la paraffine d'être diffusée dans les tissus embryonnaires. Une fois imprégnés de Toluène, les embryons sont placés en surface de la paraffine (Paraplast, Sigma) durcie à température ambiante, puis incubés toute la nuit à 56°C. Ils sont ensuite inclus de façon définitive dans un bloc de paraffine, où leur orientation est précisément contrôlée selon l'axe de coupe désiré. Les embryons sont alors coupés au moyen d'un microtome (Leica RM2135). Les coupes sont récupérées et déposées avec de l'eau distillée sur des lames Superfrost puis étalées sur une platine chauffante à 37°C. Avant d'être utilisées pour les traitements histologiques, les coupes sont séchées dans une étuve à 37°C pendant 48 h.

L'Ac anti- α -Tubuline (Ac α -TUBU ; 1:500) dirigé contre la tubuline acétylée accumulée dans le cil primaire à la surface des CCN. Les coupes sont incubées toute la nuit en chambre humide. Après rinçage au PBS, elles sont ensuite incubées de la même manière, avec l'Ac secondaire (Goat-Anti-Mouse-IgG2b-ALEXA488) et du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole ; 1:500). Le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) est une molécule fluorescente capable de se lier fortement aux bases adénine (A) et

thymine (T) de l'ADN. Quand le DAPI absorbe la lumière UV (350 nm), il émet une fluorescence bleue brillante (450-490 nm), ce qui permet de détecter et visualiser l'ADN grâce à un microscope à fluorescence. Cette coloration permet la mise en évidence des noyaux en bleu.

III. 5. Hybridation in situ sur coupes

C'est le même principe que *l'hybridation in situ* des embryons entiers et la même méthode mais on procède après la deuxième fixation par le milieu de (PBT+ Glutaraldéhyde 0,1% +Formaldéhyde 4%) pendant 20 minutes suivie de deux rinçages au PBT pendant 5 minutes, une incubation dans une solution d'inclusion composée d'un tampon TAE (Tris acétate d'EDTA) additionné d'Agarose 4% préalablement dissout et homogénéisé par le chauffage au microonde. Une fois à température ambiante, les têtes de embryons sont alors incluses dans ce milieu semi-solide. Les embryons peuvent alors être coupés au vibratome (Lieca), à 90µm d'épaisseur, à une vitesse d'avancement de 4-6(unité) et une fréquence de 5-6hz. Les coupes sont récupérées au pinceau sur lames Superfrost® (Thermo Scientific), puis les coupes sont séchées dans une étuve à 37°C pendant 24 h. dans une boîte déjà humidifiée par une solution visqueuse composée de Formamide 50% + SCC 2x, pH5.

IV- Coloration en Crésyl violet :

Afin d'étudier les conséquences des traitements sur le développement de certains dérivés de la CNC aux stades tardifs (à partir de

E5), nous avons utilisé la coloration de crésyl violet 0,1% (ou le violet de crésyl) qui colore le cytoplasme en bleu, la chromatine des noyaux en rouge violet, le collagène en rouge clair et le cartilage en rouge. Après une incubation de 5 minutes, les coupes ont été rincées et ont subi une déshydratation progressive dans des bains d'éthanol 70%, puis d'éthanol absolu suivi de deux bains de toluène et puis elles ont été montées avec le milieu de montage Entellan (*MerckMillipore*).

V- OBSERVATIONS

V - 1. Observation au microscope à fluorescence

Un microscope à fluorescence (Leica DM 6000 B) est utilisé pour observer la fluorescence après marquage immunohistochimique des coupes d'embryons ; les acquisitions des images saisies sont obtenues avec le logiciel AF 6000 *Modular system* (LAS AF version : 3.1.0 *build* 8587). Pour d'embryons entiers, un microscope (Leica MZFLIII) est utilisé. Leur analyse et montage définitifs sont réalisés en exploitant les programmes Adobe® Photoshop® CS et ImageJ (National Institute of Health).

V - 2. Observation au microscope confocal SP8

Un microscope confocal (Leica TCS SP8) est également utilisé pour les coupes d'embryons plus épaisses. Leur analyse et montage définitifs sont réalisés en exploitant les programmes Adobe® Photoshop® CS et ImageJ (National Institute of Health).

VI - Transcription Reverse et PCR quantitative (q-PCR)

VI -1. Extraction des ARN totaux et transcription reverse

Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit *Nucleospin RNA II* (MACHEREY- NAGEL, France) suivi d'un traitement à la DNase sur colonne dont le protocole est fourni par le même fournisseur. La quantité d'ARN obtenu est déterminée par la mesure de l'absorbance optique à 260 nm. La qualité et l'intégrité des ARN obtenus sont contrôlées par une migration électrophorétique de 200 ng après leur dénaturation pendant 15 min à 65°C. 2 ug d'ARN totaux extraits sont utilisés pour la synthèse d'ADNc simple brin utilisant une Reverse Transcriptase (MMLV reverse transcriptase (PROMEGA, Madison, Wi USA) et des oligo-dTs comme amorces.

VI -2. Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR

25ng d'ADNc synthétisés sont utilisées pour étudier le taux d'ARNm des différents gènes testés par PCR quantitative en temps réel réalisée avec le système *Light Cycler® Fast Start. DNA Master SYBR Green I* (Roche, Version 15.0) conformément au protocole fourni par le fournisseur. La q-PCR se fait comme suit : - Dénaturation initiale de 5 min à 95°C suivie de 40 cycles : - Dénaturation pendant 15 s à 95°C suivie d'1 min d'hybridation à 60°C et élongation à 72°C. La quantification utilisée est une quantification relative $2^{-\Delta CT}$ avec *GAPDH* comme gène standard. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 10.

Gènes	Amorces	Gènes	Amorces
<i>GAPDH</i>	Sens : CTGAGTCTGAACCCCGACAT Anti-sens : AACCCCTATGCAGTCGTCGAG	<i>HDAC8</i>	Sens : TCGCCAGGATTTTTCCCAGG Anti-sens CAGCGTACACCTCCTTCAGC
<i>NF1</i>	Sens : GGCTTCCGTTACAGCCTGAA Anti-sens : CGTTTCCTGCCACCTGTTTG	<i>SOX9</i>	Sens : AAGTACCAACCACGCAGGAG Anti-sens CTGATGCTGGAGGATGACTG
<i>NF2</i>	Sens : AAAGGCCGACTCATTGGAGG Anti-sens : TCAGCCTTCTCTCCAGCTCA	<i>SOX10</i>	Sens : ACATGTCATGGGAGGAGGAG Anti-sens ATCAGCAAGGAAGCAAGCAT
<i>HDAC1</i>	Sens : CCGAGGACTCGGGGCTCTAT Anti-sens : CTGCGGGTCGCTGTAGACCT	<i>Wnt8b</i>	Sens : AAGGCCTTGAAGGTGGACTT Anti-sens CGTCTTGTCTCCAGGCAGT
<i>HDAC2</i>	Sens : GGAGATGTACCAGCCCAGTG Anti-sens : CCTAACATCAGCAATGGCAAGT		

Tableau 10: Les amorces spécifiques sens et anti-sens pour les analyses de RT-qPCR ont été synthétisées pour amplifier des séquences de 149-151 pb.

VII. Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées sous la forme \pm SEM (*standard error of the mean*). Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel *Graph-Pad Prism5.04* avec un intervalle de confiance de 95%. Les résultats collectés, à partir des observations indépendantes, sont comparés en utilisant le test non paramétrique de *Mann-Whitney U* ($*\leq 0.05$, $**\leq 0.01$ and $***\leq 0.001$). Pour la Q-PCR, La méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ est utilisée pour l'analyse des variations relatives d'expression génétique avec *GAPDH* comme gène normalisateur.

III- RESULTATS

La neurofibromatose de type 1 englobe un ensemble de manifestations pathologiques variées, à l'origine de tumeurs le long des nerfs et de la peau particulièrement invalidantes, associées à des troubles neurologiques occasionnés par des tumeurs cérébrales. Causée par des mutations polymorphes du gène NF1, qui code pour un suppresseur de tumeur, la Neurofibromine, la NF1 est largement étudiée dans son contexte génomique. Cependant, les causes développementales et les mécanismes cellulaires qui conditionnent la survenue de ses manifestations restent à élucider.

La raison tient principalement au fait que cette maladie peut potentiellement affecter tous les dérivés de la CN : aucun système expérimental n'a permis jusqu'à présent de modéliser cette maladie avec des modèles conventionnels. Les approches transgéniques systémiques reposent sur l'exploitation de l'activité des séquences promotrices des gènes considérés comme des marqueurs précoces de la CN. Cependant, l'activité de ces marqueurs précoces n'est que transitoire, et rapidement après la migration des cellules de la CN, elle se restreint à une sous-population destinée à générer un dérivé ou un lignage particulier. Considéré individuellement, chacun de ces marqueurs est exprimé soit, suivant un cours transitoire, soit de façon partielle dans la CN, soit selon un patron d'expression « en mosaïque ». Ceci implique que, dans ce contexte, une partie de la population des CCN échappe au contrôle du transgène, ce qui introduit un biais important dans l'expérimentation, et exclut la possibilité d'avoir

recours à leur cinétique d'expression pour suivre à long terme et de façon systématique le comportement des CCN (Barriga et al. 2014).

Par conséquent, une approche purement transgénique qui repose uniquement sur l'activation des séquences régulatrices d'un gène pour conduire des études de lignages ou des stratégies fonctionnelles de gain- ou perte-de-fonction n'est pas adaptée au type de projet que nous voulons mener. C'est ce qui a motivé le choix de notre stratégie expérimentale, basée sur l'utilisation des modèles aviaires, où la manipulation de l'expression de gènes, pour une surexpression ou une inactivation des gènes d'intérêt, est conduite par l'électroporation in ovo, de séquences nucléiques exogènes dans des tissus et à des stades précis.

1- Cinétique d'expression de NF1 chez l'embryon.

Afin de mettre au point notre modèle, nous avons, dans un premier temps, analysé le pourcentage d'homologie dans la composition en acides aminés entre le gène du poulet et de l'humain. L'alignement des séquences montre que cette composition présente plus de 95% d'homologie. (Voir Fig 29).

Sur la base de cette étude comparative, nous avons sous-cloné l'ADN complémentaire du gène NF1 du poulet et préparé un vecteur pour la synthèse des sondes sens et anti-sens afin de permettre l'analyse des transcrits de ce gène. (Voir Fig 30).

Nous avons établi le patron d'expression du gène NF1 au cours du développement embryonnaire normal, par hybridation in situ, entre les stades précoces de la neurulation qui correspondent à l'induction, la

formation et la migration des CCN et les stades tardifs qui correspondent aux étapes de différenciation des divers lignages des CCN, après leur migration dans les processus faciaux et les arcs branchiaux.

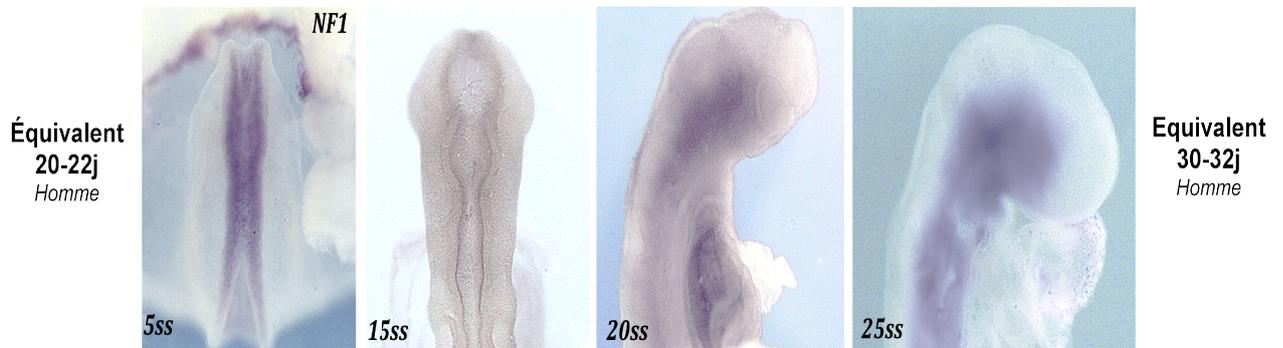


Fig.31: Patron d'expression de NF1 dans la région céphalique au cours de deux premiers jours de développement chez l'embryon de poulet.

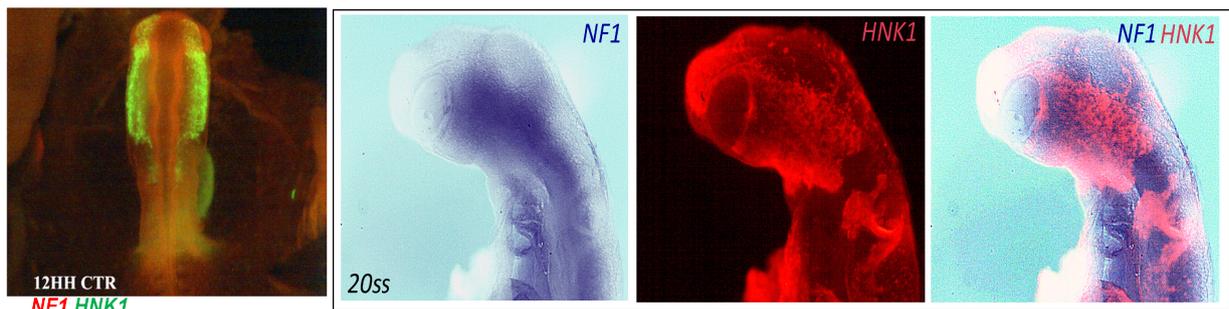


Fig. 32 : Patron d'expression de NF1 dans les CCN en migration par immunofluorescence et hybridation in situ.

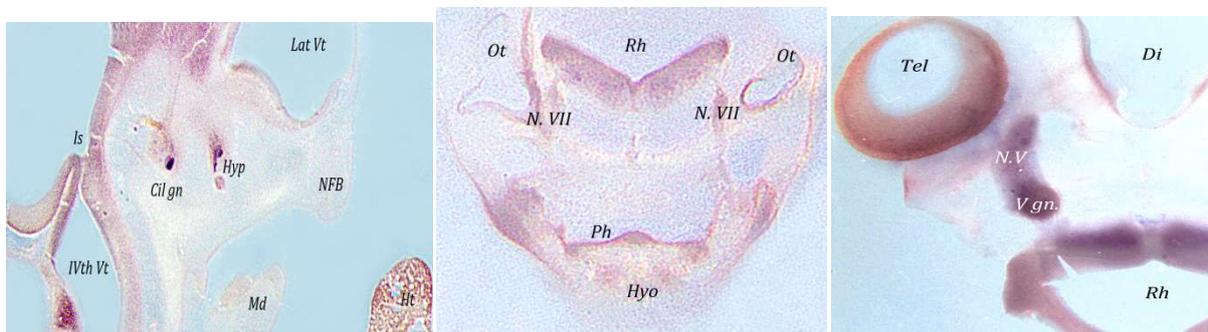


Fig. 33 : Patron d'expression de NF1 dans les dérivés neuraux des CCN chez l'embryon à E5. Rh: rhombencéphale, Di: diencéphale, Ot.: oreille, tel: télencéphale, ph: pharynx, Ve: ventricule.

Notre étude montre que le gène *NF1* est exprimé selon une cinétique qui présente deux phases d'accumulation des transcrits dans les CCN. Une première étape correspond la phase neuroépithéliale, à 5-6ss (E1.5), alors que les CCN sont encore associées au tube neural. Quelques heures plus tard, alors que les cellules débutent leur migration, elles cessent temporairement d'exprimer ce gène (fig.31). Puis, une fois qu'elles commencent à coloniser les processus faciaux et arcs branchiaux, c'est-à-dire, à partir de du stade de 20ss, jusqu'à deux jours (E2), le mésenchyme dérivé des CCN présente une forte accumulation des transcrits de *NF1* (fig.31). A des stades plus tardifs, l'activité de *NF1* est strictement corrélée à présence des CCN révélées en double coloration par l'immuno-fluorescence sur embryons entiers avec l'Ac HNK1 (Fig. 32). Nous avons pu montrer que l'activité du *NF1* est fortement maintenue dans les structures neurales dérivées des CCN, et plus particulièrement le ganglion trijumeau et les nerfs crâniens VII, VIII (Fig. 33).

2- Mise au point et validation du modèle d'inactivation de *NF1* chez l'embryon.

Nous avons développé un système permettant l'inactivation totale du gène *NF1* spécifiquement dans les CCN, en utilisant des molécules d'ARN interférent (ARNi) dirigés contre l'ADN complémentaire de *NF1*. Ces molécules ont été transfectées par électroporation bilatérale dans les CCN avant le début de leur migration chez l'embryon de poulet. De cette manière, nous pouvons réaliser une inactivation rapide, globale et bilatérale du gène

dans la population des CCN qui colonisent le territoire céphalique, sans risquer de compensation contralatérale par des cellules non-transfectées.

Nous avons réalisé une gamme de concentration afin de déterminer le meilleur compromis entre la survie des embryons et la pénétrance phénotypique. En effet, il s'est avéré que pour les concentrations les plus élevées d'ARNi normalement utilisées en routine au laboratoire (300ng/ μ l), nous avons obtenu une mortalité massive de plus de 90% dès les 24 premières heures après la transfection (Fig.34).

Cette concentration n'étant pas compatible avec une étude à long terme, nous avons donc décidé de travailler avec la dose de 175ng/ μ l qui permet d'obtenir une survie de 40% à des stades plus tardifs (E8), nous permettant ainsi d'étudier la pénétrance du « silencing » de *NF1* sur les divers lignages dérivés des CCN, tant précoces (gliaux, périvasculaires, conjonctifs), que plus tardifs (squelettiques, pigmentaires).

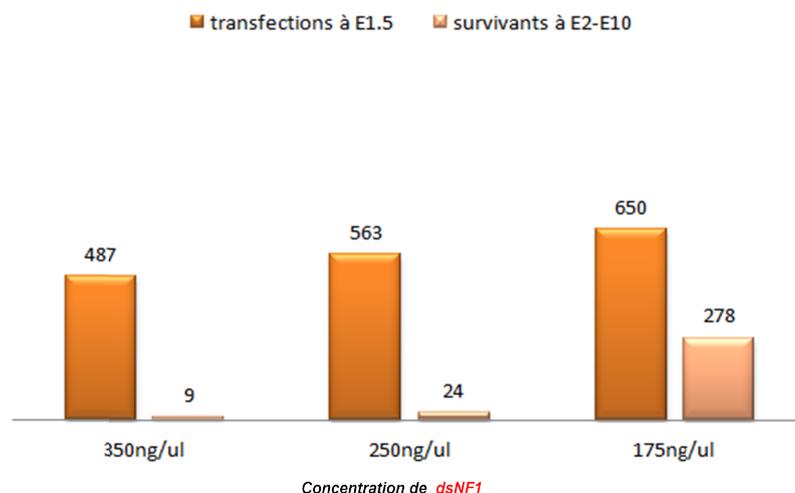
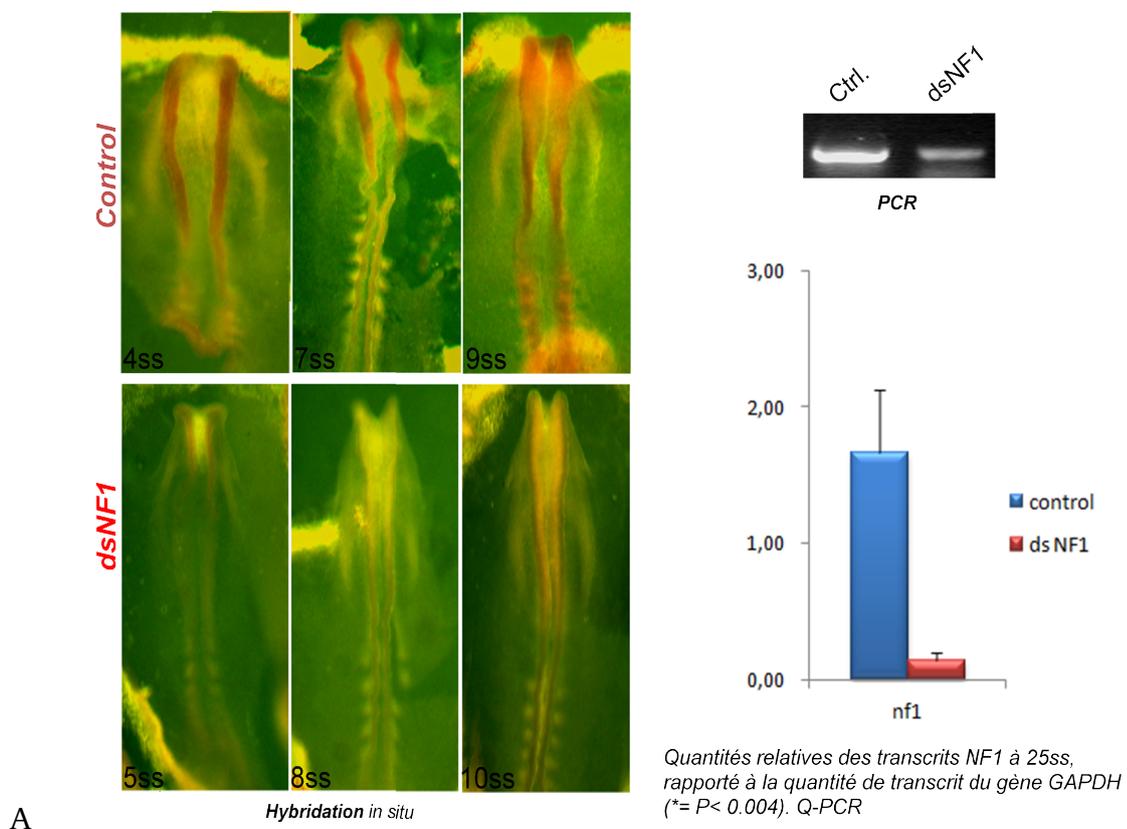
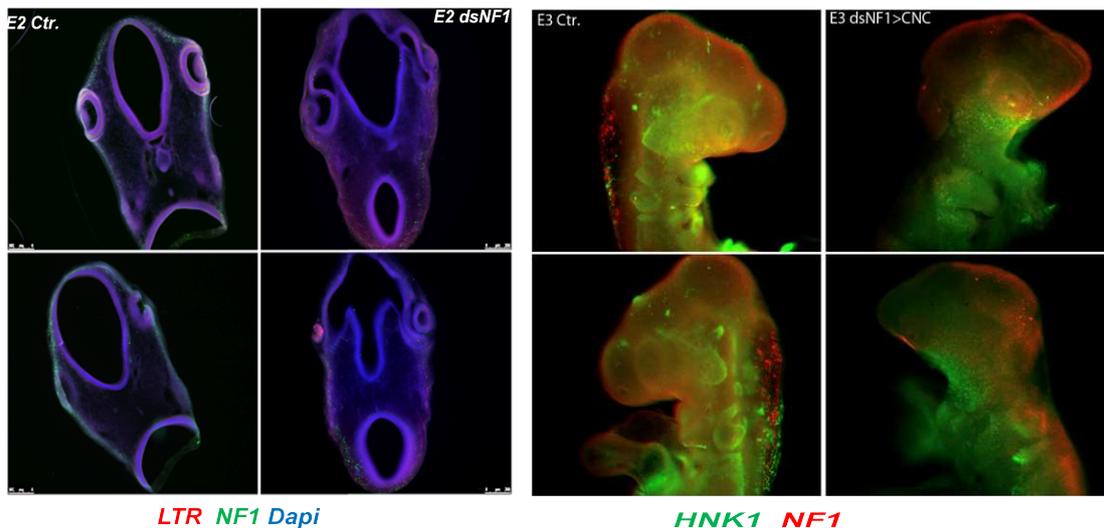


Fig.34 : Pourcentage de survie des embryons expérimentaux selon la dose des molécules ANRi transfectées: les effectifs expérimentaux sont exprimés en nombre d'individus.

L'efficacité et la spécificité de l'inactivation de *NF1* sur les accumulations des transcrits ont été contrôlées semi-quantitativement par hybridation in situ quelques heures après la transfection et quantitativement par la Q-PCR, 24h après transfection dans les CCN.





B

Fig. 35 : **(A)** Evaluation de l'efficacité de l'inactivation du gène *NF1* après électroporation de l'ARN *dsNF1*, par hybridation *in situ* sur l'embryon entier (*in toto*) à 5ss, 8ss et 10ss. Analyse par la PCR et q-PCR 24 heures après la transfection. **(B)** Analyse immunocytochimique sur coupes, 48 heures après la transfection montrant une augmentation de la mort cellulaire et une répression de *NF1*, puis à 72 heures: les immunomarquages sur embryons totaux montrent une diminution de l'activité de *NF1* (en rouge, Alexa 596) et l'altération du comportement migratoires des CCN (en vert, Alexa 488).

3- Analyse des phénotypes anatomiques, histologiques du silencing de *NF1* chez l'embryon.

Nous avons cherché à caractériser les conséquences de l'inactivation de *NF1* sur le comportement migratoire, prolifératif des CCN, et parallèlement nous avons suivi l'apparition des foyers de mort cellulaire à E2,5. Suite à l'inactivation de *NF1*, nous notons une altération du comportement migratoire des CCN, ainsi qu'une diminution de leur capacité proliférative, révélée par des doubles immunomarquages réalisés avec

l'anticorps anti-phospho-Histone H3 et HNK1, ainsi que l'augmentation des foyers de la mort cellulaire, mis en évidence par marquage fluorescent au Lyotracker® (Invitrogen) au niveau cervico-céphalique chez les embryons expérimentaux transfectés. (Fig.36).

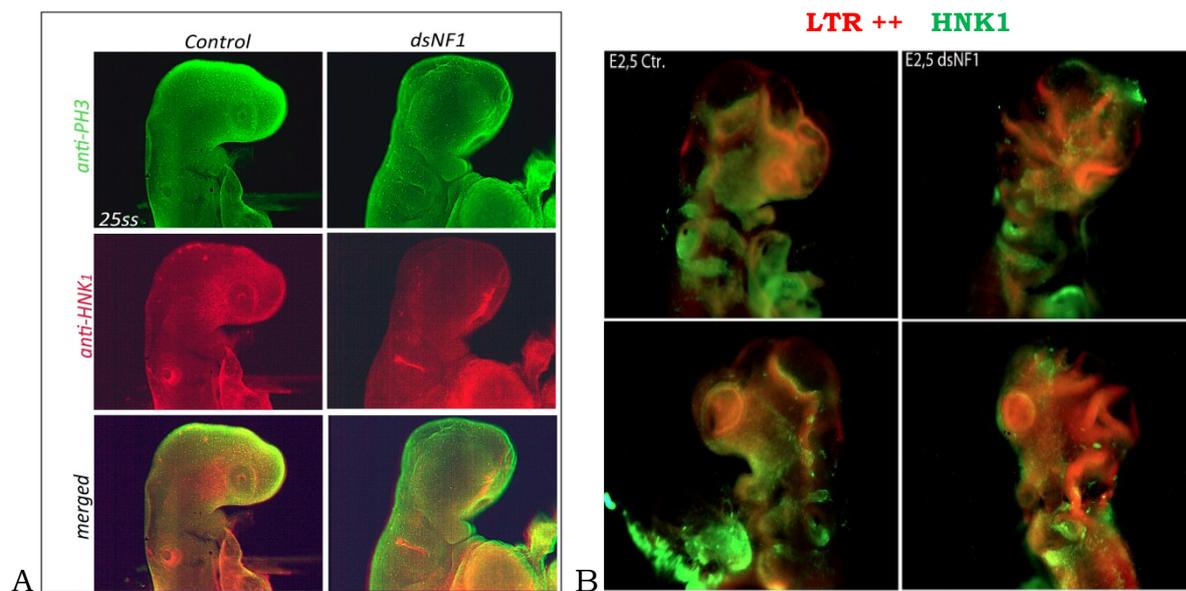
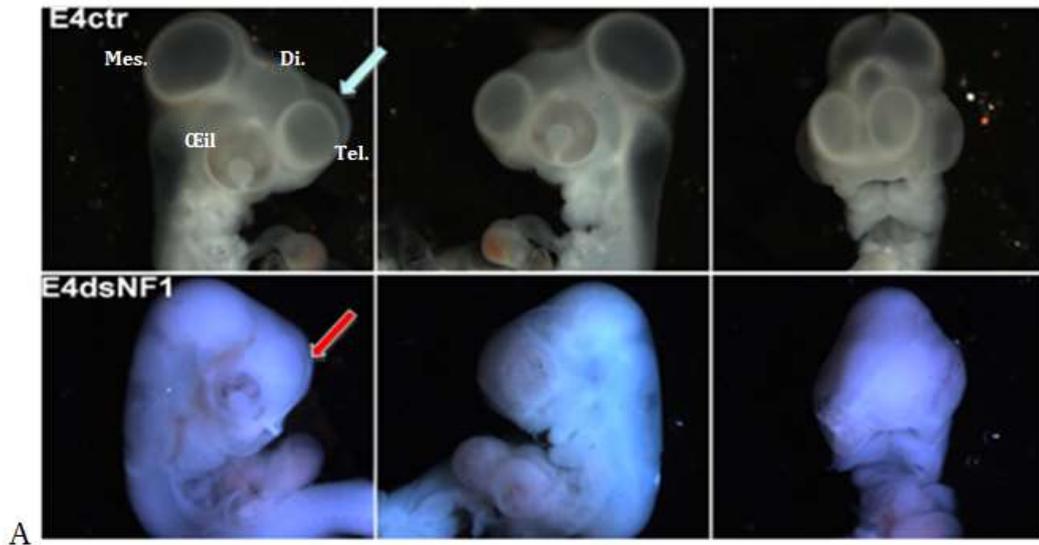


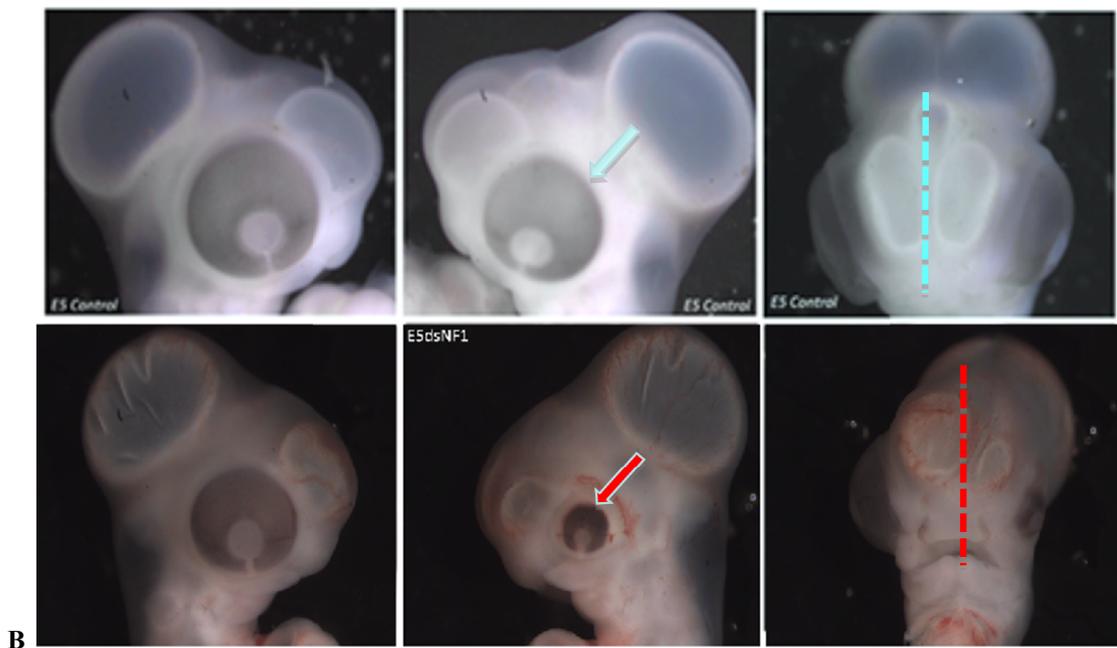
Fig.36 : (A) Les embryons traités par dsNF1 présentent des malformations crâniennes et faciales à cause de la migration déficiente des CCN et la diminution de la prolifération. (B) Augmentation des foyers de mort cellulaire, mis en évidence dans les flux de migration des CCN.

À partir d'E5, nous observons les altérations morphologiques importantes chez les embryons soumis à l'inactivation de NF1. Celles-ci consistent en une hypotrophie de la face supérieure, caractérisée par une hypoplasie sévère du télencéphale et une microphthalmie. Au contraire, au niveau de la face inférieure et de la région pharyngée, nous notons une hypertrophie des ABs (Fig. 37A)

De façon très frappante, et bien que la perte de fonction de *NF1* soit conduite de façon bilatérale, nous observons systématiquement une progression très asymétrique des manifestations malformatives faciales (Fig. 37B).

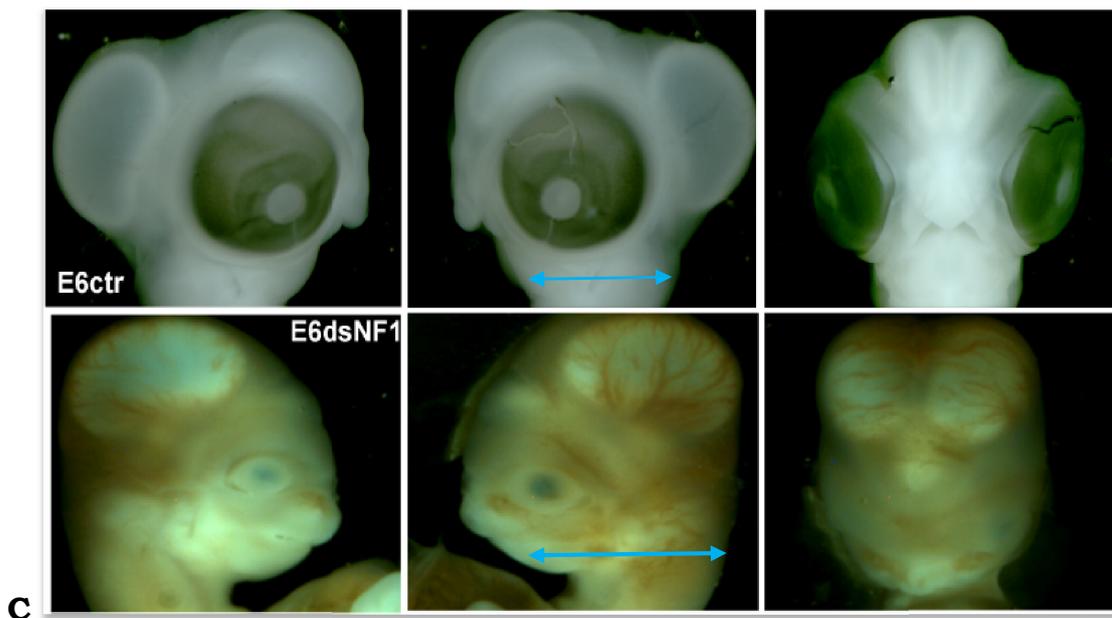


(Fig. 37) : A- Microcéphalie télencéphalique et Microphthalmie. Mes : Mesencéphale ; Di : Diencéphale ; Tel : télencéphale ; Œil.



(Fig. 37) : B- Aspects faciaux asymétriques

L'hypertrophie des arcs branchiaux coïncide avec une dilatation vasculaire cervico-céphalique généralisée à l'échelle de l'arborescence vasculaire qui s'étend des troncs brachio-céphaliques et des artères carotides aux fines ramifications capillaires méningées et faciales (Fig. 37B). En utilisant l'anticorps α SMA pour mettre en évidence l'actine du muscle lisse présente dans le cytoplasme des péricytes, les cellules péri-vasculaires dérivées de la CN, nous avons constaté que la dilatation vasculaire cervicale (Fig. 39), est associée à un épaissement de la paroi des vaisseaux de l'axe jugulo-carotidien et mais également des vaisseaux méningés (Fig. 40).



(Fig. 37) : C- *Microcéphalie télencéphalique, Microphthalmie, Hypertrophie cervicale (Hypertrophie des arcs branchiaux -flèches blues-), et Dilatation vasculaire.*

A des stades plus tardifs, à partir de E6, alors que le parenchyme cérébral tend à se différencier en zone épendymaire (Ventricular zone) et sous-épendymaire (Sub-ventricular zone) et l'épaissit, les modifications vasculaires au niveau central, sont corrélées à un

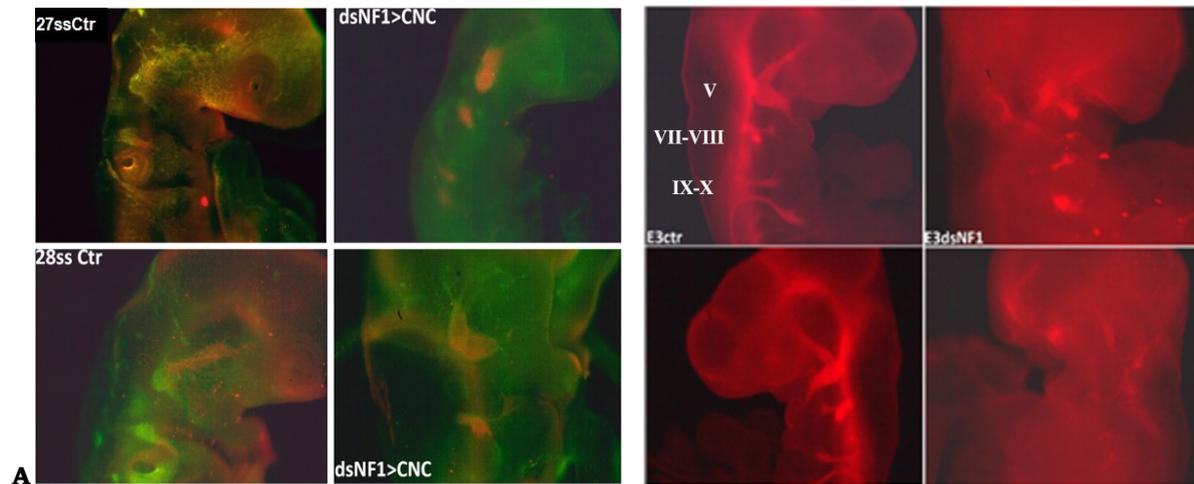
épaississement flagrant sous-épendymaire et une altération au ratio épendymaire/sous-épendymaire tant au niveau rhombencéphalique que diencéphalique. A E8, nous notons l'apparition de processus néoplasiques centraux et de tumeurs intracérébrales (Fig.37).



(Fig. 37) : D- Formations néoplasiques cérébrales et Aspects faciaux asymétriques
Fig. 37 : Défauts phénotypiques céphaliques, cervicaux, vasculaires. A, B, C et D.

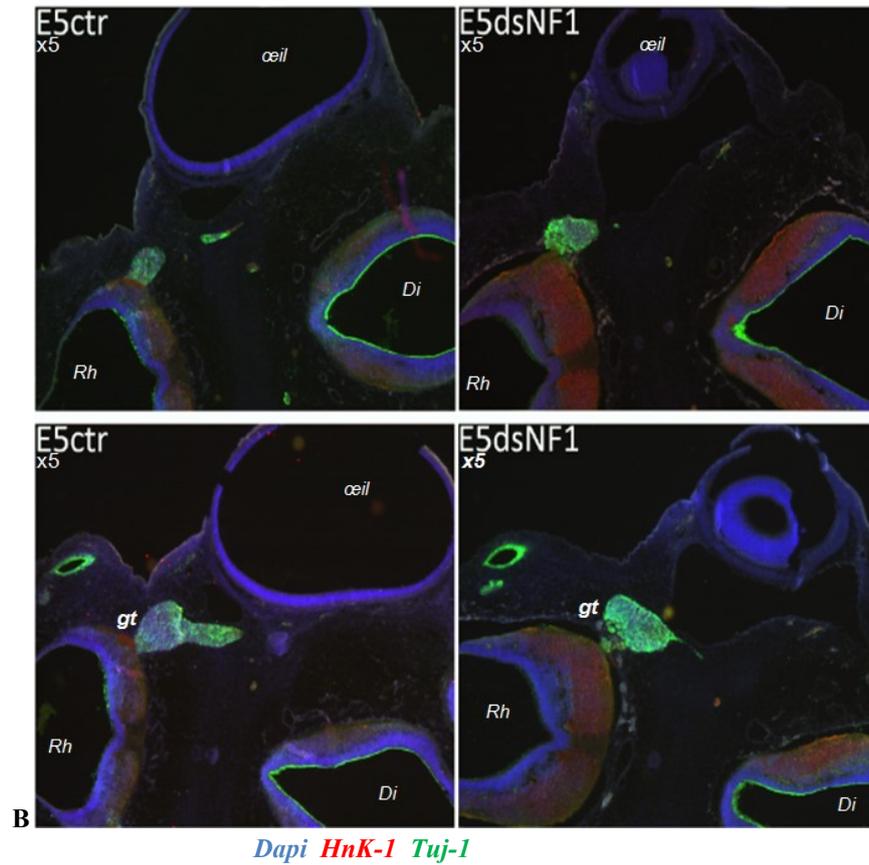
De façon concomitante à l'hypertrophie des arcs branchiaux, nous avons noté des défauts de la gangliogénèse céphalique, visible dès E2,5. Cette altération porte plus particulièrement sur les ganglions trijumeau, glosso-vagal et acoustico-facial (Fig 38A). Ces défauts sont constatés par une étude des tissus par immunofluorescence (avec quels anticorps ??) montrant en parallèle un épaississement évident en sous-épendymaire et une altération du ratio épendymaire/sous-épendymaire. (Fig. 38B). En utilisant l'anticorps anti- α SMA pour mettre en évidence les péricytes (cellules péri-vasculaires dérivées de la CN) nous avons constaté la

dilatation vasculaire cervicale à l'axe jugulo-carotidien et encore au niveau des vaisseaux méningés (Fig. 39, 40).

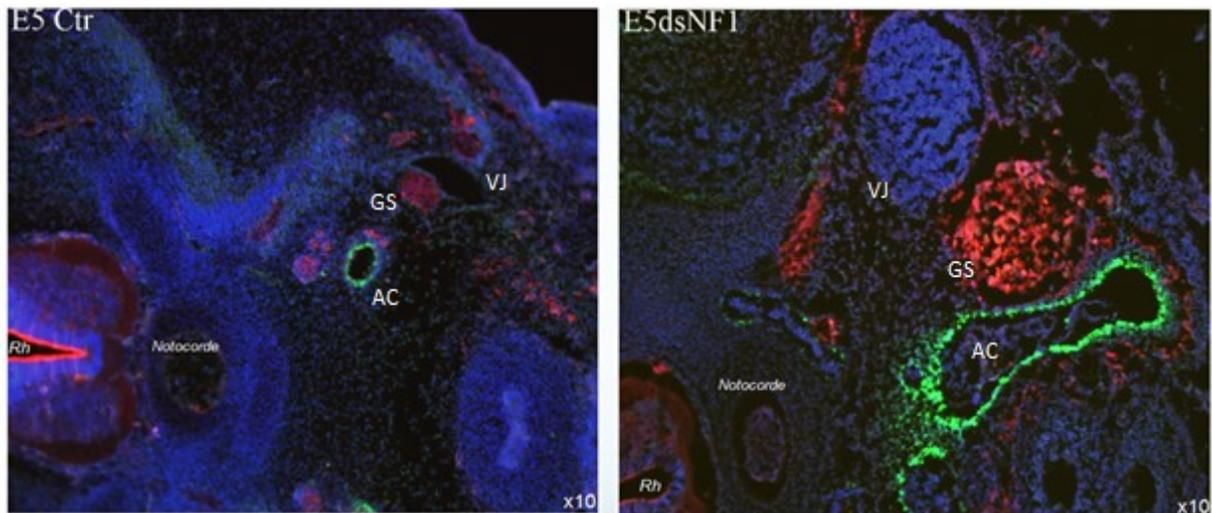


Ac-HNK1 (cellules gliales), Ac-Tuj1 (neurones)

Fig. 38 : A-Effets de l'inactivation de NF1 sur la gangliogenèse crânienne, Altération morphologique développementale des ganglions V, VII-VIII & IX-X.



(Fig.38) : B-Altération ganglionnaires et cérébrales sur coupes en immunofluorescence révélant les péricytes par l'AC-SMA; Or.: oreille ; Gt: trigéminal ; Di: diencéphale ; Rh: rhombencéphale là où le ratio épendymaire (bleu) /sous-épendymaire (rouge).

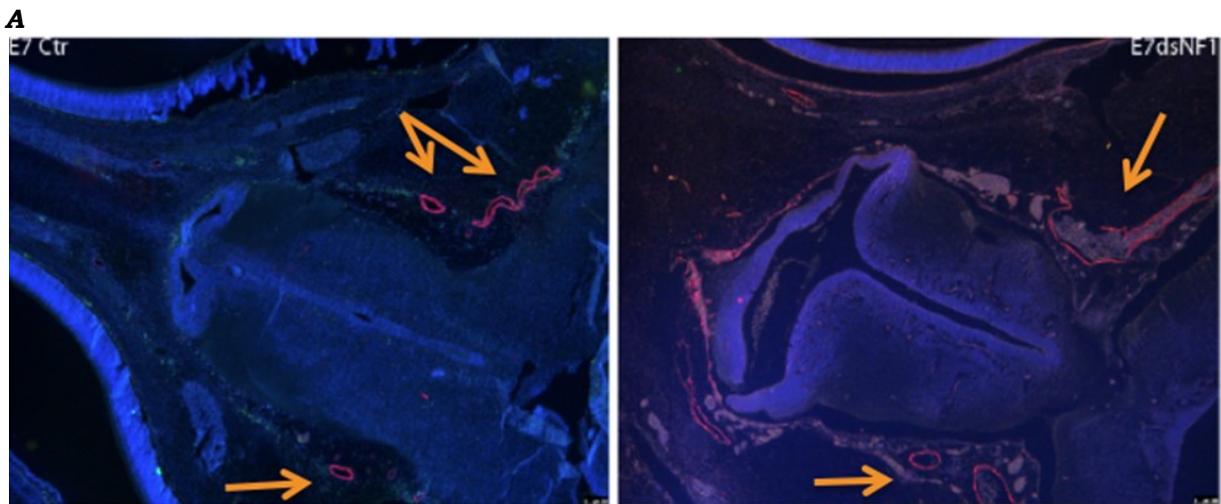


A

B

Dapi, HnK-1, SMA

Fig. 39: **A-** E5 Contrôle. **B-** E5 dsNF1 représentant la dilatation vasculaire cervicale à l'axe jugulo-carotidien à la paroi de l'artère carotide (CA). Veine Jugulaire (VJ), Ganglion Sympathique (GS).



A

Dapi, NF1, SMA

B

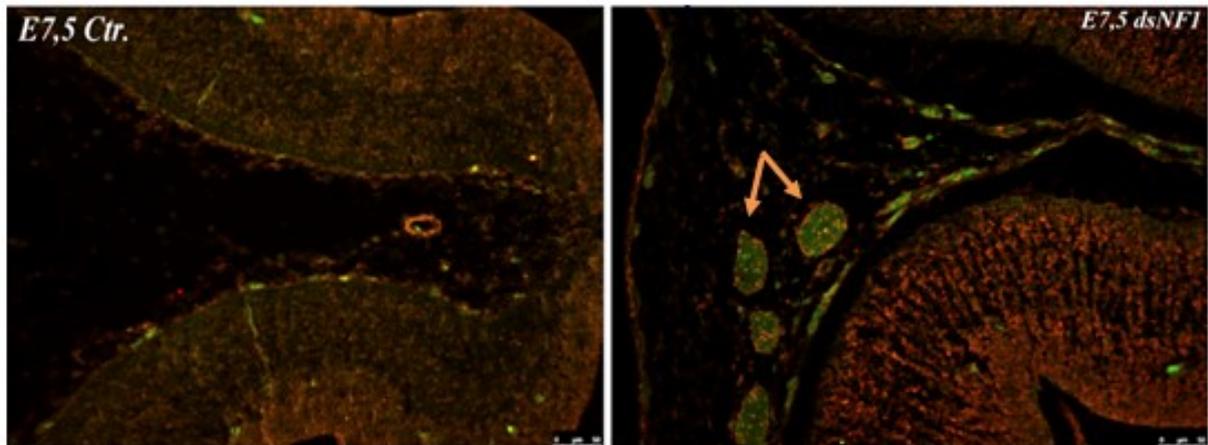
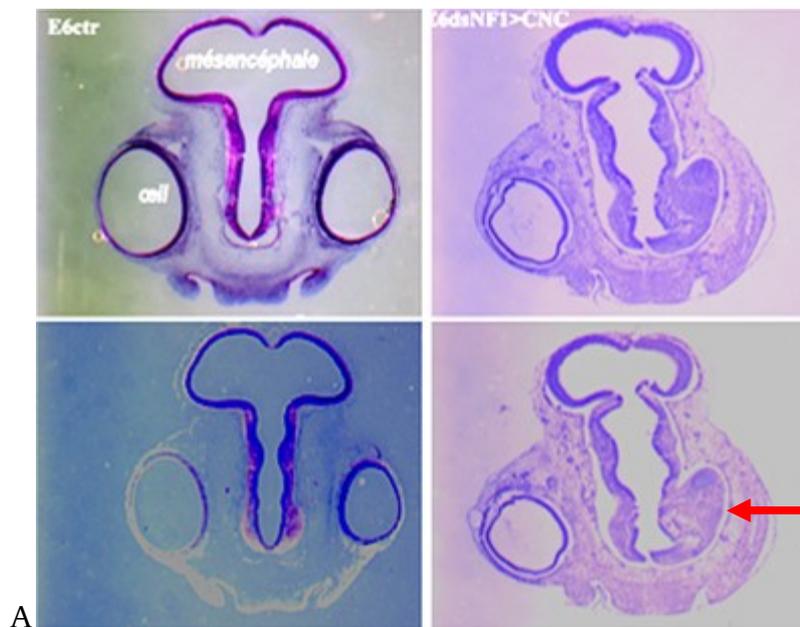


Fig. 40 : **A**- E7 Contrôle. **B**- E7, 5 dsNF1 avec dilatation vasculaire cervicale au niveau des vaisseaux méningés.

Chez les malades atteints de la NF1, le gliome optique survient dans environ la moitié des cas. Nous avons donc recherché cette manifestation dans notre système expérimental. Nous obtenons un processus néoplasique des voies optiques visible dès E6, et qui reproduit le gliome du nerf optique (Fig 41).



A

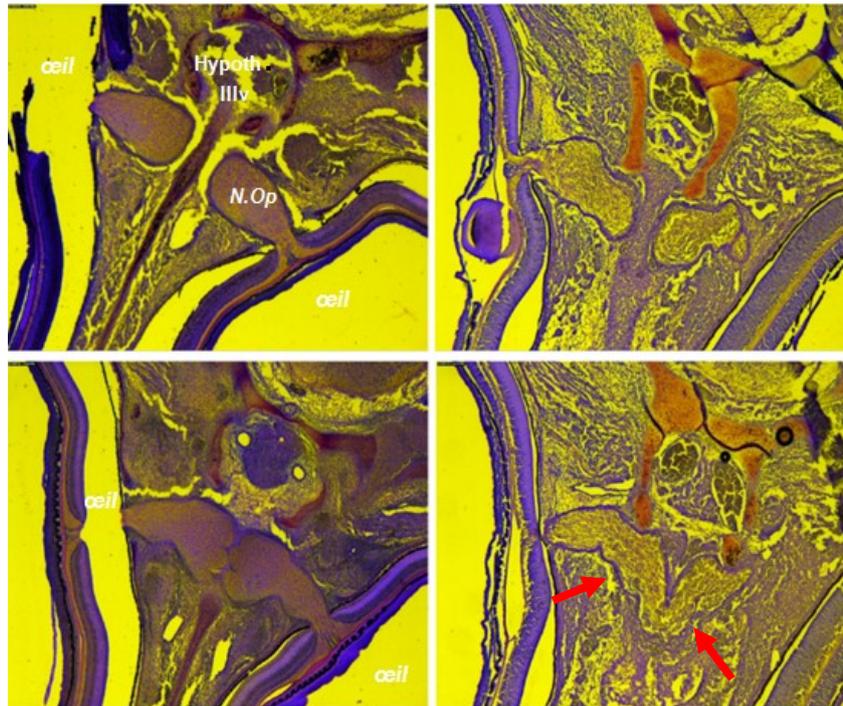


Fig. 41 : Processus néoplasique et dysplasie des voies optiques (flèches rouges) chez des embryons à E6. **(A)**- Coupes histologiques axiales passant par les voies optiques, et colorées au Cresyl violet. **(B)**- Coupes histologiques axiales passant par le chiasma optique. colorées en Cresyl violet sur des embryons de E8,5j.

De plus, nous avons recherché dans notre modèle, si le signe cardinal de cette pathologie chez l'Homme, les manifestations pigmentaires cutanées, était également reproduit dans notre système expérimental. Dans notre modèle, Nous obtenons des manifestations cutanées chez les embryons expérimentaux à partir d'E11 : ils consistent en des excès d'accumulation de mélanoblastes et mélanocytes, mis en évidence par les immunomarquages avec l'AC anti-melEM. Les modifications pigmentaires sont très évocatrices des taches « café-au-lait, » le signe le plus constant et plus stable chez les patients de la NF1. (Fig.42).

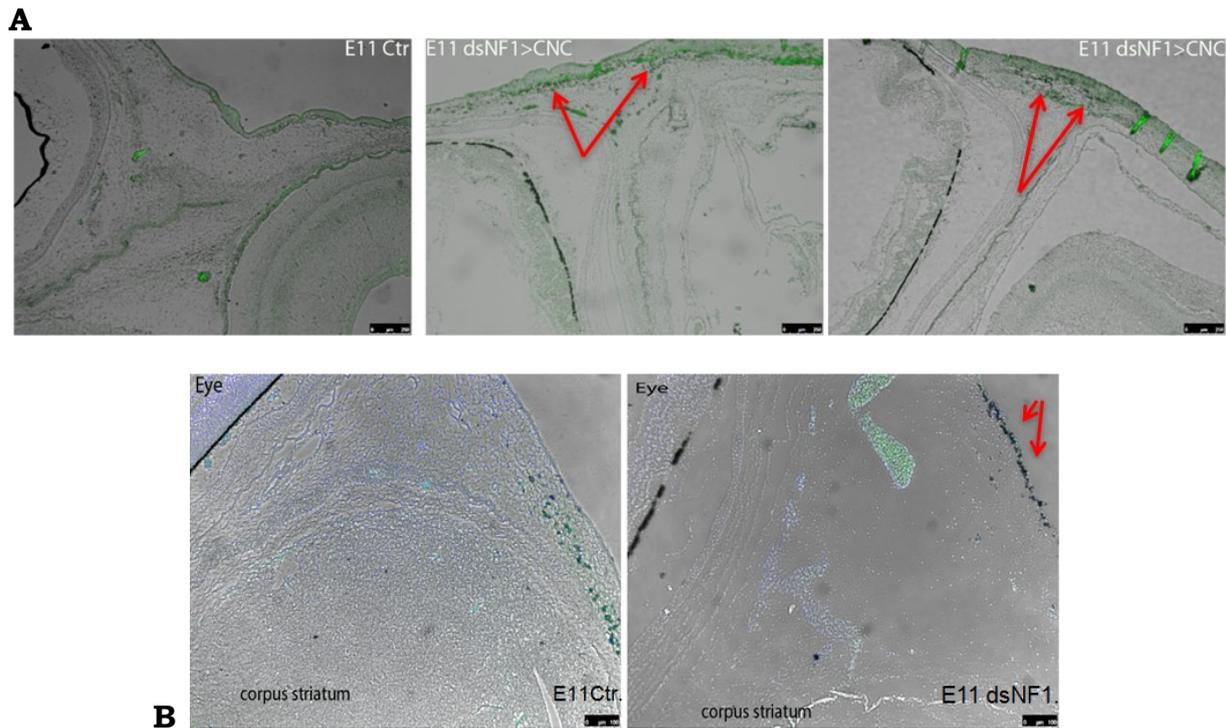


Fig 42: Les taches pigmentées Café au lait. *melEM* (mélanocytes) flèches rouges. **A-** l'excès d'accumulation de mélanoblastes et mélanocytes dans la peau des embryons transfectés *dsNF1*. **B-** Image en superposition avec une coloration *Dapi* visualisant la position normale des noyaux cellulaires dans la peau de contrôle alors que l'on observe une augmentation du nombre de ces derniers au niveau de la pigmentation (*melEM* et *Dapi*) de la peau ainsi qu'une perturbation de celle de la rétine.

Ainsi, nous montrons que notre modèle d'inactivation du gène *NF1* restreint à la population des CCN permet de générer l'ensemble des signes cliniques de la maladie. Cette première partie du projet a permis également de révéler que la première modification qui intervient dans la capacité de différenciation des CCN concerne le lignage périvasculaire et l'épaississement de la paroi des vaisseaux, associé à des dilatations vasculaires. Cette première partie du travail montre également que ces phénotypes vasculaires précèdent la survenue de processus néoplasiques au niveau cérébral et optique.

4- Relation moléculaire entre NF1 & NF2.

Nous savons qu'en pathologie humaine, il existe deux types de neurofibromatoses, d'une part, la NF1 que nous étudions plus particulièrement, et, d'autre part, la neurofibromatose de type 2 (NF2) causée par des mutations du gène *NF2* ou *Merlin* (Chen Y. et al. 2004). Actuellement, la nosologie appréhende ces deux pathologies de façon totalement indépendante car elles sont considérées comme des maladies distinctes (Wolkenstein et al, 2001).

Nous avons cherché à savoir si l'inactivation du gène *NF1* pouvait avoir des conséquences sur l'expression du gène *NF2*. Nous avons par conséquent cherché à évaluer par qPCR, les effets de la perte de fonction de *NF1*, sur l'activité transcriptionnelle de *NF2*. Vingt-quatre heures après l'inactivation de *NF1*, nous constatons une réduction drastique du niveau d'activité de *NF2* (Fig.43). Cette observation montre qu'il existe une régulation transcriptionnelle du gène *NF2* par *NF1*. Ce résultat suggère qu'un lien moléculaire existe entre ces deux pathologies. Ce lien fonctionnel pourrait être impliqué dans les manifestations neurocutanées et neurofibromes au niveau des cellules gliales, communes à ces deux maladies.

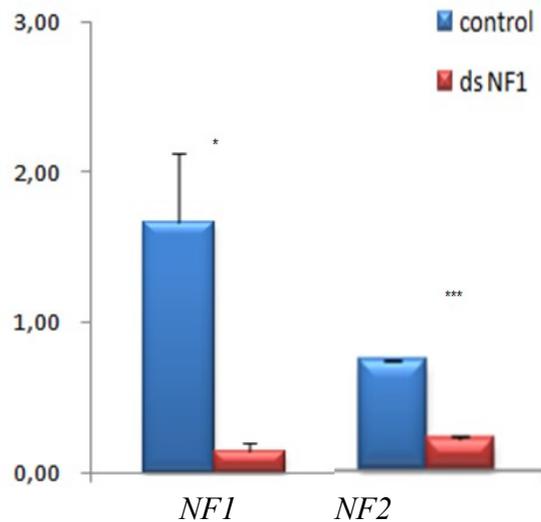


Fig. 43: Quantités relatives des transcrits NF1 et NF2 à 25ss, rapportées à la quantité de transcrits du gène GAPDH (*= $P < 0.05$, ***= $p < 0,001$). Q-PCR.

5- Analyse fonctionnelle du rôle des Histone désacétylases et implication dans la régulation de NF1.

Pour une large part, la maladie NF1 survient de façon sporadique, ce qui peut suggérer que des mécanismes épigénétiques soient impliqués dans les dérégulations de la différenciation des CCN, à l'origine de cette maladie.

Nous avons voulu évaluer l'implication des régulations épigénétiques sur l'activité du gène *NF1*, à travers l'étude de l'expression des molécules Histones Désacétylases (HDACs) qui sont impliquées dans le remodelage de la chromatine et régulent l'expression des gènes.

Nous avons porté notre intérêt sur l'activité des gènes *HDAC 1*, *HDAC2* et *HDAC8*, car ils sont exprimés selon un patron d'expression, aux mêmes stades et dans les mêmes CCN, que le gène *NF1*.

Les résultats obtenus, après la mise en silence de NF1 par une analyse Q-PCR montrent que les activités de *HDAC2* et *HDAC8* sont réprimées à 20% et 80% respectivement.

A l'inverse, les transcrits de *HDAC1* sont augmentés ($\Delta x2$ par rapport au contrôle (Fig.44)

Nous avons également considéré l'accumulation des protéines de ces gènes par immunofluorescence sur embryons entiers au même stade (Fig. 45, 46, 47).

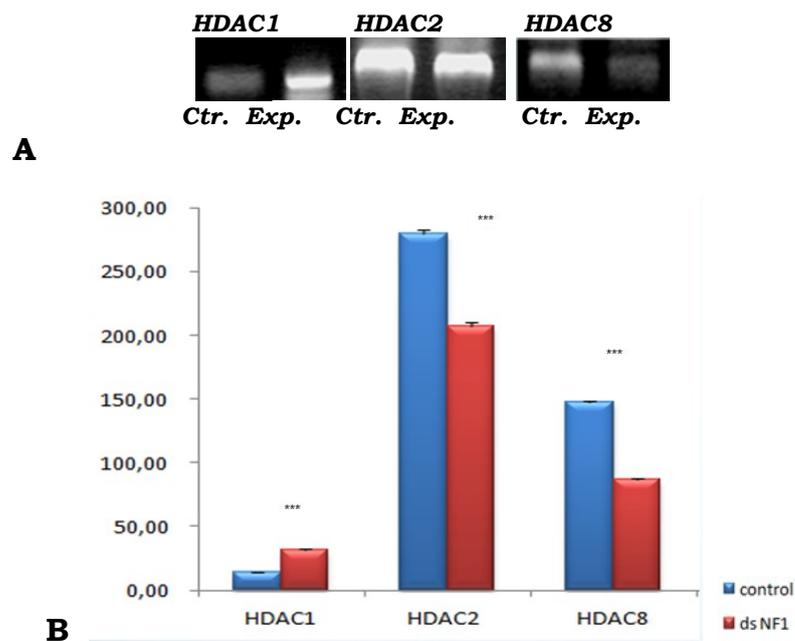


Fig. 44: A) : Quantités relatives des transcrits *HDAC1*, *HDAC2* et *HDAC8* à 25ss, rapporté à la quantité de transcrit du gène *GAPDH* (***= $p < 0,001$) en Q-PCR. **B) :** RT-PCR sur gel : entre Contrôles et expérimentales (Ctr. & Exp.) pour les trois gènes respectivement (*HDAC1*, *HDAC2* et *Hdac8*) les résultats sont confirmés par la Q-PCR.

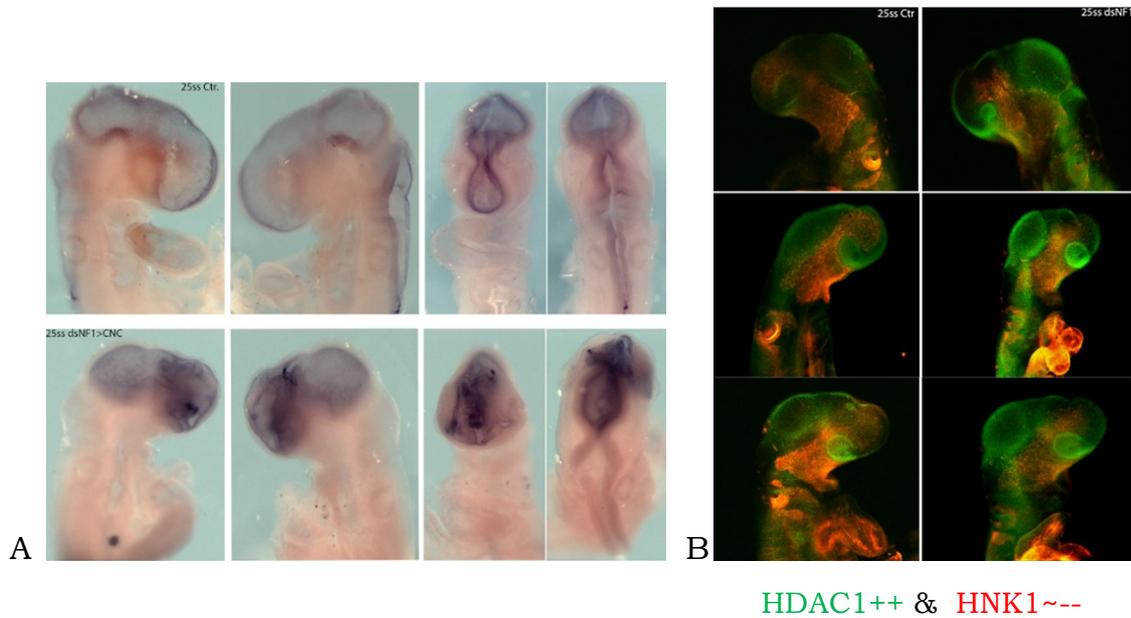


Fig. 45 : **A)** : Patron d'expression *HDAC1* chez l'embryon témoin de 25ss et celui après la transfection par *dsNF1* après inactivation de *NF1* . L'expression de *HDAC1* est augmentée. **B)** : En immunofluorescence les effets de l'inactivation de *NF1* sur l'expression de *HDAC1* où *HDAC1*⁺⁺ est surexprimé et la migration des CCN *HNK1*⁻⁻ - perturbées et leur nombre diminué

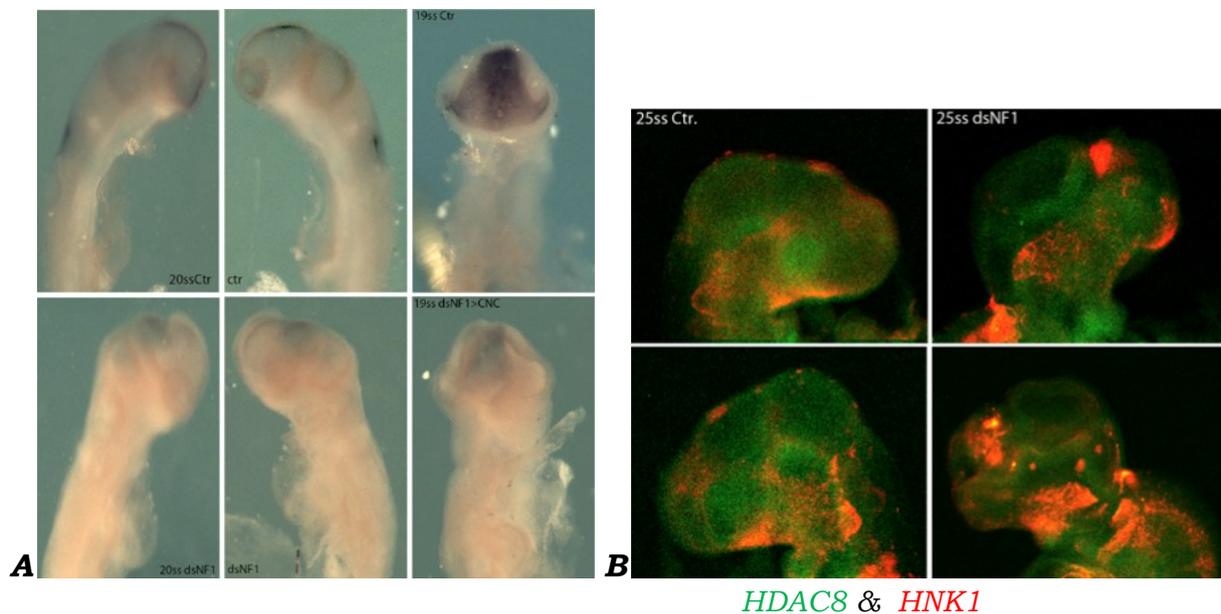


Fig. 46 : **A)** : Patron d'expression *HDAC8* chez l'embryon contrôle de 20ss et celui après la transfection par *dsNF1* (hybridation *in situ in toto* Fab-anti-Dig puis le substrat *NBT-BCIP*). L'expression de *HDAC8* est réprimée. **B)** : En immunofluorescence, les effets de l'inactivation de *NF1* se caractérisent par la répression de *HDAC8* et *HDAC8*⁻ dans les CCN *HNK1*⁻⁻ en migration

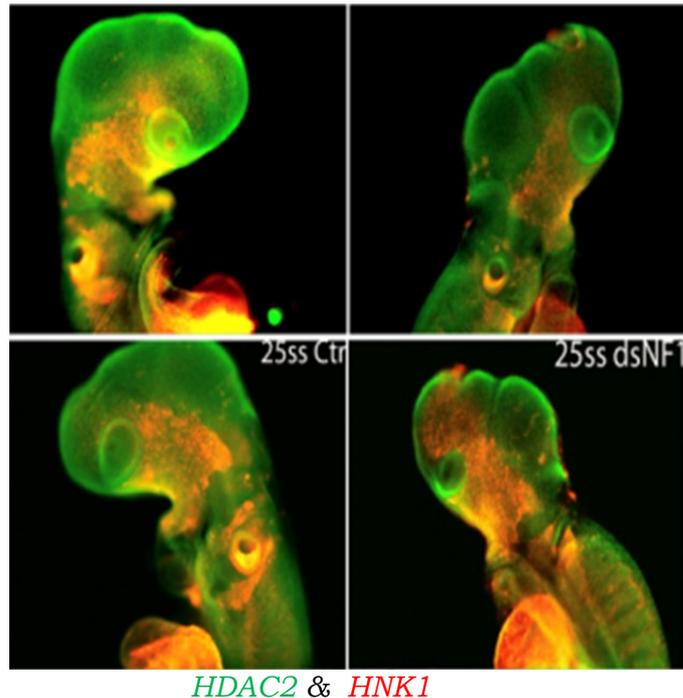


Fig. 47 : Immunofluorescence montrant les effets de l'inactivation de *NF1* sur l'expression de *HDAC2* (*HDAC2* - -) bien réprimé et les CCN (*HNK1* ~~-) la migration perturbée et diminuée.

Sur la base de ses résultats, nous avons entrepris un crible fonctionnel de chacun de ces gènes, selon un protocole expérimental analogue à celui appliqué à l'étude du gène *NF1*.

De façon analogue à ce que nous avons noté lors de l'inactivation de *NF1*, nous observons que la perte de fonction de *HDAC8* s'accompagne de dilatations vasculaires (Fig. 48), tant au niveau méningé que basicrânien (Fig. 49). Nous montrons que l'inactivation du gène de *HDAC8* permet à lui seul de phénotypier les altérations vasculaires observées chez les embryons hypomorphes pour *NF1*. Ces observations suggèrent un rôle important de *HDAC8* dans l'engagement du lignage péricytaire des CCN et dans la stabilité phénotypique des péricytes céphaliques.

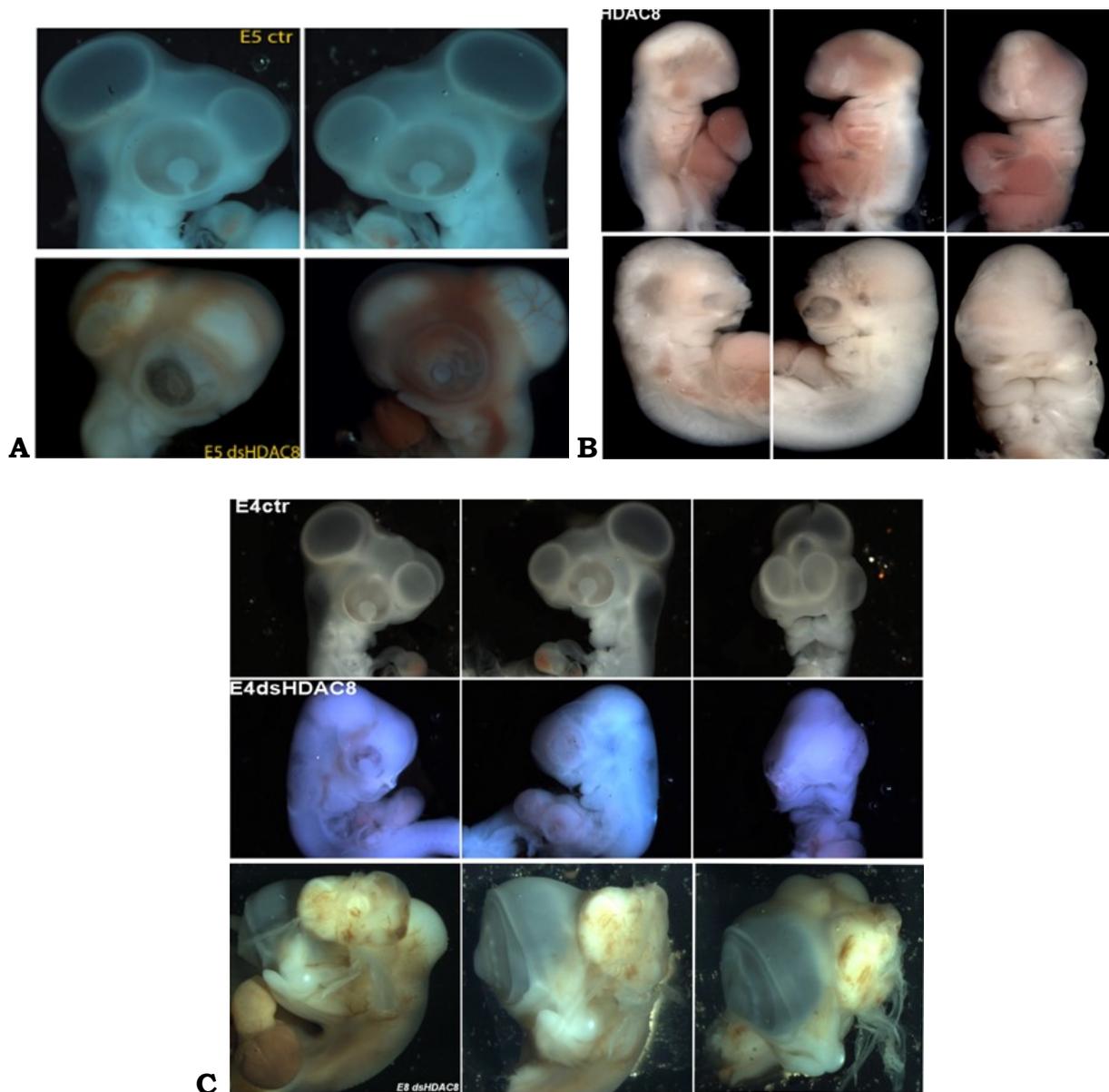


Fig. 48: Défauts phénotypiques céphaliques, cervicaux, vasculaires après l'inactivation de HDAC8 par dsHDAC8 **A)** : à une concentration de dsHDAC8 de 180ng/μl, **B)** : de 350ng/μl, **C)** : de 300ng/μl. Plus la dose injectée est élevée, plus elle est malformative. L'inactivation de HDAC8 s'accompagne toujours de dilatations vasculaires.

Au cours de ces expériences, nous avons noté une élévation de l'activité d'acétylation (H3K27acétylée) dans les vaisseaux méningés et les zones capillaires sous-épendymaire, qui coïncide avec les altérations de

croissance de la zone sous-épendymaire par rapport à la couche épendymaire, et qui précède l'apparition de processus néoplasiques centraux dans le parenchyme cérébral. Cette augmentation de l'acétylation est également observée au cours de la gangliogénèse crânienne tant chez les embryons transfectés avec dsNF1 que ceux transfectés avec le dsHDAC8.

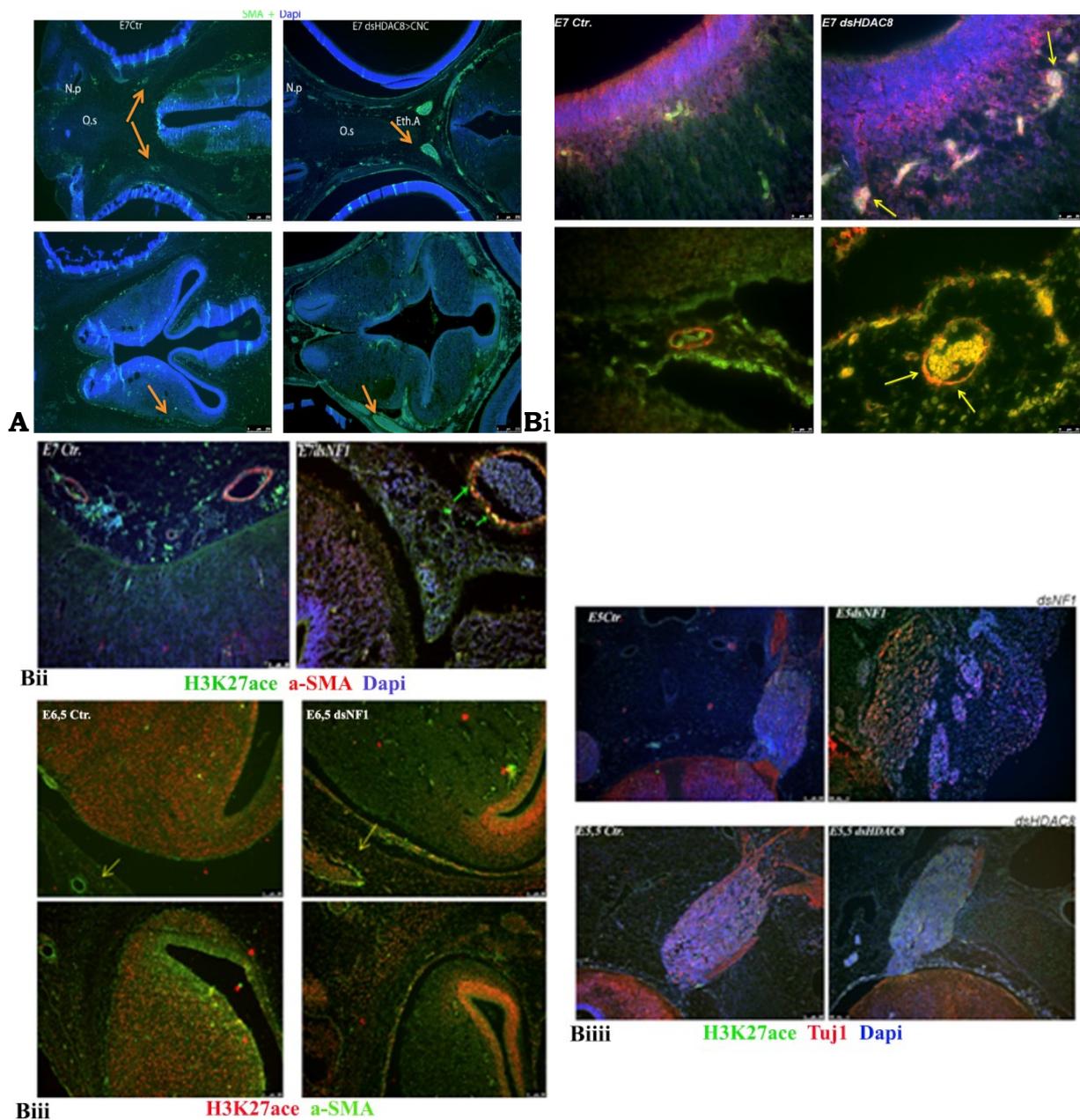


Fig. 49 : A) : Analyse immunocytochimique montrant, suite à la perte de fonction de HDAC8, des dilatations vasculaires au niveau méningé et basicranien (O.s : Septum

Orbitaire, Eth.A : Artère Ethmoïdale, N.p : Processus Nasal) suggérant un rôle prépondérant de ce gène dans la stabilité des péricytes (α -SMA) et Dapi. **Bi**) : les péricytes visualisés au moyen de (α -SMA) dans lesquelles une élévation de l'activité d'acétylation révélées par l'anticorps H3K27acétyle dans les zones capillaires de sous-épendymaire et les vaisseaux méningés. **Bii**) Par comparaison, suite à l'inactivation de NF1, nous observons au niveau des vaisseaux méningés une élévation de l'activité d'acétylation (H3K27acétyle) dans les péricytes (α -SMA). **Biii**) : L'élévation de l'activité d'acétylation (H3K27acétyle) après la mise en silence de NF1 **Biiii**) : L'élévation de l'activité d'acétylation (H3K27acétyle) aussi observée au cours de la gangliogenèse crânienne, comme le montre le double marquage avec l'Ac Tuj1 chez les embryons transfectés par les ARNi dsNF1 et les ARNi dsHDAC8.

Dans les séries expérimentales où le gène HDAC8 est inactivé par les molécules ARNi dsHDAC8, les observations réalisées par les études histologiques et immuno-histochimiques, ont été confortées par une analyse quantitative en Q-PCR qui montre une diminution des transcrits des autres gènes NF1, NF2, HDAC1 mais une légère augmentation concomitante de l'activité de HDAC2.

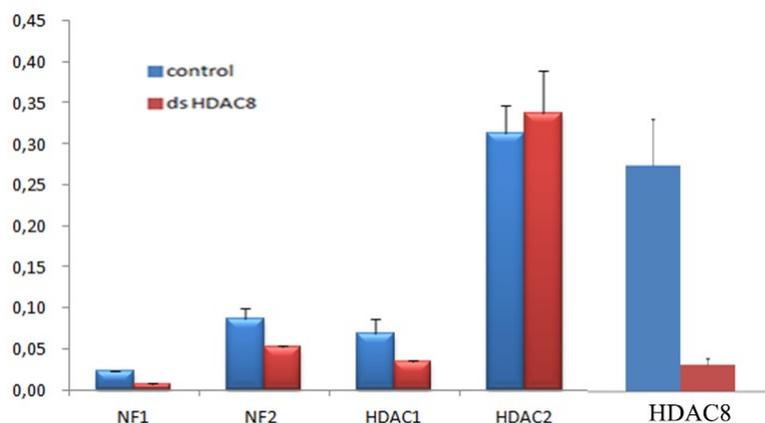
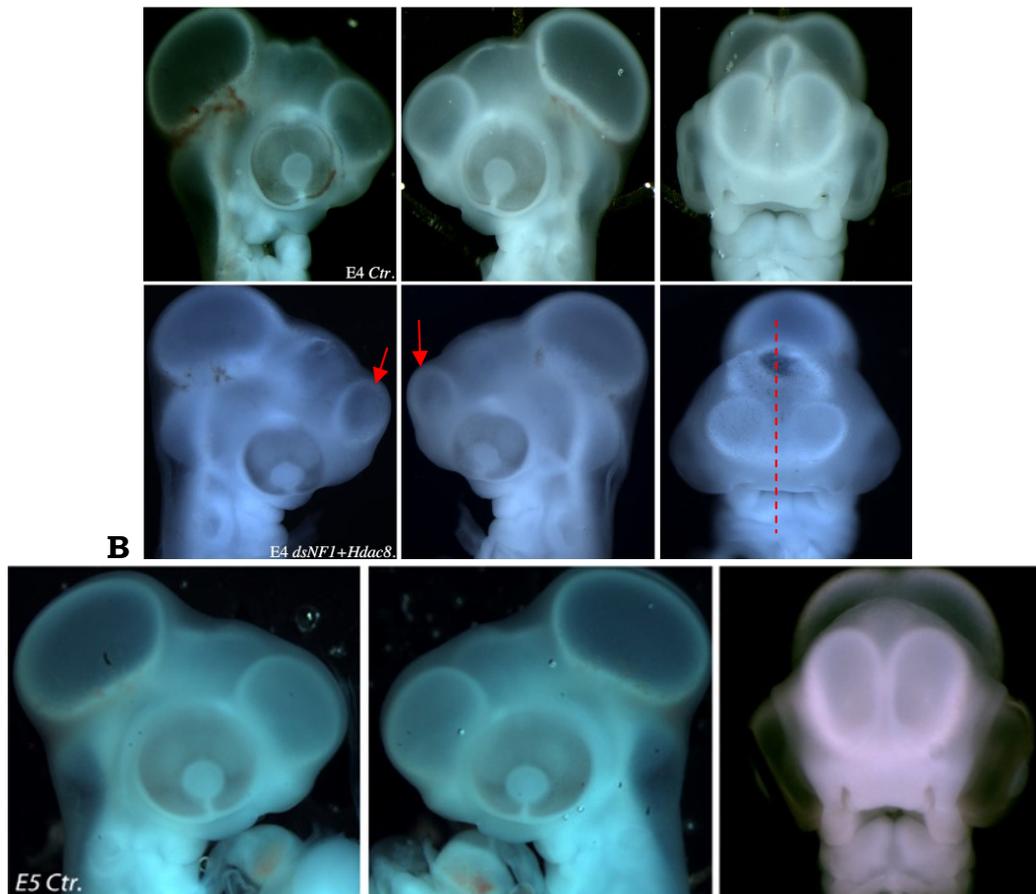
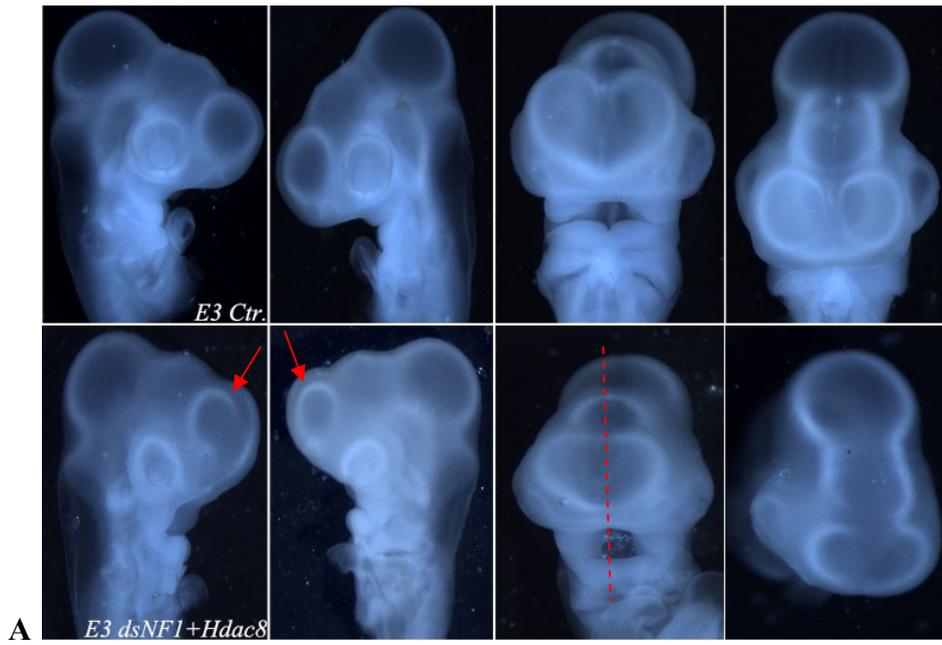


Fig. 50 : Quantités relatives des transcrits NF1, NF2, HDAC1, HDAC2 et HDAC8 à 25ss, rapportées à la quantité de transcrits du gène GAPDH. On révèle une diminution des transcrits de HDAC8 (80%) et des gènes NF1, NF2, HDAC1 et une légère augmentation des transcrits HDAC2.

6- Expérience de sauvetage de phénotype de NF1 par HDAC8.

Nous avons alors engagé des expériences pour tenter le sauvetage des phénotypes générés par l'inactivation de *NF1*, en stimulant conjointement l'activité du gène *HDAC8* dans les CCN avant leur migration. Pour cela, nous avons co-électroporé les molécules ARNi bloquant l'activité de *NF1* simultanément à un vecteur d'expression pour stimuler l'expression de *HDAC8* (plasmide utilisé psiCHECK2-*HDAC8* (*Oliver Pusch's lab.*)).

Dans ce contexte, l'observation de phénotypes à E4, E5, et E8 consécutifs à la double transfection montre un sauvetage phénotypique des embryons, et plaide en faveur d'une normalisation des phénotypes malformés observés lorsque seul *NF1* est inactivé (je ne comprends pas ce que tu veux dire). Cette observation vaut tant pour les phénotypes vasculaires, gliaux que pigmentaires. Cette « normalisation » quasi-totale du développement des dérivés de la CCN dépend du dosage et de la concentration de plasmide induisant l'expression de *HDAC8* transfecté simultanément avec les molécules *dsNF1* (Fig. 51D).



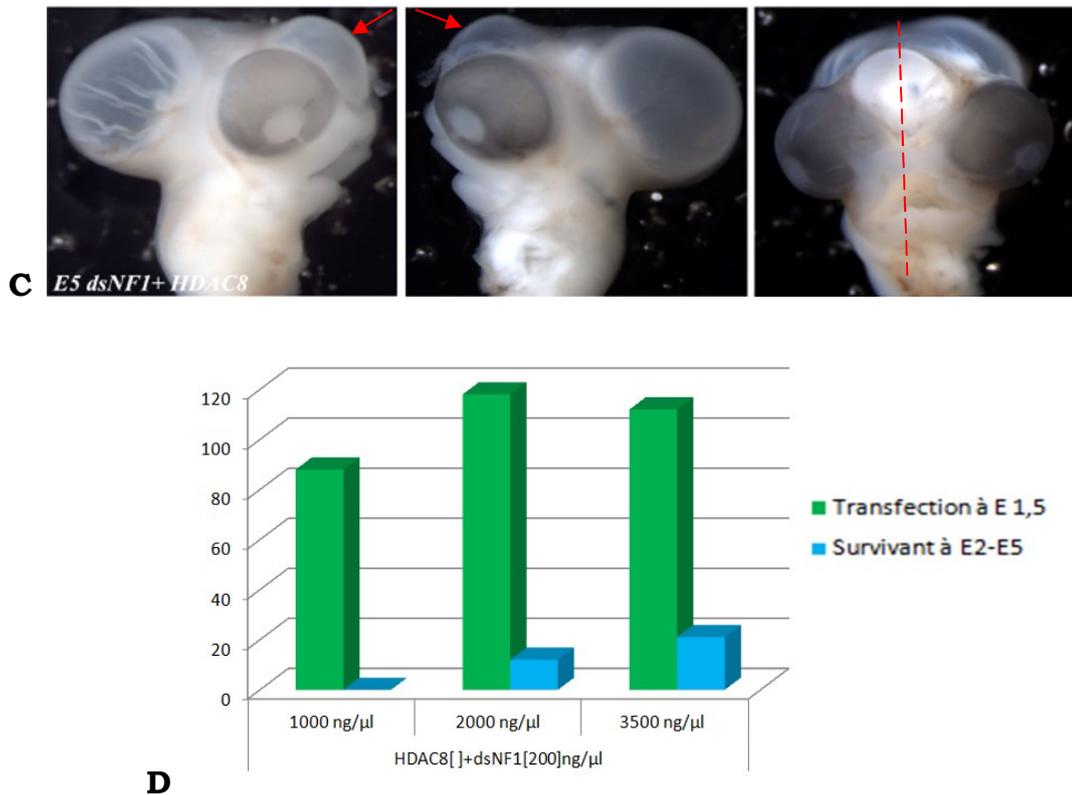


Fig. 51: *Expérience de sauvetage phénotypique (flèches rouges) par injection et transfection du vecteur d'expression de HDAC8 simultanément aux molécules ANRi dsNF1 à E3, (A), à E4 (B) et à E5 (C). (D), Survie des embryons expérimentaux : effectifs expérimentaux HDAC8- dose-dépendants.*

7- Identification des signalisations en aval de NF1 et de HDAC8.

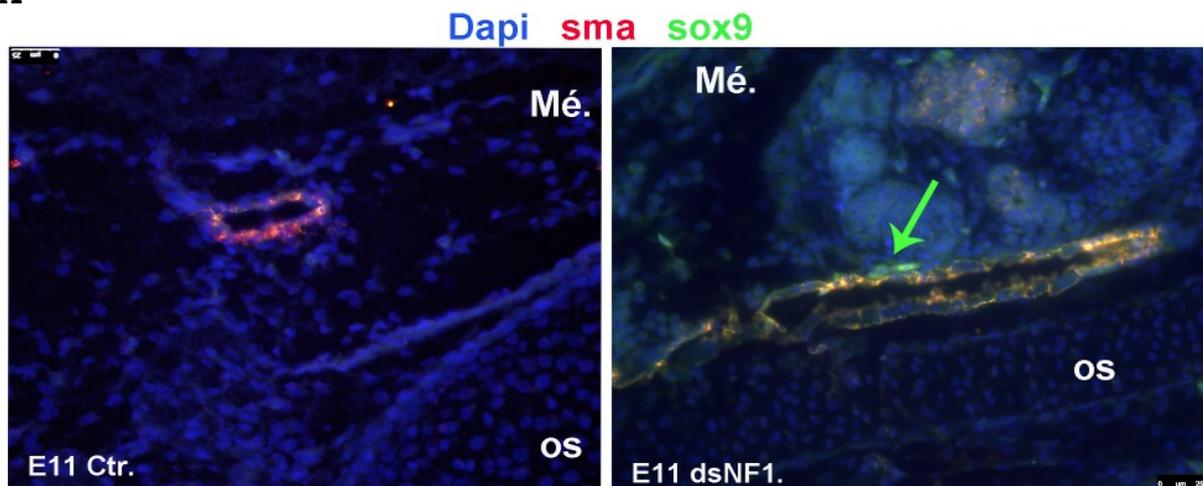
Etant donné que les manifestations de la maladie NF1 chez l'Homme consistent en la formations de structures gliomateuses et de calcifications qui apparaissent de façon ectopique et dispersée, nous avons cherché à déterminer quels étaient les facteurs de transcription susceptibles d'être activés en aval des modifications d'acétylation au niveau des péricytes.

Nous avons focalisé notre attention sur les gènes spécifiques du lignage glial et de la différenciation squelettogénique, les gènes *Sox9* et *Sox10*. Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur

l'expression du gène *Sox9* qui est connu pour guider la différenciation cartilagineuse chez l'embryon, mais dont l'activation favorise également la différenciation gliale (Haruhiko A., et al.2002 ; Jaesang K et al. 2003).

Nous avons donc réalisé des marquages immunocytochimiques chez les embryons contrôles et expérimentaux traités avec l'ARNi de *NF1*. Nous avons observé une activation ectopique du facteur de transcription *Sox9* dans les péricytes méningés et faciaux, et qui pourrait rendre compte de la capacité de ces cellules à dégénérer en calcification intracérébrales (Fig. 52) et processus gliomateux.

A



B

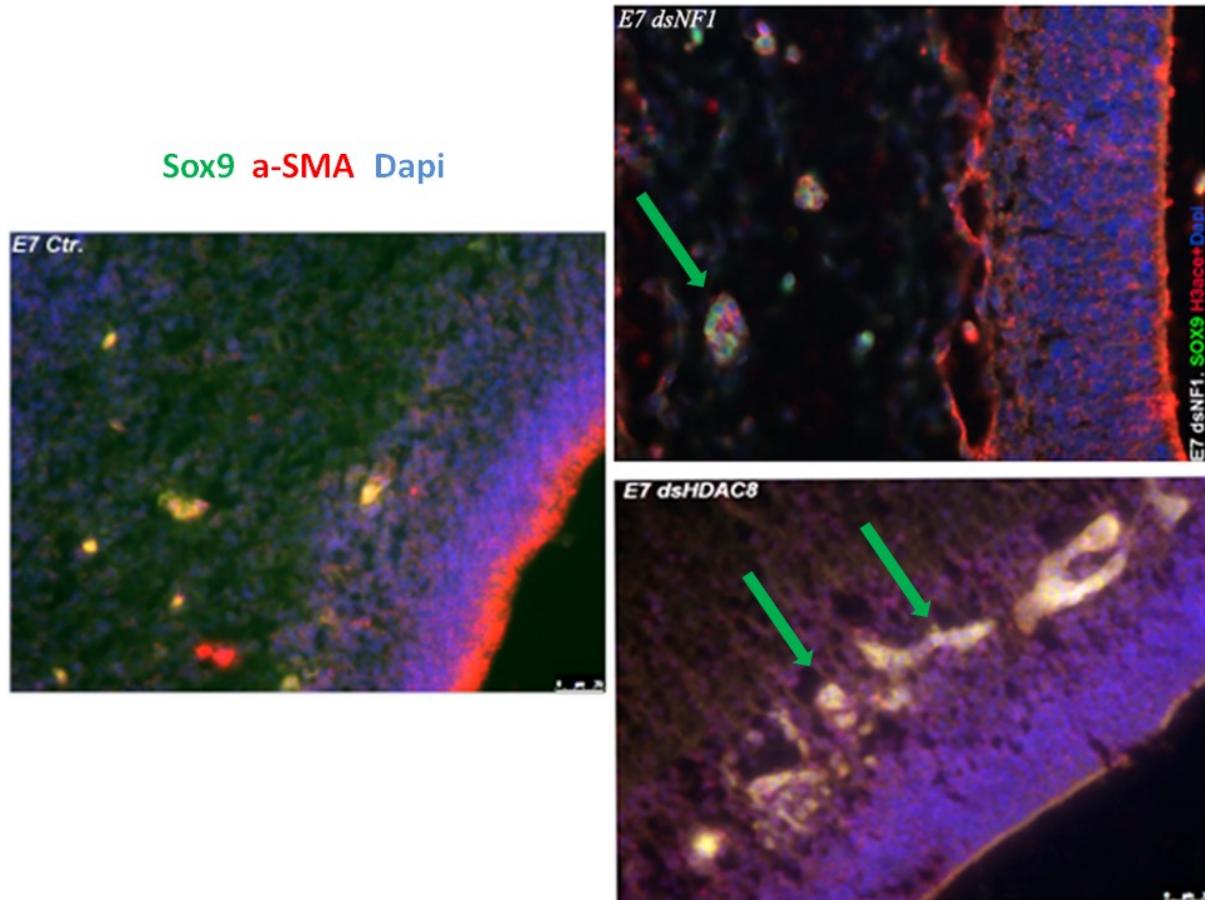


Fig. 52: A) : Accumulation de Sox9 dans les péricytes des vaisseaux méningés (Mé : méninges). **B)** : Activité de Sox9 aussi dans les péricytes dans les zones capillaires de sous-épendymaire chez les embryons transfectés par dsNF1 et dsHDAC8.

IV- Discussion

- *Les conséquences de l'inactivation du gène NF1 et la validation de notre modèle expérimental*

Au cours de cette étude, nous avons voulu analyser le rôle de gène *NF1* dans les cellules de la CN spécifiquement et aux stades précoces de la neurulation, par l'inactivation de ce gène à travers la mise en silence de

l'ADN complémentaire de *NF1* par ARNi. Suite à l'inactivation du gène *NF1*, nous avons obtenus des déficits multi-systémiques qui consistent principalement en des altérations de la gangliogénèse céphalique, avec des phénotypes gliomateux, mais aussi des défauts périvasculaires qui affectent tant les parois adventitielles des artères branchiales et les vaisseaux jugolo-carotidiens, que les péricytes des capillaires faciaux et cérébraux, associés à des asymétries faciales et des formations néoplasiques intra-cérébrales, y compris le gliome du nerf optique (survenant chez 50% des sujets de *NF1*) ainsi que manifestations cutanées comme les taches pigmentaires, très évocatrices des taches café-au-lait, rencontrés chez tous les malades de *NF1*.

Par contre pour établir d'autres modèles animaux pour *NF1* et/ou *NF2*, des stratégies de knock-out conventionnelles et conditionnelles pour les gènes ont été essayées, mais ni le développement de neurofibromes dermiques ni d'anomalie de pigment n'a été rapporté (Saito et al. 2007), aussi les souris hétérozygotes pour une mutation de *NF1* sont insuffisantes pour promouvoir l'hyperplasie des cellules de Schwann (Kim et al. 1996) et ne développent pas de neurofibromes, contrairement aux humains (Cichowski K. et al. 1999) (Jouhilahti et al 2011), à savoir que les souris qui n'ont pas l'expression de *NF1* ne survivent pas développement embryonnaire, ainsi que les souris knock-out conditionnel pour le gène *NF1*, étant inactivé dans les astrocytes par la technologie Cre / LoxP, ils ne développent pas de gliomes, en fait l'absence de formation de gliomes chez ces souris, même après 20 mois, suggère que des événements supplémentaires ou génétiques sont nécessaires pour la tumorigénèse du gliome dans le cadre de

NF1(Bajenarou et al. 2003). Cependant et de manière très spécifique une nouvelle souris transgénique exprimant N-ras oncogénique spécifiquement dans les cellules nerveuses centrales, les cellules dérivées de la crête neurale et les cellules épithéliales du cristallin avait été générée par l'équipe de (Saito et al. 2007),qui présentait neurofibromes et anomalies pigmentaires, mais neurofibrome plexiforme, schwannome, gliome optique (astrocytome) et phéochromocytome n'ont pas été observés chez ces souris Enfin, les études de souris knock-out *NF1* ont également démontré des rôles importants pour les changements génétiques de coopération qui accélèrent la tumorigenèse ainsi que les gènes modificateurs qui ont un impact sur la susceptibilité au cancer (Dasgupta et al. 2003).

D'une autre part, Pour étudier le développement de la crête neurale dans la souris de façon spatiotemporelle, par exemple, le *Wnt1-Cre* est l'outil génétique le plus largement utilisé pour le knock-out conditionnel des gènes. Cela pourrait ne pas être idéal pour le développement précoce de la crête neurale, parceque dans les embryons aviaires, l'expression de *Wnt1* commence bien après l'induction de la crête neurale (Barriga et al. 2015). En fonction de cette observation et par rapport à ce que nous avons montré par notre patron d'expression de *NF1* chez l'embryon de poulet dans le quel l'expression de *NF1* passe par des stades d'expression et de cesse d'expression par les CCNs qui commence très précocement à s'exprimer le *NF1* au cours de la neurulation même avant de leur détachement du tube neural.

En fait, l'analyse de perte de fonction dans des modèles animaux (essentiellement aviaires embryons, *Xenopus* et zebrafish) ont établi un réseau de gènes régulateurs de la crête neurale chez les vertébrés (*gene regulatory network, GRN*) (Sauka-Spengler et Bronner-Fraser. 2008), (Betancur (Bronner-Fraser) et al. 2010) dans laquelle l'inhibition des composants individuels de la transcription dans les CCN induites conduit à des phénotypes sévères. De manière surprenante, les souris mutantes –pour les mêmes gènes par exemple : *Fgf8*, *Pax3*, *Pax7*, *Notch1*- ne présentent souvent pas les phénotypes comparables aux modèles animaux non-mammifères, au moins dans les premiers stades de développement de la crête neurale (Barriga et al. 2015).

De toute façon, l'ARN interférant transfectés chez les souris entraîne souvent un blocage non-spécifique de la synthèse de protéine (Wianny et al. 1999), ainsi que l'ARNi déclenche la réponse des interférons (IFN), ce qui conduit à un arrêt général de l'expression génique et / ou de la mort cellulaire. L'ARNi n'est donc pas utile pour l'analyse de la fonction des gènes dans la plupart des cellules de mammifères (Calegari et al. 2002), alors que, chez le poulet, l'ARNi conduit à une inactivation hautement spécifique (Pekarik et al.2003).

Alors dans le modèle aviaire, nous montrons que ces déficits peuvent être corrélés aux altérations du comportement migratoire, prolifératif et apoptotique des cellules de la CN, donc une pathologie liée aux neurocristopathies. Ainsi, notre modèle expérimental, l'embryon de poulet,

nous permet de produire des manifestations cliniques ressemblant à celles qui surviennent chez l'homme atteint de la NF1. Comme cette maladie n'est pas encore étudiée sur un tel modèle expérimental, nous avons poursuivi l'étude en vue de chercher un possible impact moléculaire sur l'activité de gène *NF1*.

En conséquence, à la différence de modèles mammifères, où la transgénèse est systémique et portée à l'échelle de l'embryon entier, les approches fonctionnelles chez l'oiseau permettent de la mise en œuvre d'une transgénèse localisée « tissu et stade spécifique » (Pekarik et al.2003).

- ***L'impact des modulations épigénétiques de l'activité du NF1.***

Une grande partie des neurofibromatoses survient de façon sporadique, sans que chez les parents des sujets atteints, une quelconque mutation du gène *NF1* soit mise en évidence.

Ce fait suggère que des régulations épigénétiques peuvent être une cause de cette pathologie ou de l'une de ces manifestations.

Au cours du développement embryonnaire, certains facteurs de transcription dont l'expression est essentielle à la différenciation de CCN sont sujets à des régulations par des Histone désacétylases (Ropero et Esteller. 2007). Partant de ce fait, nous avons cherché à évaluer l'implication des régulations épigénétiques sur l'activité de *NF1*. Nous nous sommes focalisés sur l'activité des Histones Désacétylases (*HDAC*), qui contrôlent la

configuration chromatinienne. Il s'avère que les transcrits de la classe I de la famille des *HDAC*, les *HDAC1*, *2* et *8*, normalement accumulés dans les cellules de la CN au cours de leur migration et selon un patron d'expression spatial et temporel similaire à celui de *NF1*, présentent des variations significatives suite au *silencing* de *NF1* dans les embryons aviaires.

Cependant, l'inactivation sélective dans les souris de chaque membre de cette classe conduit à la létalité dans tous les cas, ce qui suggère les rôles essentiels de chaque *HDAC* pour initier ou contrôler des programmes ontogéniques vitaux (Murko et al. 2010).

Dans les souris transgéniques où le gène *HDAC1* est muté, les embryons meurent avant le jour embryonnaire E10.5, en raison de défauts de prolifération graves et d'un retard de croissance générale. L'importance de cette molécule pour le développement des dérivés de la CN a été plus particulièrement illustrée chez le poisson zèbre, où la mutation de *HDAC1* entraîne une réduction sévère du nombre de mélanoblastes, ainsi que des défauts majeurs de la chondrogenèse au niveau craniofacial et au niveau des ABs (Ignatius et al., 2013). De plus, des perturbations du système nerveux périphérique et notamment de la différenciation neuronale dans les ganglions entériques et sympathiques sont également observées (Ignatius et al., 2013).

L'invalidation du gène *HDAC2* chez la souris entraîne la mort des souriceaux dans le premier jour qui suit la naissance en raison de malformations cardiaques graves, associées à un excès en prolifération des

cardiomyocytes ventriculaires (Murko et al. 2010). Chez l'homme une mutation à ce gène retrouvé par (Ropero et Esteller. 2007) dans une forme sporadique de carcinome colorectal.

L'inactivation du gène *HDAC3* provoque une létalité embryonnaire dès E9.5, chez la souris, en raison de défauts de gastrulation (Knutson et al. 2008).

Quant aux rôles des HDAC de classe II dans la biologie de la CN, on peut mentionner le rôle important qu'exerce *HDAC4* chez le poisson zèbre. Ce gène est normalement activé de façon prépondérante dans les CCN, et son inactivation génère des fentes faciales et palatines, associées à l'absence ou une sévère réduction de l'éthmoïde (DeLaurier et al., 2012).

L'invalidation du gène *HDAC8* conduit à des déficits très spécifiques des CCN, et notamment de la voûte crânienne. Cette mutation entraîne la mort périnatale en raison de traumatismes crâniens causés par l'instabilité du crâne (Hu et al., 2014).

A partir de ce que nous avons cité en ce qui concerne l'inactivation des HDAC dans les modèles non-aviaires, notre modèle a permis de pouvoir obtenir des embryons survivant jusqu'au long terme dans des stades tardives de développement embryonnaire.

Nous avons dès lors cherché à tester l'implication et l'inactivation sélective de ces gènes et leur activité sur la fonctionnalité du

gène *NF1*. Ainsi, nous avons montré que l'inactivation de *HDAC8* seule, permet de reproduire les altérations des phénotypes vasculaires observés chez les embryons hypomorphes pour *NF1*. Ces dernières observations suggèrent un rôle prépondérant de *HDAC8* dans la régulation de la vasculogenèse et de la différenciation des cellules de la CN en péricytes. Cela veut dire que la dérégulation de *NF1* conduit à une diminution de l'activité de *HDAC8* entraînant des altérations des vaisseaux cervico-faciaux et méningés

Les résultats que nous avons obtenus suite aux expériences de sauvetage par la double transfection (ds*NF1*+*HDAC8*) plaident en faveur d'une restauration des phénotypes normaux par rapport à ceux observés lors que seul *NF1* est inactivé. Ceci suggère que *HDAC8* est central parmi les facteurs de convergence de ces signalisations et qu'il pourrait être une cible thérapeutique potentielle. Augmenter l'expression de *HDAC8* ou de ces cibles transcriptionnelles pourrait constituer une stratégie pour diminuer les effets génétiques et phénotypiques de l'absence de l'activité du *NF1*.

- ***Implications cliniques :***

- Notre modèle expérimental, avec les déficits multi-systémiques y compris la formation dysplasique et néoplasique intracérébrale (gliome optique, tumeur encéphalique) ainsi que les manifestations cutanées pigmentaires, pourrait représenter un modèle préclinique pour étudier tel processus de manière détaillée

- Nos résultats représenteraient une nouvelle direction dans les essais thérapeutiques cliniques par exemple la NF1 pourrait être ciblée par les inhibiteurs des HDAC notamment de façon plus sélective contre l'hyperactivité remarquée de *HDAC1*, par contre il faudrait bien tenir en compte, éventuellement en recherche clinique, que la perte en fonction de *HDAC8* chez les malades de NF1 pourrait induire une résistance de traitement par les inhibiteurs des HDAC, c'est pourquoi une sélection pharmacogénétique s'impose pour ce type de traitement (tel Vorinostat, Trichostatine A ou SAHAetc).

IV- Conclusions

Nous avons pu identifier les déterminants moléculaires du polymorphisme des manifestations néoplasiques et tumorales de la neurofibromatose. De façon frappante, il montre que la variété de ces manifestations a pour foyers primaires les péricytes issus de la différenciation des CCN.

A leur niveau, nous avons identifié comme dénominateur commun, des altérations du niveau de l'acétylation des gènes par dérégulations des Histones désacétylases (HDAC). Les variations d'activités de ces molécules, et de *HDAC8* notamment, conditionnent l'activation ectopique des gènes *Sox9* un des facteurs de transcription susceptible de soutenir la transdifférenciation pathologique des péricytes en processus gliomateux ou en calcifications intracérébrales.

- **Perspectives :**

-Nous avons, au cours de cette étude, évalué les conséquences de l'inactivation de *NF1* in Vivo, une analyse quantitative par une étude (*in Vitro*) de la mise en culture des méninges, notamment les péricytes, est prévue dont nous avons obtenu des résultats préliminaires pour les cellules prélevées des embryons témoins. (Fig.53).

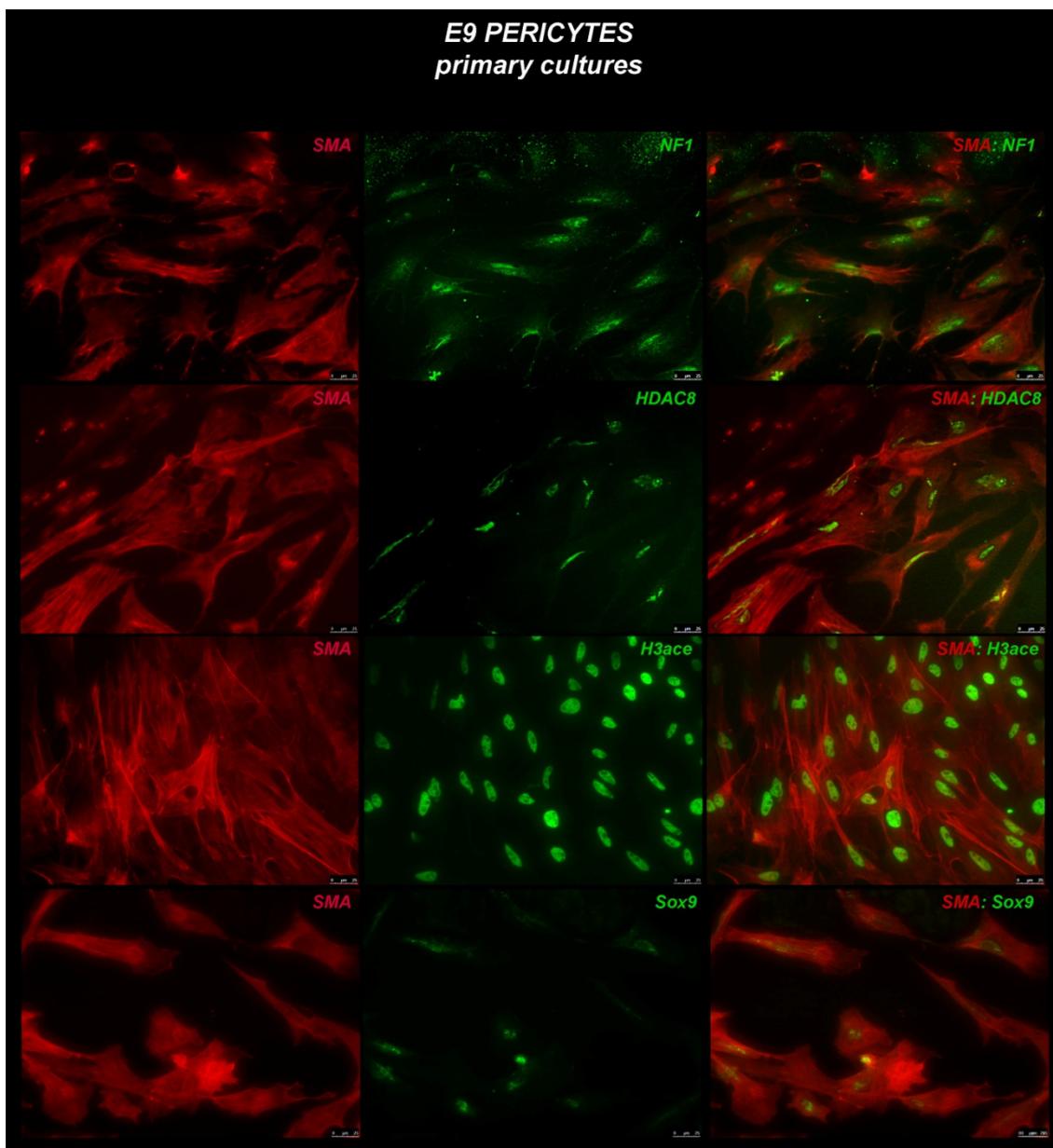


Fig.53: Mise en culture des cellules méningées prélevées des embryons

Contrôles à E8.

Nous viserons à analyser les conséquences de l'inactivation du gène NF1 sur l'expression et la modulation des signaux trophiques nous chercherons à identifier les signaux morphogénétiques dont l'activité est perturbée lorsque le gène NF1 est inhibé. Cette analyse sera menée par hybridation *in situ* et par quantitative RT-PCR. Les travaux antérieurs de l'équipe ont permis de montrer qu'il existe une relation réciproque liant le devenir des cellules de la CN à l'expression de morphogènes dans le compartiment ectodermique et neur ectodermique de l'embryon. Ces travaux montrent notamment que l'activité des signalisations Fgf8 et Wnt sont intimement liées à la présence des cellules de la CN qui stimule à distance la prolifération des cellules de la NC et permet d'orienter leur migration vers leur site de différenciation, et que réciproquement, les expériences montrent que la CN exerce un contrôle positif sur l'activité de Fgf8 et Wnt dans l'ectoderme et le neur ectoderme (Creuzet et al., 2006 ; Creuzet, 2009 ; Aguiar and Creuzet, 2013). En outre, ces travaux montrent que des perturbations du programme morphogénétique de la CN peuvent induire des processus malformatifs cérébraux. Ceci suggère qu'un mécanisme analogue soit à l'origine de processus tumoraux cérébraux et ouvre une voie pour comprendre l'étiologie de déficits neurologiques dans la neurofibromatose. Nous attendons de cette approche de préciser selon les déficits engendrés, les signalisations qui sont principalement mobilisées et d'identifier les facteurs de convergence de ces signalisations— ainsi que leurs réseaux d'interaction — comme des cibles thérapeutiques potentielles.

Egalement, établir le profil transcriptomique de l'expression génique des tissus cérébraux prélevés chez embryons contrôle et traités avec les molécules ARNi dirigées contre le gène NF1. Cette analyse du transcriptome pourrait être réalisée en collaboration avec la plateforme d'analyse Microarray de IGBMC. Sur la base de cette étude, nous entreprendrons de tester la fonctionnalité des facteurs de convergence de ces signalisations, et de «phénotyper» les conséquences de ces pertes de fonction sélectives. Cette étude fonctionnelle visera notamment à éclairer les mécanismes embryologiques des défauts neurologiques de cette pathologie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abu-Issa R, Smyth G, Smoak I, Yamamura K, Meyers EN. (2002). *Fgf8* is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse. *Development*. 129:4613–4625.
- Achilleos A., Trainor Paul A. (2015). Mouse models of rare craniofacial disorders. *Dev. Biol.*, 115 ISSN 0070-2153.
- Alrajeh M., Aguiar D.P., and Creuzet S.E. (2016). Neural Crest and Fgf signalling in Cleft Lip and Palate. Book chapter “Cleft Lip and Palate”. InTech- Open Access Publisher.
- Aoto, K., Nishimura, T., Eto, K., and Motoyama, J. (2002). Mouse *GLI3* regulates *Fgf8* expression and apoptosis in the developing neural tube, face and limb bud. *Dev. Biol.*, 251, 320-332.
- Bachelet J.T., P. Combemale, C. Devic, N. Foray, E. Jouanneau, P. Breton. (2015). Prise en charge des atteintes craniofaciales de la neurofibromatose de type 1 Management of craniofacial type 1 neurofibromatosis Elsevier Masson SAS
- Bachiller D., Klingensmith, J., Kemp, C., Belo, J.A., Anderson, R.M., May, S.R., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Harland, R.M., Rossant, J., and De Robertis, E.M. (2000). The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature*, 403, 658-661.
- Baker, C.V. (2008). The evolution and elaboration of vertebrate neural crest cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 18, 536-543.
- Balic A, Adams D, Mina M. (2009). *Prx1* and *Prx2* cooperatively regulate the morphogenesis of the medial region of the mandibular process. *Dev Dyn.*;238(10):2599-613. doi: 10.1002/dvdy.22092.
- Barriga Elias H., Paul A. Trainor, Marianne Bronner, and Roberto Mayor. (2015) Animal models for studying neural crest development: is the mouse different? Company of Biologists Ltd | *Development*. 142, 1555-1560
- Basch ML, Bronner-Fraser M, and García-Castro MI. (2006). Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires *Pax7*. *Nature*, 441: 218-22
- Benchakroun F., DAFIRI R., Neurofibromatose type 1 de la tête au pied Service de Radiologie. Hôpital d’Enfants-Matérnité Rabat- Maroc
- Beverdam A, Merlo GR, Paleari L, Mantero S, Genova F, Barbieri O, Janvier P, Levi G. (2002). Jaw transformation with gain of symmetry after *Dlx5/Dlx6* inactivation: mirror of the past? *Genesis*. 34(4):221-7
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Müller, U., and Filipowicz, W. (2001). Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.*, 98, 14428-14433.
- Bothe I, and Dietrich S. (2006). The molecular setup of the avian head mesoderm and its implication for craniofacial myogenesis. *Dev Dyn*, 235:2845-60.
- Cackett P., J Vallance and H Bennett. (2005). Neurofibromatosis type 1 presenting with Horner's syndrome *Eye* 19, 351–353

- Cajal M., Creuzet S.E., Papanayotou C., Sabéran-Djoneidi D., Chuva de Sousa Lopes S., Zwijsen A., Collignon J., and Camus A. (2014). A conserved role for non-neural ectoderm cells in early neural development. *Development*, in press.
- Caron S, Soto-Ares G, Vinchon M, Dhellemes P, Pruvo JP.(2004). Neuro-imagerie des phacomatoses. *Feuilles de radiologie*;44:241-263.
- Cases O., Perea-Gomez A, Aguiar D.P., Nykjaer A., Lelièvre V., Amsellem S., Chandellier J., Pedersen G., Cereghini S., Collignon J., Verroust P., Umbhauer M., Madsen M., Riou J.F., Creuzet S.E. and Kozyraki R. (2013). Cubilin is required for FGF-promoted cell survival in the developing vertebrate head. *J. Biol. Chem.*, 288, 16655-16670.
- Catala, M., Teillet, M.-A., De Robertis, E.M., and Le Douarin, N.M. (1996). A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development*, 122, 2599-2610.
- Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas Jr., P., Han, J., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P., and Sucov, H.M. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 127, 1671–1679.
- Charrier JB., Creuzet S. (2007). Embryology of the efface and otomandibular dysplasia. *Orthod* 78(1):7-24.
- Charrier JB., Bennaceur S., Couly G. (2001). Hemifacial microsomia. Embryology and clinical approach. *Ann Chir Plast Esthet* 46(5):385-99.
- Charrier JB., Racy E., Nowak C., Lemaire B., Bobin S., (2007). Embryologie et anomalies congénitales du nez. Elsevier Masson 20-264-A-10.
- Chen Y., Gutmann DH., C.A. Haipek, B.J. Martinsen, M. Bronner-Fraser, C.E. Krull. (2004). Characterization of Chicken *Nf2*/Merlin Indicates Regulatory Roles in Cell Proliferation and Migration *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* 229:541–554
- Cohen MM Jr. (2000). Craniofacial disorders caused by mutations in homeobox genes *MSX1* and *MSX2*. *Craniofac Genet Dev Biol.* 20(1):19-25.
- Couly, G. (1983). A new concept of Pierre Robin syndrome and disease : dysneurulation of the rhombencephalon. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.*, 84, 225-232.
- Couly, G., Creuzet, S., Bennaceur, S., Vincent, C., and Le Douarin, N.M. (2002). *Development* 129,1061-1073.
- Couly, G.F. and Le Douarin, N.M. (1985). Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev. Biol.* 110, 422–439
- Couly, G.F. and Le Douarin, N.M. (1987). Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: Implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Dev. Biol.*, 120, 198–214.
- Couly, G.F. and Le Douarin, N.M. (1988). The fate map of the cephalic neural primordium at the presomitic to the 3-somite stage in the avian embryo. *Development (suppl.)* 103, 101–103.
- Couly, G.F., Coltey, P.M., and Le Douarin, N.M. (1993). The triple origin of skull in higher vertebrates : a study in quail-chick chimeras. *Development*, 117, 409-429.
- Couly, G., Grapin-Botton, A., Coltey, P., and Le Douarin, N.M. (1996). The regeneration of the cephalic neural crest, a problem revisited: The regenerating cells originate from the contralateral or from the anterior and posterior neural fold. *Development*, 122, 3393-3407.

- Couly, G., Grapin-Botton, A., Coltey, P., Ruhin, B., and Le Douarin, N.M. (1998). Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest: incompatibility between Hox gene expression and lower jaw development. *Development*, 125, 3445-3459.
- Couly, G., Creuzet, S., Bennaceur, S., Vincent, C., and Le Douarin, N.M. (2002). Interactions between Hox-negative cephalic neural crest cells and the foregut endoderm in patterning the facial skeleton in the vertebrate head. *Development*, 129,1061-1073.
- Crawford AH Jr, Bagamery N. (1986). Osseous manifestations of neurofibromatosis in childhood. *J Pediatr Orthop*;6:72-88.
- Creazzo, T.L., Godt, R.E., Leatherbury, L., Conway, S.J., and Kirby, M.L. (1998). Role of cardiac neural crest cells in cardiovascular development. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 267-286.
- Creuzet, S. E. (2009a). Regulation of pre-otic brain development by the cephalic neural crest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 : 15774-15779.
- Creuzet, S. E. (2009b). Neural crest contribution to forebrain development. Book chapter In *Development of Patterning of the Vertebrate Forebrain. Sem. Cell Dev. Biol.*, 20, 751-759.
- Creuzet, S., Couly, G., Vincent, C., and Le Douarin, N. M. (2002). Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development* 129: 4301-4313.
- Creuzet, S., Schuler, B., Couly, G., and Le Douarin, N. M. (2004). Reciprocal relationships between Fgf8 and neural crest cells in facial and forebrain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4843-4847.
- Creuzet S., Vincent C., and Couly G. (2005a). Neural crest derivatives in ocular and periocular structures. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 161-171.
- Creuzet S., Couly G., and Le Douarin, N.M. (2005b) Patterning the neural crest derivatives during the development of the vertebrate face: insights from avian studies. *J. Anatomy*, 207, 447-459.
- Creuzet, S., Schuler, B., Couly, G., and Le Douarin N. M. (2004) Reciprocal relationships between Fgf8 and neural crest cells in facial and forebrain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101, 4843-4847.
- Creuzet, S., Martinez, S., and Le Douarin, N. M. (2006). The cephalic neural crest exerts a critical effect on forebrain and midbrain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 14033-14038.
- Crisan, M., Corselli, M., Chen, W. C. W., and Péault, B. (2012). Perivascular cells for regenerative medicine. *J. Cell. Mol. Med.*, 16, 2851–2860.
- Crossett LS, Beaty JH, Betz RR, Warner W, Clancy M, Steel HH.(1989).Congenital pseudarthrosis of the tibia. Long-term follow-up study. *Clin Orthop Relat Res* ;(245):16-8.
- Crossley, P.H., Martinez, S., and Martin, G.R. (1996a). Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature*, 380, 66-68.
- Crossley, P. H., Minowada, G., McArthur, C. A. and Martin, G. R. (1996b). Roles of FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chicklimb development. *Cell*, 84, 127-136.
- Crossley, P.H., Martinez, S., Ohkubo, Y., and Rubinstein, J.L. (2001). Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience*, 108, 183-206.
- Cynthia H., Jacobs B, Kennedy L, Rohde S, Zhou B, Baldwin S, Goudy S.(2015). Cranial neural crest deletion of VEGFa causes cleft palate with aberrant vascular and bone development. *Cell Tissue Res.* 2015 Sep;361(3):711-22.
- Daston MM, Ratner N.(1992). Neurofibromin, a predominantly neuronal GTPase activating protein in the adult, is ubiquitously expressed during development. *Dev Dyn*;195 :216-26.

- DeBella K, Szudek J, Friedman JM. (2000). Use of the national institutes of health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics*, 105:608-14.
- DeLaurier, A., Nakamura, Y., Braasch, I., Khanna, V., Kato, H., Wakitani, S., Postlethwait, J.H., Kimmel, C.B. (2012). Histone deacetylase-4 is required during early cranial neural crest development for generation of the zebrafish palatal skeleton. *BMC Dev. Biol.* 12, 16
- Depew MJ, Lufkin T, Rubenstein JL. (2002) Specification of jaw subdivisions by Dlx genes. *Science*. ;298(5592):381-5. Epub 2002 Aug 22.
- Di Virgilio, G., Lavenda, N., and Worden, J.L. (1967). Sequence of events in neural tube closure and the formation of neural crest in the chick embryo. *Acta Anat.*, 68, 127-146.
- Dokmanovic M., Clarke C., and Marks PA. (2007). Histone Deacetylase Inhibitors: Overview and Perspectives. *Mol Cancer Res* 10.1158/1541-7786.MCR-07-0324
- Donoghue, P.C.J., Graham, A., and Kelsh, K.N. (2008). The origin and evolution of the neural crest. *Bioessays*, 30, 530-541.
- Duband, J.L., and Thiery, J.P. (1987). Distribution of laminin and collagens during avian neural crest development. *Development*, 101, 461-478.
- Duprez, D., Leyns, L., Bonnin, M.-A., Lapointe F., DeRobertis E.M. and Le Douarin, N.M. (1999). Expression of Frzb-1 during chick development. *Mech. Dev.* 89, 179-183.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel W., and Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.*, 20, 6877-88.
- Enseignement Institut Cochin <http://cvirtuel.cochin.univ-paris5.fr/Embryologie/Embry/EmbryCours/EmbryCh04>
- Epstein, J.A. (1996). Pax3, neural crest and cardiovascular development. *Trends Cardio. Med.*, 6, 255-260.
- Erini Makariou, and Athos D. Patsalides. (2009). Intracranial calcifications.
- Etchevers, H.C., Couly, G., Vincent, C., and Le Douarin, N.M. (1999). Anterior cephalic neural crest is required for forebrain viability. *Development*, 26, 3533-3543.
- Etchevers, H.C., Vincent, C., Le Douarin, N.M., and Couly, G.F. (2001). The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development*, 128, 1059-1068.
- Evans, D.J. and Noden, D.M. (2006). Spatial relations between avian craniofacial neural crest and paraxial mesoderm cells. *Dev. Dyn.* 235, 1310-1325.
- Feng, J., Mantesso, A., De Bari, C., Nishiyama, A., and Sharpe, P. T. (2011). Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 108, 6503-6508.
- Firnberg N, and Neubüser A (2002). FGF signaling regulates expression of Tbx2, Erm, Pea3, and Pax3 in the early nasal region. *Dev Biol.* 247:237-50.
- Fogel JL, Thein TH, Mariani F. (2012). Use of LysoTracker to Detect Programmed Cell Death in Embryos and Differentiating Embryonic Stem Cells. *J Vis Exp.* 2012; (68): 4254
- Friedman J. M., Patricia Birch, and Arol Greene. (1993). National Neurofibromatosis Foundation International Database.
- Fuentealba, L.C., Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E.M., and de Robertis, E.M. (2007). Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell*, 131, 980-993.

- Gans, C. and Northcutt, R. G. (1983). Neural crest and the origins of the vertebrates: a new head. *Science*, 220: 268-274.
- Garabédian EN, Bobin S, Monteil JP, Triglia JM. (1996). *ORL de l'enfant*. Paris, Médecine-Sciences Flammarion.
- Garcez, R.C., Le Douarin, N.M., and Creuzet, S.E. (2014). Combinatorial activity of Six1-2-4 genes in cephalic neural crest cells controls craniofacial and brain development. *Cell Mol Life Sci.*, 71, 2149-2164.
- Gendron-Maguire, M., Mallo, M., Zhang, M., and Gridley, T. (1993). Hoxa-2 mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal elements derived from cranial neural crest. *Cell*, 75, 1317-1331.
- Goldberg M., Davit T., Barbet P., (2012). *Embryologie craniofaciale (I) regulation cellulaires et moléculaires des étapes initiales de l'embryologie craniofaciale*. Elsevier Masson 22-001-A-20
- Golding, J.P., Trainor, P., and Gassmann, M. (2002). Cues from neuroepithelium and surface ectoderm maintain neural crest-free regions within cranial mesenchyme of the developing chick. *Development*, 129, 1095-1105.
- Gou Y., Zhang T., Jian Xu., (2015). *Transcription Factors in Craniofacial Development: From Receptor Signaling to Transcriptional and Epigenetic Regulation*. *Dev. Biol.* v115
- Graham, A., Francis-West, P., Brickell, P. and Lumsden, A. (1994). The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature*, 1994; 372(6507):684-686.
- Grammatopoulos, G.A., Bell E., Toole, L., and Lumsden, A. (2000). Homeotic transformation of branchial arch identity after Hoxa2 overexpression. *Development*, 127, 5355-5365.
- Greinwald J, Derkay CS, Schechter GL.(1996). Management of massive head and neck neurofibromas in children. *Am J Otolaryngol* ;17:136-42.
- Gross, J.B. and Hanken, J. (2008). Review of fate-mapping studies of osteogenic cranial neural crest in vertebrates. *Dev Biol.*, 317, 389–400.
- Gruss P, and Walther G. (1992) Pax in development. *Cell*, 69:719-22.
- Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE et al. (1997). The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA*; 278:51-7.
- Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE et al. (1997). The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA*; 278:51-7.
- Hall, B. K. (2000). The neural crest as a fourth germ layer and vertebrate as quadroblastic not triploblastic. *Evol. & Dev.* , 2, 3-5.
- Hamburger, V., and Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of chick embryo. *J. Morphol.*, 88, 49–92.
- Hari Reddi A, Anand Reddi (2009). Bone morphogenetic proteins (BMPs): From morphogens to metabologens. *Cytokine & Growth Factor Reviews*.
- Haruhiko A., Marie-Christine C., Jam. (2002).The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6l. *GENES & DEVELOPMENT* 16:2813–2828
- Heude E, Bouhali K, Kurihara Y, Kurihara H, Couly G, Janvier P, Levi G. (2010). Jaw muscularization requires Dlx expression by cranial neural crest cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.107(25):11441-6.

- Heuze Y, Piot B, Mercier J. (2002). Difficultés de la prise en charge chirurgicale des manifestations faciales de la neurofibromatose de type 1 ou maladie de von Recklinghausen chez l'enfant. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*;103:105-13.
- Hill RE¹, Jones PF, Rees AR, Sime CM, Justice MJ, Copeland NG, Jenkins NA, Graham E, Davidson DR. (1989). A new family of mouse homeo box-containing genes: molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of Hox-7.1. *Genes Dev.* 3(1):26-37.
- Holland, L.Z., and Holland, N.D. (1999). Chordate origins of the vertebrate central nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9, 596-602.
- Holland, L.Z., Holland, N.D. and Schubert, M. (2000). Developmental expression of *AmphiWnt1*, an amphioxus gene in the Wnt 1 /wingless subfamily. *Dev. Genes. Evol.*, 210, 522-524.
- Hong, C.-H. and Saint-Jeannet, J.-P. (2005). Sox proteins and neural crest development. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 16, 694–703.
- Hörstadius, S. (1950). *The neural crest: its properties and derivatives in the light of experimental research.* London: Oxford University Press.
- Hörstadius, S., and Sellman, S. (1941). Experimental studies on the determination of the chondrocranium in *Amblystoma mexicanum*. *Ark. Zool. Stockholm*, 33A, n°13.
- Hu, D., Helms, J. A. (1999). The role of Sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. *Development*, 126(21), 4873–4884.
- Hu G, Vastardis H, Bendall AJ, Wang Z, Logan M, Zhang H, Nelson C, Stein S, Greenfield N, Seidman CE, Seidman JG, Abate-Shen C. (1998). Haploinsufficiency of *MSX1*: a mechanism for selective tooth agenesis *Mol Cell Biol.* 18(10):6044-51.
- Hu Na, Pablo H. Strobl-Mazzulla, Marianne E. Bronner. (2014). Epigenetic regulation in neural crest development. *Dev. Biol.* 396(2014)159–168.
- Hunt, P., Gulisano, M., Cook, M., Sham, M.H., Faiella, A., Wilkinson, D., Boncinelli, E., and Krumlauf, R. (1991). A distinct Hox code for the branchial region of the vertebrate head. *Nature*, 353, 861-864.
- Houart, C., Westerfield, M., and Wilson, S.W. (1998) A small population of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation. *Nature.* 391, 788-792.
- Ignatius M.S., Unal Eroglu, A., Malireddy, S., Gallagher, G., Nambiar, R.M., Henion, P.D. (2013). Distinct functional and temporal requirements for zebrafish *Hdac1* during neural crest derived craniofacial and peripheral neuron development. *PLoS One* 8, e63218.
- Ito, Y., Yeo, J.Y., Chytil, A., Han, J., Bringas Jr., P., Nakajima, A., Shuler, C.F., Moses, H.L., Chai, Y., (2003). Conditional inactivation of *Tgfb2* in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. *Development*, 130, 5269–5280.
- Jacob Claire, Pirmin Lo¨tscher, Stefanie Engler, Arianna Baggolini, Sandra Varum Tavares, Vale´rie Brugger et al. (2014) *HDAC1 and HDAC2 Control the Specification of Neural Crest Cells into Peripheral Glia.* 34(17):6112– 6122
- Jaesang K., Liching Lo, Emma Dormand, David JA. (2003). *SOX10 Maintains Multipotency and Inhibits Neuronal Differentiation of Neural Crest Stem Cells.* *Neuron*, Vol. 38, 17–31.
- Jensen A. (2005). Potential Roles for BMP and Pax Genes in the Development of Iris Smooth Muscle. *Dev Dyn*, 232:385-92.
- Jiblaoui Y., Neji B., Haddad S., Mnif D., Hchicha S. (2006). Difficultés de la prise en charge des atteintes de l'extrémité céphalique dans les neurofibromatoses Elsevier Masson
- Jiang, X., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P., and Sucov, H.M. (2000). Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development*, 127,1607–1616.

- Jiang, X., Iseki, S., Maxson, R.E., Sucov, H.M., and Morriss-Kay, G.M. (2002). Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. *Dev. Biol.*, 241,106–116.
- Johansson AC, Appelqvist H., Katarina N., Kågedal K, Roberg K., Öllinger K. (2010). Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis*. 15(5): 527–540.
- Johnston, M. C. (1966). A radioautographic study of the migration and fate of cranial neural crest cells in the chick embryo. *Anat. Rec.*, 156, 143–156
- Johnston, M. C., Noden, D. M., Hazelton, R. D., Coulombre, R.D. and Coulombre, A. J. (1979). Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp. Eye Res.* 29, 27-43.
- Jouhilahti EM, Peltonen S, Heape AM, Peltonen J. (2011). The pathoetiology of neurofibromatosis 1. *Am J Pathol*. 178(5):1932-9.
- Karabagli H, Karabagli P, Ladher RK, Schoenwolf GC (2002). Comparison of the expression patterns of several fibroblast growth factors during chick gastrulation and neurulation. *Anat Embryol.*; 205:365-370.
- Kastschenko, N. (1888). Zur Entwicklungsgeschichte der Selachierembryos. *Anat.Anz.* 3, 445-467.
- Kevin P. Boyd, Bruce R. Korf, et Amy Theos. (2009). Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol*. Volume 61, Number 1, Pages 1-14.
- Khudyakov J, and Bronner-Fraser M. 2009. Comprehensive spatiotemporal analysis of early chick neural crest network genes. *Dev Dyn*, 238:716-23.
- Kirby, M.L., Gale, T.F., and Stewart, D.E. (1983). Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science*, 220, 1059-1061.
- Kirby, M.L., Turnage, K.L., and Hayes, B.M. (1985). Characterization of conotruncal malformations following ablation of «cardiac» neural crest. *Anat. Rec.*, 213, 87-93.
- Kitamura K, Senba T, Komatsuzaki A. (1989). Bilateral internal auditory canal enlargement without acoustic nerve tumor in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Neurofibromatosis.*;2:47-52.
- Köentges, G., and Lumsden, A. (1996). Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout crâniiofacial ontogeny. *Development*, 122, 3229-3242.
- Knotsun SK, Chyla BJ, Amann JM, Bhskara S, Huperrt SS, Hiebertt SW. (2008). Liverspecific deletion of histone deacetylase 3 disrupts metabolic transcriptional networks. *EMBO J.*; 27:1017–1028.
- Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell*, 78, 191-201.
- Kutejova, E., Engist, B., Mallo, M., Kanzler, B., and Bobola, N. (2005) Hoxa2 downregulates Six2 in the neural crest-derived mesenchyme. *Development*, 132, 469-478.
- Langman J., Guerrant, R.L., and Freeman B.G. (1966). Behavior of neuro-epithelial cells during closure of the neural tube. *J Comp Neurol.*, 127, 399-411.
- Lumsden, A., Sprawson, N., and Graham A. (1991). Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development*,113, 1281-1291.
- Le Douarin, N. M. (1969). Particularités du noyau interphasique chez la caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*). Utilisation de ces particularités comme “marquage biologique” dans les recherches sur les interactions tissulaires et les migrations cellulaires au cours de l’ontogenèse. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 103, 435–452.
- Le Douarin, N. M. (1973). A biological cell labelling technique and its use in experimental embryology. *Dev. Biol.*, 30, 217–222.
- Le Douarin N. (1982). *The Neural Crest* Cambridge: Cambridge University Press.
- Le Douarin, N. M., and Kalcheim, C. (1999). *The neural crest*. Cambridge, UK: Cambridge University Press 2ed. ISBN 0 521 620104.

- Le Douarin N.M., Creuzet, S., Couly, G., and Dupin, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development*, 131, 4637-4650.
- Lee H, Habas R, Abate-Shen C. (2004). MSX1 cooperates with histone H1b for inhibition of transcription and myogenesis. *Science*. 304(5677):1675-8.
- Legendre C-M, Charpentier-Côté C, Drouin R, Bouffard C (2011) Neurofibromatosis Type 1 and the “Elephant Man's” Disease: The Confusion Persists: An Ethnographic Study. *PLoS ONE* 6(2): e16409. doi:10.1371/journal.pone.0016409
- Le Lièvre, C.S (1974). Rôle des cellules mésodermiques issues des crêtes neurales céphaliques dans la formation des arcs branchiaux et du squelette viscéral. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 31, 453-477.
- Le Lièvre, C.S. (1978). Participation of neural crest-derived cells in the genesis of the skull in birds. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 47, 17-37.
- Le Lièvre, C.S., and Le Douarin, N. M. (1975). Mesenchymal derivatives of the neural crest : analysis of chimeric quail and chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 34, 125-154.
- Lewis, A.E., Vasudevan, H.N., O'Neill, A.K., Soriano, P., and Bush, J.O. (2013). The widely used Wnt1-Cre transgene causes developmental phenotypes by ectopic activation of Wnt signaling. *Dev Biol.*, 379, 229–234.
- Li Y, O'Connell P, Huntsman Breidenbach H, Cawthon R, Stevens J, Xu G et al. (1995) .Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1). *Genomics* ;25:9-18.
- Liu W, Selever J, Murali D, Sun X, Brugger SM, Ma L, Schwartz RJ, Maxson R, Furuta Y, Martin JF. (2005). Threshold-specific requirements for Bmp4 in mandibular development. *Dev Biol*. 283(2):282-93.
- Lindhurst MJ, Sapp JC, Teer JK, Johnston JJ, Finn EM, Peters K, Turner J, Cannons JL, Bick D, Blakemore L, Blumhorst C, Brockmann K, Calder P, Cherman N, Deardorff MA, Everman DB, Golas G, Greenstein RM, Kato BM, Keppler-Noreuil KM, Kuznetsov SA, Miyamoto RT, Newman K, Ng D, O'Brien K, Rothenberg S, Schwartzenuber DJ, Singhal V, Tirabosco R, Upton J, Wientroub S, Zackai EH, Hoag K, Whitewood-Neal T, Robey PG, Schwartzberg PL, Darling TN, Tosi LL, Mullikin JC, Biesecker LG (2011). "A mosaic activating mutation in AKT1 associated with the Proteus syndrome." *N Engl J Med* 365 (7): 611–9.
- Lumsden A., Sprawson N., and Graham, A. (1991). Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development*, 113, 1281-1291.
- MacKenzie A., Ferguson M.W., and Sharpe P.T. (1991). Hox-7 expression during murine craniofacial development. *Development* 113: 601-611.
- Mansouri A, Stoykova A, Torres M, and Gruss P (1996). Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7-/- mutant mice. *Development*, 122: 831-8.
- Mansouri A., Pla P., Larue L., and Gruss P. (2001). Pax3 acts cell autonomously in the neural tube and somites by controlling cell surface properties. *Development*, 128: 1995-2005.
- Manzanares, M., and Nieto, M.A. (2003). A celebration of the New Head and an evaluation of the new mouth. *Neuron*, 37, 895-898.
- Marin, F., and Puelles, L. (1994). Patterning of the embryonic avian midbrain after experimental inversions: a polarizing activity from the isthmus. *Dev. Biol.*, 163, 19-37.
- Martinez, S. (2001). The isthmus organizer and brain regionalization. *Dev. Biol.*, 45, 367–371.
- Martinez, S., and Alvarado-Mallart, R.-M. (1989). Rostral cerebellum originates from the caudal portion of the so-called “mesencephalic” vesicle: A study using chick/quail chimeras. *Eur. J. Neurosci.*, 1, 549–560.

- Matsuoka, T., Ahlberg, P.E., Kessar, N., Iannarelli, P., Dennehy, U., Richardson, W.D., McMahon, A.P., and Köentges, G. (2005). Neural crest origins of the neck and shoulder. *Nature*, 436, 347-355.
- McKenna KX. (1991). Neurofibromatosis type I—a rare case resulting in conductive hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg*;104:868-72.
- Meulemans, D., and Bronner-Fraser, M. (2004). Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev. Cell*, 7, 291-299.
- Michael Krauthammer, Yong Kong, Antonella Bacchicchi et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in *NF1* and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nature Gen* :10.1038/ng.3361
- Morsier (de) G. (1956) Études sur les dysraphies, crâniocéphaliques. III. Agénésie du septum pellucidum avec malformation du tractus optique. La dysplasie septo-optique. *Schweizer Archiv für Neurologie und Psychiatrie*, Zurich., 77, 267-292.
- Muecke M, Amedee RG. (1994). Head and neck manifestations of neurofibromatosis. *J La State Med Soc* ;146:183-6.
- Mukhopadhyay D, Anant S, Lee RM, Kennedy S, Viskochil D, Davidson NO. (2002). CrU Editing of Neurofibromatosis 1 mRNA Occurs in Tumors That Express Both the Type II Transcript and apobec-1, the Catalytic Subunit of the Apolipoprotein B mRNA—Editing Enzyme Debnath
- Murko C, Sabine L, Marianne S, Christian S, Oliver P. (2010). Expression of class I histone deacetylases during chick and mouse development. *Int J Dev Biol*. 54(10): 1527–1537.
- Hu Na, PabloH.Strobl-Mazzulla B, MarianneE.Bronner. (2014). Epigenetic regulation in neural crest development. *Developmental Biology*: 396, 159–168
- Noden, D.M. (1983). The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev. Biol.*, 96, 144-165.
- Nordlund M, Gu X, Shipley MT, Ratner N.(1993). Neurofibromin is enriched in the 88 endoplasmic reticulum of CNS neurons. *J Neurosci*;13:1588-600.
- Odier L. Manuel de médecine pratique. Genève, 1811.
- Pasment E., Vidaud M., Vidaud D., Wolkenstein P. (2012). Neurofibromatosis type 1 : from genotype to phenotype. *J Med Gent*:49:438-489.
- Pasqualetti, M., Ori, M., Nardi, I., and Rijli, F.M. (2000). Ectopic *Hoxa2* induction after neural crest migration results in homeosis of jaw elements in *Xenopus*. *Development*, 127, 5367-5578.
- Pavy B., Vacher C., Vendroux J., Smarrito S. Fentes labiales et palatines. *Traitement primaire* . Elsevier Masson 1998, 21p.
- Pekarik, V., Bourikas, D., Miglino, N., Joset, P. and Stoekli, E. (2003). Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation *Nature Biotech.*, 21:93-96.
- Perris, R., and Perissinotto, D. (2000). Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech. Dev.* , 95, 3-21.
- Pinson S, Creange A, Barbarot S, Stadler JF, Chaix Y, Rodriguez D et al. (2002). Neurofibromatosis 1: recommendations for management. *Arch Pediatr* ;9:49-60.
- Pinson S. et P. Wolkenstein. (2005). Neurofibromatose de type 1 ou maladie de Von Recklinghausen. *Rev Med Interne*. Volume 26, Issue 3, Pages 196-215.

- Pinson S. (1999). Neurofibromatose de type 1 : étude clinico-biologique et mise en place d'une consultation multidisciplinaire dans la région Rhône-Alpes. Th D Pharm Lyon 1.
- Platt, J. (1873). Ectodermic origin of the cartilage of the head. *Anat Anz.* 8, 506-509.
- Platt, J. (1897). The development of the cartilaginous skull and the branchial and hypoglossal musculature in *Necturus*. *Morphol Jahrb.* 25, 377-464.
- Prince, V., and Lumsden, A. (1994). *Hoxa-2* expression in normal and transposed rhombomeres: independent regulation in the neural tube and neural crest. *Development*, 120, 911-923.
- Ramirez-Solis, R., Zheng, H., Whiting, J., Krumlauf, R., and Bradley, A. (1993). *Hoxb-4* (*Hox-2.6*) mutant mice show homeotic transformation of a cervical vertebra and defects in the closure of the sternal rudiments. *Cell*, 73, 279-294.
- Rosenbaum T, Engelbrecht V, Krolls W, van Dorsten FA, Hoehn-Berlage M, Lenard HG.(1999). MRI abnormalities in neurofibromatosis type 1 (NF1): a study of men and mice. *Brain Dev*; 21:268-73.
- Rijli, F.M., Mark, M., Lakkaraju, S., Dierich, A., Dollé, P., and Chambon, P. (1993). A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of *Hoxa-2*, which acts as a selector gene. *Cell*, 75, 1333-1349.
- Riccardi VM, Mulvihill JJ. (1981). Neurofibromatosis (Von Recklinghausen disease). *Adv Neurol*; 29:1-282.
- Riccardi VM.(1982). Neurofibromatosis : phenotype, natural history and pathogenesis. Baltimore : Johns Hopkins University Press.
- Ruggieri M.(1999). The different forms of neurofibromatosis. *Childs Nerv Syst*; 15:295-308.
- Ruhin, B., Creuzet, S., Vincent, C., Benouaiche, L., Le Douarin, N.M., and Couly, G. (2003). Patterning of the hyoid cartilage depends upon signals arising from the ventral foregut endoderm. *Dev. Dyn.*, 228, 239-246.
- Santagati, F., and Rijli, F.M. (2003). Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nat Rev Neurosci.*, 4, 806-818.
- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R. (2000). *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet.* 24(4):391-5.
- Sauka-Spengler, T., and Bronner-Fraser, M. (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 557-568.
- Saunders, J.W., and Gasseling, M. (1968). Epithelio-mesenchymal interactions. Williams and Wilkins, Baltimore. 78-97.
- Shanmugalingam, S., Houart, C., Picker, A., Reifers, F., MacDonald, R., Barth, A., Griffin, K., Brand, M., and Wilson, S.W. (2000) *Ace/Fgf8* is required for forebrain commissure formation and patterning of the telencephalon. *Development*, 127, 2549-2561.
- Shimamura, K., and Rubenstein, J.L. (1997) Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development.* 124, 2709-2718.
- Simeone, A., Acampora, D., Gulisiano, M., Stornaiuolo, A., and Boncinelli, E. (1992). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature*, 358, 687-690.
- Skuse GR., Cappeon Amedio J. (1997). RNA processing and clinical variability in neurofibromatosis type I (NF1) *Human Molecular Genetics*, Vol. 6, No. 10 Review
- Smith RW. (1849) A treatise on the pathology, diagnosis, and treatment of neurofibroma. Dublin.
- Soo, K., O'Rourke, M.P., Khoo, P.L., Steiner, K.A., Wong, N., Behringer, R.R., and Tam, P.P. (2002). Twist function is required for the morphogenesis of the cephalic neural tube and the

- differentiation of the cranial neural crest cells in the mouse embryo. *Dev. Biol.*, 247, 251-270.
- Stock DW, Ellies DL, Zhao Z, Ekker M, Ruddle FH, Weiss KM. (1996). The evolution of the vertebrate *Dlx* gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(20):10858-63.
- Stoeckli, E.T. (2003). RNAi in avian embryos. 'RNAi: A Guide to Gene Silencing' Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 297-312.
- Stone, L. (1929) Experiments showing the role of migrating neural crest (mesectoderm) in the formation of head skeleton and loose connective tissue in *Rana palustris*. *Dev. Genes Evol.*, 11, 40-77.
- Storm, E.E., Garel, S., Borello, U., Hebert, J.M., Martinez, S., McConnell, S.K., Martin, G.R., and Rubenstein, J.L. (2006) Dose-dependent functions of *Fgf8* in regulating telencephalic patterning centers. *Development.* 133, 1831-1844.
- Tassabehji M, Read AP, Newton VE, Harris R, Balling R, and Gruss P. (1992). Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature*, 355: 635-6.
- Theveneau, E., and Mayor, R. (2011). Collective cell migration of the cephalic neural crest: the art of integrating information. *Genesis*, 49, 164-176.
- Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, van Heyningen V, Hastie ND, Meijers-Heijboer H, Drechsler M, et al. (1991). Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell*, 67:1059-74.
- Trainor, P. A., Ariza-McNaughton, L. and Krumlauf, R. (2002). Role of the isthmus and FGFs in resolving the paradox of neural crest plasticity and prepatterning. *Science*, 295, 1288-1291.
- Tribulo C, Aybar MJ, Nguyen VH, Mullins MC, Mayor R. (2003). Regulation of *Msx* genes by a *Bmp* gradient is essential for neural crest specification. *Development.* 130(26):6441-52. Epub 2003 Nov 19.
- Trumpp, A., Depew, M. J., Rubenstein, J. L., Bishop, J. M. and Martin, G. R. (1999). Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Genes Dev.*, 13, 3136-3148.
- Upadhyahya M, Cooper DN.(1998). Neurofibromatosis type 1. From genotype to phenotype. *Bios Oxford*;21-38.
- Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE. (1996). A human *MSX1* homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet.*13(4):417-21.
- Viskochil D. Neurofibromatosis 1.(1999) Introduction. *Am J Med Genet*;89:5-8.
- Waldo, K., Zdanowicz, M., Burch, J., Kumiski, D.H., Stadt, H.A., Godt, R.E., Creazzo, T.L., and Kirby, M.L. (1999). A novel role for cardiac neural crest in heart development. *J. Clin. Invest.* 103, 1499-1507.
- Wilkie AO, Tang Z, Elanko N, Walsh S, Twigg SR, Hurst JA, Wall SA, Chrzanowska KH, Maxson RE Jr. (2000). Functional haploinsufficiency of the human homeobox gene *MSX2* causes defects in skull ossification. *Nat Genet.* 24(4):387-90.
- Wolkenstein, P., J. Zeller, C. Mathoret, L. Lantieri. (1997). Traitement des manifestations cutanées Volume 3, numéro 8, John Libby 609-13
- Wolkenstein P, Decq P.(1998). Neurofibromatoses. *Neurochirurgie*; 44:267-72.
- Ylikorkala A., Rossi D.J., Korsisaari N., Luukko, K., Kari Alitalo, K., Henkemeyer, M., and Mäkelä, T.P. (2001). Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in *Lkb1*-deficient mice. *Science*, 293, 1323-1326.
- Yu, H.H., and Moens, C.B. (2005). Semaphorin signaling guides cranial neural crest cell migration in

zebrafish. *Dev. Biol.*, 280, 373-385.

Yu Lan, Jingyue Xu, Rulang Jiang. (2015). Cellular and Molecular Mechanisms of Palatogenesis. *Dev. Biol* 115

Zhang H, Hu G, Wang H, Sciavolino P, Iler N, Shen MM, Abate-Shen C. (1997). Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. *Mol Cell Biol.* 17(5):2920-32.

Zumkeller W., Orth U., and Gal A. (2003). Three novel PAX6 mutations in patients with aniridia. *Mol Pathol*, 56:180–3.