



Université de Liège
Faculté des sciences

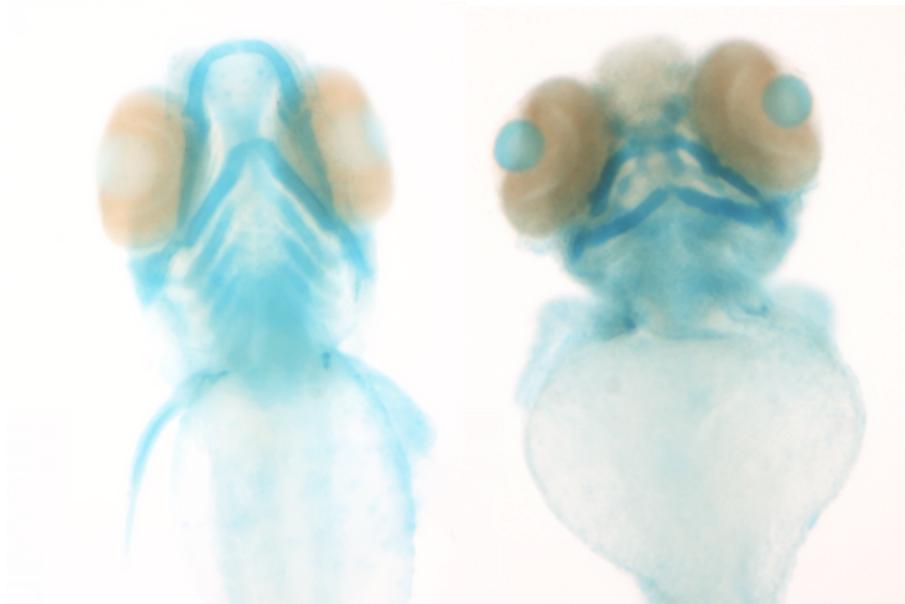


Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée (GIGA)
Département des Sciences de la Vie

Laboratoire d'Organogenèse et Régénération

Professeur M.Muller

Rôle des récepteurs Fgfs dans la formation des cartilages crâniens du zebrafish.



Thèse présentée par
Arnaud Larbuisson

En vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences

Année Académique 2013-2014

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur, Marc Muller, pour ses conseils avisés tout au long de cette recherche mais aussi pour son enthousiasme à l'égard de ce travail.
Sans oublier, ma collègue Julia qui m'a épaulé et prodigué de judicieux conseils durant ces années. Années où cette collaboration s'est transformée en profonde amitié. De plus, je tiens également à remercier tout le groupe « Mullerien » pour le soutien et les moments de détente.
Enfin, je tiens à remercier ma famille qui m'a soutenu durant cette recherche et ma compagne Kathy pour le soutien apporté lors des moments de doute et des difficultés rencontrées pendant ces années.

Table des matières

1 LISTE DES ABREVIATIONS	7
2 LE CARTILAGE	11
2.1 CARTILAGE HYALIN	11
2.2 CARTILAGE ELASTIQUE	12
2.3 CARTILAGE FIBREUX	13
3 PROCESSUS D'OSSIFICATION	13
4 LE CRANE DU ZEBRAFISH	15
4.1 STRUCTURE	15
4.2 FORMATION DU CHONDROCRANE CHEZ LE ZEBRAFISH	17
4.2.1 DIFFERENCIATION DES CELLULES DES CRETES NEURALES	20
4.2.2 POCHE ENDODERMIQUE	24
4.2.3 SIGNALISATION HEDGEHOG	27
4.2.4 LA SIGNALISATION BMP	28
4.3 INTERACTIONS IMPLIQUEES DANS LA CHONDROGENESE.	29
5 LA SIGNALISATION FGF	30
5.1 FONCTION DES FGFS ET FGFRS.	30
5.1.1 FGFR ET MALADIE HUMAINE	31
5.2 STRUCTURES DES FGFS ET FGFRS	33
5.3 VOIE DE SIGNALISATION ET TRANSDUCTION DU SIGNAL	35
5.3.1 LA LIAISON LIGAND-RECEPTEUR	35
5.3.2 SIGNALISATION INTRACELLULAIRE	36
6 EVOLUTION DES FGFS ET FGFRS	38
6.1 CONSERVATION ENTRE ESPECES	40
6.2 SPECIFICITE DES LIGANDS	42
7 LA VOIE FGF CHEZ LE ZEBRAFISH	42
7.1 EXPRESSION DES FGFR CHEZ LE ZEBRAFISH	42
7.1.1 FGFR1A	43
7.1.2 FGFR1B	43
7.1.3 FGFR2	43
7.1.4 FGFR3	44
7.1.5 FGFR4	44
7.1.6 FGFR1L	45
7.2 FONCTIONS DE LA SIGNALISATION FGF	45
8 BUT DU TRAVAIL	47
9 ROLE DE FGFR1A ET FGFR2 DANS LA CHONDROGENESE CRANIENNE DU ZEBRAFISH	49
9.1 RESULTATS SUPPLEMENTAIRES	65
9.1.1 L'INJECTION DE MORPHOLINOS MOFGFR1A ET MOFGFR2 N'AFFECTE PAS L'APOPTOSE NON SPECIFIQUE.	65

9.1.2 LE KNOCKDOWN DE L'EXPRESSION DE FGFR1A OU FGFR2 N'AFFECTE PAS L'EXPRESSION ENDODERMIQUE DE <i>BMP4</i> .	66
9.1.3 LE PROFIL D'EXPRESSION DE SONIC HEDGEHOG (<i>SHH</i>) N'EST PAS AFFECTE DANS LES MORPHANTS <i>FGFR1A</i> ET <i>FGFR2</i> .	67
9.2 DISCUSSION PARTIM FGFR1A ET FGFR2	68
<u>10 ROLES DU RECEPTEUR 3 DES FGFS DANS LA FORMATION DES CARTILAGES PHARYNGIENS CHEZ LE ZEBRAFISH</u>	71
10.1 PROFIL D'EXPRESSION FGFR3.	71
10.2 IMPLICATION DE FGFR3 DANS LA CHONDROGENESE	74
10.2.1 LE KNOCKDOWN DE <i>FGFR3</i> AFFECTE LA FORMATION DU CARTILAGE	74
10.2.2 FGFR3 ET LA MIGRATION DES CCNC	77
10.2.3 FGFR3 EST IMPLIQUE DANS LA CONDENSATION ET LA MATURATION DES CHONDROCYTES	78
10.3 FGFR3 ET L'ENDODERME	82
10.3.1 FGFR3 PARTICIPE A L'ACTIVATION D'UNE CASCADE GENETIQUE DANS L'ENDODERME.	83
<u>11 DISCUSSION ET CONCLUSIONS PARTIM FGFR3</u>	85
<u>12 DISCUSSION GLOBALE ET PERSPECTIVES</u>	89
<u>13 MATERIEL ET METHODES</u>	94
13.1 LE ZEBRAFISH	94
13.2 L'EMBRYOGENESE DU ZEBRAFISH	94
13.3 LES VECTEURS	96
13.4 SOUCHES BACTERIENNES	100
13.5 LES MILIEUX DE CULTURE POUR LES SOUCHES BACTERIENNES	100
13.6 DIGESTION ENZYMATIQUE	100
13.7 EXTRACTION AU PHENOL-CHLOROFORME	101
13.8 L'ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE	101
13.9 LA TRANSFORMATION DES BACTERIES	102
13.10 LA MINIPREPARATION D'ADN	102
13.11 LA MAXIPREPARATION D'ADN	103
13.12 LA MICROINJECTION DANS LES ŒUFS	104
13.13 LA COLORATION DES CARTILAGES A L'ALCIAN BLUE	106
13.14 L'HYBRIDATION IN SITU SIMPLE VISIBLE	106
13.15 L'HYBRIDATION IN SITU DOUBLE FLUORESCENCE	110
13.16 IMAGES ET ANALYSE	111
13.17 ACRIDINE ORANGE	111
13.18 EXPERIENCE DE RESCUE	111
<u>14 ANNEXES</u>	112
<u>15 BIBLIOGRAPHIE</u>	114

1 Liste des abréviations

5'UTR-MOFgfr1a	Morpholino de traduction dirigé contre la région 5'UTR de <i>fgfr1a</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AP	Phosphatase alcaline
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messager
Barx1	BarH-like homeobox 1
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Bovine Serum Albumine
CCN	Cellules des Crêtes Neurales
CCNc	Cellules des Crêtes Neurales crâniennes
Col2a1	Collagène de type II
CRE	Cyclic AMPc Response Element
Cy3	Cyanine 3
DEPC	DiEthylPyroCarbonate
Dig	Digoxigénine
Dlx2	Distal-less homeobox 2
DNP	2, 4-dinitrophénol
dNTP	DésoxyriboNucléotide TriPhosphate
Dpf	« day(s) post fertilization » : jour(s) après fécondation
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetracetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
Erm	ETS Related Molecule
ERK	Extracellular signal-Regulated protein Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
Fli1	friend leukemia integration 1
Fsta	Follistatine a
g	Gramme
GAG	GlycosAminoGlycan

GFP	“Green fluorescent protein” : protéine fluorescente verte
HIS	Hybridation <i>in situ</i>
HLGAG	Heparan Like GlycosAminoGlycan
hpf	“hour(s) post fertilization” : heure(s) après fécondation
HS	Heparan Sulfate
HRP	Horseradish peroxidase
kb	Kilo bases
LB	Milieu de culture Luria-Bertani
M	Molaire (mole/litre)
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MEK	MAPK ERK Kinase
MHB	Midbrain Hindbrain Boundary
µl	Microlitre(s)
mM	milliMolaire
min	Minutes
MOcon	Morpholino de contrôle
MOFgfr2	Morpholino de splicing dirigé contre <i>fgfr2</i>
MOFgfr3	Morpholino de splicing dirigé contre <i>fgfr3</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)PropanSulfonic acid
NBT	Nitro Blue Terazolium
ng	Nanogramme
nl	Nanolitre
NGF	Nerve Growth Factor
Nkx2.3	NK2 transcription factor related 3
NTP	Nucleoside TriPhosphate
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline Tween 20
PDGF	Plateled-Derived Growth Factor
Pea3	Polyoma Enhancer Activator 3
PFA	ParaFormAldéhyde
pb	Paire(s) de bases
PTU	PropylThioUracil

Raf	Ras-Associated Factor
Ras	Rat Sarcoma
RTK	Receptor Tyrosin Kinase
Runx2b	Runt-related transcript factor 2b
Runx3	Runt-related transcript factor 3
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Shh	Sonic hedgehog
sMOFgfr1a	Morpholino de splicing dirigé contre <i>fgfr1a</i>
SOS	Son Of Sevenless
Sox9a	SRY (Sex determining Region Y)-Box 9a
Sox9b	SRY (Sex determining Region Y)-Box 9b
Sox17	SRY (Sex determining Region Y)-Box 17
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Factor
SSC	Saline Sodium Citrate
SSCT	Saline Sodium Citrate Tween 20
TAE	Tris, Acetic acid, EDTA
TCF	Ternary Complex Factor
tMOFgfr1a	Morpholino de traduction dirigé contre <i>fgfr1a</i>
TRIS	TRIShydroxymethylaminomethane
Tween 20	Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
UTR	Untranslated region : “region non traduite”
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wild-type : “sauvage”

INTRODUCTION

2 Le cartilage

Le cartilage est un tissu squelettique semi-rigide qui allie flexibilité et dureté. Le tissu cartilagineux est uniquement composé par des cellules de même type qui sécrètent la matrice extracellulaire (MEC) conférant ainsi les propriétés physiques du cartilage.

Les propriétés physiques des tissus cartilagineux (flexibilité, semi-rigidité, ...) sont dues à la nature de la MEC principalement composée de glycosaminoglycans (GAGs), de protéoglycans (GAGs liés à diverses protéines), de fibres élastiques et de collagène. En fonction des proportions de fibres incluses dans la MEC, on distingue différentes classes de cartilage : hyalin (collagène II en fibrilles), élastique (collagène II en fibres élastiques) et fibrocartilage (collagène I en fibres). Le cartilage n'est ni innervé ni vascularisé (Chèvremont 1966; Wheater 2001).

La formation du cartilage commence par la différenciation de cellules mésenchymateuses en chondroblastes. Ceux-ci se divisent par mitose et forment des agrégats sécrétant les différentes substances et les composants fibreux (collagène de type II) de la MEC. Le collagène de type II sécrété forme un réseau de fines fibrilles d'environ 300 nm de long. La matrice extracellulaire cartilagineuse ainsi formée va englober les chondroblastes qui, à ce stade, sont devenus matures et peuvent être appelés chondrocytes. En périphérie du cartilage mature se trouve un tissu conjonctif, le péricondre, contenant des chondroblastes encore actifs. On parle de croissance appositionnelle par opposition à la croissance interstitielle où les divisions cellulaires ont lieu *a posteriori* dans des lacunes entourant les chondroblastes qui sont formées suite à l'accumulation de MEC.

2.1 Cartilage hyalin

Ce type de cartilage est le plus répandu, il est le composant principal du squelette des poissons cartilagineux, on le retrouve également dans le squelette des embryons des vertébrés et chez les adultes au niveau du larynx, des articulations, de la cloison nasale et de la trachée. Le cartilage hyalin est également à la base de l'ossification endochondrale qui sera abordée ultérieurement. Le cartilage hyalin est composé de deux zones : une zone de cartilage mature et une zone de prolifération des chondroblastes (péricondre).

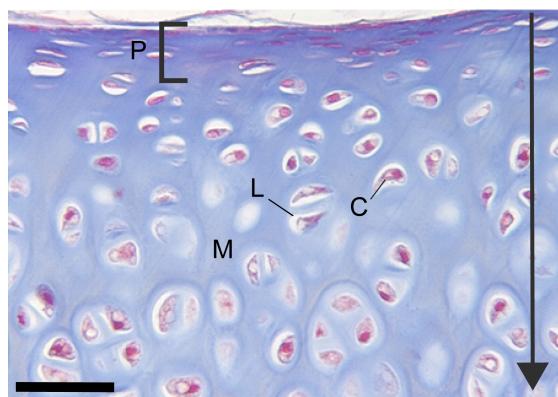


Fig. 1 Cartilage hyalin de rat. Echelle 50 µm. C : Chondrocytes ; L : Lacunes ; M : Matrice extracellulaire cartilagineuse ; P : Périchondre. Image adaptée de <http://www.edu.upmc.fr/histologie/>

2.2 Cartilage élastique

Ce type de cartilage se retrouve chez les mammifères au niveau du pavillon de l'oreille, de l'épiglotte, du conduit auditif externe, du larynx et au niveau de la trompe d'Eustache.

Le cartilage élastique a un aspect histologique semblable au cartilage hyalin avec en plus la particularité d'être composé de faisceaux de fibres élastiques (FE) à proximité des chondrocytes de la matrice cartilagineuse. Ce réseau de faisceaux n'a pas de structure organisée, ce qui permet une bonne élasticité dans toutes les directions de mouvement.

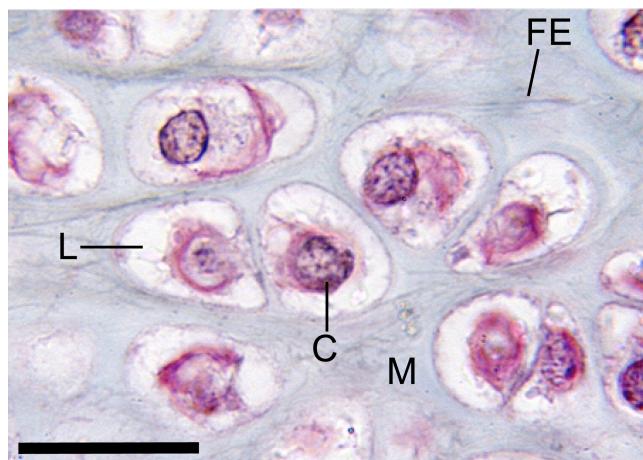


Fig 2 : cartilage élastique de lobe d'oreille humain. Echelle : 20 µm. C : Chondrocytes ; L : Lacunes ; M : Matrice extracellulaire cartilagineuse ; FE : fibres élastiques. Image adaptée de <http://www.edu.upmc.fr/histologie/>

2.3 Cartilage fibreux

Les cartilages fibreux se retrouvent principalement au niveau des disques intervertébraux, des ménisques, de la symphyse pubienne, des ligaments et de certains tendons. Ces cartilages sont composés d'une superposition de couches de matrice cartilagineuse hyaline et de couches de fibres de collagène épaisses orientées dans une direction en fonction des forces requises.

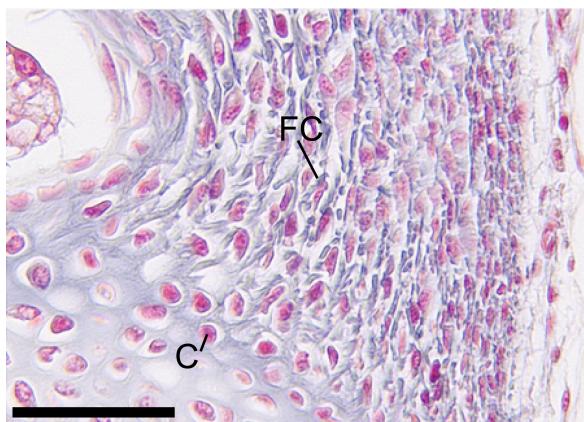


Fig. 3 : Disque intervertébral. (2009) Echelle 50 µm. C : Chondrocytes ; FC : Fibres collagène épaisses. Image adaptée de <http://www.edu.upmc.fr/histologie/>

3 Processus d'ossification

L'os est un tissu rigide constitué d'une matrice extracellulaire minéralisée, composée majoritairement de collagène de type 1, appelée ostéoïde et de 3 types de cellules mésenchymateuses : les ostéoblastes synthétisant l'ostéoïde et régulant sa minéralisation le long de la surface osseuse ; les ostéocytes qui sont des ostéoblastes inactifs enchâssés dans la matrice osseuse ; les ostéoclastes, cellules multinucléées de la lignée phagocytaire, capables de remodeler l'os en l'érodant en fonction de différentes contraintes perçues et de la concentration en calcium présente dans le sang.

Le système osseux constitue la charpente de l'endosquelette de différents organismes. Sa rigidité et sa résistance permettent l'attachement des muscles et *in fine* le mouvement. La majorité des os est composée d'une couche périphérique d'os compact et du périoste, d'une partie centrale d'os spongieux formé de trabécules osseuses. Dans certains cas, les espaces « libres » de l'os spongieux peuvent être occupés par de la moelle jaune et rouge.

Lors de l'ostéogenèse, on distingue différents types d'ossification au cours du temps mais ayant un résultat final identique.

- L'ossification endochondrale est le processus d'ossification à partir d'une matrice cartilagineuse. Les chondrocytes s'hypertrophient et résorbent le tissu cartilagineux, ne laissant que de fines traverses qui se calcifieront progressivement. Ensuite le périchondre, tissu conjonctif périphérique, acquiert un potentiel dit ostéogène : des cellules mésenchymateuses et des capillaires sanguins envahissent les différents espaces vides suite à la dégénérescence des chondrocytes. Les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes et sécrètent l'ostéoïde qui se minéralisera par la suite. L'os formé est, dans un premier temps, dit réticulé et subira différents remodelages pour devenir compact, lamellaire ou encore spongieux.
- L'ossification endomembranaire ou dermique est le processus d'ossification sans support cartilagineux. Dans ce cas, les cellules mésenchymateuses se différencient directement en ostéoblastes, remplaçant le mésenchyme par de l'os. Les étapes ultérieures sont identiques à celle de l'ossification endochondrale.
- L'ossification périostique est le résultat de la production appositionnelle de substance osseuse lamellaire par les ostéoblastes permettant ainsi l'épaisseissement de l'os et sa réparation en cas de fracture.
- L'ossification haversienne ne se réalise qu'au niveau d'os préexistant, on parle d'une ossification de réorganisation. Les ostéoclastes dégradent la matrice osseuse présente et forment ainsi des tunnels cylindriques contenant des vaisseaux sanguins, lymphatiques et des nerfs appelés canaux de Havers. Des cellules conjonctives vont ensuite y être acheminées et vont se différencier en ostéoblastes afin de produire des couches osseuses concentriques de la périphérie du tunnel vers son centre.

4 Le crâne du zebrafish

4.1 *Structure*

Le crâne du zebrafish adulte se divise en trois parties : le dermatocrâne, le neurocrâne et le viscérocrâne comprenant les paires d'arcs pharyngiens. L'ensemble du crâne compte 74 os, dont 45 endochondraux du neurocrâne et du viscérocrâne et 29 dermiques du dermatocrâne. Avant l'ossification, le crâne cartilagineux porte le nom de chondrocrâne et une fois l'ossification terminée porte le nom de ostéocrâne. La morphogenèse crânienne et son ossification sont complètes après les 21 premiers jours du développement.

Le neurocrâne protège le cerveau et les organes sensoriels. Il est composé de quatre capsules : l'ethmoïde, l'orbitale, l'optique et l'occipitale.

Le viscérocrâne est constitué de sept paires d'arcs pharyngiens cartilagineux et osseux entourant le pharynx. Dès le stade juvénile, chaque arc se compose de cinq éléments : les basi-, hypo-, céramoïde, épi- et pharyngobranchiaux. On note que ces structures sont plus importantes dans les deux premiers arcs correspondant à la mandibule et l'hyoïde. Les quatre paires d'arcs suivantes portent les branchies et sur la dernière, dépourvue de branchies, se trouvent les dents. Les cinq dernières paires d'arcs sont aussi appelées arcs branchiaux. Au stade larvaire, les cinq composants de chaque arc branchial ne sont pas distincts, mais forment une unique structure transitoire appelée cérotobranchial (Fig. 4).

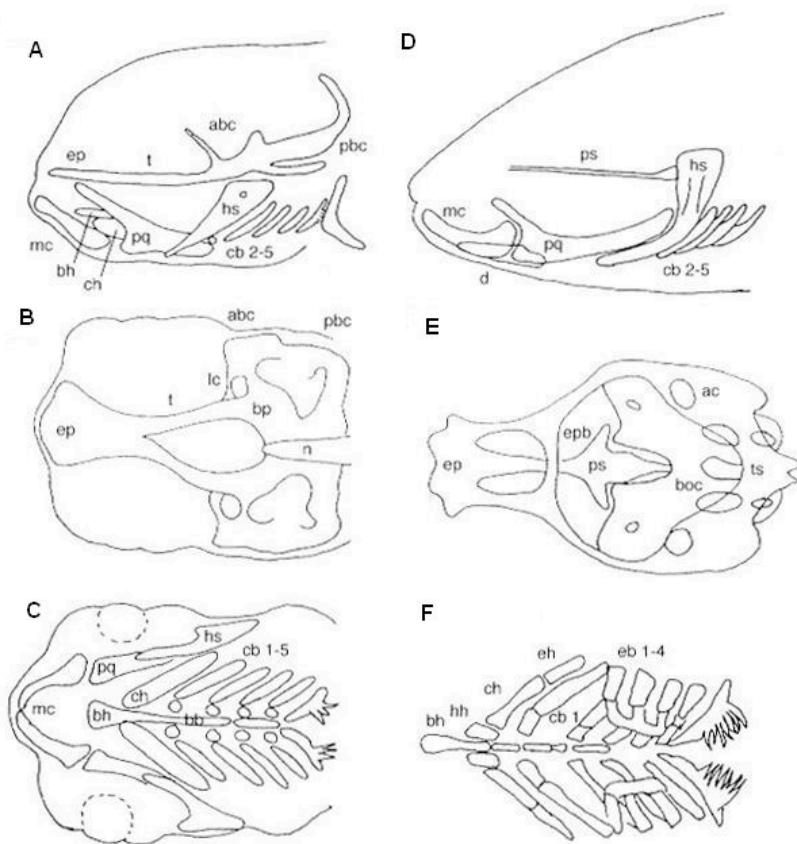


Figure 4: Représentations schématiques des crânes d'une larve (A, B, C) et d'un juvénile (D, E, F) en vues latérales (A, B) et ventrales du neurocrâne (B, E) et du viscérocrâne (C, F). En (F), la mandibule n'est pas représentée. abc : commissure basicrânienne antérieure , ac : capsule otique , bh : basihyal , bb : basibranchiaux , boc : basioccipital , bp : plancher basal , cb : cératobranchiaux , ch : cératohyal , d : dentaire , eb : épibranchiaux , eh : épihyal , ep : plancher ethmoïdien , ep : barre épiphysaire , hh : hypohyal , hs : hyosymplectique , lc : commissure latérale , mc : cartilage de Meckel , n : notocorde , pbc : commissure basicrânienne postérieure , pq : palatocarré , ps : parasphénoïde , t : trabécule , ts : tectum synopticum (Nüsslein-Volhard and Dahm 2002)

Le dermatocrâne, partie externe du crâne, entoure le neurocrâne et les deux premiers arcs branchiaux. Il comprend également l'opercule (os dermique) qui recouvre les branchies.

4.2 Formation du chondrocrâne chez le zebrafish

La formation du chondrocrâne du zebrafish est le résultat de la migration et différenciation des cellules des crêtes neurales crâniennes (CCNc) et du mésoderme paraxial. Le viscérocrâne est formé exclusivement de CCNc, alors que le neurocrâne est formé de CCNc et de cellules du mésoderme. Le mésoderme, adjacent aux CCNc, forme quant à lui du muscle et de l'endothélium (Schilling and Kimmel 1994; Knight and Schilling 2006).

Les cellules des crêtes neurales (CCN) se forment au moment de la neurulation (lors du repli de la plaque neurale en quille neurale) en position dorsale de part et d'autre de la quille neurale. Ces cellules perdent leur propriété adhésive suite à une modification de l'expression des membres de la famille des cadhérines (Kulesa, Bailey et al. 2010) et se détachent de la périphérie du tube neural. Les CCN vont ensuite migrer et se différencier soit en neurones, soit en cellules gliales, soit en cartilage ou encore en mélanocytes (Wolpert 2004).

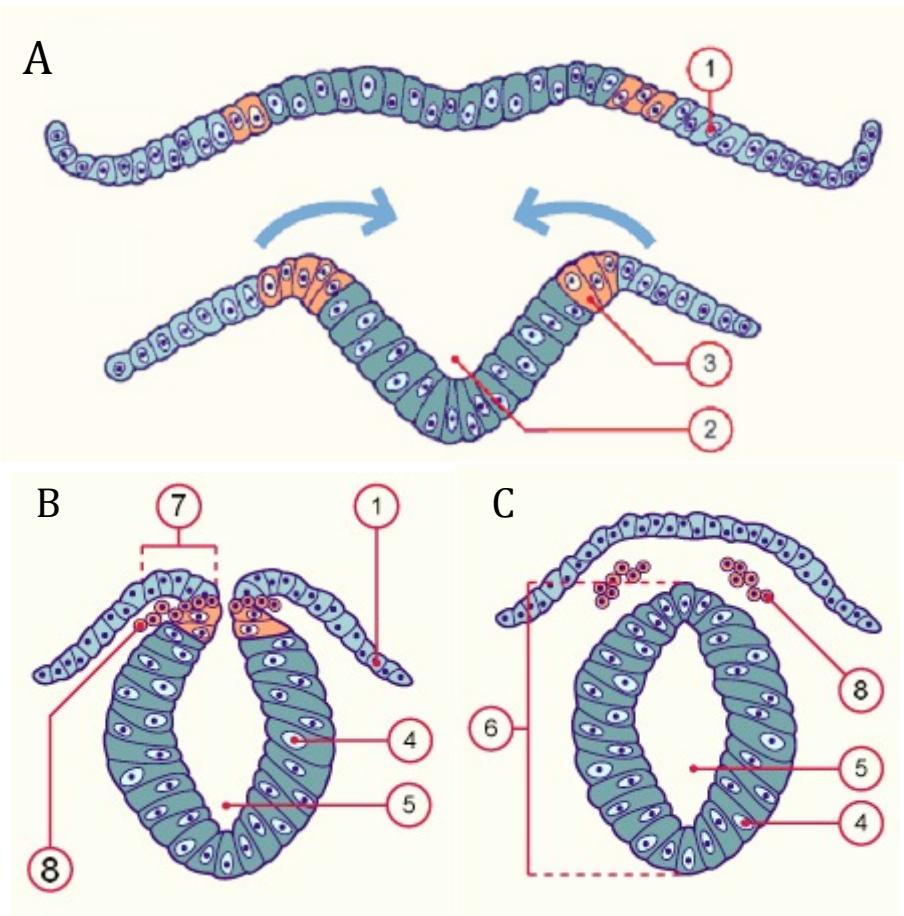


Figure 5: Représentation schématique générale de la formation et de la migration des cellules des crêtes neurales (CCN) à partir de la plaque neurale. (A) La neurulation débute dans la région cervicale et se traduit par un phénomène de cavitation de la plaque neurale à partir de l'épiblaste. La gouttière neurale se forme. (B) Les deux bourrelets neuraux se rapprochent et on observe une première ébauche du tube neural. Les cellules des crêtes neurales se détachent du neuroépithélium et perdent leur caractère cohésif. (C) Le tube neural, situé sous l'épiderme, est formé et formera par la suite l'encéphale et la moelle épinière. Les CCN migrent et donneront naissance à divers tissus et cellules. 1 : épiblaste, 2 : gouttière neurale, 3 : crêtes neurales, 4 : neuroépithélium, 5 : canal ependymaire, 6 : tube neural, 7 : bourrelets neuraux, 8 : cellules des crêtes neurales en migration.

<http://www.embryology.ch/francais/vcns/tubecrete04.html>

A l'origine, les cellules des crêtes neurales crâniennes se retrouvent au niveau du cerveau postérieur adoptant une structure segmentée en sept rhombomères (r1-7) (Schilling and Kimmel 1994; Piotrowski and Nusslein-Volhard 2000). Ils ont une organisation segmentée en relation avec leur rhombomère d'origine, on parle d'une spécification segmentaire (Fig. 5) régulée par l'expression des gènes homeobox *hox* et *otx* (Orthodenticle homolog) participant à l'établissement de l'axe antéro-postérieur (Santagati and Rijli 2003; Knight and

Schilling 2006). Les CCNc vont former trois amas bien distincts qui migreront en trois vagues successives au niveau des poches endodermiques pharyngiennes où les CCNc vont se différencier. Une interaction physique entre l'endoderme et les CCNc a été démontrée et l'absence ou la réduction de l'endoderme pharyngien est corrélée avec une réduction des cartilages crânofaciaux (David, Saint-Etienne et al. 2002). La première vague formera la mandibule, la seconde vague l'hyoïde et la troisième les cinq arcs branchiaux (Fig. 6)

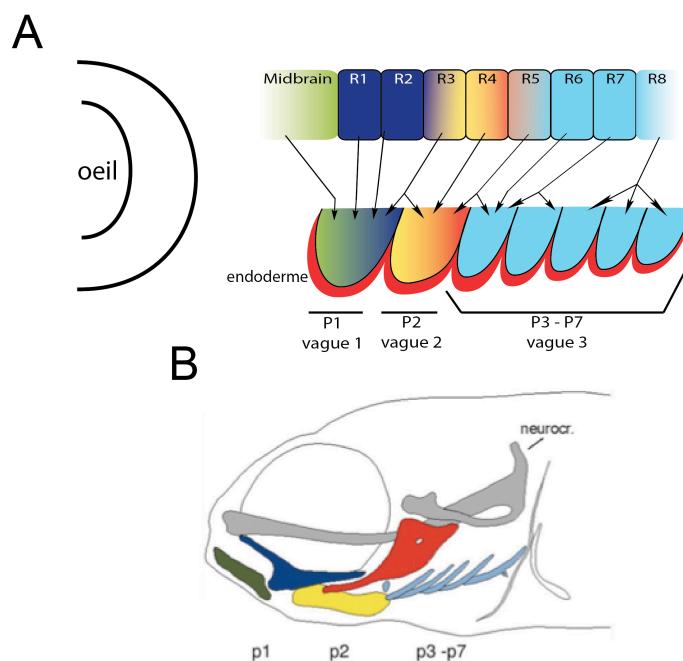


Figure 6: Représentations schématiques de la relation entre la segmentation du cerveau postérieur, la migration des cellules des crêtes neurales et les éléments des arcs pharyngiens. (A) Le cerveau postérieur est divisé en 7 rhombomères (r1-r7). Les cellules des crêtes neurales migrent vers les poches endodermiques (p1-p7) en 3 vagues (vague 1-3). (B) Le code couleur indique les cellules des crêtes neurales provenant des rhombomères et qui sont à l'origine du viscérocrâne. P1-p7 : arcs pharyngiens de 1 à 7, r1-r8 : rhombomères 1 à 8. Adaptée de (Piotrowski et al. 2000).

4.2.1 Différenciation des cellules des crêtes neurales

Au cours de la chondrogenèse, les CCNC se différencient en chondrocytes en exprimant différents facteurs de transcription et grâce aux signaux extracellulaires qu'elles perçoivent et qui proviennent des tissus adjacents tels que l'endoderme et/ou l'ectoderme pharyngien (Fig. 7). Les chondrocytes vont s'organiser en « stack » et produire la matrice cartilagineuse composée de collagène encodé par *col2a1*. Ce processus nécessite l'expression de différents facteurs de transcription tels que Dlx2a, Barx1, Sox9a, Runx2b, etc.

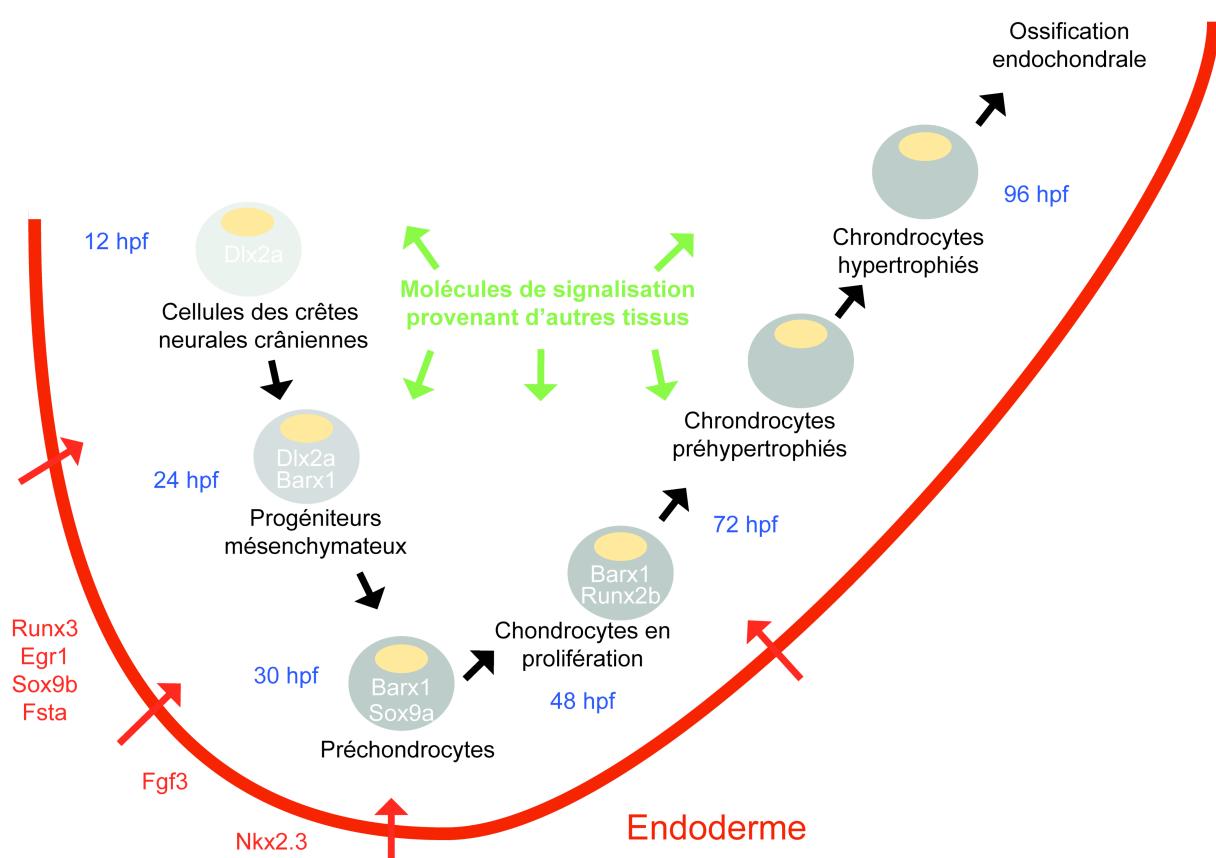


Figure 7: Schéma du mécanisme de différenciation des cellules des crêtes neurales crâniennes en chondrocytes. Lors du processus de la chondrogenèse, les cellules des crêtes neurales crâniennes vont se différencier en chondrocytes suite à l'expression de différents gènes tels que *dlx2a*, *barx1*, *sox9a*, *runx2b* au fil du temps. La différenciation des CCNC n'est possible que par l'expression de ces gènes, mais également grâce à l'interaction des tissus avoisinants comme l'endoderme. Ce dernier va exprimer des gènes (*runx3*, *egr1*, *sox9b*) participant au contrôle de l'expression de gènes codants pour des protéines (*Fsta*, *Fgf3*) impliquées dans une signalisation extracellulaire cruciale pour la différenciation des CCNC en chondrocytes.

4.2.1.1 Dlx2a

Dlx2a est un facteur de transcription à homéodomaine de la famille des Distal-less homeobox (Dlx). Cette famille de facteurs de transcription est impliquée dans l'établissement de la polarité proximo-distale au niveau des arcs pharyngiens (Akimenko, Ekker et al. 1994; Knight and Schilling 2006; Sperber, Saxena et al. 2008) permettant ainsi la spécification positionnelle des cellules. Chez le zebrafish, l'expression de *dlx2a* est détectée dans les cellules des crêtes neurales crâniennes (CCNc) à partir de 12 hpf (Akimenko, Ekker et al. 1994). Cette expression permet de suivre la migration des CCNc lors de la formation des cartilages. Lorsque l'expression de *dlx2a* est réduite (knock down) par l'injection de morpholino, les embryons morphants pour ce gène présentent une réduction de la taille de la tête, des défauts dans la croissance des cartilages pharyngiens et un empilement aberrant des chondrocytes. De plus, *dlx2a* est important pour l'expression de différents facteurs impliqués dans la chondrogenèse tels que *sox9a* dont le rôle sera abordé ultérieurement. Cependant, le « knock down » de *dlx2a* ne modifie pas la présence de l'endoderme pharyngien contribuant à la formation des cartilages pharyngiens. Un autre gène de la famille des Dlx, *dlx1*, est exprimé dans les mêmes cellules que *dlx2a* sans pour autant compenser la perte de fonction de ce dernier (Sperber, Saxena et al. 2008). Chez le zebrafish, un gène parologue à *dlx2a* existe : *dlx2b/dlx5*. Toutefois, ce gène n'étant pas exprimé dans la région pharyngienne lors de la formation du viscérocrâne, il ne sera pas abordé lors de ce travail bien qu'il participe au développement des dents présentes sur le 5^{ème} arc cératobranchial (Jackman, Draper et al. 2004).

4.2.1.2 Barx1

La famille des facteurs de transcription à homéodomaine Barx est impliquée dans la régulation des molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) ainsi que dans la production des fibres de collagène par le contrôle de l'expression du gène du collagène de type 2 (*col2a1*), composant principal de la matrice cartilagineuse (Sperber and Dawid 2008). L'expression de *barx1* est observée dans les CCNc en migration à partir de 13 hpf jusque 3 jours après fécondation (dpf). Barx1 n'affecte pas la migration des CCNc ni leur spécification, mais joue un rôle dans la prolifération, la différenciation et la condensation des chondrocytes. De plus,

l'expression de *barx1* autorise celle de *runx2b*, facteur tardif de maturation des chondrocytes. Ce dernier point a été mis en évidence par l'injection de morpholino dirigé contre *barx1*; les embryons injectés présentaient des modifications cartilagineuses pharyngiennes importantes.

4.2.1.3 Sox9a

Le gène *Sox9* (SRY (Sex determining Region Y)-Box 9) code pour un facteur de transcription impliqué dans le développement des cartilages et des os. Chez le zebrafish, ce gène est dupliqué en *sox9a* et *sox9b* qui présentent des profils d'expression et des fonctions similaires, mais aussi spécifiques à chacun. A 14 hpf, *sox9a* est fortement exprimé au niveau de la vésicule otique (ov) et des somites (s) tandis que *sox9b* est exprimé dans les CCNc (nc) avant leur migration. Les transcrits de *sox9a* sont détectables au niveau des CCNc (amas) après leur migration dans les arcs pharyngiens à partir de 24 hpf, tandis que l'expression de *sox9b* y diminue et apparaît dans l'endoderme et l'ectoderme. L'expression de *sox9a* continue à être détectable dans les chondrocytes de la mandibule, de l'hyoïde, des arcs cérotobranchiaux jusqu'à 3 dpf (Fig. 8)(Yan, Miller et al. 2002; Yan, Willoughby et al. 2005).

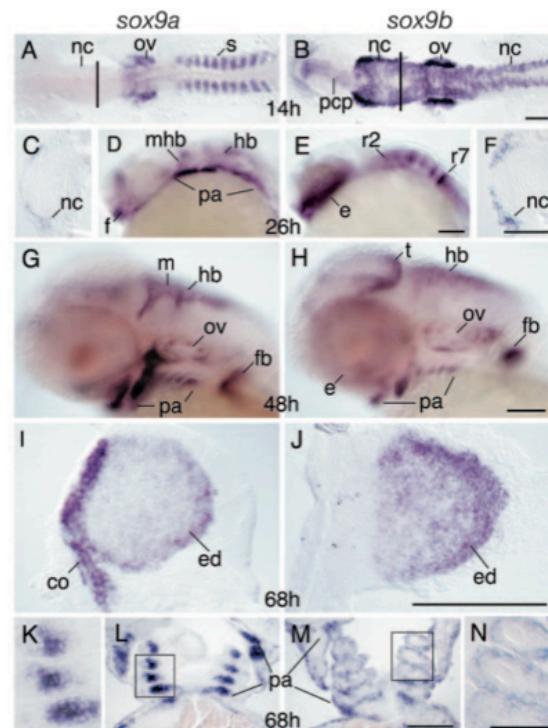


Figure 8 : Profil d'expression embryonnaire de *sox9a* et *sox9b*. A,C,D,G,I,K,L, *sox9a* ; B,E,F,H,J,M,N, *sox9b*. (A,B) 14 hpf, vue dorsale. (C,F) Coupe latérale d'un embryon à 14 hpf au niveau de la barre noire des images A et B. (D,E) Vue latérales d'un embryon à 26 hpf. (G,H) Vue latérale à 48 hpf. (I,J) Bourgeons de la nageoire pectorale à 68 hpf. (K-N) Vue ventrale de la région des arcs cérotobranchiaux d'embryons à 68 hpf. Co : scapulocoracoïde ; f : cerveau antérieur ; fb : bourgeons de la nageoire pectorale ; e : œil ; ed : disque endochondral ; hb : cerveau postérieur ; m : cerveau moyen ; mbh : « midbrain-hindbrain boundary » ; nc : cellules des crêtes neurales ; ov : vésicule otique ; pa : arcs pharyngiens ; pcp : plaque préchordale ; r : rhombomères ; s : somites ; t : tectum. Echelle : 50 µm K,N ; 100 µm A-J et L,M.

Le mutant pour *sox9a*, appelé *jellyfish (jef)*, montre une absence quasi totale des cartilages crâniens (neurocrâne et viscérocrâne). Yan, Miller et al. (2002) ont montré que *Sox9a* est impliqué dans la maturation des chondrocytes et leur stacking (empilement), mais aucunement dans leur condensation et leur migration au niveau des arcs pharyngiens. De plus, *Sox9a* est essentiel pour l'expression du collagène de type 2 (*col2a1*) formant la matrice cartilagineuse.

4.2.1.4 Runx2b

Lors du processus de maturation, les chondrocytes vont exprimer le facteur de transcription Runx2b. Ce facteur fait partie de la famille des facteurs de transcription runt-related impliqués dans différents processus tels que la différenciation des tissus (sang, neurones, os), le développement embryonnaire précoce, etc. Chez le zebrafish, on retrouve également les gènes *runx1*, *runx2a* (Flores, Tsang et al. 2004) et *runx3*. Chez les mammifères, Runx2 est essentiel pour la différenciation des ostéoblastes, le contrôle de la maturation des chondrocytes et *in fine* l'expression du collagène de type 2 (*col2a1*) (Flores, Lam et al. 2006). Chez le zebrafish, *runx2a* et *runx2b* sont exprimés à 48 hpf dans les précurseurs des os dermiques au niveau du cleithrum, de l'opercule et des os endochondraux. Au même moment, lors de la formation des cartilages et des os crâniens, les transcrits de *runx2a* sont détectés en faible quantité uniquement au niveau de l'épithélium pharyngien du neurocrâne, de la mandibule et de l'hyoïde tandis qu'une expression élevée de *runx2b* est observée dans les chondrocytes de ces mêmes structures, mais également dans ceux des arcs cératobrachiaux (Flores, Tsang et al. 2004; Flores, Lam et al. 2006). Les études de knock down des transcrits *runx2a* ont montré que ce gène a peu d'influence sur la chondrogenèse, ce qui n'est pas le cas de *runx2b*. Lors de l'injection de morpholinos dirigés contre *runx2b*, la majorité des cartilages pharyngiens sont absents à 3.5 dpf et 5 dpf (Flores, Lam et al. 2006) confirmant l'implication de ce gène dans la chondrogenèse.

4.2.2 Poches endodermiques

La formation du viscérocrâne est le résultat de la différenciation des CCNc (ectoderme) après leur migration au niveau de poches endodermiques (endoderme). Le mésoderme étant entouré des CCNc formera les muscles pharyngiens. Ce système complexe formé des trois feuillets embryonnaires est le lieu de multiples interactions sans lesquelles la différenciation des tissus ne serait pas possible (David, Saint-Etienne et al. 2002; Nie, Luukko et al. 2006; Shin, Shin et al. 2007).

Lors d'une étude de criblage de mutants zebrafish (Piotrowski, Schilling et al. 1996; Schilling, Piotrowski et al. 1996; Kimmel, Miller et al. 2001), certains spécimens présentaient des défauts cartilagineux dus à l'absence ou à la désorganisation des poches endodermiques. Le mutant *casanova* (*cas*), déficient pour le gène *sox32* et le mutant *bonnie and clyde* (*bon*) ne forment pas d'endoderme, engendrant l'absence de cartilages pharyngiens (viscérocrâne) tandis que le neurocrâne reste présent. Ce résultat souligne l'importance de la présence de l'endoderme dans le processus de la chondrogenèse pharyngienne du viscérocrâne (Alexander, Rothenberg et al. 1999; Kikuchi, Trinh et al. 2000; David, Saint-Etienne et al. 2002). Le mutant *van gogh* (*vgo*, mutant pour le gène *tbx1*) présente un défaut dans la segmentation des poches endodermiques, ce qui empêche la migration correcte des CCNc dans la région pharyngienne. Ces dernières vont s'agglomérer et les cartilages en résultant seront fusionnés. Les défauts cartilagineux observés dans le mutant *tbx1* peuvent être restaurés lors d'une transplantation d'endoderme sauvage (WT) (Piotrowski and Nusslein-Volhard 2000; Piotrowski, Ahn et al. 2003).

Ces résultats nous montrent bien à quel point la segmentation et la présence de l'endoderme est primordiale pour la formation du viscérocrâne. De plus, cela nous montre l'importance des interactions endoderme/CCNc par le biais des signaux entre les deux. Ce point sera abordé ultérieurement.

Afin de mieux comprendre le rôle de l'endoderme dans la chondrogenèse pharyngienne, il a été mis en évidence que l'endoderme devait exprimer différents gènes tels que *runx3*, *egr1* et *sox9b* (Dalcq, Pasque et al. 2012).

4.2.2.1 Runx3

Runx3 fait partie de la famille des facteurs de transcription « runt-related ». Ce gène se retrouve chez tous les vertébrés. Chez le poulet et la souris, *runx3* est exprimé dans les chondrocytes hypertrophiés impliqués dans l'ossification endochondrale et joue un rôle dans la maturation des chondrocytes (Stricker, Fundele et al. 2002; Yoshida, Yamamoto et al. 2004). Chez le zebrafish, les transcrits de *runx3* sont également détectés dans les chondrocytes hypertrophiés à 4 dpf. Avant ce stade, l'expression de *runx3* se retrouve dans l'endoderme pharyngien à partir de 34 hpf, précédant ainsi l'expression de *runx2b* dans les chondrocytes (Flores, Lam et al. 2006; Dalcq, Pasque et al. 2012). Le « knock-down » de *runx3* affecte fortement les cartilages crâniens : aucun élément du viscérocrâne n'est observable tandis que quelques vestiges du neurocrâne persistent. L'absence de Runx3 n'affecte en rien la présence de l'endoderme, sa segmentation et sa survie dans l'embryon. De plus, l'étude de fonction réalisée sur des morphants *runx3* montrait que ce facteur de transcription contrôle, par un mécanisme inconnu, l'expression de *runx2b* dans les chondrocytes du viscérocrâne tandis qu'elle n'est nullement affectée dans le neurocrâne.

4.2.2.2 Egr1

Le gène *egr1* appartient à la famille des gènes rapidement induits par les facteurs de croissance (early growth response) et très conservés au cours de l'évolution des espèces telles que l'homme, la souris, le rat et le zebrafish (Drummond, Rohwer-Nutter et al. 1994). L'expression des facteurs de transcription à doigt de zinc de cette famille se réalise suite à la perception de signaux tels que des facteurs de croissance, des hormones ou des neurotransmetteurs (Thiel and Cibelli 2002).

Egr1 régule différentes fonctions cellulaires telles que l'apoptose, la croissance cellulaire ainsi que l'arrêt de celle-ci, la réparation, la différenciation, la transformation cellulaire, la reproduction, la mémoire et l'apprentissage.

Chez la souris, *egr1* est exprimé dans les cartilages, les os, les glandes nasales, les vibrisses en développement, les dents, etc. (McMahon, Champion et al. 1990). Chez le zebrafish, son profil d'expression et sa fonction ont été déterminés par notre laboratoire. Les premiers transcrits *egr1* dans la région pharyngienne ont

été observés à partir de 27 hpf (Close, Toro et al. 2002; Dalcq 2008) et on retrouve son expression au niveau du viscérocrâne jusque 4 dpf. Récemment, une étude plus précise a montré son expression dans les poches endodermiques et dans l'ectoderme pharyngien. Egr1 joue un rôle primordial dans la chondrogenèse sans pour autant influencer la migration et les premières étapes de la différenciation des chondrocytes. Le « knockdown » d'*egr1* a également montré que ce gène n'était en rien impliqué dans la formation de l'endoderme où il est exprimé (Dalcq, Pasque et al. 2012).

4.2.2.3 **Sox9b**

sox9b est le gène parologue de *sox9a* mentionné plus haut, tous les deux homologues chez le zebrafish du gène *Sox9* (SRY (Sex determining Region Y)-Box 9) chez les mammifères. On retrouve l'expression de *sox9b* à 14 hpf dans la vésicule otique en développement, l'œil, la plaque pré-chordée et les cellules des crêtes neurales avant leur migration. Après leur migration, les CCNc expriment de manière décroissante *sox9b* et à un niveau inférieur à celui de *sox9a* à 26 hpf (Fig. 9). A 48 hpf, les ARNm de *sox9b* sont détectés dans la région pharyngienne et plus précisément dans l'ectoderme et l'endoderme pharyngien jusqu'à au moins 68 hpf. Des études de knockdown associées à l'étude du mutant *sox9b^{b971}* ont montré que, tout comme *sox9a*, *sox9b* est indispensable à la formation correcte des cartilages pharyngiens. Cependant, *sox9b* n'est pas impliqué dans la migration des CCNc de la région pharyngienne mais joue un rôle dans le contrôle de leur nombre. Toutefois, à l'inverse de *sox9a*, *sox9b* est impliqué dans le mécanisme de régulation de l'expression de *runx2b* à 48 hpf et *in fine* dans la production du collagène de la matrice cartilagineuse (Yan, Willoughby et al. 2005).

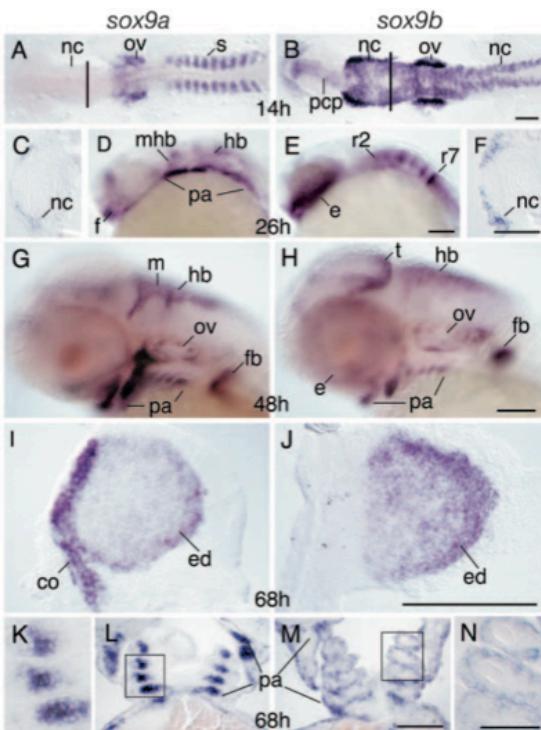


Figure 9: Profil d'expression embryonnaire de *sox9a* et *sox9b*. A,C,D,G,I,K,L, *sox9a*; B,E,F,H,J,M,N, *sox9b*. (A,B) 14 hpf, vue dorsale. (C,F) Coupe latérale d'un embryon à 14 hpf au niveau de la barre noire des images A et B. (D,E) Vue latérales d'un embryon à 26 hpf. (G,H) Vue latérale à 48 hpf. (I,J) Bourgeons de la nageoire pectorale à 68 hpf. (K-N) Vue ventrale de la région des arcs cérotbranchiaux d'embryons à 68 hpf. Co : scapulocoracoïde ; f : cerveau antérieur ; fb : bourgeons de la nageoire pectorale ; e : œil ; ed : disque endochondrale ; hb : cerveau postérieur ; m : cerveau moyen ; mhb : « midbrain-hindbrain boundary » ; nc : cellules des crêtes neurales ; ov : vésicule otique ; pa : arcs pharyngiens ; pcp : plaque préchordale ; r : rhombomères ; s : somites ; t : tectum. Echelle : 50 µm K,N ; 100 µm A-J et L,M.

4.2.3 Signalisation Hedgehog

La voie Hedgehog (Hh) a été identifiée dans un premier temps chez la drosophile, *Drosophila melanogaster*. Cette voie est impliquée dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur de la larve. Chez les vertébrés, trois homologues ont été identifiés : sonic hedgehog (Shh), indian hedgehog (Ihh) et desert hedgehog (Dhh). Cette voie de signalisation est impliquée dans divers mécanismes du développement embryonnaire tels que la formation du système nerveux, des dents, de la notochorde, des poumons, des membres, de l'établissement des axes, etc. Chez les vertébrés, la voie Hh est connue pour être également impliquée dans la formation des pièces osseuses et un défaut dans cette signalisation peut engendrer différentes maladies humaines présentant des défauts craniofaciaux, cyclopie, ... (Roessler, Belloni et al. 1996; Roessler, Ma et al. 2009).

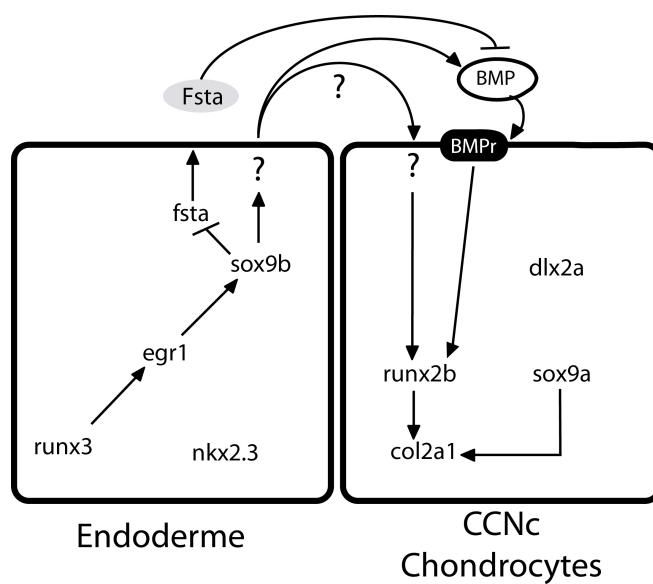
Les mutants pour la voie Hh étudiés dans le zebrafish ont montré des défauts de formation du chondrocrâne. Par exemple, le mutant *chameleon* (*disp1*) n'exprime pas des gènes cruciaux pour la différenciation des chondrocytes (*dlx2a*, *sox9a*) ayant pour effet une réduction et/ou absence des différentes pièces cartilagineuses du chondrocrâne (Schwend and Ahlgren 2009). De plus, un déficit dans la migration des CCNc dans le premier arc a été observé dans ces mêmes mutants sans pour autant influer sur la migration et la condensation (*barx1*) des cellules des crêtes neurales crâniennes.

4.2.4 La signalisation BMP

La signalisation BMP (Bone Morphogenic Protein) est impliquée dans divers processus allant de la migration des CCNc à la maturation des chondrocytes et ostéoblastes lors de la chondrogenèse et de l'ossification endochondrale (Nie, Luukko et al. 2006; Nishimura, Hata et al. 2012). Il a été mis en évidence que les ligands BMP2, BMP4, BMP6 et BMP7 sont impliqués dans la maturation des chondrocytes et qu'ils participent au contrôle de l'expression de gènes participant à la chondrogenèse tels que *runx2b*, *sox9*, *osterix* (Nishimura, Hata et al. 2012). Des études dans le modèle murin ont mis en évidence l'implication de BMP4 dans la prolifération cellulaire des chondrocytes et dans leur première étape de différenciation, mais également lors de l'ossification endochondrale où il participerait à l'hypertrophie des chondrocytes (Shum, Wang et al. 2003; Hatakeyama, Tuan et al. 2004; Zuniga, Rippen et al. 2011). De plus, chez le zebrafish, BMP4 participe à l'établissement de l'axe dorso-ventral dans la région pharyngienne et donc à la différenciation des CCNc en fonction de leur emplacement dans les poches endodermiques pharyngiennes (Medeiros and Crump 2012). Encore chez le zebrafish, la spécification des cellules du foie est sous le contrôle coordonné de la signalisation des BMP et des FGF (Shin, Shin et al. 2007). Il a été montré que les deux voies de signalisation sont toutes les deux indispensables et que l'une ne peut compenser l'autre en cas de défaillance. De plus, la surexpression de la voie des BMP après inhibition de celle des Fgf permet de récupérer un phénotype « sauvage » suggérant que la signalisation BMP est en aval de celle des Fgfs.

4.3 Interactions impliquées dans la chondrogenèse.

Nous avons déjà mentionné l'importance des tissus avoisinants sur le développement des cartilages. Ces tissus, notamment l'endoderme pharyngien, sécrètent des facteurs de signalisation tels que l'endothéline, les Fgfs, les Bmps qui interviennent dans l'établissement des différents axes de l'embryon, dans la formation de l'endoderme pharyngien, dans la différenciation des chondrocytes. Récemment, nous avons mis en évidence au sein de notre laboratoire une cascade génétique régulatrice de la chondrogenèse. Cette cascade prend place dans l'endoderme et fait intervenir les différents facteurs de transcription suivants : Runx3, Egr1, Sox9b. Nous avons montré que le facteur de transcription Runx3 contrôle l'expression de Egr1, contrôlant à son tour celle de Sox9b. Ensuite, cette cascade endodermique inhibe l'expression de la *follistatine a* (*fsta*) régulant ainsi son rôle d'inhibiteur de la voie des BMP. L'expression de *fsta* étant réduite, Fsta se lie dans une moindre mesure aux ligands BMP et permet la liaison de ceux-ci à leur récepteur (BMP_r). Cette voie de signalisation peut donc jouer son rôle dans l'activation de *runx2b* dans les chondrocytes. Donc nous avons mis en évidence une voie de signalisation importante où la fonction de l'endoderme est indispensable à la chondrogenèse impliquant la signalisation extracellulaire des BMP (Dalcq, Pasque et al. 2012).



5 La signalisation Fgf

Au départ, les fibroblast growth factors (Fgfs) ont été isolés comme des molécules mitogènes pour les fibroblastes du cerveau et de l'hypophyse (Gospodarowicz 1974; Ornitz and Itoh 2001). Toutefois, les Fgfs sont reconnus actuellement comme de petits facteurs de croissance de 150-250 acides aminés. Ils sont sécrétés dans l'espace extracellulaire et se lient à des récepteurs membranaires à domaine tyrosine kinase (Fgfrs). La signalisation Fgfs joue différents rôles, tant dans le développement embryonnaire où elle contrôle, entre autres, la morphogenèse, la prolifération et la différenciation cellulaires, que dans les tissus adultes où elle contrôle le système nerveux, la réparation des tissus blessés et l'angiogenèse (Eswarakumar, Lax et al. 2005).

Les organismes unicellulaires tels que *Escherichia coli* ou la levure *S. cerevisiae* ne possèdent pas dans leur génome les gènes codants pour les Fgfs et les Fgfrs, tandis qu'ils sont présents dans le génome des organismes pluricellulaires comme le nématode, *Caenorhabditis elegans*, la souris, *Mus musculus*, et l'homme, *Homo sapiens* (Itoh and Ornitz 2004). A présent, 23 gènes *Fgfs* ont été identifiés chez plusieurs mammifères (Homme, souris), alors que 27 gènes *fgfs* ont été détectés chez le zebrafish (Itoh 2007). Une grande similarité de structure interne se retrouve à travers les différents Fgfs, ainsi qu'une grande affinité de liaison à l'héparine. En ce qui concerne les récepteurs, seulement 5 gènes codants pour ceux-ci ont été identifiés chez les mammifères (Sleeman, Fraser et al. 2001; Itoh and Ornitz 2004).

5.1 Fonction des Fgfs et Fgfrs.

La signalisation Fgf est une voie de communication cellulaire à laquelle on attribue une multitude de fonctions dans un organisme tout au long de son existence. Le signal est transmis dans la cellule suite à un stimulus extérieur : le ligand qui se fixe sur son récepteur. L'activation de gènes impliqués dans la morphogenèse, par exemple, par des facteurs de transcription spécifiques est l'aboutissement de cette voie de signalisation.

Par l'utilisation de souris « knockout » pour les Fgfs et les Fgfrs, il a été démontré que la signalisation Fgf est impliquée dans l'induction du mésoderme, la

gastrulation, la différenciation cellulaire, l'établissement des axes dorsoventral et antéropostérieur, l'ostéogenèse ou encore la morphogenèse du cerveau et des membres (Eswarakumar, Lax et al. 2005; Itoh 2007) (Tableau 1). Plusieurs ligands Fgfs et plusieurs récepteurs Fgfrs peuvent être impliqués dans un même phénomène, engendrant aussi une redondance qui complique l'interprétation des résultats.

Récepteur	mutation	Survie	Phénotype	Référence
Fgfr1	Fgfr1 null	Mort à E8.5-9.5	Problèmes de gastrulation, défauts du mésoderme et des somites.	(Deng, Wynshaw-Boris et al. 1994; Yamaguchi, Harpal et al. 1994)
	Fgfr1IIIb <i>-/-</i>	Viable	Problèmes dans le développement de la queue.	(Partanen, Schwartz et al. 1998)
	Fgfr1 IIIc <i>-/-</i>	Mort à E9.5	Défaut établissement axe antéropostérieur, défaut de migration cellulaire, problèmes craniofaciaux.	(Partanen, Schwartz et al. 1998)
	Fgfr1 hypomorphe	Viable	Défauts dans la région pharyngienne et dans la migration des CCNc.	(Trokovic, Trokovic et al. 2003)
Fgfr2	Fgfr2 mutant null	Mort à E4.5	/	(Arman, Haffner-Krausz et al. 1998)
	Fgfr2 hypomorphe	Mort à E10.5	Défaut du placenta et dans la formation des membres.	(Xu, Weinstein et al. 1998)
	Fgfr2IIIb <i>-/-</i>	Meurt à P0	Défaut dans le développement des poumons, hypophyse, tyroïde, dents...	(De Moerlooze, Spencer-Dene et al. 2000)
	Fgfr2IIIc <i>-/-</i>	Viable	Retard dans l'ossification, synostose du crâne, nanisme.	(Eswarakumar, Monsonego-Ornan et al. 2002)
Fgfr3	Mutant null	Viable	Défaut de l'oreille interne et hypercroissance osseuse.	(Colvin, Bohne et al. 1996; Deng, Wynshaw-Boris et al. 1996)
Fgfr4	Fgfr4 <i>-/-</i>	Viable	Pas de phénotype sérieux, retard dans croissance pulmonaire dans double mutant avec FGFR3.	(Weinstein, Xu et al. 1998)

Tableau 1: Phénotypes murins lors de la perte de fonction des Fgfr. Adapté de (Eswarakumar, Lax et al. 2005)

5.1.1 FGFR et maladie humaine

L'Homme tel que nous le connaissons est le résultat d'une longue évolution due à des modifications de son génome. De manière générale, nous pouvons appeler ces modifications des mutations, qui dans certains cas engendrent des maladies telles que des dysplasies du système osseux et cartilagineux (Mundlos and Olsen 1997; Baldridge, Shchelochkov et al. 2010). Plus de 150 formes d'ostéochondroplasies ont

été décrites et certaines sont reliées à des mutations au niveau des FGF et de leurs récepteurs. L'exemple le plus flagrant que nous connaissons est une forme de nanisme. Dans les dysplasies du système osseux, ce sont l'épiphyse, la métaphyse et la diaphyse qui sont affectées, engendrant ainsi une malformation des os (Fig. 10).

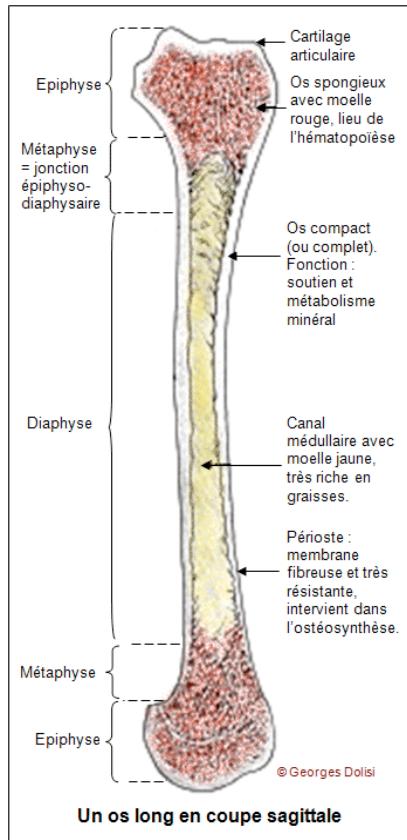


Figure 10 : Schéma d'une coupe sagittale d'un os long. Un os long est formé d'une zone d'os compact entouré du périoste formant la diaphyse. Aux extrémités de la diaphyse se trouvent les métaphyses et épiphyse. Cette dernière est le lieu de la prolifération des cartilages de croissance ainsi que de l'hématopoïèse.

Les syndromes de Pfeiffer, de Crouzon, de Jackson-Weiss, de Apert sont des exemples de maladies dont les patients atteints présentent des malformations crâniennes dues à des craniosynostoses, un raccourcissement des os, des problèmes dentaires. De plus, dans certains cas, le système nerveux des patients peut être affecté (perte de l'odorat, surdité) sans pour autant avoir de retard mental.

La majorité des mutations présentes dans les FGFR1 et FGFR2 vont engendrer une craniosynostose caractérisée par une fusion prématûrée des os du crâne tandis que l'achondroplasie, le nanisme ou la craniosynostose seront observés chez des patients présentant une mutation dans le FGFR3 (Mundlos and Olsen 1997; Baldridge, Shchelochkov et al. 2010).

Deux types de mutations ont été décrits dans les récepteurs FGFR. Les mutations présentes dans les domaines immunoglobulines des récepteurs affectent la liaison FGF-FGFR, soit en fixant le ligand de manière définitive, soit en perdant la spécificité de liaison, permettant dans les deux cas une activation constante de la voie des FGF. Des mutations au niveau des domaines tyrosine kinase ont également été identifiées. Ces mutations d'un seul acide aminé vont changer la conformation à proximité des tyrosines et ainsi favoriser ou non leur phosphorylation (Kan, Elanko et al. 2002; Lajeunie, Heuertz et al. 2006; Pitteloud, Meysing et al. 2006; Baldridge, Shchelochkov et al. 2010).

5.2 Structures des Fgfs et Fgfrs

La plupart des Fgfs sont des molécules constituées de 150-250 acides aminés comprenant un peptide signal de sécrétion en N-terminal. Cependant, certains Fgfs tels que Fgf1, 2, 11-14 ne possèdent pas ce peptide signal et ne sont sécrétés que si la cellule est endommagée ou par un mécanisme différent de l'exocytose (Ornitz and Itoh 2001). Tous les Fgfs possèdent une région comprenant 28 acides aminés hautement conservés dont 6 sont identiques. Ce sont dix acides aminés de cette région hautement conservée qui interagissent avec le Fgfr et participent à la dimérisation du récepteur. Une étude portée sur la structure des Fgf1 et Fgf2 a montré qu'ils étaient composés de 12 brins β anti-parallèles (Fig. 11) (Ornitz and Itoh 2001).

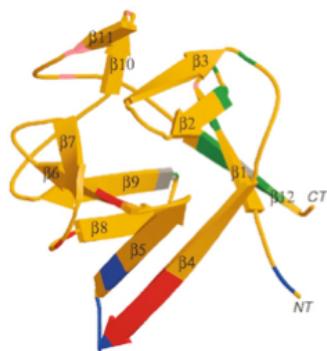


Figure 11 : Structure tridimensionnelle de Fgf2. Les 12 brins β sont annotés de 1 à 12. La région rose est celle qui lie l'héparine ; les régions vertes, bleues, rouges sont les régions de liaisons avec le récepteur. NT : région N-terminale ; CT : région C-terminale.

Fgfrs

Les récepteurs des Fgfs peuvent être subdivisés en deux classes : les Fgfr1-4 et le Fgfr5/Fgfr1. Dans les deux cas, le récepteur monomère est composé d'une partie extracellulaire formée de deux à trois domaines immunoglobulines et d'une séquence de liaison à l'héparine ou à un protéoglycan héparan sulfate (HSPG), d'un domaine acide (AD), ainsi que d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire portant l'activité tyrosine kinase (Fig. 12).

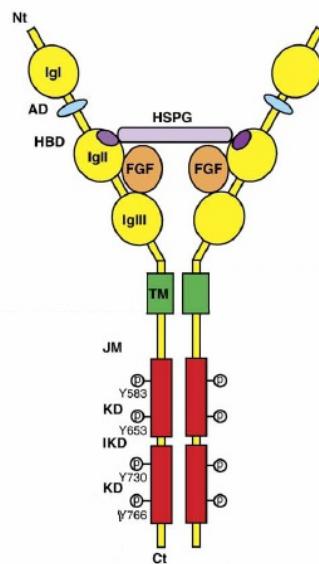


Figure 12 : Représentation schématique d'un récepteur des Fgfrs. La forme active du récepteur est un dimère. La partie extracellulaire est composée de deux à trois domaines immunoglobulines (IgI, IgII, IgIII), un domaine acide (AD), une séquence de liaison à l'héparine (HBD) permettant la liaison à un protéoglycan héparan sulfate (HSPG). Suivent alors un domaine transmembranaire (TM) et un domaine intracellulaire formé de deux domaines tyrosine kinase (KD) séparé par des domaines interkinases (IKD). (Thisse and Thisse 2005)

La différence entre les deux types de récepteurs se situe au niveau de la partie intracellulaire, où le domaine tyrosine kinase est absent dans le Fgfr5/Fgfr1 (Powers, McLeskey et al. 2000; Sleeman, Fraser et al. 2001; Thisse and Thisse 2005; Trueb, Neuhauss et al. 2005) mais qui présente deux motifs de liaison à des protéines phosphatases SHP-like. Ce motif permet une régulation de la signalisation FGF.

Un mécanisme d'épissage alternatif affecte la séquence du troisième domaine immunoglobuline (IgIII) (Fig. 13 ; D3) permettant l'obtention d'isoformes IIIb ou IIIc (Powers, McLeskey et al. 2000; Itoh and Ornitz 2004). Cet évènement modifie

fortement la spécificité de la liaison ligand-récepteur (Miki, Bottaro et al. 1992; Yayon, Zimmer et al. 1992). Il est à noter que l'épissage alternatif se produit pour les Fgfr1, 2, 3 et non pour le Fgfr4. Actuellement, aucune donnée n'est disponible pour le Fgfr1/Fgfr5 (Eswarakumar, Lax et al. 2005).

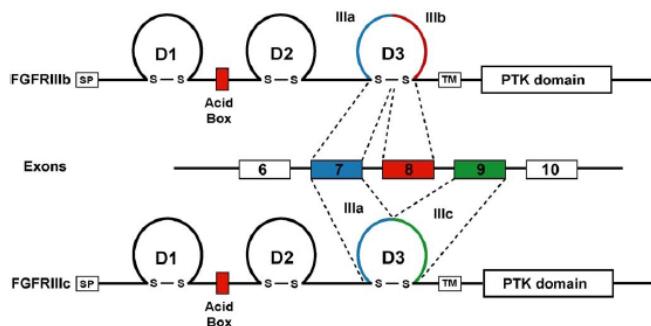


Figure 13: Les différentes isoformes des FGFRs sont générées par épissage alternatif des transcrits FGFRs. Les deux formes existantes sont générées par épissage alternatif des exons 8 et 9. La moitié du domaine C-terminal de DIII est encodée par l'exon 8 pour générer la forme FGFR-IIIB tandis que pour la forme FGFR-IIIC, c'est l'exon 9 qui encode la moitié du domaine C-terminal (Eswarakumar, Lax et al. 2005).

5.3 Voie de signalisation et transduction du signal

5.3.1 La liaison ligand-récepteur

La partie extracellulaire des récepteurs est composée de différents domaines riches en cystéine ou des domaines de types fibronectines ou encore de types immunoglobulines.

L'activation de la voie de signalisation ne peut se faire que sous certaines conditions. Les Fgfs ont une haute affinité pour l'héparine. L'expression spatiale et temporelle de protéoglycans héparan sulfate (HSPG), macromolécules présentes au niveau de la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire, régule l'interaction Fgf-Fgfr ainsi que le signal qui en découle. Ces HSPG comprennent un corps protéique auquel viennent s'attacher des chaînes de glycosaminoglycans (GAG) héparan sulfate (HS).

Les HSPG interagissent directement avec les Fgfs et leurs récepteurs en formant un complexe ternaire au niveau de la surface cellulaire (Fig. 14). Cette interaction peut soit faciliter la liaison entre ligand et récepteur, soit augmenter la stabilité du complexe Fgf-Fgfr (Thisse and Thisse 2005).

Les Fgfrs existent sous forme monomérique inactive. L'interaction Fgf-Fgfr-HSPG permet la dimérisation du récepteur et ainsi l'activation de la voie de signalisation (Powers, McLeskey et al. 2000).

5.3.2 Signalisation intracellulaire

La voie principale de transduction des Fgfr1-4 est la cascade Ras-Raf-MEK-ERK. Après dimérisation du récepteur, les tyrosines des domaines intracellulaires d'un monomère seront phosphorylées par l'autre monomère. Une fois les tyrosines phosphorylées, la protéine transmembranaire FRS2 α est recrutée au niveau du Fgfr actif et est activée par la phosphorylation de tyrosines qui recrutent alors le complexe Grb2-Sos-Ras. Ce dernier interagit avec Raf, qui est phosphorylé et va démarrer la cascade des MAP-kinases. Le dernier membre de cette cascade de phosphorylation, la MAP-kinase ERK, active alors des facteurs de transcription dans le cytoplasme ou après sa migration, dans le noyau (Sternberg and Alberola-Ila 1998) (Fig. 14). Cependant, une autre voie est possible par recrutement de la phospholipase C- γ (PLC- γ) impliquée dans la synthèse de l'inositol triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). Le DAG ainsi formé va, entre autres, activer la protéine kinase C- δ participant à l'activation de la protéine Ras impliquée dans la cascade de la signalisation FGF.

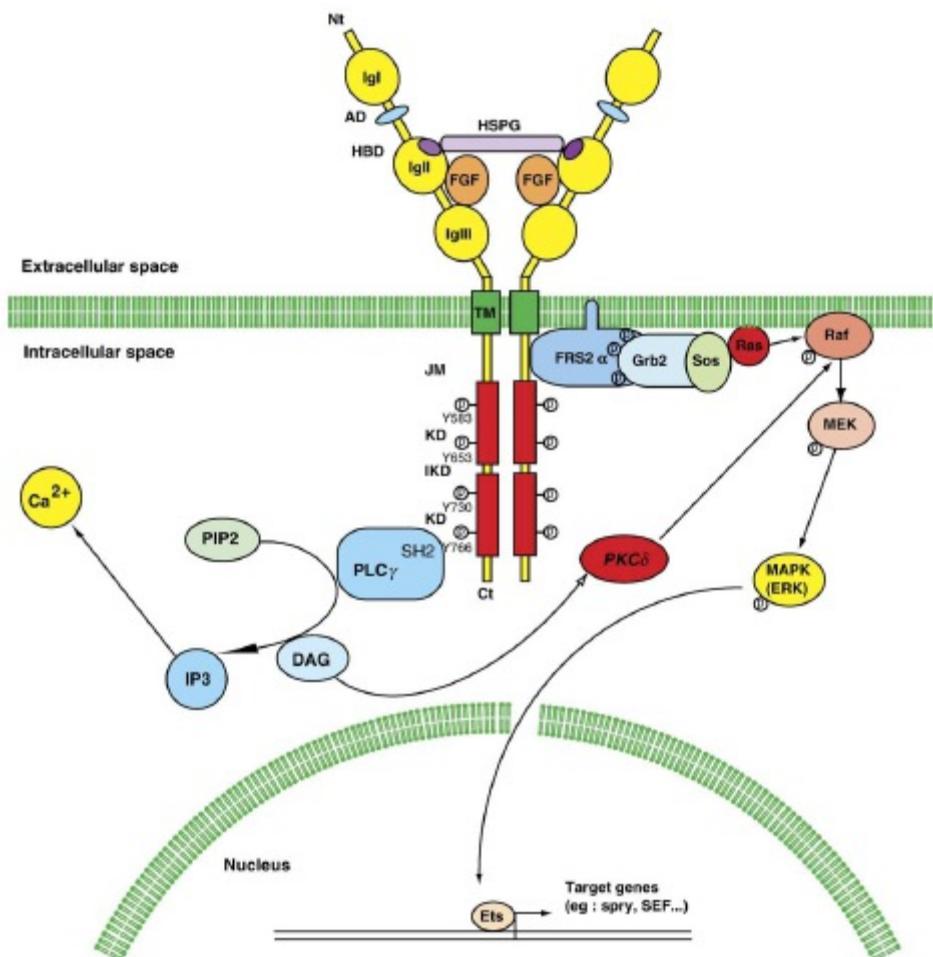


Figure 14: Récepteur FGF et transduction du signal FGF. Les ligands FGFs liés au protéoglycan héparan sulfate (HSPG) se lient au domaine IgII ou IgIII du récepteur. S'ensuivent une dimérisation et une phosphorylation des résidus spécifiques tyrosine dans le domaine intracellulaire. La transduction du signal se fait au travers de deux voies cytosoliques distinctes: la cascade Ras/MAP kinase ou la phospholipase C- γ (PLC- γ). Le domaine SH2 de la PLC- γ interagit avec Y766 phosphorylée du récepteur activé. Ensuite, PLC- γ hydrolyse le PIP2 (phosphatidyl-inositol4, 5-dephosphate en IP3 (inositol-1, 4, 5-triphosphate) et en DAG (diacylglycérol). IP3 provoque la libération de Ca2+ tandis que DAG active une autre protéine kinase : C- δ (PKC δ). L'étape suivante est l'activation de la protéine Raf par phosphorylation de son résidu S338 due à l'action de PKC δ . Le signal rejoint la voie principale ou cascade Ras/MAP. FRS2 α est activée par phosphorylations multiples sur des résidus Tyr et réagit en activant Grb2, protéine liée à Sos, un facteur d'échange nucléotidique impliqué dans l'activation de Ras. Ras active Raf laquelle stimulate MEK laquelle à son tour phosphoryle la MAP kinase ERK. Une fois activé, ce dernier composant de la cascade migre dans le noyau et phosphoryle des facteurs de transcriptions spécifiques (famille Ets), étape ultime pour l'activation spécifique des gènes FGF cibles (Thisse and Thisse 2005).

Les facteurs de transcription phosphorylés et activés par la voie MAP-kinases sont le facteur SRF (serum response factor) associé aux facteurs de type TCF (Ternary Complex factor), dont les plus étudiés sont ceux de la famille Ets. Ces derniers, avec les gènes de réponse précoce comme *c-Fos* et *Ets*, font aussi partie

des gènes dont l'expression est induite après induction de la voie Fgf (Raible and Brand 2001). Deux de ces facteurs ont été isolés : Erm et Pea3. Des expériences de knock-down ont montré une corrélation entre l'expression de ces facteurs et le niveau d'activation de la signalisation Fgf. Cela suggère un lien étroit entre la signalisation Fgf et ces facteurs de transcription participant à l'embryogenèse (Raible and Brand 2001).

Le mode de fonctionnement du *Fgfrl1* reste vague actuellement; une hypothèse suggère qu'il aurait une fonction deurre pour les ligands *Fgf3* (Hall, Flores et al. 2006) et *Fgf2* (Sleeman, Fraser et al. 2001; Trueb, Zhuang et al. 2003). De plus, l'analyse de la séquence du *Fgfrl1* murin montre la présence de deux domaines SHP-like dans la partie intracellulaire du récepteur et une région riche en histidine. Ces domaines SHP-like ont une activité protéine tyrosine phosphatase et joueraient le rôle de régulateur négatif de la cascade de signalisation des MAPK. Comme les autres récepteurs des Fgf, *Fgfrl1* doit former des dimères pour être actif mais la présence du ligand n'est pas indispensable (Rieckmann, Kotovic et al. 2008).

6 Evolution des Fgfs et Fgfrs

Depuis les métazoaires, la signalisation Fgf-Fgfr a été conservée dans les organismes pluricellulaires tout en subissant différentes phases d'expansion. Les gènes de la famille des *fgfs* ont subi deux phases dans leur expansion. Dans la lignée des métazoaires, la première phase a eu lieu lorsque les gènes des Fgfs se sont dupliqués à partir de deux ou trois gènes à six. Deux duplications génomiques successives à grande échelle, lors de l'émergence des vertébrés, constituent la deuxième phase (Fig. 15).

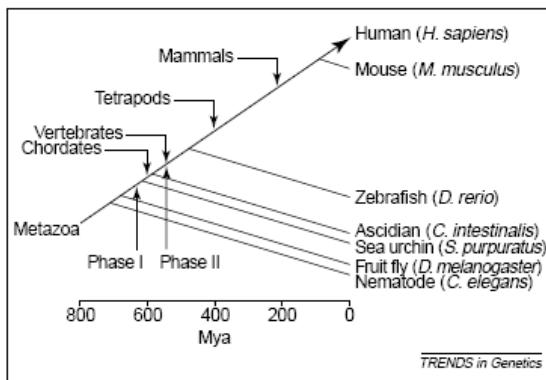


Figure 15 : Evolution des métazoaires. Le génome complet des organismes indiqués a été ou est en passe d'être complètement séquencé. Un grand nombre de familles de gènes se sont diversifiées dans deux phases majeures de l'évolution. La première phase a eu lieu dans la lignée des métazoaires, avant la divergence entre protostomiens et deutérostomiens. La seconde phase s'est produite dans la lignée des chordés, pendant le début de l'émergence des vertébrés. Mya : millions d'année. (Itoh, Ornitz 2004)

Comme résultat de ces différentes expansions, des sous-familles ont été établies dans les Fgfs. Par exemple, chez l'homme comme chez le zebrafish, il existe sept sous-familles de Fgfs mises en évidence par des études phylogénétiques (Fig. 16). Une duplication du génome supplémentaire dans la lignée des téléostéens, suivie de l'élimination selective de certains gènes dupliqués, a finalement porté le nombre de Fgfs de 22 chez l'homme à 27 chez le zebrafish.

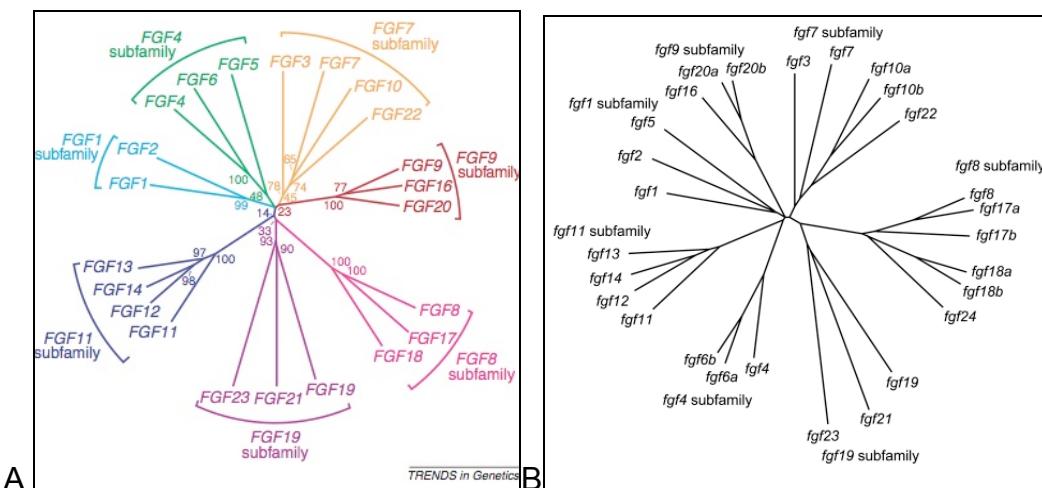


Figure 16 : Les relations évolutives de la famille des FGFs chez l'humain (A) et le zebrafish (B). 22 gènes codants ont été identifiés dans le génome humain et 27 chez le zebrafish. Des analyses phylogénétiques suggèrent que ces gènes peuvent être classés dans 7 sous-familles, chacune contenant de deux à quatre membres. On constate que le gène *fgf5* du zebrafish se retrouve dans la sous-famille *fgf1* tandis que *FGF5* est placé dans la sous-famille de *FGF4* chez l'homme. La longueur des branches est proportionnelle à la distance évolutive entre chaque gène. La valeur à chaque nœud indique le pourcentage qu'un nœud est supporté sur 1000 « pseudorépliques » (méthode du bootstrap) (Itoh and Ornitz 2004; Itoh and Konishi 2007).

Les quatre récepteurs des Fgfs auraient été générés lors de la deuxième phase d'expansion. Cette évolution simultanée a permis d'augmenter la spécificité et la diversité des interactions ligand-récepteur chez les eucaryotes supérieurs (Itoh and Ornitz 2004; Itoh 2007).

6.1 Conservation entre espèces

Malgré une haute conservation de la voie de signalisation au fil du temps et chez les espèces, le nombre de gènes *fgf* varie entre espèces suite à des pertes ou duplications de gènes individuels, voire des duplications de génome entier (téléostéens), tout comme le nombre de *fgfr* (ex : Fgfr1a et Fgfr1b chez le zebrafish).

La comparaison des séquences des *Fgfs* entre l'humain et le zebrafish nous apprend que la majorité des *FGF* se retrouve chez le zebrafish à l'exception de *FGF9*. On constate également des taux de similitude entre les séquences d'acides aminés supérieurs à 60%. De plus, six paralogues *fgf* ont été identifiés chez le zebrafish (Tableau 2).

Zebrafish			Zebrafish		
Humain	Orthologue	Parologue	Humain	Orthologue	Parologue
<i>FGF1</i>	<i>fgf1</i> (52,4%)		<i>FGF8</i>	<i>fgf8a</i> (66,2%)	<i>fgf8b/fgf17a</i> (61,3%)
<i>FGF2</i>	<i>fgf2</i> (75,5%)		<i>FGF17</i>	<i>fgf17b</i> (65,9%)	
<i>FGF5</i>	<i>fgf5</i> (58,6%)		<i>FGF18</i>	<i>fgf18a</i> (68,8%)	<i>fgf18b</i> (63,6%)
					<i>fgf24</i> (61,3%)
<i>FGF3</i>	<i>fgf3</i> (62,7%)		<i>FGF9</i>	/	
<i>FGF4</i>	<i>fgf4</i> (62,3%)		<i>FGF16</i>	<i>fgf16</i> (80,8%)	
<i>FGF6</i>	<i>fgf6b</i> (64,1%)	<i>fgf6a</i> (64,7%)	<i>FGF20</i>	<i>fgf20b</i> (76,9%)	<i>fgf20a</i> (72,5%)
<i>FGF19</i>	<i>fgf19</i> (41,6%)				
<i>FGF21</i>	<i>fgf21</i> (31,7%)		<i>FGF11</i>	<i>fgf11</i> (67,1%)	
<i>FGF23</i>	<i>fgf23</i> (32,2%)		<i>FGF12</i>	<i>fgf12</i> (66,5%)	
			<i>FGF13</i>	<i>fgf13</i> (91,4%)	
<i>FGF7</i>	<i>fgf7</i> (48,8%)		<i>FGF14</i>	<i>fgf14</i> (89,8%)	
<i>FGF10</i>	<i>fgf10a</i> (57,7%)	<i>fgf10b</i> (52,9%)			
<i>FGF22</i>	<i>fgf22</i> (50,6%)				

Tableau 2 : Tableau comparatif des séquences des *fgfs* entre l'humain et le zebrafish. 22 *FGF* sont identifiés chez l'humain tandis que 27 gènes *fgf* ont été identifiés chez le zebrafish. Seul le *FGF9* n'a pas d'orthologue zebrafish. Chez le zebrafish, six paralogues de certains gènes *fgf* existent. Les nombres entre parenthèses représentent le pourcentage d'identité des acides aminés. Classement réalisé par rapport aux sous-familles des *fgf* dans le zebrafish. Modifié d'après (Itoh and Konishi 2007).

La conservation de la signalisation Fgf entre les espèces est encore plus flagrante lorsqu'on analyse l'alignement des séquences des Fgfrs. Nous constatons qu'un pourcentage de similarité plus élevé se retrouve lors de l'alignement des séquences complètes des récepteurs "orthologues" (Tableau 3): FGFR1/Fgfr1a : 72% ; FGFR1/Fgfr1b : 80% ; FGFR2/Fgfr2 : 84% ... De plus, un taux de similarité élevé est observé également entre deux récepteurs « différents » comme par exemple entre FGFR1/zFgfr2 : 71%.

Zebra humain	Fgfr1a	Fgfr1b	Fgfr2	Fgfr3	Fgfr4
FGFR1	72%	80%	71%	66%	63%
FGFR2	68%	73%	84%	70%	65%
FGFR3	62%	71%	72%	77%	66%
FGFR4	58%	63%	65%	64%	67%

Tableau 3 : Tableau comparatif des pourcentages de similarité des séquences complètes d'acides aminés des Fgfr.

De plus, les domaines catalytiques des récepteurs (domaine tyrosine kinase) sont encore plus fortement conservés (75%-94% de similarité entre l'humain et le zebrafish) (Tableau 4).

Zebra humain	Fgfr1a	Fgfr1b	Fgfr2	Fgfr3	Fgfr4
FGFR1	90%	92%	85%	83%	81%
FGFR2	84%	86%	94%	87%	84%
FGFR3	81%	82%	85%	90%	84%
FGFR4	75%	77%	78%	76%	78%

Tableau 4 : Tableau comparatif des pourcentages de similitude entre séquences d'acides aminés des domaines tyrosine kinase des Fgfr.

Ces taux de similitude élevés nous confirment que la voie de signalisation est hautement conservée entre des espèces éloignées et suggèrent une conservation de la fonction de cette voie.

6.2 Spécificité des ligands

Le nombre de Fgfs étant supérieur à celui du nombre de récepteurs, un même récepteur peut lier plusieurs Fgfs. Toutefois, c'est par le processus d'épissage alternatif du 3^{ème} domaine Ig du récepteur que l'on obtient différentes isoformes permettant une sélectivité de liaison ligand-récepteur. En effet, deux isoformes d'un même récepteur ne lient pas forcément les mêmes ligands. Par exemple, l'isoforme Fgfr2 IIIb de souris peut lier Fgf3 contrairement à l'isoforme Fgfr2 IIIc. Donc on parlera de groupes de ligands associés à un récepteur (Eswarakumar, Lax et al. 2005) (Tableau 5).

Isoformes des Fgfrs	Spécificité du ligand
Fgfr1 IIIb	Fgf 1, 2, 3, 10
Fgfr1 IIIc	Fgf 1, 2, 4, 5, 6
Fgfr2 IIIb	Fgf 1, 3, 7, 10, 22
Fgfr2 IIIc	Fgf 1, 2, 4, 6, 9, 17, 18
Fgfr3 IIIb	Fgf 1, 9
Fgfr3 IIIc	Fgf 1, 2, 4, 8, 9, 17, 18, 23
Fgfr4	Fgf 1, 2, 4, 6, 8, 9, 16, 17, 18, 19

Tableau 5: Tableau récapitulatif des interactions entre les différentes isoformes des récepteurs des Fgfs et les Fgfs chez les mammifères. (Eswarakumar, Lax et al. 2005).

7 La voie FGF chez le zebrafish

7.1 Expression des Fgfr chez le zebrafish

Le développement embryonnaire est le résultat d'une succession d'étapes permettant l'établissement des différents tissus et leur agencement afin de former un organisme complet. Lors de ce processus, l'expression des récepteurs suit cette dynamique. Chaque récepteur est exprimé de manière spécifique dans le temps et l'espace lors du développement embryonnaire du zebrafish (Tonou-Fujimori, Takahashi et al. 2002; Scholpp, Groth et al. 2004; Ota, Tonou-Fujimori et al. 2010).

7.1.1 *fgfr1a*

Au cours du développement embryonnaire du zebrafish, le récepteur Fgfr1a est exprimé à partir du stade une cellule à partir d'ARN maternels. Lors de la phase de l'épibolie, les transcrits *fgfr1a* sont localisés dans la région dorsale. Ils vont ensuite se confiner au niveau de la plaque neurale et du mésoderme postérieur et paraxial de l'embryon. A 9 hpf, l'expression de *fgfr1a* est donc détectable au niveau du cerveau antérieur et des somites. A 18 hpf, l'expression du récepteur 1a est observée dans la partie antérieure du tube neural, dans le télencéphale, le cerveau moyen, une partie du cerveau postérieur et au niveau de la midbrain-hindbrain boundary (MHB) (Fig. 17 a,b).

7.1.2 *fgfr1b*

Tout comme Fgfr1a, l'expression de Fgfr1b est observée dès le stade une cellule à partir d'ARN maternels et ce de manière ubiquiste jusqu'à mi-gastrulation. Ensuite son expression diminue dans la partie dorsale de l'embryon. A partir du stade 5 somites, l'expression de *fgfr1b* est détectée à la limite du diencéphale, du cerveau moyen, du cerebellum, dans la partie ventrale du cerveau postérieur et des somites. De plus, la rétine exprime également le Fgfr1b. Cependant, aucune expression n'est observée dans le télencéphale et une faible expression de *fgfr1b* est détectée dans les cellules des crêtes neurales et de la vésicule otique à 18 hpf. A 24 hpf, *fgfr1b* est exprimé faiblement au niveau de la région pharyngienne et fortement dans les somites postérieurs (Rohner, Bercsenyi et al. 2009).

7.1.3 *fgfr2*

C'est à 70% d'épibolie (8 hpf) que l'expression de *fgfr2* est observée pour la première fois dans la partie dorsale de l'embryon. Son expression persiste ensuite dans l'ectoderme antérieur et dans le mésoderme paraxial à partir de 9 hpf. A 10 hpf, l'expression du récepteur est observée dans le cerveau antérieur et moyen et au niveau des somites tout comme *fgfr1a*. A partir de 18 hpf, les ARNm *fgfr2* sont observés dans le télencéphale ventral, le diencéphale antérieur, le cerveau moyen antérieur et dans trois rhombomères du cerveau postérieur (Fig. 17 c,d).

7.1.4 *fgfr3*

L'expression du récepteur 3 est plus tardive que celle des *fgfr1a* et *fgfr2*. *fgfr3* commence à être exprimé au niveau du mésoderme seulement à partir de 9 hpf. Vers 10 hpf, la notochorde de l'embryon va exprimer fortement ce récepteur qui sera aussi observé dans le cerveau moyen et les somites. Les transcrits *fgfr3* sont ensuite détectés à 18 hpf dans le thalamus, le diencéphale, le cerveau postérieur et une forte expression est observée dans la partie postérieure du rhombomère 1 (Fig. 17 e,f).

7.1.5 *fgfr4*

C'est vers 4 hpf que l'expression du récepteur 4 est détectée dans l'embryon. Cette expression persiste lors du développement de l'embryon pour être uniquement observée dans le cerveau moyen et une partie du cerveau postérieur. Ensuite, vers 18 hpf, on retrouve l'expression du récepteur dans le télencéphale ventral, le thalamus, le diencéphale et dans la partie antéro-dorsale du cerveau postérieur (Fig. 17 g,h).

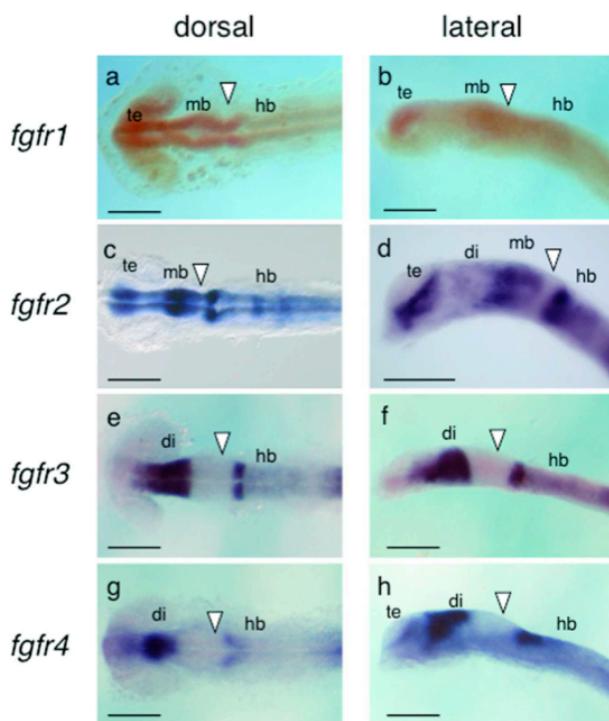


Figure 17 : Profil d'expression des *fgfr1a-4* chez le zebrafish à 18 hpf. A 18 hpf, l'expression des récepteurs 1 et 2 est principalement observée au niveau du télencéphale, du cerveau moyen et postérieur et de la MHB. Les transcrits *fgfr3* et *fgfr4* sont présents au niveau du diencéphale et du cerveau postérieur. La colonne de gauche : vue dorsale et antérieure à gauche. Colonne de droite : vue latérale et antérieure à gauche. te : télencéphale ; mb : cerveau moyen ; di : diencéphale ; hb : cerveau postérieur ; flèche blanche : MHB. Echelle : 100 µm. Adaptée de (Ota, Tonou-Fujimori et al. 2010).

7.1.6 *fgfrl1*

L'expression de *fgfrl1* est détectée une première fois au stade 10 somites (14 hpf) tandis qu'aucun transcrit maternel n'est observé. Dans un premier temps, l'expression est limitée au niveau du cerveau, de la notochorde et des somites. A 24 hpf, les transcrits *fgfrl1* sont toujours détectés dans ces structures mais ils sont aussi observables au niveau des poches endodermiques, des vésicules otiques et dans certaines CCNc de la mandibule et de l'hyoïde jusqu'au delà de 56 hpf. Cependant, à ce stade, l'expression de *fgfrl1* diminue progressivement dans les structures de la région pharyngienne (Hall, Flores et al. 2006).

7.2 Fonctions de la signalisation Fgf

Plusieurs rôles précis de la voie Fgf sur le développement embryonnaire du zebrafish ont été mis en évidence par l'étude des gènes supposés impliqués dans cette voie. Des résultats similaires ont été obtenus grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques tels que le SU5402 (3-[3-(2-Carboxyethyl)-4-méthylpyrrol-2-methylidenyl]-2-indoline) qui se lient aux récepteurs des Fgfs et empêchent la transduction du signal via l'activité tyrosine kinase des Fgfrs (Mohammadi, McMahon et al. 1997; Raible and Brand 2001). Cela a permis l'étude de la voie de signalisation grâce aux différents effets observés lors de l'embryogenèse (Sawada, Shinya et al. 2001; Shinya, Koshida et al. 2001), une méthode complémentaire à celles utilisant des mutants ou des morpholinos.

Les Fgfs, et plus spécifiquement Fgf3 et Fgf8, sont essentiels dans différentes étapes du développement du système nerveux et des arcs pharyngiens. Les Fgf3 et Fgf8 sont exprimés lors du développement du cerveau postérieur dans un premier temps dans le rhombomère 4 (r4). Cette expression est indispensable à la mise en place des rhombomères avoisinants et surtout les rhombomères 5 et 6 (Maves, Jackman et al. 2002). Ces deux ligands Fgfs régulent aussi la segmentation de l'endoderme pharyngien en poches. Le « knock-down » chez le zebrafish de *fgf3* et *fgf8* entraîne une désorganisation des cellules endodermiques pharyngiennes en migration ainsi que l'échec de la formation des poches (Crump, Maves et al. 2004). De plus, une réduction importante du viscérocrâne et du neurocrâne est constatée dans les étapes ultérieures du développement (Walshe and Mason 2003; Crump, Maves et al. 2004). Il a été également mis en évidence que l'expression de *barx1* est

sous le contrôle de la voie de Fgfs (Sperber and Dawid 2008) suite à des expériences utilisant des inhibiteurs de la signalisation Fgf et des études dans des mutants *fgf3* et *fgf8* sans pour autant déterminer quel récepteur était impliqué.

Bien qu'il ne possède pas de domaine tyrosine kinase, le Fgfrl1 joue aussi un rôle important dans la formation des cartilages pharyngiens. Les expériences de knockdown de *fgfrl1* ont montré que ce récepteur est nécessaire pour le processus de différenciation des chondrocytes exprimant *sox9a* et *runx2b*, par contre il ne joue aucun rôle dans la migration, la spécification des CCNc ainsi que leur survie au niveau des poches endodermiques (Hall, Flores et al. 2006). Ces dernières n'étant nullement affectées par la diminution de l'expression de *fgfrl1*. Malheureusement, aucune donnée actuelle ne permet de comprendre exactement son mode de fonctionnement ainsi que les différents ligands que ce récepteur pourrait lier. Une hypothèse est qu'il agirait comme un régulateur négatif de la signalisation FGF en liant des ligands libres comme Fgf3.

8 BUT DU TRAVAIL

Bon nombre d'études ont déjà mis en évidence l'implication de la signalisation Fgf dans le processus de la chondrogenèse par l'étude des ligands comme par exemple Fgf3, Fgf8 (Ornitz and Itoh 2001; Walshe and Mason 2003; Crump, Maves et al. 2004; Thisse and Thisse 2005) sans pour autant déterminer quel récepteur était impliqué dans ce mécanisme. Pourtant à l'heure actuelle, différentes maladies caractérisées par des défauts crâniofaciaux, par des problèmes survenus lors de l'ossification endochondrale sont reliées à des mutations dans les récepteurs des Fgfs.

Au sein du laboratoire, nous avons mis en évidence qu'une cascade endodermique (Runx3-Egr1-Sox9b-Fsta) participait à la différenciation des CCNC/chondrocytes via la régulation de la signalisation des BMP (Dalcq, Pasque et al. 2012). La réduction de l'activité de cette cascade engendre l'absence et la modification des différents éléments cartilagineux de la région pharyngienne. De plus, les gènes *runx3*, *egr1*, *sox9* ont été identifiés comme des cibles de la signalisation Fgf sans laquelle leur expression est réduite (Hughes-Fulford and Li 2011; Yardley and Garcia-Castro 2012).

Dans cette optique, nous pensons qu'il est intéressant de mieux comprendre comment les récepteurs des Fgf sont impliqués dans le mécanisme de formation des cartilages. Un avantage de l'étude des récepteurs est que leur lieu d'expression correspond à leur lieu d'action ; c'est pourquoi nous nous intéresserons à leur profil d'expression au niveau de la région pharyngienne afin de déterminer avec précision dans quels tissus et types cellulaires ils sont exprimés.

Ensuite, nous étudierons leur rôle dans la chondrogenèse au cours du développement embryonnaire du zebrafish par des méthodes d'injection de morpholinos dirigés contre les récepteurs, d'activation de récepteurs dominants négatifs, des hybridations *in situ* afin d'élucider l'implication des récepteurs dans la régulation de la cascade génétique mise en évidence au sein du laboratoire.

RESULTATS

9 Rôle de Fgfr1a et Fgfr2 dans la chondrogenèse crânienne du zebrafish

Dans un premier temps, nous avons cherché à comprendre quel était le rôle des récepteurs Fgfr1a et Fgfr2 lors de la chondrogenèse du crâne du zebrafish. Nous avons déterminé avec précision dans quel tissu pharyngien chacun des récepteurs est exprimé au cours du développement. De plus, nous avons étudié les gènes qui sont dépendants de leur présence et donc quel processus de la chondrogenèse est régulé par chacun des récepteurs Fgf.

Ces résultats ont été retranscrits et publiés dans l'article ci-après.

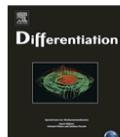
ARTICLE IN PRESS

Differentiation ■ (■■■) ■■■-■■■



Contents lists available at ScienceDirect

Differentiation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diff

Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development

Arnaud Larbuissou, Julia Dalcq, Joseph A. Martial, Marc Muller*

Laboratory for Molecular Biology and Genetic Engineering, GIGA-R, Université de Liège, B34, Liège, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 January 2013
Received in revised form
1 July 2013
Accepted 22 July 2013

Keywords:
Zebrafish
Fgfr
Signaling
Cartilage
BMP

ABSTRACT

Cranial cartilage derives mainly from cranial neural crest cells and its formation requires fibroblast growth factor (Fgf) signaling for early differentiation and survival of developing chondrocytes as well as patterning of the endodermal pouches.

Here, we investigate the role of Fgf receptors in chondrocyte maturation at later stages, beyond 24 hpf. Using inducible expression of a dominant-negative Fgf receptor, we show that Fgf signaling is required around 30 hpf for correct cartilage formation. The receptor genes *fgfr1a* and *fgr2* are expressed in pharyngeal endodermal pouches after 24 hpf or 26 hpf, respectively. Depletion of any of these two receptors by microinjection of antisense morpholinos results in severe defects in cartilage formation at 4 dpf and a decrease in expression of the late chondrocyte markers *barx1* and *runx2b*. Although endodermal pouches are correctly formed and patterned, receptor knock down leads to decreased expression of *runx3*, *egr1* and *sox9b* in this tissue, while expression of *fsta*, coding for a secreted BMP/Tgf β inhibitor, is clearly increased. Rescue experiments revealed that each Fgfr1a or Fgfr2 receptor is able to compensate for the loss of the other.

Thus, we show that minimal amounts of Fgfr1a or Fgfr2 are required to initiate a regulatory cascade in pharyngeal endoderm reducing expression of *fsta*, thereby allowing correct BMP signaling to the maturing chondrocytes of the head cartilage.

© 2013 International Society of Differentiation. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Craniofacial bone structures result from both membranous and endochondral or perichondral ossification, the latter requiring preliminary formation of a cartilaginous matrix. Pharyngeal cartilages derive from migration and differentiation of cranial neural crest cells (cNCC) within the pharyngeal arches. These cNCCs are formed at the neurulation stage and migrate in three streams into the seven pharyngeal pouches to form the different cartilage elements of the viscerocranum (mandible, hyoid, five ceratobrachial arches) (Schilling and Kimmel, 1994; Knight and Schilling, 2006). During and after this migration, the cNCCs undergo several differentiation steps to finally give rise to hypertrophic chondrocytes and osteogenic cells. After initial expression of *tfap2a* characteristic to all cNCC cells (Barallo-Gimeno et al., 2004), ectomesenchymal cartilage precursors are identified by early expression of *db2a* (Sperber et al., 2008) while chondrogenic differentiation is characterized by the onset of *sox9a* expression required for production of the cartilage-specific collagen Col2a1 (Kluver et al., 2005; Yan et al.,

2005). Finally, maturing hypertrophic chondrocytes express *runx2b* (Flores et al., 2008; Flores et al., 2004), a marker that is also present in bone-forming osteoblasts.

In the arches, the cNCCs are surrounded by and interact with different tissues such as pharyngeal endoderm and ectodermal epithelium. In *casanova* (*cas*) mutant zebrafish, endoderm is lacking (Alexander et al., 1999) and pharyngeal cartilages are not formed (David et al., 2002). Loss of function of several genes expressed in pharyngeal endoderm, such as *egr1*, *runx3* or *sox9b* leads to severe reduction of head cartilage at 4 dpf (Dalcq et al., 2012; Kluver et al., 2005; Yan et al., 2005; Flores et al., 2006). Thus, interaction between endoderm and cNCCs is primordial for the correct formation of pharyngeal cartilage (Crump et al., 2004; Piotrowski and Nusslein-Volhard, 2000; Schilling et al., 1996) involving signaling pathways initiated by Bmp, Fgf or Hh ligands (Goldring et al., 2006; Walshe and Mason, 2003). Recently, BMP signaling was shown to be required for early ventral arch development, upstream and simultaneously to endothelin1 (Edn1) (Alexander et al., 2011). An additional role for craniofacial patterning at later stages was also shown. We recently showed the existence of a regulatory cascade formed by the three transcription factors Runx3-Egr1-Sox9b, each being required for expression of the next, in pharyngeal endoderm at 30 hpf (Dalcq et al., 2012).

* Corresponding author. Tel.: +32 4 366 4437; fax: +32 4 366 4198.

E-mail address: m.muller@ulg.ac.be (M. Muller).

0301-4681/\$ - see front matter © 2013 International Society of Differentiation. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.
Join the International Society for Differentiation (www.isdifferenciation.org)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.006>

Please cite this article as: Larbuissou, A., et al., Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development. *Differentiation* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.006>

ARTICLE IN PRESS

This cascade controls late chondrogenesis by down-regulating expression of Follistatin A (*fsta*), a known antagonist of BMP signaling, thereby allowing correct activation of the BMP pathway required to activate *runx2b* expression in developing chondrocytes.

Fibroblast growth factor (Fgf) signaling is involved in proliferation, migration and specification of many cell types (Ornitz and Itoh, 2001; Walshe and Mason, 2003; Thisse and Thisse, 2005). It is highly conserved across different species (Itoh, 2007; Itoh and Ornitz, 2008) and is initiated by numerous Fgf ligands binding specific tyrosine kinase (RTK) receptors (Fgfrs). In mice, Fgf9 controls early hypertrophic chondrocyte differentiation (Hung et al., 2007) while in zebrafish, Fgf3 and Fgf8 are produced in pharyngeal endoderm and ectoderm and control segmentation of the pharyngeal endoderm and survival of cNCCs (Crump et al., 2004; David et al., 2002; Walshe and Mason, 2003). Five genes for Fgfrs have been identified: Fgfr1–4 (RTK) and Fgfr5/Fgfr11. In Fgfr11, the tyrosine kinase domain is replaced by a phosphatase domain: it thus acts as a negative regulator of Fgf signaling (Hall et al., 2006) and is also important for craniofacial cartilage formation (Hall et al., 2006; Trueb and Taeschler, 2006). In humans, mutations in Fgfrs, causing either increased or decreased Fgf signaling, generate craniofacial malformations resulting from deficient chondrogenesis (e.g. Apert syndrome, Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome, Kallmann syndrome 2, Jackson–Weiss syndrome) (Nie et al., 2006; Baldridge et al., 2010). In mice, *fgrf1* controls endoderm patterning in the pharyngeal region and plays a crucial role in cNCC migration into the branchial arches (Trokovic et al., 2003). Different studies in zebrafish have shown that inhibition of Fgf signaling by SU5402 generates embryos lacking pharyngeal cartilage at 4 days post fertilization (dpf) and down-regulates expression of genes known to be crucial for chondrogenesis (Walshe and Mason, 2003; Sperber et al., 2008).

In zebrafish, the role of Fgf signalling in head cartilage formation was mainly studied by blocking the pathway at very early stages and thus possibly affecting multiple functions of this versatile signaling during early development. Here, we used heat-shock controlled expression of a dominant-negative Fgf receptor in *Tg(hsp70l:dnfgfr1-EGFP)pd1* transgenic embryos to show a critical stage for Fgfr activities in chondrogenesis around 30 hpf. We also show that *fgrf1a* and *fgrf2* are both expressed in pharyngeal endoderm at this stage and we demonstrate that *fgrf1a* or *fgrf2* depletion specifically causes severe cartilage defects at 4 dpf, which can be rescued by concomitant expression of exogenous zebrafish or human Fgf receptors. We further show that these two receptors are required for activation of the Runx3–Egr1–Sox9b–Fsta cascade in the endoderm and for *runx2b* expression in developing chondrocytes. Finally, the defects in cartilage structure and gene expression observed in morphants for each of the receptors Fgfr1a or Fgfr2 can be rescued by ectopic expression of each of the two receptors, indicating that the exact identity of the receptor active in pharyngeal endoderm is not important, but rather the precise number of receptor molecules.

2. Materials and methods

2.1. Zebrafish maintenance and transgenic line

Adult zebrafish (*Danio rerio*) and embryos were raised as described (Westerfield, 2007). Embryos were kept in E3 medium at 28 °C and developed until the stages of interest according to Kimmel et al. (1995). The transgenic lines *Tg(hsp70l:dnfgfr1-EGFP)pd1* (Lee et al., 2005) and *Tg(sox17-GFP)s870* (Sakaguchi et al., 2006) were obtained from the ZIRC (Eugene, Oregon, USA).

2.2. Ethics statement

All experiments and the entire study were evaluated by the Ethical Committee of the University of Liege, Belgium and accepted under the file numbers 377, 568 and 1074.

2.3. Knockdown of *fgrf1a* and *fgrf2*

One to two cell-stage embryos were injected with 4 ng of antisense morpholino oligonucleotides (MO, Gene Tools Inc.) complementary to the translational start site of *fgrf1a* (tMOFgfr1: 5'-GCAGCAGCGTGGCTTCATTATCAT-3' (Scholpp et al., 2004) or its 5' UTR: MOFgfr1a: 5'-CAAAGATCCCTACATCTGAACCTCC-3' (Thummel et al., 2006). Splicing morpholinos targeting, respectively the second or first intron's donor splice site in the coding region of *fgrf1a* (5 ng; sMOFgfr1a: 5'-ATTCAGTTGCAATTCTCACCTGTAAAC-3' (Nakayama et al., 2008)) or *fgrf2* (4 ng; MOFgfr2: 5'-GCCTAAATGTCTTACCTCAGGTGC-3' were also used. Co-injection of tMOFgfr1a and MOFgfr2 was performed with 2 ng of each morpholino. Morpholinos were diluted in Danieau buffer and Tetramethylrhodamine dextran (Invitrogen, Belgium) was added at 0.5% to verify proper injection of the embryos by fluorescence stereomicroscopy. Standard control morpholino (MOcon) was injected at the same concentrations. The efficacy of the sMOFgfr1a splicing morpholino was tested previously by RT-PCR (Nakayama et al., 2008), while that of sMOFgfr2 was confirmed using the oligonucleotides Fgfr2-MOtest-F: 5'-CIGCTAATGACCCCTGGCAAC-3' and Fgfr2-MOtest-R: 5'-AGCTGCTTGGTCCAGACG-3' targeting, respectively exon 2 and exon 3. Injection of sMOFgfr2 led to alternative splicing resulting in deletion of 22 nucleotides at the end of exon 2, thus coding for a truncated and inactive protein (Fig. S1H). Although no increase of cell death was observed in the Fgfr1a morphants, in absence or presence of co-injection of a morpholino directed against p53, this MOp53 was co-injected in all knockdown experiments to ensure inhibition of MO-induced unspecific cell death (Robu et al., 2007). The effects of morpholino injection were tested on at least 150 individuals, performed in at least three independent experiments.

2.4. Rescue experiments

Human *FGFR1* mRNA was synthesized using mMessage mMachine Sp6 Kit (Ambion, TX, USA) from the IMAGE full length cDNA clone IRATp970D1237D (IMAGE ID: 3896359). The clone was digested using NotI. 80 pg of *FGFR1* mRNA was injected alone or co-injected with morpholino at the one-cell stage. *fgrf2* mRNA was obtained by digestion of the pZL1-zfgrf2 (ZDB-GENE-030323-1) clone by BamHI and synthesized using mMessage mMachine Sp6 Kit. 100 pg/egg of this mRNA were injected alone or with morpholino directed against Fgf receptors.

2.5. Whole-mount *in situ* hybridization

Wild type and injected embryos were raised in presence of 0.003% of 1-phenyl-2-thiourea (PTU) until the desired stages, fixed for 2 h in 4% PFA and dehydrated in 100% methanol for storage at -20 °C. Embryos were rehydrated in PBS and whole mount *in situ* hybridization was performed as described and adapted from Dalcq et al., 2012. Antisense probes were labeled with digoxigenin or DNP (2,4-dinitrophenol). Anti-digoxigenin-AP was used with NBT/BCIP for single *in situ* hybridization; anti-digoxigenin-HRP and anti-DNP-HRP were used with tyramide-Cy3 (Red) and tyramide-FITC (green) for the double fluorescent *in situ* hybridizations (Perkin-Elmer TSA Kit). The *fgrf1a* (ZDB-GENE-980526-255) and *fgrf2* (ZDB-GENE-030323-1) riboprobes were prepared from cDNA clones with Sp6 and T7 RNA polymerase. Other probes used were *barx1* (ZDB-GENE-050522-28) (Sperber and Dawid, 2008), *dlx2a*

Please cite this article as: Larbuisson, A., et al., Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development. *Differentiation* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.006>

ARTICLE IN PRESS

A. Larbuisson et al. / Differentiation ■ (■■■) ■■■-■■■

3

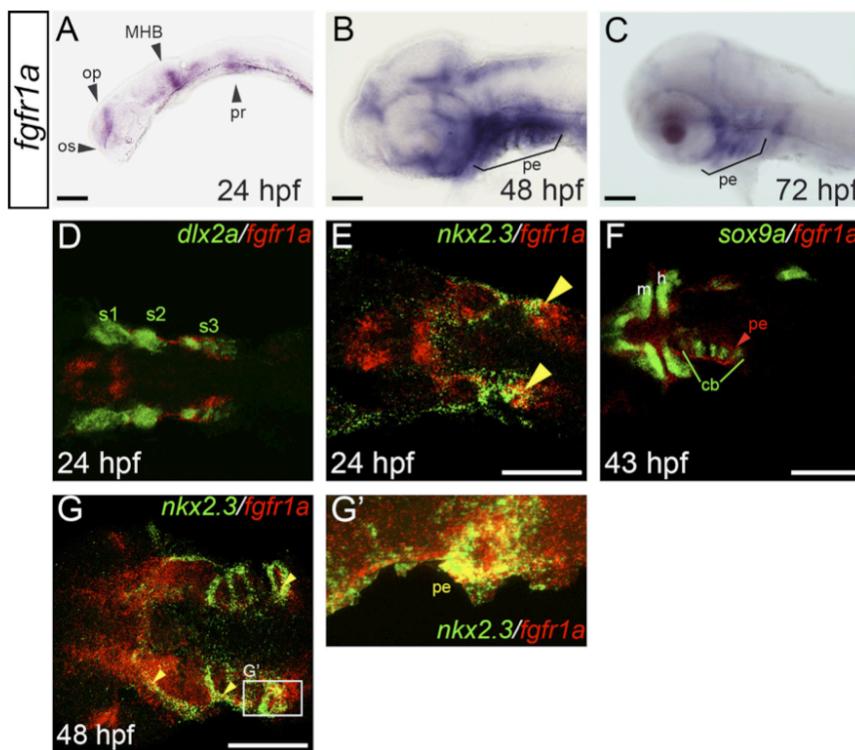


Fig. 1. *fgfr1a* is expressed in pharyngeal endoderm beyond 24 hpf. Simple *in situ* hybridization (ISH) using an *fgfr1a* probe of wt embryos at 24 (A), 48 (B) and 72 hpf (C); lateral views, anterior to the left. Single confocal sections of double fluorescent *in situ* hybridizations for expression of *fgfr1a* (red) and *dlx2a* (green) (D) or *nkk2.3* (green) (E) at 24 hpf; *sox9a* (green) at 43 hpf (F) or *nkk2.3* (green) at 48 hpf (G). (G') confocal projection for *nkk2.3* (green) and *fgfr1a* (red) at 48 hpf in the domain delineated by the white rectangle in (G). Ventral views, anterior to the right (D-G'). *fgfr1a* expression is detected in the pharyngeal region (pr), the midbrain/hindbrain boundary (MHB), the optic stalk (os) and the olfactory placode (op) at 24 hpf (A). *fgfr1a* mRNA is still observed in brain and in the pharyngeal endoderm (pe) at 48 (B) and 72 hpf (C). In the pharyngeal region at 24 hpf, *fgfr1a* (red) expression domains surround those of *dlx2a* (green) (D), while they overlap with those of *nkk2.3* (green) cells in pharyngeal endoderm (E, yellow arrows). At 43 hpf, no colocalisation is observed between *sox9a* (green) and *fgfr1a* (red) (F). *fgfr1a* (red) continues to coexpress with *nkk2.3* (green) in endodermal pouches (pe) at 48 hpf (G,G'; yellow arrows). [Movies S1-S3](#): migration stream of cNCC. Scale bar: 150 μ m.

(ZDB-GENE-980526-212) (Akimenko et al., 1994), *egr1* (ZDB-GENE-980526-320) (Close et al., 2002), *nkk2.3* (ZDB-GENE-990415-178) (Lee et al., 1996), *runx2b* and *runx3* (ZDB-GENE-040629-4 and ZDB-GENE-000605-2) (Flores et al., 2006), *sox9a* and *sox9b* (ZDB-GENE-001103-1 and -2) (Yan et al., 2005; Yan et al., 2002).

2.6. Alcian blue staining

To observe cartilage at 4 dpf, the embryos were stained with Alcian blue (Sigma, Bornem, Belgium) as described (Schilling et al., 1996).

2.7. Acridin orange staining

To detect unspecific cell death possibly due to morpholino injection, the treated larvae were exposed to a solution of acridin orange 5 μ g/ml followed by 5 washing steps in E3 and finally observation of the fluorescent cells at 502 nm excitation.

2.8. Heatshock conditions

Tg(hsp70l:dnfgfr1-EGFP)pd1 embryos were heat shocked during 30 min at the desired stages by transferring into preheated E3 at 37 °C in a water bath. After that, the embryos were returned to 28 °C until the desired stages were reached. After 24 h, the embryos were screened for GFP fluorescence to sort transgenic individuals from their non-transgenic siblings, only strongly fluorescent individuals were used for the experiment.

2.9. Immunohistochemistry for MAPK phosphorylation

For immunohistochemistry, embryos were fixed in 2% PFA/Pipes 0.1 M/MgSO₄, 1 mM/EGTA 2 mM, pH=7 over night at 4 °C. After washing with PBTr 0.3% (PBS with Triton X100 0.3%), embryos were permeabilized with acetone at -20 °C. Then, samples were washed 4 times in PBTr 0.3% and endogenous peroxidases were inhibited during 45 min with PBTr 0.3/H₂O₂ 2% followed by 4 washes in PBTr 0.3%. Finally, embryos were incubated in PBTr 0.3/4% BSA during 2 h at room temperature followed by incubation with P-MAPK antibodies 1/2000 in PBTr 0.3/4% BSA (Sigma M8159) over-night at 4 °C. Next, embryos were washed

Please cite this article as: Larbuisson, A., et al., Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development. *Differentiation* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.006>

ARTICLE IN PRESS

4

A. Larbuisson et al. / Differentiation ■ (■■■) ■■■-■■■

6×30 min in PBTr 0.3 and incubated 1 h in PBTr 0.3/4% BSA. The blocking solution was replaced by blocking solution supplemented with a 500-fold dilution of the secondary antibody from Vectastain ABC Elite Mouse kit (Vector Laboratories) and incubated overnight at 4 °C. Then, embryos were washed 6 times for 30 min in PBTr 0.3. Next, they were incubated 1 h in A+B solutions from Vectastain Kit (15 µL/mL). After 3 washes of 15 min in PBTr 0.3, embryos were incubated in amplification diluent from TSA Molecular Probe kit (Perkin Elmer) for 5 min. Colorimetric staining was performed with Tyramide-FITC (1/1000) or Tyramide-Cy3 (1/500) in amplification diluent during 45 min at room temperature in the dark and, finally, the embryos were washed 5 times in PBTr 0.3.

2.10. Imaging and analysis

Visible *in situ* hybridization and Alcian blue pictures were acquired on a Nikon® ECLIPSE 90i microscope using NIS-Elements microscope imaging software. Fluorescent *in situ* images were captured on a Leica TCS SP2 confocal using LCS Leica SP2 software. Pictures and Z-stacks were analyzed with ImageJ; the same adjustments were used for all pictures from a same data group.

3. Results

3.1. *fgfr1a* and *fgfr2* are expressed in pharyngeal endoderm.

Zebrafish *fgfr1a* expression was previously reported in brain, somites and in the pharyngeal region until 24 h post fertilization (Rohner et al., 2009; Schilling et al., 1996; Scholpp et al., 2004; Ota et al., 2010). We confirmed and analyzed more precisely *fgfr1a* expression in the pharyngeal region between 24 hpf and 72 hpf by simple ISH and by double fluorescent ISH with specific probes for *fgfr1a*, *dtx2a*, *nkx2.3* and *sox9a*. At 24 hpf, *fgfr1a* expression is observed in the Midbrain/Hindbrain Boundary (MHB), optic stalk, olfactory placode and pharyngeal region (Fig. 1A), as expected. Moreover, *fgfr1a* mRNA co-localized with that for *nkx2.3* in pharyngeal endoderm at 24 hpf (yellow arrows; Fig. 1E; Movie S1), but scarcely with *dtx2a* mRNA in cranial neural crest cells (cNCC) (Fig. 1D; Movie S2); areas of *fgfr1a* expression in the pharyngeal region mainly surround those of *dtx2a*. At 43 hpf, the *sox9a* expression domain in cNCC is mainly surrounded by *fgfr1a* expression domains in the endodermal pouches (Fig. 1F; Movie S3). *fgfr1a* is still expressed at 48 hpf and 72 hpf in brain and in endodermal tissues (Fig. 1B, C, G, G'). Colocalisation of *nkx2.3* and *fgfr1a* expression at 48 hpf is apparent in endodermal pouches in the pharyngeal region (yellow arrows; Fig. 1G, G'; Movies S4 and S5).

Expression of *fgfr2* is detected in wild type 24 hpf embryos in hindbrain rhombomers (R1-4), the tectum, the optic stalk and olfactory placodes and weakly in the pharyngeal region (Fig. 2A). Expression increases in the pharyngeal region at 26 hpf in the most posterior arch and was present until 72 hpf (Fig. 2B-D), while its expression in the brain was maintained during these developmental stages. At 38 hpf, *fgfr2* mRNA was observed in the same cell type than *nkx2.3* i.e. in endodermal pouches of the pharyngeal region (yellow arrows; Fig. 2E; Movie S6). No coexpression of *fgfr2* mRNAs was observed with those of *sox9a* in cNCC of the pharyngeal region at 72 hpf (Fig. 2G; Movie S8); the *fgfr2* expression domains surround those for *sox9a* and correspond to pharyngeal endoderm. Double fluorescent ISH using probes for *fgfr1a* and *fgfr2* confirms co-expression of these two genes in endodermal pouches and in otic vesicles at 48 hpf (yellow; Fig. 2F; Movie S7).

In conclusion, both *fgfr1a* and *fgfr2* are predominantly expressed in cells of the pharyngeal endoderm.

3.2. Viscerocranum cartilage formation requires Fgf signaling beyond 24 hpf

To determine the importance of Fgf signaling specifically at stages beyond 24 hpf, we used *Tg(hsp70l:dnfgfr1-EGFP)pd1* transgenic embryos which express a dominant-negative Fgrf1 receptor under the control of the *hsp70l* heat shock promoter. We performed a heat shock for 30 min at different developmental stages between 24 and 48 hpf, thereby blocking Fgf signaling in the entire embryo. The embryos were left to develop until 4 days post fertilization (dpf) and head cartilage formation was assessed by alcian blue staining. We observed different phenotypes (Fig. 3A-F), ranging from close to wild type (type A), mildly affected cartilage with shortened mandible and hyoid (types B and C) through increasingly affected viscerocranum with a complete absence of ceratobranchials, a reduction of Meckel's cartilage and palatoquadrata, axis modification or absence of ceratohyoid (types D and E) to finally only remnants of the neurocranium (type F). Embryos that underwent heat shock at 26 or 30 hpf presented the highest proportion (Fig. 3G) of strongly affected cartilage structures. Heat shock treatments at earlier (before 25 hpf) or later stages (beyond 40 hpf) led to a lower proportion of highly affected larvae. The extent of MAPK phosphorylation was drastically reduced 15 h after heat shock treatment both at 24 and at 28 hpf (Fig. S1A-D), showing that Fgf signaling was similarly reduced in both cases. Siblings, identified as non-transgenic by the absence of GFP fluorescence formed normal head cartilage after any of the heat shock treatments, proving that the observed defects are indeed due to impairment of Fgf signaling by the transgene.

These observations indicate that Fgf signaling plays a crucial role for pharyngeal cartilage formation between stages 26 and 40 hpf.

3.3. Both *Fgfr1a* and *Fgfr2* receptors are required for cranial cartilage formation

To determine the effect of *fgfr1a* and *fgfr2* loss of function, we assessed cartilage formation in morpholino-injected larvae at 4 dpf by alcian blue staining. Injection of tMOFgrf1a, directed against the *fgfr1* translation initiation codon (Nakayama et al., 2008) caused an absence of ceratobranchial arches, a strong reduction of mandible size and inversion of the dorso-ventral axis of the hyoid in 49% ($n=185/377$) of observed individuals (Fig. 4A, B), as compared to embryos injected with control morpholino (MOcon). No difference was observed between injection of tMOFgrf1a and co-injection of a morpholino directed against p53 (MOp53), showing that the observed defects were not caused by unspecific apoptosis (not shown). In addition, no increase of apoptotic or necrotic cells was observed in the morphants by acridine orange staining, with or without co-injected MOp53 (not shown). Nevertheless, we performed all subsequent knock-down experiments by co-injecting MOp53. To further confirm the specificity of the observed effects for Fgfr1a depletion, we co-injected tMOFgrf1a and mRNA coding for human FGFR1 into one-cell stage eggs. At 4 dpf, the proportion of strongly affected embryos had considerably decreased, whereas 48% ($n=146/305$) of the embryos presented only slight modifications (Fig. 4C).

For further experiments, the alcian blue stained larvae were classified according to their cranial cartilage pattern, from wt (Type A, Fig. 5A), mildly affected (Fig. 5B), strongly affected head cartilage but with ceratobranchial arches still present (Fig. 5C), strongly affected and lacking ceratobranchial arches (Fig. 5D) to only remnants of the neurocranium (type E, Fig. 5E). Finally, type F

Please cite this article as: Larbuisson, A., et al., Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development. *Differentiation* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.006>

ARTICLE IN PRESS

A. Larbuissou et al. / Differentiation ■ (■■■■) ■■■-■■■

5

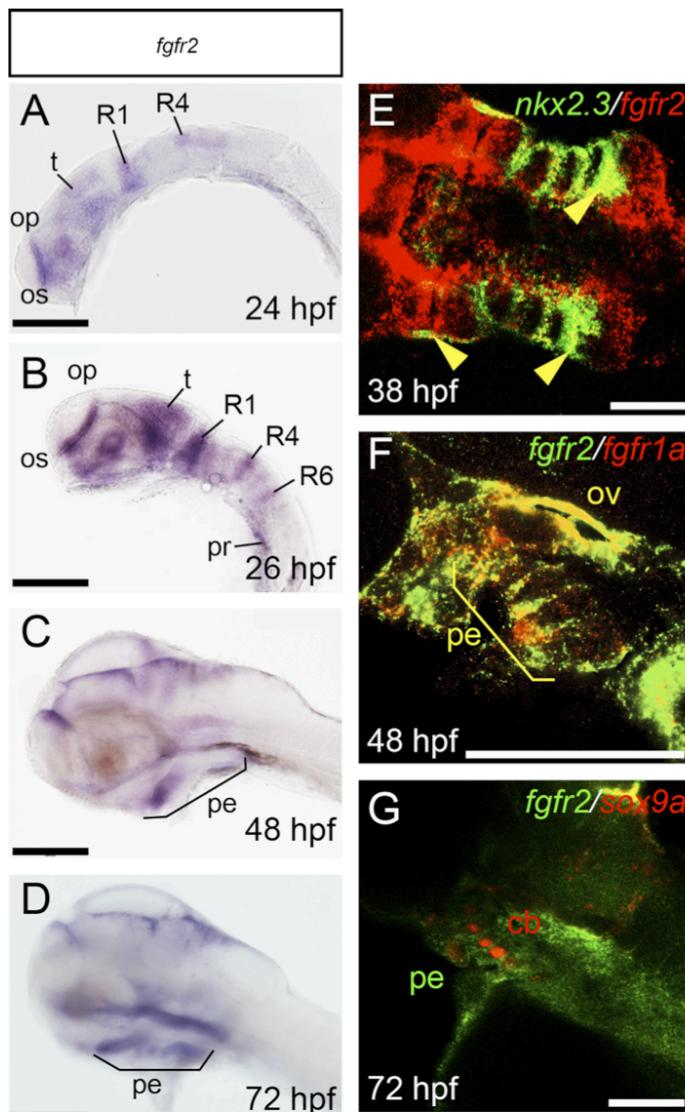


Fig. 2. *fgfr2* is expressed in pharyngeal endoderm starting at 26 hpf. Simple *in situ* hybridization for *fgfr2* of wt embryos at 24 hpf (A), 26 hpf (B), 48 hpf (C) and 72 hpf (D). Lateral views, anterior to the left (A-D). Expression of *fgfr2* is detected in the optic stalk (os), in the olfactory placode (op), in rhombomers 1, 4, 6 (R1-6) and in the optic tectum (t) at 24 hpf. These expression domains are still observed at 26 hpf and expression starts in the pharyngeal region (pr). *fgfr2* mRNA is still expressed in the different domains of the brain and in pharyngeal endoderm (pe) until 72 hpf (B, C). Confocal section of double fluorescent *in situ* hybridization for *fgfr2* (red) and *nkx2.3* (green) reveals co-expression in endodermal pouches at 38 hpf (E; yellow arrows). At 48 hpf, *fgfr2* positive cells co-express *fgfr2* in the pharyngeal endoderm (pe) and in the otic vesicle (ov) (F, yellow). The *sox9a* expression domain (red) in cartilage (cb) surrounds that of *fgfr2* (green) at 72 hpf (G). Scale bar: 150 μ m.

corresponds to a slightly more intensely stained cartilage and an abnormal position of the ceratohyals (Fig. 5F). The proportions of each observed phenotype at the indicated conditions are summarized in the form of a table (Fig. 5G).

Two additional morpholinos targeting *fgfr1a* mRNA were tested, one directed against the 5' UTR region of *fgfr1a* (5' UTR MO_{FGFR1a})

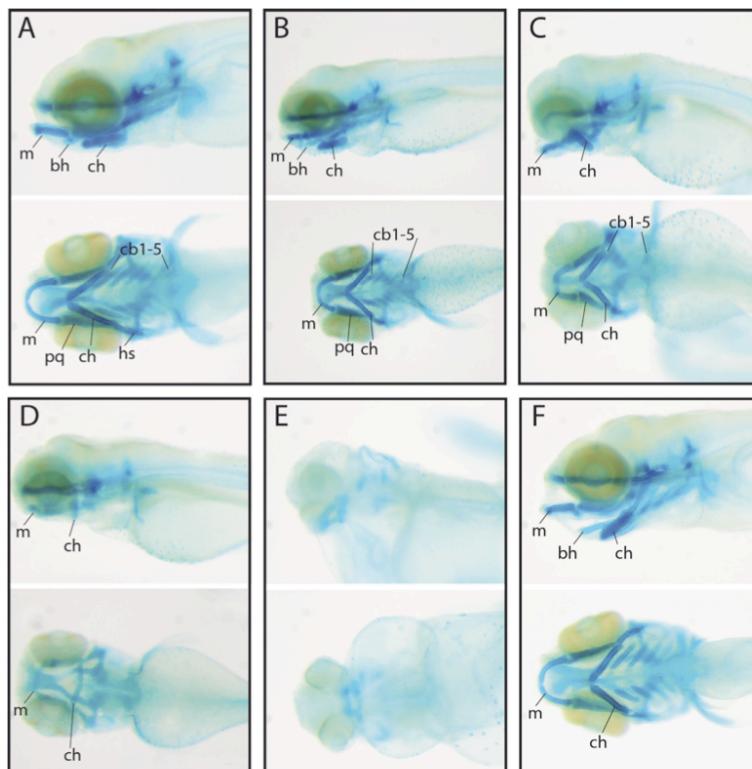
and one splicing morpholino (sMO_{FGFR1a}). Microinjection resulted in 42% and 47% of type D cartilage, respectively for sMO_{FGFR1a} and 5' UTR MO_{FGFR1a} (Fig. 5G). Microinjection of a splicing morpholino directed against *fgfr2* mRNA (MO_{FGFR2}) resulted in less severe cartilaginous defects than those injected with MO_{FGFR1a}. Only 16% of Fgfr2 morphants are strongly affected (type D), while 65%

Please cite this article as: Larbuissou, A., et al., Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development. *Differentiation* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.006>

ARTICLE IN PRESS

A. Larbuisson et al. / Differentiation ■ (■■■■) ■■■-■■■

7

Table 1. Cartilage phenotypes in *fgfr1a* and *fgfr2* morphants.

	<i>n</i>	Cartilage phenotype (%)					
		A	B	C	D	E	F
Uninjected	331	84	14	1	1	0	1
MOcon	317	92	5	<1	<1	<1	2
tMOFgr1a	377	5	18	11	49	17	0
sMOFgr1a	125	26	29	1	42	2	0
5' UTR MOFgr1a	296	8	22	8	47	15	0
tMOFgr1a + mRNA FGFR1	305	38	48	3	8	3	0
mRNA FGFR1	186	58	25	2	0	1	14
MOFgr2	156	19	0	65	16	0	0
MOFgr2 + mRNA _{fgfr2}	229	44	48	4	2	2	0
mRNA _{fgfr2}	235	73	1	0	1	0	25
tMOFgr1a + MOFgr2	275	0	0	52	36	12	0
<hr/>							
tMOFgr1a + mRNA _{fgfr2}	271	26	66	0	8	0	0
tMOFgr1a + mRNA _{runx3}	176	56	34	2	0	1	7
tMOFgr1a + mRNA _{egr1}	173	10	33	29	10	18	0
MOFgr2 + mRNA _{runx3}	253	66	29	1	1	0	3
MOFgr2 + mRNA _{egr1}	148	11	76	4	2	7	0
mRNA _{runx3}	239	89	7	1	1	0	2
mRNA _{egr1}	126	85	0	0	0	5	10

Fig. 5. Cranial cartilage structures observed in 4 dpf larvae previously injected with *fgfr1a* and *fgfr2* morpholinos and/or mRNA. At this stage, Meckel's cartilage (m), palatoquadrate (pq), ceratohyoid (ch), hyosymplectic (hs) and ceratobranchials (cb1-5) are formed. Panels A-F illustrate the different cartilage types that were observed in these experiments, lateral and ventral views, anterior to the left. (A) Wild type and control Mo injected embryos display a normal growth of the different pieces of pharyngeal cartilage. (B) mildly affected cartilage. (C) strongly affected head cartilage with ceratobranchial arches still present, (D) strongly affected cartilage also lacking ceratobranchial arches. (E) only remnants of the neurocranium are observed. (F) embryos displaying a stronger staining of cartilage and an abnormal position of the ceratohyal. (G) table summarizing the proportions of each type of head cartilage pattern observed in the indicated experiments. Column "n" indicates the number of observed individuals for that particular experiment. Bold numbers indicate the highest proportion of cartilage phenotype in each experiment and red numbers concern the increased cartilage phenotype.

ARTICLE IN PRESS

6

A. Larbuisson et al. / Differentiation ■ (■■■) ■■■-■■■

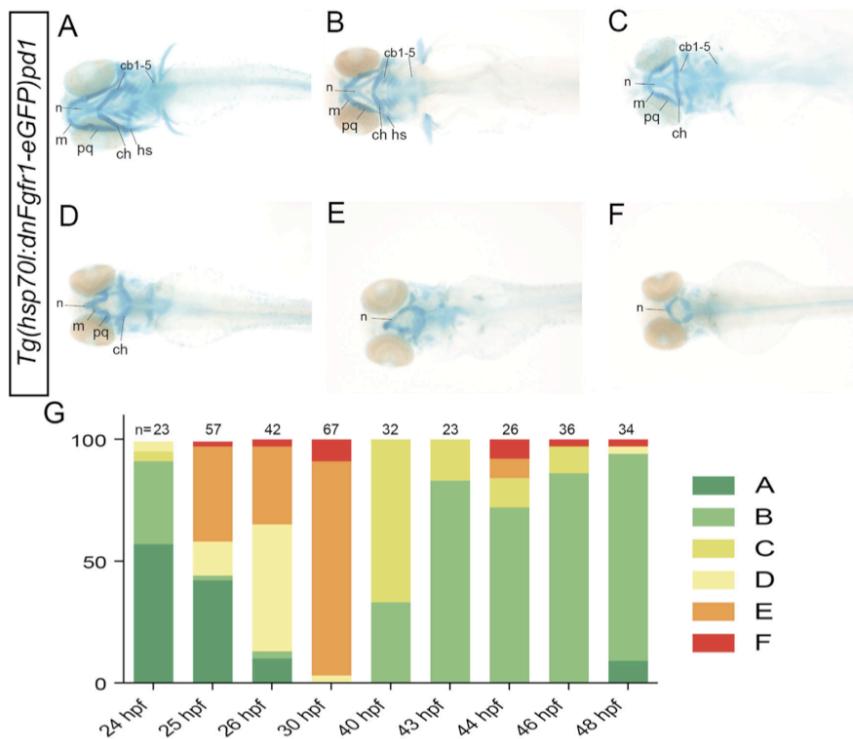


Fig. 3. Inhibition of Fgf signaling beyond 24 hpf perturbs craniofacial cartilage formation. Alcian blue staining at 4 dpf of transgenic *Tg(hsp70l:dnFgfr1-eGFP)pd1* embryos after a heat shock at 37 °C during 30 min starting at the indicated times after fertilization. (A–F) Ventral views, anterior to the left. Six different phenotypes are observed, ranging from (A) wild type like, all cartilaginous structures are present than (B) all structures are present but reduced in size, (C) all structures are present but a strong modification of the ceratohyoid axis and a reduction of the mandible size is observed, (D) strong modifications of the ceratohyoid and the mandible and absence of ceratobranchial arches, (E) remnants of the viscerocranum and defects in the neurocranium to (F) no viscerocranum and strongly affected neurocranium. m: Meckel's cartilage; pq: palatoquadrate; ch: ceratohyoid; hs: hyosymplectic; n: neurocranium; cb1-5: ceratobranchial 1–5. (G) The proportion of strongly affected cartilage (D–F) dramatically increases when heat shock is performed between 26 hpf and 30 hpf, while treatment after 40 hpf causes only weak cartilage defects (B, C).

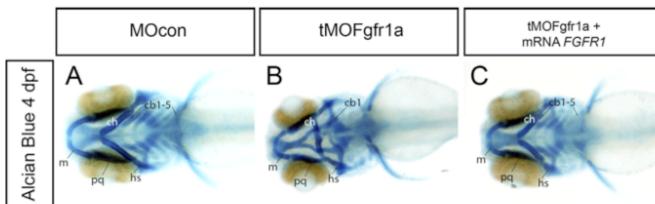


Fig. 4. Knockdown of *fgfr1a* expression generates cartilage defects at 4 dpf. Ventral view, anterior to the left. Wild type and control MO injected embryos display a normal growth of the different pieces of pharyngeal cartilage (A). At this stage, Meckel's cartilage (m), palatoquadrate (pq), ceratohyoid (ch), hyosymplectic (hs) and ceratobranchials (cb1-5) are formed. In tMOFgfr1a morpholino injected embryos, we predominantly observe an absence of the ceratobrachial cartilage, a dorsal modification of the axis of the hyoid and a strong reduction of the mandible (B) (47%). When mRNA for human FGFR1 is co-injected with tMOFgfr1a, all pharyngeal cartilage pieces are restored (C; 38%).

presented a type C head cartilage (Fig. 5G). Evaluation of MAPK phosphorylation revealed that both tMOFgfr1a and MOFgfr2 injection lead to a significant decrease of Fgf signaling at 30 hpf (Fig. S1E–G). Co-injection of mRNA coding for zebrafish Fgfr2 together with MOFgfr2 resulted in rescue of the severe defects, with larvae presenting normal (type A) or mildly affected (type B) head cartilage. Ectopic expression of either human FGFR1 or zebrafish Fgfr2 alone generated larvae with normal or mildly affected

head cartilage (type A, B; Fig. 5) or with slightly hypertrophic cartilage elements (14% and 25%, respectively) (Fig. 5F, G). Co-injection of tMOFgfr1a and MOFgfr2 generated respectively 52% of type C, 38% of type D and 12% of type E cartilage. Efficacy of the splicing morpholinos was verified by RT-PCR on mRNA from 48 hpf morphants (Fig. S1H). Taken together, these results clearly suggest that both Fgfr1a and Fgfr2 are crucial for viscerocranum formation during chondrogenesis.

Please cite this article as: Larbuisson, A., et al., Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development. *Differentiation* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.006>

ARTICLE IN PRESS

8

A. Larbuisson et al. / Differentiation ■ (■■■) ■■■-■■■

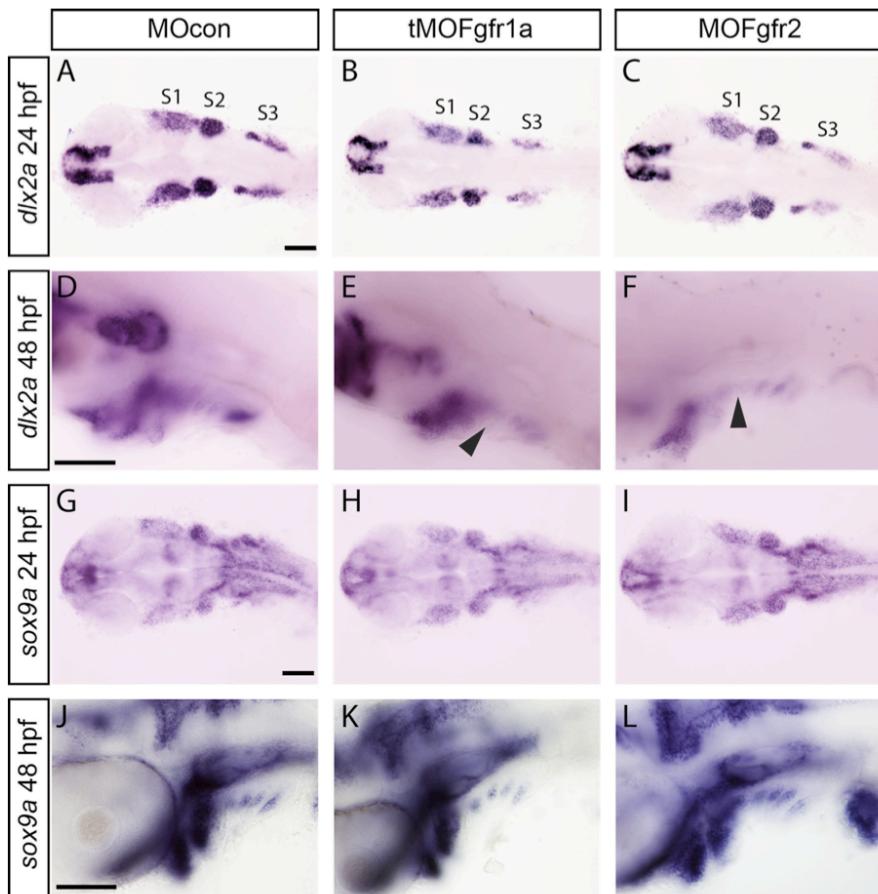


Fig. 6. Fgfr1a and Fgfr2 are not required for *dlx2a* and *sox9a* expression. ISH on morphants with probes for *dlx2a* (A–F) and *sox9a* (G–M) show no difference of the expression pattern of these genes compared to control embryos at 24 hpf (A–C, G–I) and at 48 hpf (D–F, J–L), except for a minor modification of the *dlx2a* expression domain (black arrows; F,G). Anterior is to the left. Ventral views (A–C, G–I) and lateral views (D–F, J–L). Scale bar: 100 μ m.

To test whether one receptor can rescue depletion of the other, we co-injected *fgfr2* mRNA into tMOFgfr1a morphants, leading to rescue of the observed defects with a decrease in the proportion of strongly affected larvae (type D, from 49% to 8%; Fig. 5G) and an increase of embryos with only slight modifications of cartilage structure (type B, from 18% to 66%; Fig. 5G).

3.4. Early neural crest cell differentiation does not require Fgfr1a and Fgfr2

To investigate the function of *fgfr1a* and *fgfr2* genes in early differentiation of neural crest cells, we performed ISH on morphants using probes for *dlx2a*, a marker of migrating and post migratory cNCCs (Sperber et al., 2008; Akimenko et al., 1994) and for *sox9a*, a transcription factor involved in chondrocyte maturation (Yan et al., 2005). In all experiments, the expression patterns of *dlx2a* (Fig. 6A–F; Movie S3, Fig. S3) and *sox9a* (Fig. 6G–L; Movie S2, Fig. S2; Movie S3, Fig. S3) remained unaffected both in Fgfr1a and Fgfr2 morphants at 24 and 48 hpf, although a slight decrease

of *dlx2a* expression was observed at 48 hpf in branchial arches 1 and 2 in both *fgfr1a* and *fgfr2* morpholino-injected embryos (Fig. 6D–F). Double fluorescent *in situ* hybridization in control embryos at 24, 30 and 48 hpf revealed that *dlx2a*-expressing cells are intermingled with those expressing *sox9a* in the pharyngeal arches, with patches of cells expressing only one of these factors neighboring domains of cells expressing both mRNAs (Movie S3, Fig. S3 A, D, G). Moreover, the expression and colocalisation domains of *sox9a* and *dlx2a* mRNAs are not affected in *fgfr1a* or *fgfr2* morphants (Movie S3, Fig. S3 A–I) although a slight reduction of their expression domains is observed at 48 hpf. Similarly, expression of GFP in *fli*-GFP transgenic embryos was not affected at 48 hpf after injection of tMOFgfr1a or MOFgfr2, although Fgfr1a knockdown led to perturbations in the branchial arches (Movies S4, Fig. S4). The absence of substantial modifications in *dlx2a*, *sox9a* and *fli1* expression in morphants suggests that migration of neural crest cells and their first steps of differentiation within the endodermal pouches are normal.

Please cite this article as: Larbuisson, A., et al., Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development. *Differentiation* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.006>

ARTICLE IN PRESS

A. Larbuisson et al. / Differentiation ■ (■■■■) ■■■■■

9

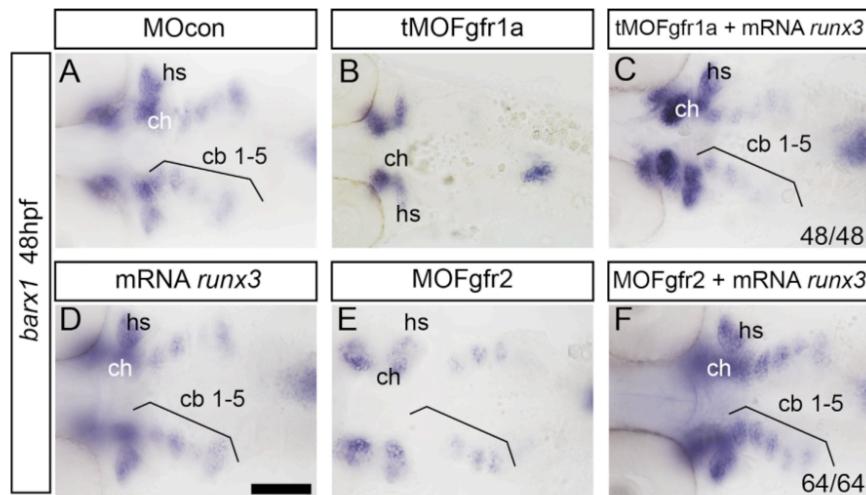


Fig. 7. *barx1* expression is down-regulated in Fgfr1a and Fgfr2 morphants at 48 hpf. In control embryos at 48 hpf, *barx1* transcripts are detected in chondrocytes of the ceratobranchial arches (cb1-5), the ceratohyoid (ch), the hyosymplectic (hs) and in the mandibular zone (A). Depletion of Fgfr1a leads to a dramatic decrease of *barx1* expression in the ceratobranchial chondrocytes (B), while a more modest decrease is observed in Fgfr2 morphants in the pharyngeal region (E) compared to control. *runx3* mRNA injection does not affect the *barx1* expression pattern (D). Co-injection of *runx3* mRNA with tMOFgfr1a or MOFgfr2 restores wild type expression of *barx1* (C, F) in 100% of morphants. Ventral views, anterior to left. Scale bar: 100 μm.

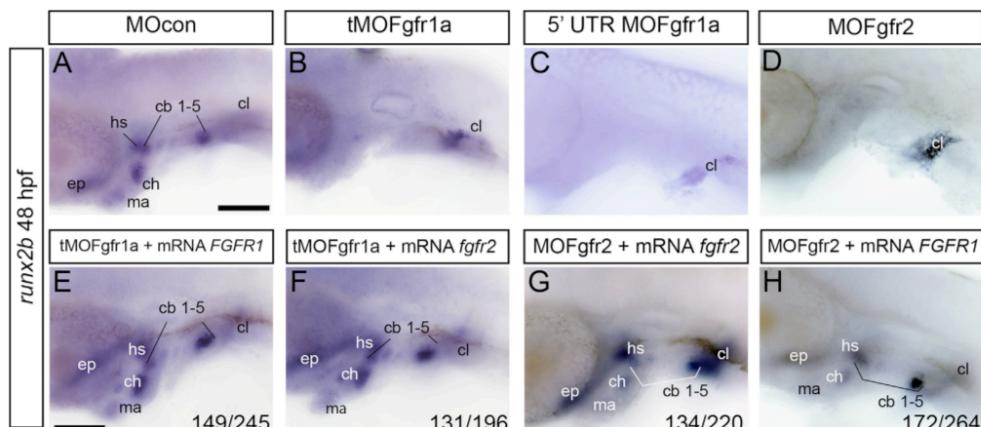


Fig. 8. Transcription of the *runx2b* gene is decreased in Fgfr1a and Fgfr2 morphants. Lateral views of *in situ* hybridizations, anterior to the left. At 48 hpf, *runx2b* expression in absence of *fgfr1a* is observed only in the cleithrum (cl) (B,C), while in control embryos *runx2b* transcripts are detected in the mandible (ma), in the ceratohyoid (ch), in the hyosymplectic (hs), in ceratobranchials (cb1-5) and in the ethmoid plate (ep) (A,F). Ectopic expression of *FGFR1* mRNA in morphants for Fgfr1a restores *runx2b* expression in the pharyngeal cartilages (D, 61% n=149/245), similar to co-injection of tMOFgfr1a and *fgfr2* mRNA (E, 67% n=131/196). In Fgfr2 morphants, *runx2b* expression persists only in the cleithrum (G,H). Co-injection of *FGFR1* mRNA and MOFgfr2 restores wild type *runx2b* expression in 61% (n=134/220) of the embryos (I) and 65% (n=172/264) of embryos who have a wild type *runx2b* expression pattern when morpholino against *fgfr2* is co injected with *fgfr2* mRNA (J). Scale bar: 100 μm.

3.5. Fgfr1a and Fgfr2 are required for condensation and late differentiation of chondrocytes

Barx1 is a transcription factor involved in condensation of cranial neural crest cells whose expression was shown to be controlled by Fgf signaling (Sperber and Dawid, 2008). Moreover, *barx1* expression is essential for *runx2b* expression, a transcription factor absolutely required for chondrocyte maturation (Flores et al., 2006; Flores et al., 2004) in the pharyngeal region. At 48 hpf,

barx1 mRNA is detected in chondrocytes of the ceratobranchial arches, the hyosymplectic and the ceratohyoid in control embryos (Fig. 7A) (Sperber and Dawid, 2008). At this stage, *fgfr1a* or *fgfr2* knock-down caused a reduction of *barx1* expression, to different extents (Fig. 7B, E).

At 48 hpf, *runx2b* mRNAs are observed in the mandible, the hyoid, the ceratobranchial arches, the ethmoid plate and in the cleithrum (Fig. 8A). In Fgfr1a or Fgfr2 morphants, all *runx2b* expression domains are absent in the pharyngeal region except

Please cite this article as: Larbuisson, A., et al., Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development. *Differentiation* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.006>

ARTICLE IN PRESS

10

A. Larbuisson et al. / Differentiation ■ (■■■) ■■■-■■■

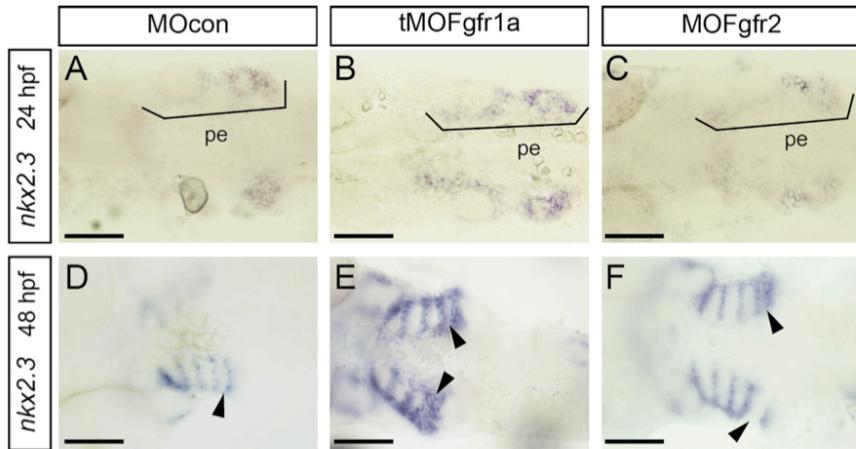


Fig. 9. Endodermal expression of *nkx2.3* is maintained in the pharyngeal region upon Fgfr1a and Fgfr2 knock-down. In both Fgfr1a and Fgfr2 morphants, *nkx2.3* expression is still observed in the pharyngeal region at 24 hpf and 48 hpf. However, *nkx2.3* patterning is modified in the ceratobranchial 5 region (E, F; arrows) at 48 hpf. Ventral views, anterior to the left. pe: pharyngeal endoderm. Scale bar: 100 μ m.

for its expression in the cleithrum (Fig. 8B–D). Rescue experiments reveal that co-injection of tMOFgfr1a with human *FGFR1* mRNA or zebrafish *fgfr2* restores wild type *runx2b* expression in 61% ($n=149/245$) and 67% ($n=131/196$) of the larvae, respectively (Fig. 8E, F). Similarly, MOFgfr2-injected embryos recover expression of *runx2b* in the pharyngeal region when *FGFR1* mRNA or mRNA *fgfr2* is co-injected, respectively in 61% ($n=134/220$) and 65% ($n=172/264$) of injected embryos (Fig. 8G, H). These data suggest that the two receptors are involved in condensation and late maturation of chondrocytes.

3.6. Fgfr1a and Fgfr2 are not essential for formation of the endodermal pouches

To determine the function of the two receptors in endodermal pouch formation, we performed *in situ* hybridization with the endodermal marker *nkx2.3* (Lee et al., 1996) on both morphants. At 24 and 48 hpf and in comparison with control embryos, loss of function of *fgfr1a* or *fgfr2* does not affect *nkx2.3* expression, only a modification of the endodermal pouch patterning was observed in the ceratobranchial 5 (cb5) region (arrows; Fig. 9E, F) at 48 hpf. We also observed that Fgfr1a depletion does not affect *fgfr2* expression and conversely Fgfr2 depletion does not affect *fgfr1a* expression in the pharyngeal endoderm at 48 hpf (Fig. 10). Similarly, injection of both morpholinos into *sox17-GFP* (Sakaguchi et al., 2006) transgenic embryos revealed that expression of this endodermal marker is maintained, albeit again displaying an aberrant patterning of the cb5 pouches at 48 hpf (Fig. S5 B, C).

These results suggest that both Fgfr1a and Fgfr2 are not required for formation of the pharyngeal endoderm, but contribute to its correct shaping at 48 hpf.

3.7. Fgfr1a and Fgfr2 activate the Runx3-Egr1-Sox9b-fsta cascade in pharyngeal endoderm

Recently, a regulatory cascade was described in zebrafish pharyngeal endoderm involving the transcription factors Runx3-Egr1-Sox9b (Dalcq et al., 2012) that inhibits expression of Follistatin A, a BMP inhibitor. This down-regulation allows the full activity of BMP signaling required for expression of *runx2b* in

cartilage mesenchyme. We investigated the effect of Fgfr1a or Fgfr2 depletion on this cascade.

In control embryos, *runx3* expression was observed at 48 hpf in pharyngeal endoderm, the cleithrum and the trigeminal ganglion (Fig. 11A, C), as expected (Flores et al., 2006). Knockdown of each receptor decreases *runx3* expression in the pharyngeal endoderm (Fig. 11B, D), while its expression in the cleithrum and in the trigeminal ganglia is still present. This effect is specific, as co-injection of MOFgfr2 with *fgfr2* or human *FGFR1* mRNA caused respectively 87% ($n=47/54$) or 85% ($n=59/70$) of larvae to recover *runx3* expression in the pharyngeal endoderm.

At 72 hpf, *egr1* expression can be detected in oral epithelium, in the brain and in the pharyngeal endoderm of control embryos (Fig. 11G, I). Fgfr1a and Fgfr2 morphants showed an absence of *egr1* expression in the pharyngeal endoderm whereas the other expression domains remain unchanged (Fig. 11H, J).

At 48 hpf, *sox9b* mRNA is localized in pharyngeal endoderm, in the hindbrain, in the tectum and in the pectoral fin bud in control embryos (Fig. 11K, M) (Yan et al., 2005). *In situ* hybridizations indicate that Fgfr1a or Fgfr2 knock down leads to an absence of *sox9b* expression in the endodermal pouches (Fig. 11 L, N) and a decrease in the mandibular and hyoid region, whereas expression in the hindbrain is maintained.

Sox9b was shown to repress expression of the secreted BMP inhibitor follistatin A in pharyngeal endoderm, thereby allowing correct BMP signaling to the developing chondrocytes (Dalcq et al., 2012). In control embryos, we observed weak *fsta* expression in the pharyngeal region at 48 hpf (Fig. 11O, Q), while *fsta* transcription was strongly upregulated when tMOFgfr1a or MOFgfr2 were injected into one-cell stage embryos (Fig. 11P, R).

To further support the involvement of Fgfr1a and Fgfr2 receptors in activation of the endodermal regulatory cascade, we tested whether ectopic expression of Egr1 or Runx3 would be able to rescue the cartilage defects in Fgfr morphants. Injection of either *egr1* or *runx3* mRNA together with tMOFgfr1a or MOFgfr2 resulted in a drastic decrease of the severe phenotypes observed in Fgfr morphants (table in Fig. 5G). In 48 hpf embryos, co-injection of *runx3* mRNA with tMOFgfr1a resulted in partial (43%, $n=57/133$) or near complete (52%, $n=69/133$) rescue of *runx2b* expression (Fig. 12A–D). Ectopic Runx3 expression partially (33%, $n=38/115$)

ARTICLE IN PRESS

A. Larbuisson et al. / Differentiation ■ (■■■) ■■■-■■■

11

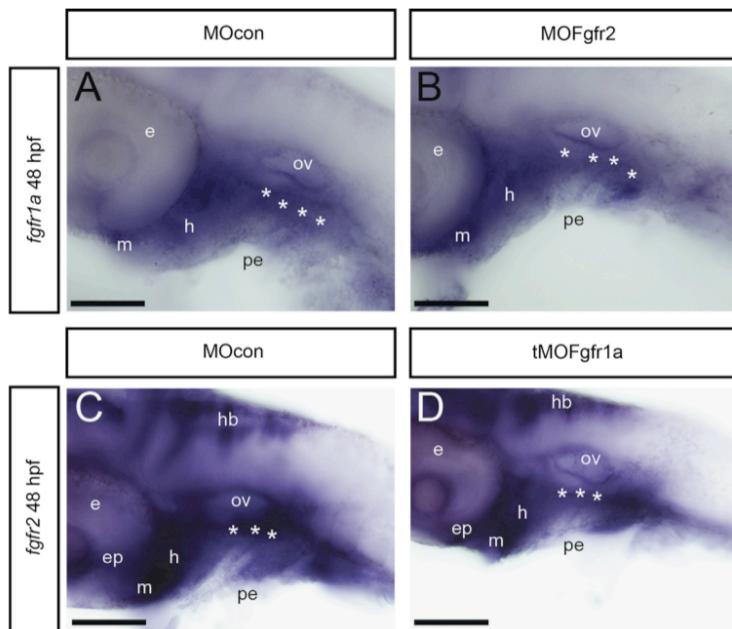


Fig. 10. No mutual regulation between *fgfr1a* and *fgfr2* in the pharyngeal region. Lateral view of *in situ* hybridization, anterior is to the left. At 48 hpf, Fgfr2 knock down does not affect *fgfr1a* expression in the pharyngeal endoderm (pe), mandible region (m) and hyoid region (h) (B) compared to control embryos (A). Similarly, *fgfr2* expression is still observed at 48 hpf (D) in pharyngeal endoderm (pe), mandibular and hyoid region (m, h), hindbrain (hb) and ethmoid placode (ep) in control and Fgfr1a morphants embryos. Scale bar: 100 μ m.

or completely (62%, $n=71/115$) rescued Fgfr2 knockdown, while injection of *runx3* mRNA alone had no effect (Fig. 12E–H). Similarly, injection of *runx3* mRNA rescued the loss of *bax1* expression caused by tMOFgr1a (100% rescue, $n=48/48$) or MOFgr2 (100% rescue, $n=64/64$) (Fig. 7C, F).

These results show that in pharyngeal endoderm, both Fgfr1a and Fgfr2 control the endodermal cascade involved in chondrogenesis.

4. Discussion

4.1. The receptors Fgfr1a and Fgfr2 are required for late differentiation of pharyngeal chondrocytes

The development of head cartilage, deriving from cranial neural crest cells and forming the matrix for subsequent endochondral bone formation, depends on a complex and precisely controlled interplay between different extracellular signaling pathways. Among these, Fgf signaling has been extensively studied in zebrafish. Fgf3 and Fgf8 ligands produced in the hindbrain and lateral mesoderm are required during early segmentation stages for correct organization of the endodermal pouches (Crump et al., 2004). Later, Fgf signaling is required in cNCCs for their conversion into the ectomesenchymal lineage, characterized by *dlx2a* expression, after migration into the endodermal pouches (Blentic et al., 2008). Endodermal expression of *fgf3* is required for *dlx2a* expression in post migratory cNCCs and their survival in the posterior arches (David et al., 2002; Nissen et al., 2003), while loss of function of both *fgf3* and *fgf8* affect differentiation and survival of cNCCs as well as *dlx2a* expression in all the arches (Crump et al., 2004; Walshe and Mason, 2003). Thus, Fgf signaling acts during

segmentation stages before 24 hpf on pharyngeal cartilage formation through cell-autonomous mechanisms within cNCC-derived chondrocyte precursors and indirectly through patterning of the pharyngeal endoderm.

In this study, we examined the role of Fgf signaling during craniofacial cartilage formation using the transgenic line *Tg(hsp70l:dnfgfr1-ECFP)pd1* which allows controlled expression of a dominant negative Fgf receptor mutant (Ota et al., 2010). We show an additional function for Fgf signaling at later stages in chondrogenesis, which is most effective after 30 hpf compared to earlier (24–26 hpf) or later (beyond 40 hpf) stages. At this stage, conversion of cNCCs to ectomesenchyme is finished and the first steps of chondrocyte differentiation, such as *sox9a* expression, are initiated.

As the dominant negative receptor blocks signaling by interacting with endogenous receptors in the cells where it is expressed, we decided to study the role of Fgfr1a and Fgfr2 receptors by antisense morpholino injection, as both were previously shown to be expressed in the pharyngeal region at 24 hpf (Tonou-Fujimori et al., 2002; Ota et al., 2010). Depletion of each Fgfr1a or Fgfr2 leads to severe defects in cranial cartilage formation, similar to those observed upon Fgf inhibition after 24 hpf. Efficacy of the splicing morpholinos was verified by RT-PCR, while unspecific effects due to morpholino injection were excluded by co-injecting a morpholino against p53 to block unspecific apoptosis (Robu et al., 2007) in all experiments. Results obtained in the presence of MOp53 were similar to those obtained without co-injection (data not shown). In addition, we tested three different morpholinos directed against *fgfr1a* with similar results and we show that the defects caused by depletion of each receptor are rescued by ectopic expression of exogenous receptor. Furthermore,

Please cite this article as: Larbuisson, A., et al., Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development. *Differentiation* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.006>

ARTICLE IN PRESS

12

A. Larbuisson et al. / Differentiation ■ (■■■) ■■■-■■■

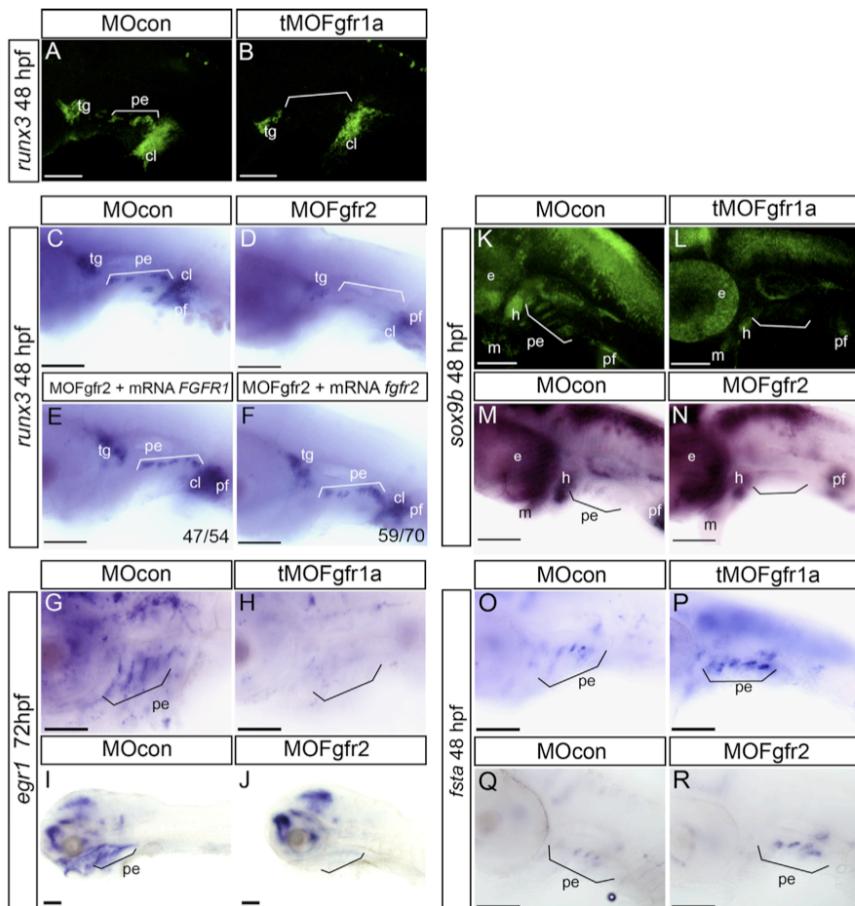


Fig. 11. Fgfr1a or Fgfr2 knockdown leads to decreased expression of *runx3*, *egr1* and *sox9b* in the pharyngeal endoderm. Lateral view, anterior to the left. At 48 hpf, *runx3* expression in the pharyngeal endoderm (pe) is absent in Fgfr1a and Fgfr2 morphants, whereas its expression is still observed in the clitellum (cl), the pectoral fin (pf) and in the trigeminal ganglia (tg) (B, D). Co-injection of *FGFR1* mRNA with morpholino against Fgfr2 restores *runx3* expression in pharyngeal endoderm at 48 hpf (E, n=59/70). Similarly, *runx3* mRNA expression is restored when *fgrf2* mRNA is co-injected with MOFgfr2 (F, n=47/54). At 72 hpf in both Fgfr1a and Fgfr2 morphants, *egr1* expression is absent in the pharyngeal endoderm (pe), while its expression is still present in the different parts of the brain (H,I) compared to control embryos (G,J). Compared to control embryos (K,M), the endodermal marker *sox9b* is absent in the pharyngeal endoderm of the ceratobranchial region at 48 hpf when Fgfr1a or Fgfr2 are downregulated (L,N). Moreover, *sox9b* expression is reduced in the mandibular (m) and hyoid region (h) in both receptor morphants (L,N). At 48 hpf, *fsta* expression in the pharyngeal endoderm is upregulated in *fgrf1a* and *fgrf2* morphants (P,R) compared to injected control embryos (O,Q). Scale bar: 100 μm.

ectopic expression of the receptors alone led to either no defect or an increase in cartilage formation.

When we investigated the effect of receptor depletion on chondrocyte differentiation, we observed that expression of *dlx2a* and of *sox9a* is maintained at 24 and 48 hpf. By double fluorescent *in situ* hybridization at 24, 30 and 48 hpf, we observed three types of domains within the ectomesenchymal condensations: one domain mostly consisting of cells expressing both *dlx2a* and *sox9a*, the other two formed of cells expressing either *dlx2a* or *sox9a*. One possible explanation for this observation would be that cells expressing first *dlx2a* only subsequently differentiate into cells expressing both factors and finally into *sox9a*-only expressing cells. Importantly, we did not observe a substantial modification of this combined expression pattern in Fgf receptor morphants, suggesting an absence of effect on developmental timing.

In contrast, expression of the late chondrocyte marker *runx2b* was completely abolished in the pharyngeal arches, indicating that cNCC formation, migration and early differentiation are not affected, while late maturation is absent.

In addition, we observe a decreased expression of *barx1* in the pharyngeal arches of both Fgfr1a and Fgfr2 morphants. In mouse, *Barx1* is expressed in cranio-facial ectomesenchyme and the stomach (Tissier-Seta et al., 1995), it is required for differentiation of the stomach epithelium by controlling expression of Wnt signaling inhibitors and for spleen morphogenesis (Woo et al., 2011). In zebrafish, *barx1* expression was observed in a subset of cNCC at 19 hpf, in the three streams of cranial neural crest at 24 hpf and in developing ectomesenchyme at later stages (Sperber and Dawid, 2008). Its expression was abolished in the presence of the Fgf inhibitor SU5402. Morphants for *Barx1* displayed a

Please cite this article as: Larbuisson, A., et al., Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development. *Differentiation* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.006>

ARTICLE IN PRESS

A. Larbuisson et al. / Differentiation ■ (■■■) ■■■-■■■

13

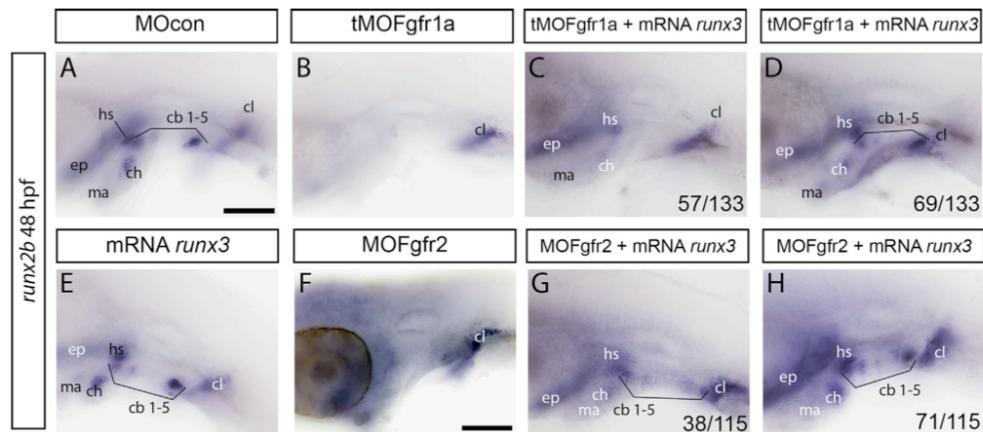


Fig. 12. Co-injection of *runx3* mRNA rescues the defects in tMOFgfr1 and MOFgfr2 morphants. Lateral views of *in situ* hybridizations, anterior to the left. At 48 hpf, *runx2b* expression is detected in the mandible (ma), in the ceratohyoid (ch), in the hyosympletic (hs), in ceratobrachials (cb1-5) and in the ethmoid plate (ep) (A, F) in control embryos, while it is only observed in the cleithrum (cl) in Fgfr1a or Fgfr2 morphants (B, E). Ectopic expression of *runx3* mRNA in Fgfr1a morphants restores expression of *runx2b* in the pharyngeal cartilages partially in 43% (*n*=57/133) of embryos (C) and completely in 52% (*n*=69/133) of injected embryos (D). Co-injection of *runx3* mRNA and MOFgfr2 restores wild type *runx2b* expression in 62% (*n*=71/115) of embryos (G), while 33% (*n*=38/115) of embryos present a decreased expression of *runx2b* (F). Injection of *runx3* mRNA alone does not affect *runx2b* expression in injected embryos (H). Scale bar: 100 μm.

deficiency in prechondrocyte aggregation and various defects in formation of the different pharyngeal cartilage elements. Expression of *dlx2a* and *sox9a* was maintained while *runx2b* expression was decreased. Barx1 was also shown to promote cartilage fate versus joint formation in the head (Nichols et al., 2013). Together with these observations, our results suggest that Barx1 is part of a regulatory cascade in developing chondrocytes required for expression of *runx2b* and subsequent maturation.

4.2. Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in head cartilage formation

At this point, it was important to determine the precise tissues that express these Fgf receptors at the stages beyond 24 hpf. We show that both Fgfr1a and Fgfr2 receptors are expressed in pharyngeal endoderm by double fluorescent *in situ* hybridization revealing their coexpression with the endodermal marker *nkx2.3*, while their expression domains are clearly distinct from those of cNCC markers such as *dlx2a* or *sox9a*. We further show that *fgrf1a* and *fgrf2* expression largely overlaps in pharyngeal endoderm at 48 hpf. This is consistent with the previously described expression for *fgrf1a* in the pharyngeal arches (Ota et al., 2010) and *fgrf2* in axial mesoderm and endoderm at 24 hpf (Tonou-Fujimori et al., 2002). In our experiments, *fgrf2* mRNA was weakly detected in the pharyngeal region at 24 hpf, but clearly observed at 48 hpf, suggesting that its endodermal expression starts around this stage. With the observed timing of the requirement for Fgf signaling around 30 hpf, this observation could explain the somewhat weaker effects observed upon Fgfr2 depletion. Earlier requirement for Fgf signaling in cNCCs during segmentation (Blentic et al., 2008) suggests the presence of an Fgf receptor at this stage in cNCCs, however the exact nature of this receptor was not determined.

Our loss of function studies reveal that both receptors act on the function of pharyngeal endoderm during chondrogenesis. Formation and initial patterning of pharyngeal pouches is not affected, as shown by the intact expression patterns of *nkx2.3* and *sox17*. Only a slight defect is observed at 48 hpf in segmentation of the most posterior pouch, which might arise as a secondary effect

due to the defects in cNCC differentiation. In contrast, expression of later markers of endodermal pouches, such as *runx3*, *egr1* and *sox9b* is severely reduced, indicating that the function of the mature endodermal pouches is abolished. Expression of the three transcription factors Runx3, Egr1 and Sox9b was recently shown to be required in pharyngeal endoderm to reduce expression of *fsta*, coding for the BMP inhibitor follistatin A (Dalcq et al., 2012). Consistent with this model, we observed a clear increase of *fsta* expression in Fgfr1a and Fgfr2 morphants. Furthermore, the defects observed in our receptor morphants could be rescued by expression of exogenous Runx3 or Egr1, indicating that the loss of this endodermal regulatory cascade is the major cause for cartilage defects in Fgfr1a or Fgfr2 morphants. Taken together, these observations suggest that the two Fgf receptors are required to initiate the regulatory cascade in pharyngeal endoderm that controls expression of *fsta*, and thus allows correct BMP signaling to the cNCC.

The various Fgf ligands bind to the different receptors with specific affinities and further variation is brought about by the presence of different splicing isoforms for Fgfr1, 2 and 3 (Zhang et al., 2006; Ornitz et al., 1996). Using the human FGFR isoforms, it appears that the two major Fgfs involved in cartilage formation, Fgfr3 and Fgfr8 are able to bind to at least one isoform of each receptor 1 or 2. The fact that loss of function of each Fgfr1a or Fgfr2 results in cartilage defects points at a non-redundant, specific function for each receptor, which could be brought about by specificity for a particular ligand or specificity in downstream signaling for each receptor. Our results showing that the defects caused by lack of one receptor can be rescued by expression of the other argue against such specificity. We also show that knockdown of one receptor does not affect expression of the other. Although we cannot completely rule out rescue of specific functions of one receptor by exogenous over expression of the other, we favor the explanation of a requirement for a precise amount of receptors to ensure activation of the regulatory cascade. Further support for this interpretation comes from the similarity of the defects observed upon knockdown of each receptor.

Considering the importance of Fgf signaling for the entire development (Itoh and Ornitz, 2011), specifically during segmentation, for

Please cite this article as: Larbuisson, A., et al., Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development. *Differentiation* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.006>

ARTICLE IN PRESS

14

A. Larbuisson et al. / Differentiation ■ (■■■) ■■■-■■■

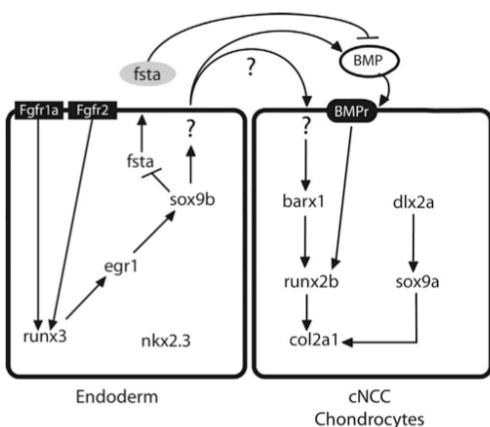


Fig. 13. Fgfr1a and Fgfr2 activate a regulatory cascade required to modulate Bmp-signaling during cranial cartilage development in zebrafish. Signaling model describing the regulatory cascades in pharyngeal endoderm and cNCCs. Fgf signaling through Fgfr1a and Fgfr2 present in pharyngeal endoderm initiate a regulatory cascade composed of the three transcription factors Runx3, Egr1 and Sox9b, which down-regulates *fsta* expression coding for a Bmp antagonist. This down-regulation allows Bmp ligands to bind to their receptor and induce *runx2b* expression in cranial neural crest cells (cNCC).

formation of the pharyngeal arches (Blentic et al., 2008; Crump et al., 2004), it seems surprising that the effects of *fgfr1a* or *fgfr2* knockdown are not more severe. Indeed, the general morphology of the morphants was not much affected, brain segmentation was normal, patterning of the pharyngeal endoderm was close to normal and the first markers for chondrocyte differentiation are present. This is in sharp contrast to the defects observed upon complete Fgf inhibition during segmentation (Crump et al., 2004). Assuming that knockdown of the receptors is probably not complete in our experiments, these observations indicate that the requirement for Fgfr1a and Fgfr2 during these early stages is less stringent and/or that their absence is more efficiently compensated by other members of the Fgfr family, such as Fgfr3.

In conclusion (Fig. 13), we show that Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 are expressed in zebrafish endodermal pouches beyond 24 hpf, where they are required to ensure activation of a regulatory cascade in pharyngeal endoderm. This cascade reduces expression of the BMP antagonist *fsta*, thereby allowing full activity of Bmp-signaling in the pharyngeal region to induce chondrocyte maturation in head cartilage.

Acknowledgments

This work was supported by the "Fonds de la Recherche Fondamentale Collective" projects 2.4555.99/ 2.4542.00/ 2.4561.10, the "Pôle d'Attraction Interuniversitaire (PAI): P5/35, the University of Liège, GAME project; the European Space Agency (ESA) and the Belgian Space Agency Prodex. A.L. was supported by the "Fonds National de la Recherche Scientifique" and the "Fonds Léon Frédéricq"; M.M. is a "Chercheur Qualifié du Fonds National de la Recherche Scientifique". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We also want to thank the sequencing and imaging platforms as well as the zebrafish facility of the GIGA-R center.

References

- Akimenko, M.A., Ekker, M., Wegner, J., Lin, W., Westerfield, M., 1994. Combinatorial expression of three zebrafish genes related to distal-less: part of a homeobox gene code for the head. *Journal of Neuroscience* 14, 3475–3486.
- Alexander, C., Zuniga, E., Blitz, I.L., Wada, N., Le Pabic, P., Javidan, Y., Zhang, T., Cho, K.W., Crump, J.G., Schilling, T.F., 2011. Combinatorial roles for BMPs and Endothelin 1 in patterning the dorsal-ventral axis of the craniofacial skeleton. *Development* 138, 5135–5146.
- Alexander, J., Rothenberg, M., Henry, G.L., Stainier, D.Y., 1999. Casanova plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish. *Developmental Biology* 215, 343–357.
- Baldridge, D., Shchelochkov, O., Kelley, B., Lee, B., 2010. Signaling pathways in human skeletal dysplasias. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 11, 189–217.
- Barrallo-Gimeno, A., Holzschuh, J., Driever, W., Knapik, E.W., 2004. Neural crest survival and differentiation in zebrafish depends on mont blanc/fafp2a gene function. *Development* 131, 1463–1477.
- Blentic, A., Tandon, P., Payton, S., Walše, J., Carney, T., Kelsh, R.N., Mason, I., Graham, A., 2008. The emergence of ectomesenchyme. *Developmental Dynamics* 237, 592–601.
- Close, R., Toro, S., Martial, J.A., Muller, M., 2002. Expression of the zinc finger Egr1 gene during zebrafish embryonic development. *Mechanisms of Development* 118, 269–272.
- Crump, J.G., Maves, L., Lawson, N.D., Weinstein, B.M., Kimmel, C.B., 2004. An essential role for Fgfs in endodermal pouch formation influences later craniofacial skeletal patterning. *Development* 131, 5703–5716.
- Dalcq, J., Pasque, V., Ghaye, A., Larbuisson, A., Motte, P., Martial, J.A., Muller, M., 2012. Runx1, Egr1 and Sox9b form a regulatory cascade required to modulate BMP-signaling during cranial cartilage development in zebrafish. *PLOS One* 7, e50140.
- David, N.B., Saint-Etienne, L., Tsang, M., Schilling, T.F., Rosa, F.M., 2002. Requirement for endoderm and FGF3 in ventral head skeleton formation. *Development* 129, 4457–4468.
- Flores, M.V., Lam, E.Y., Crosier, K.E., Crosier, P.S., 2008. Osteogenic transcription factor Runx2 is a maternal determinant of dorsoventral patterning in zebrafish. *Nature Cell Biology* 10, 346–352.
- Flores, M.V., Lam, E.Y., Crosier, P., Crosier, K., 2006. A hierarchy of Runx transcription factors modulate the onset of chondrogenesis in craniofacial endochondral bones in zebrafish. *Developmental Dynamics* 235, 3166–3176.
- Flores, M.V., Tsang, V.W., Hu, W., Kalev-Zylinska, M., Postlethwait, J., Crosier, P., Crosier, K., Fisher, S., 2004. Duplicate zebrafish runx2 orthologues are expressed in developing skeletal elements. *Gene Expression Patterns* 4, 573–581.
- Goldring, M.B., Tsuchimochi, K., Ijiri, K., 2006. The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* 97, 33–44.
- Hall, C., Flores, M.V., Murison, G., Crosier, K., Crosier, P., 2006. An essential role for zebrafish Fgfr1 during gill cartilage development. *Mechanisms of Development* 123, 925–940.
- Hung, I.H., Yu, K., Lavine, K.J., Ornitz, D.M., 2007. FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopodium. *Developmental Biology* 307, 300–313.
- Itoh, N., 2007. The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30, 1819–1825.
- Itoh, N., Ornitz, D.M., 2008. Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Developmental Dynamics* 237, 18–27.
- Itoh, N., Ornitz, D.M., 2011. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *Journal of Biochemistry* 149, 121–130.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203, 253–310.
- Kluver, N., Kondo, M., Herpin, A., Mitani, H., Schartl, M., 2005. Divergent expression patterns of Sox9 duplicates in teleosts indicate a lineage specific subfunctionalization. *Developmental Genes and Evolution* 215, 297–305.
- Knight, R.D., Schilling, T.F., 2006. Cranial neural crest and development of the head skeleton. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 589, 120–133.
- Lee, K.H., Xu, Q., Breitbart, R.E., 1996. A new tinman-related gene, nckx2.7, anticipates the expression of nckx2.5 and nckx2.3 in zebrafish heart and pharyngeal endoderm. *Developmental Biology* 180, 722–731.
- Lee, Y., Grill, S., Sanchez, A., Murphy-Ryan, M., Poss, K.D., 2005. Fgf signaling instructs position-dependent growth rate during zebrafish fin regeneration. *Development* 132, 5173–5183.
- Nakayama, Y., Miyake, A., Nakagawa, Y., Mido, T., Yoshikawa, M., Konishi, M., Itoh, N., 2008. Fgf19 is required for zebrafish lens and retina development. *Developmental Biology* 313, 752–766.
- Nichols, J.T., Pan, L., Moens, C.B., Kimmel, C.B., 2013. barx1 represses joints and promotes cartilage in the craniofacial skeleton. *Development* 140, 2765–2775.
- Nie, X., Luukko, K., Kettunen, P., 2006. FGF signalling in craniofacial development and developmental disorders. *Oral Diseases* 12, 102–111.
- Nissen, R.M., Yan, J., Amsterdam, A., Hopkins, N., Burgess, S.M., 2003. Zebrafish foxi one modulates cellular responses to Fgf signaling required for the integrity of ear and jaw patterning. *Development* 130, 2543–2554.

Please cite this article as: Larbuisson, A., et al., Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development. *Differentiation* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.006>

ARTICLE IN PRESS

A. Larbuission et al. / Differentiation ■ (■■■) ■■■-■■■

15

- Ornitz, D.M., Itoh, N., 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2. (Reviews 3001–3005, 3012).
- Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G., Goldfarb, M., 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *Journal of Biological Chemistry* 271, 15292–15297.
- Ota, S., Tonou-Fujimori, N., Nakayama, Y., Ito, Y., Kawamura, A., Yamasu, K., 2010. FGF receptor gene expression and its regulation by FGF signaling during early zebrafish development. *Genesis* 48, 707–716.
- Piotrowski, T., Nusslein-Volhard, C., 2000. The endoderm plays an important role in patterning the segmented pharyngeal region in zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Biology* 225, 339–356.
- Robu, M.E., Larson, J.D., Nasevicius, A., Beiraghi, S., Brenner, C., Farber, S.A., Ekker, S.C., 2007. p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genetics* 3, e78.
- Rohner, N., Bercsenyi, M., Orban, L., Kolanczyk, M.E., Linke, D., Brand, M., Nusslein-Volhard, C., Harris, M.P., 2009. Duplication of fgfr1 permits Fgf signaling to serve as a target for selection during domestication. *Current Biology* 19, 1642–1647.
- Sakaguchi, T., Kikuchi, Y., Kuroiwa, A., Takeda, H., Stainier, D.Y., 2006. The yolk syncytial layer regulates myocardial migration by influencing extracellular matrix assembly in zebrafish. *Development* 133, 4063–4072.
- Schilling, T.F., Kimmel, C.B., 1994. Segment and cell type lineage restrictions during pharyngeal arch development in the zebrafish embryo. *Development* 120, 483–494.
- Schilling, T.F., Piotrowski, T., Grandel, H., Brand, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Beuchle, D., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Mullins, M.C., van Eeden, F.J., Kelsh, R.N., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Odenthal, J., Warga, R.M., Trowe, T., Nusslein-Volhard, C., 1996. Jaw and branchial arch mutants in zebrafish I: branchial arches. *Development* 123, 329–344.
- Scholpp, S., Groth, C., Lohs, C., Lardelli, M., Brand, M., 2004. Zebrafish fgfr1 is a member of the fgf8 syneexpression group and is required for fgf8 signalling at the midbrain–hindbrain boundary. *Development Genes and Evolution* 214, 285–295.
- Sperber, S.M., Dawid, I.B., 2008. barx1 is necessary for ectomesenchyme proliferation and osteochondroprogenitor condensation in the zebrafish pharyngeal arches. *Developmental Biology* 321, 101–110.
- Sperber, S.M., Saxena, V., Hatch, G., Ekker, M., 2008. Zebrafish dlx2a contributes to hindbrain neural crest survival, is necessary for differentiation of sensory ganglia and functions with dlx1a in maturation of the arch cartilage elements. *Developmental Biology* 314, 59–70.
- Thisse, B., Thisse, C., 2005. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Developmental Biology* 287, 390–402.
- Thummel, R., Bai, S., Sarras Jr., M.P., Song, P., McDermott, J., Brewer, J., Perry, M., Zhang, X., Hyde, D.R., Godwin, A.R., 2006. Inhibition of zebrafish fin regeneration using *in vivo* electroporation of morpholinos against fgfr1 and msxb. *Developmental Dynamics* 235, 336–346.
- Tissier-Seta, J.P., Mucchelli, M.L., Mark, M., Mattei, M.G., Goridis, C., Brunet, J.F., 1995. Barx1, a new mouse homeodomain transcription factor expressed in cranio-facial ectomesenchyme and the stomach. *Mechanisms of Development* 51, 3–15.
- Tonou-Fujimori, N., Takahashi, M., Onodera, H., Kikuta, H., Koshida, S., Takeda, H., Yamasu, K., 2002. Expression of the FGF receptor 2 gene (fgfr2) during embryogenesis in the zebrafish *Danio rerio*. *Mechanisms of Development* 119S, S173–S178.
- Trokoovic, N., Trokovic, R., Mai, P., Partanen, J., 2003. Fgfr1 regulates patterning of the pharyngeal region. *Genes and Development* 17, 141–153.
- Trueb, B., Taeschler, S., 2006. Expression of FGFR1L, a novel fibroblast growth factor receptor, during embryonic development. *International Journal of Molecular Medicine* 17, 617–620.
- Walshe, J., Mason, I., 2003. Fgf signalling is required for formation of cartilage in the head. *Developmental Biology* 264, 522–536.
- Westerfield, M., 2007. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 5th Edition University of Oregon Press, Eugene.
- Woo, J., Miletich, I., Kim, B.M., Sharpe, P.T., Shivdasani, R.A., 2011. Barx1-mediated inhibition of Wnt signalling in the mouse thoracic foregut controls tracheo-esophageal septation and epithelial differentiation. *PLoS One* 6, e22493.
- Yan, Y.L., Miller, C.T., Nissen, R.M., Singer, A., Liu, D., Kirn, A., Draper, B., Willoughby, J., Morcos, P.A., Amsterdam, A., Chung, B.C., Westerfield, M., Haffter, P., Hopkins, N., Kimmel, C., Postlethwait, J.H., 2002. A zebrafish sox9 gene required for cartilage morphogenesis. *Development* 129, 5065–5079.
- Yan, Y.L., Willoughby, J., Liu, D., Crump, J.G., Wilson, C., Miller, C.T., Singer, A., Kimmel, C., Westerfield, M., Postlethwait, J.H., 2005. A pair of Sox: distinct and overlapping functions of zebrafish sox9 co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development. *Development* 132, 1069–1083.
- Zhang, X., Tahiri, O.A., Olsen, S.K., Umemori, H., Mohammadi, M., Ornitz, D.M., 2006. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *Journal of Biological Chemistry* 281, 15694–15700.

Please cite this article as: Larbuission, A., et al., Fgf receptors Fgfr1a and Fgfr2 control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development. *Differentiation* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.006>

9.1 Résultats supplémentaires

Afin de compléter notre étude portant sur les Fgfr1a et Fgfr2, nous avons déterminé si l'injection des morpholinos engendrait une apoptose non spécifique. Ensuite, nous nous sommes intéressés aux autres voies de signalisation connues pour être impliquées dans la chondrogenèse : BMP et Shh.

9.1.1 L'injection de morpholinos MOFgfr1a et MOFgfr2 n'affecte pas l'apoptose non spécifique.

L'injection de morpholinos peut dans certains cas engendrer des effets non spécifiques à la séquence injectée, ce qui se traduit par une augmentation de l'apoptose induite par p53 (Robu, Larson et al. 2007). Afin de contrecarrer cet effet, nous avons toujours co-injecté les morpholinos dirigés contre les récepteurs avec celui dirigé contre p53 dans les expériences présentées dans l'article. Pour en avoir le cœur net, nous avons aussi comparé les embryons injectés avec et sans le MOp53 et nous avons visualisé les cellules en apoptose à 48 hpf par coloration à l'acridine orange (Fig. 18A-H). Très peu de mort cellulaire est détectée dans la région pharyngienne, que ce soit dans les embryons contrôles (Fig. 18A,C) ou les morphants pour un des récepteurs (Fig.18E,G); aucune modification n'a été observée après co-injection du MOp53.

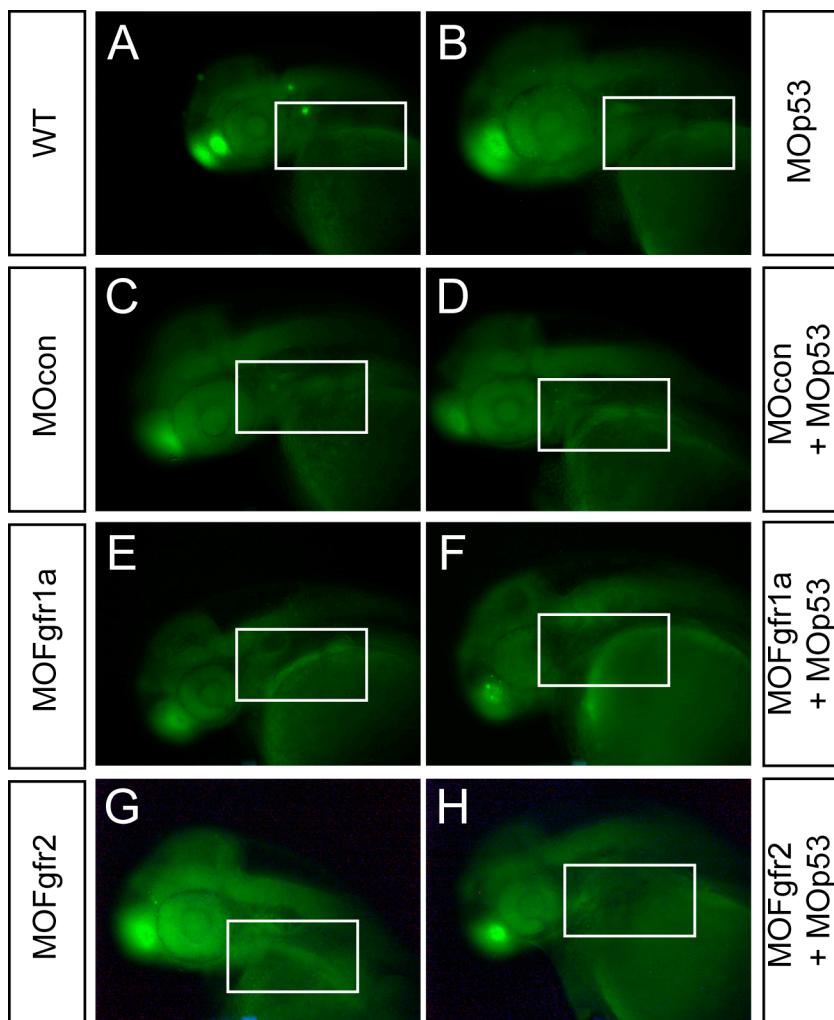


Figure 18 : Comparaison de l'apoptose entre embryons morphants injectés avec et sans morpholino dirigé contre p53. Antérieur à gauche et vue latérale. Peu d'apoptose est détectée dans la région pharyngienne (rectangle blanc) des embryons injectés uniquement avec les morpholinos contrôles ou dirigés contre un des deux récepteurs (A,C,E,G). La co-injection du morpholino MOp53 avec les morpholinos contrôles, MOFgfr1a ou MOFgfr2 ne modifie pas l'apoptose dans la région pharyngienne à 48 hpf (rectangle blanc ; B,D,F,H).

9.1.2 Le knockdown de l'expression de Fgfr1a ou Fgfr2 n'affecte pas l'expression endodermique de *bmp4*.

Nous avons voulu vérifier si ces mêmes récepteurs n'auraient pas un effet direct sur l'expression des BMPs dans l'endoderme pharyngien. Les BMPs impliqués dans la maturation des chondrocytes ont été identifiés et sont Bmp2, Bmp4, Bmp6 et Bmp7 (Nishimura, Hata et al. 2012). Ces différents BMPs contrôlent l'expression des gènes tels que *runx2b*, *sox9*, *osterix*,...

C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à Bmp4. A 48 hpf, *bmp4* est exprimé dans le cœur des embryons de zebrafish, mais également dans

l'endoderme pharyngien (Fig. 19A) ainsi que dans la partie ventrale de l'ectoderme pharyngien. En outre, ce ligand contribue à l'expression de *barx1* dans les chondrocytes de la région pharyngienne (Sperber and Dawid 2008). Lors de l'injection de morpholinos dirigés respectivement contre *fgfr1a* et *fgfr2*, aucune modification du profil d'expression de *bmp4* n'est observée dans l'endoderme pharyngien des embryons (Fig. 19B,C) en comparaison avec les embryons contrôles.

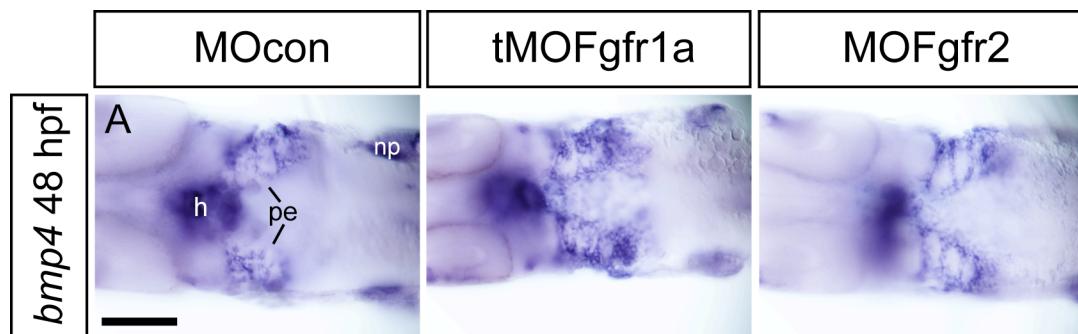


Figure 19 : Les récepteurs Fgfr1a et Fgfr2 ne sont pas impliqués dans l'expression de *bmp4* au niveau de l'endoderme pharyngien. Antérieur à gauche et vue ventrale. A 48 hpf, les transcrits *bmp4* sont exprimés au niveau du cœur (h), de l'endoderme pharyngien (pe) mais également au niveau de la nageoire pectorale (np) des embryons contrôles (A). Ces domaines d'expression sont également présents dans les morphants pour *fgfr1a* (B) ou *fgfr2* (C). Echelle : 100 µm.

9.1.3 Le profil d'expression de Sonic Hedgehog (*shh*) n'est pas affecté dans les morphants *fgfr1a* et *fgfr2*.

A 48 heures de développement chez le zebrafish, le transcript sonic hedgehog (*shh*) est observé dans le cerveau, dans la notochorde, au niveau de l'épithélium oral et dans l'endoderme pharyngien (Fig. 20A). La réduction de l'expression des gènes *fgfr1a* ou *fgfr2* (Fig. 20B,C) ne modifie en rien le profil d'expression de *shh* dans tous ses domaines d'expression tant au niveau du cerveau que de la région pharyngienne.

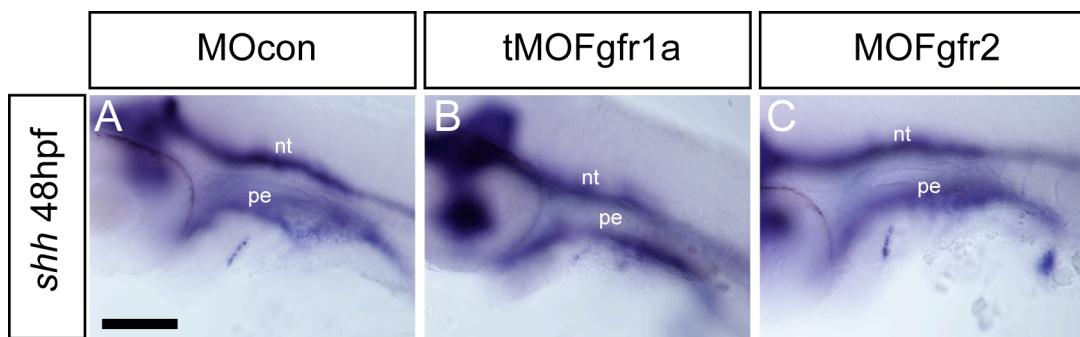


Figure 20 : L'expression des transcrits *shh* n'est pas modifiée à 48 hpf après knockdown de *fgfr1a* ou *fgfr2*. Antérieur à gauche et vue latérale. Les embryons contrôles (A) présentent, à 48 hpf, un profil d'expression de *shh* au niveau du cerveau, de la notochorde (nt) et de l'endoderme pharyngien (pe). Lors de la diminution d'expression des récepteurs 1a et 2 (B,C), aucune modification de ce profil d'expression n'est observée. Echelle : 100 µm.

9.2 Discussion partim *Fgfr1a* et *Fgfr2*

La chondrogenèse menant à la synthèse de matrice cartilagineuse est un processus complexe impliquant différents tissus dans lequel interviennent de multiples voies de signalisation toutes aussi importantes les unes que les autres. Lors de la formation du chondrocrâne, les CCNc vont migrer et se différencier au niveau de poches endodermiques pharyngiennes. Afin de comprendre ce mécanisme, nous avons mis en évidence l'implication de la signalisation Fgf par l'étude de la fonction de ses récepteurs.

Lors de notre étude portant sur l'implication des *Fgfr1a* et *Fgfr2* dans la chondrogenèse (Larbuission et al), nous avons mis en évidence que ces deux récepteurs sont exprimés dans l'endoderme pharyngien entre 24 hpf et 3 dpf. Des expériences d'inhibition de la voie des Fgf par l'utilisation d'un transgénique dominant négatif pour les *Fgfr* nous ont permis de déterminer que la signalisation Fgf joue un rôle prépondérant aux alentours de 30 hpf de développement dans la formation des cartilages pharyngiens. A ce stade, l'endoderme pharyngien est le siège d'une cascade génétique impliquant les facteurs Runx3-Egr1-Sox9b-Fsta participant à la régulation de la signalisation BMP, elle-même nécessaire pour induire l'expression de *runx2b* et la maturation tardive des chondrocytes.

Nous avons dès lors entrepris d'étudier le rôle des deux récepteurs *Fgfr1a* et *Fgfr2* dans ces processus en bloquant leur expression par injection de morpholinos. Le knock-down de chacun des deux récepteurs a provoqué des défauts considérables dans la formation des cartilages pharyngiens. Dans certains cas,

l'injection de morpholinos peut engendrer des effets non spécifiques qui ont tendance à provoquer l'apoptose par l'induction de p53 (Robu, Larson et al. 2007). Afin de contrebalancer cet effet, nous avons co-injecté nos morpholinos avec celui dirigé contre p53 et nous n'avons pas observé de différences significatives dans les défauts générés. De plus, nous avons remarqué l'absence de modifications dans le marquage à l'acridine orange sur les morphants *fgfr1a* ou *fgfr2*. Nous en concluons que les effets cartilagineux observés après diminution de l'expression des récepteurs *fgfr1a* et *fgfr2* ne peuvent être imputés à une augmentation de l'apoptose résultant de l'injection des morpholinos. De plus, la spécificité des défauts observés pour le récepteur ciblé est montrée par le fait que nous avons injecté plusieurs morpholinos dirigés contre l'expression de ce même récepteur. Nous pouvons également dire que les résultats obtenus sont bien spécifiques car lors des expériences de récupérations d'expression par co-injection d'ARNm et de morpholinos, nous récupérons un phénotype « sauvage » des cartilages.

Nous avons ensuite montré que ces deux récepteurs n'influencent pas la migration ni les premières étapes de la différenciation des CCNc en chondrocytes, mais qu'ils sont nécessaires pour l'expression des facteurs Runx3, Egr1 et Sox9b dans l'endoderme et de Runx2b dans les précurseurs des chondrocytes. Des expériences de récupération de phénotype ("rescue") ont ensuite révélé que la cascade régulatrice dans l'endoderme est activée par la voie Fgf et requiert la présence des récepteurs Fgfr1a et Fgfr2. De manière intéressante, l'absence de chacun des deux récepteurs peut être compensée par l'injection d'ARNm codant pour l'un ou l'autre, indiquant que c'est moins l'identité exacte du récepteur qui est importante, mais plutôt la quantité absolue de récepteurs Fgf dans l'endoderme. Cette conclusion est encore renforcée par notre observation que le récepteur humain FGFR1 est capable de restaurer les défauts dans les morphants Fgfr1a ou Fgfr2. Nous disposons ainsi d'une méthode simple pour évaluer la fonctionnalité de récepteurs humains mutants humains qui seraient identifiés dans des patients.

Au niveau des CCNc, les récepteurs Fgfr1a et Fgfr2 contrôlent aussi la condensation des chondrocytes par l'intermédiaire du facteur Barx1. L'expression de *barx1*, absente des morphants, peut être restituée par l'injection d'ARNm pour Runx3; elle dépend donc aussi de l'intégrité de la cascade régulatrice dans l'endoderme. D'autre part, il était connu que Barx1 est requis pour l'expression de Runx2b dans les CCNc (Sperber and Dawid 2008). Nous pouvons donc introduire

Barx1 comme un nouvel acteur dans les CCNc dont l'expression dépend de l'intensité du signal BMP et qui active celle de Runx2b.

Par la suite, nous avons encore exploré d'autres voies qui seraient potentiellement influencées par la signalisation Fgf. Ainsi, BMP4 est impliqué dans la maturation et la prolifération des chondrocytes et participe au contrôle de l'expression de gènes participant à la chondrogenèse tels que *runx2b*, *sox9*, *osterix* (Shum, Wang et al. 2003; Hatakeyama, Tuan et al. 2004; Zuniga, Rippen et al. 2011) (Nishimura, Hata et al. 2012). Nous avons montré que les récepteurs Fgfr1a et Fgfr2 activent au sein de l'endoderme une cascade de facteurs de transcription qui aboutit à la répression de l'expression de la *fsta* après 24 hpf comme montré précédemment au laboratoire (Dalcq, Pasque et al. 2012). L'absence de modification du profil d'expression de *BMP4*, dans les morphants des récepteurs Fgfr1a et Fgfr2, nous conforte dans l'idée que la signalisation Fgf n'influence pas directement la signalisation BMP aux stades étudiés mais que son rôle après 24 hpf pourrait consister à agir par l'intermédiaire de Fsta. Nous devrions confirmer cette hypothèse par l'étude des autres BMP connus pour leur implication dans la chondrogenèse ainsi que l'étude de leurs récepteurs. Nous pouvons toutefois affirmer que la voie des Fgf et celle des BMP sont toutes deux primordiales pour le bon déroulement de la chondrogenèse et que l'absence d'une des deux ne peut être compensée par l'autre. Notre travail fournit un nouvel exemple de voies de signalisation interagissant les unes avec les autres.

Une autre signalisation importante pour le développement des cartilages pharyngiens est celle de Sonic Hedgehog (Shh). L'absence de signal Shh engendre la perte des éléments cartilagineux crâniens chez le zebrafish (Schwend and Ahlgren 2009). De plus, un lien entre la signalisation Shh et Fgf a été mis en évidence. En effet, dans la région pharyngienne du poulet, l'expression du ligand *fgf8* serait sous le contrôle de Shh (Haworth, Wilson et al. 2007). L'absence de modification dans l'expression de *shh* après knockdown des *fgfr1a* et *fgfr2* est en accord avec l'idée que la signalisation Fgf se trouve en aval de celle de Shh pendant cette période. Un mutant de la signalisation Shh (*disp1*) n'exprime pas les gènes *dlx2a*, *sox9a* et *barx1* (Schwend and Ahlgren 2009), spécifiques des CCNc, tandis que nous avons observé que la diminution d'activité de la signalisation Fgf par les Fgfr1a et Fgfr2 engendre l'absence d'expression de *barx1* sans modifier celle de *dlx2a*, *sox9a*. Nous pouvons

en conclure que la signalisation Fgf a également un rôle dans la chondrogenèse indépendamment ou en aval de la signalisation Shh.

En résumé, nous pouvons conclure que les trois voies de signalisation Fgf, BMP et Shh sont étroitement liées les unes aux autres par des fonctions complémentaires à la chondrogenèse. De plus, chacune des voies a des fonctions qui lui sont propres et qui ne peuvent être compensées par une autre voie.

10 Rôles du récepteur 3 des Fgfs dans la formation des cartilages pharyngiens chez le zebrafish

10.1 Profil d'expression *fgfr3*.

Comme décrit précédemment (Ota, Tonou-Fujimori et al. 2010), les transcrits *fgfr3* sont observés à 24 hpf dans le diencéphale et dans la partie postérieure du rhombomère 1 (voir intro et Fig. 21A). Ces domaines d'expression de *fgfr3* sont maintenus lors du développement embryonnaire jusqu'à 32 hpf (Fig. 21B) et à 48 hpf. À ce dernier stade, on observe aussi des transcrits *fgfr3* au niveau de la notochorde (nt), tandis qu'aucune expression n'est observée dans la région pharyngienne (rp) (Fig. 21C) par hybridation *in situ* visible.

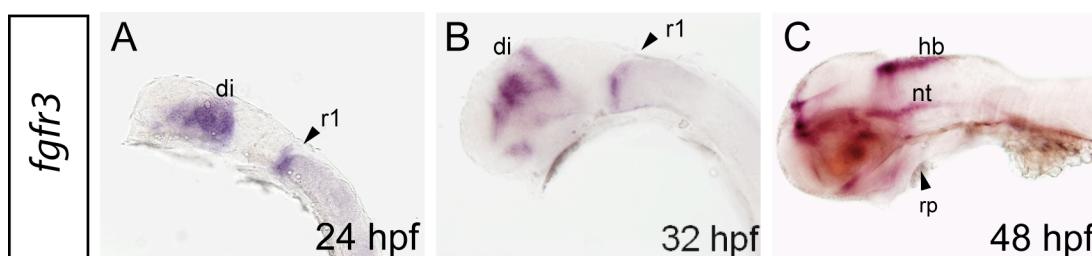


Figure 21 : Profil d'expression de *fgfr3* lors du développement embryonnaire du zebrafish. Vue latérale, antérieur à gauche. A 24 hpf, l'expression de *fgfr3* est observée au niveau du diencéphale (di), dans la partie postérieure du rhombomère 1 (r1) en se prolongeant dans le tube neural. A 32 hpf, son expression persiste dans le diencéphale et le cerveau ainsi que dans le rhombomère 1. A 48 hpf, les domaines d'expression des transcrits *fgfr3* dans le cerveau sont définis plus précisément. De plus, on peut observer des ARNm *fgfr3* dans la notochorde (nt) et le cerveau postérieur (hb) tandis qu'aucune expression n'est observée dans la région pharyngienne (rp).

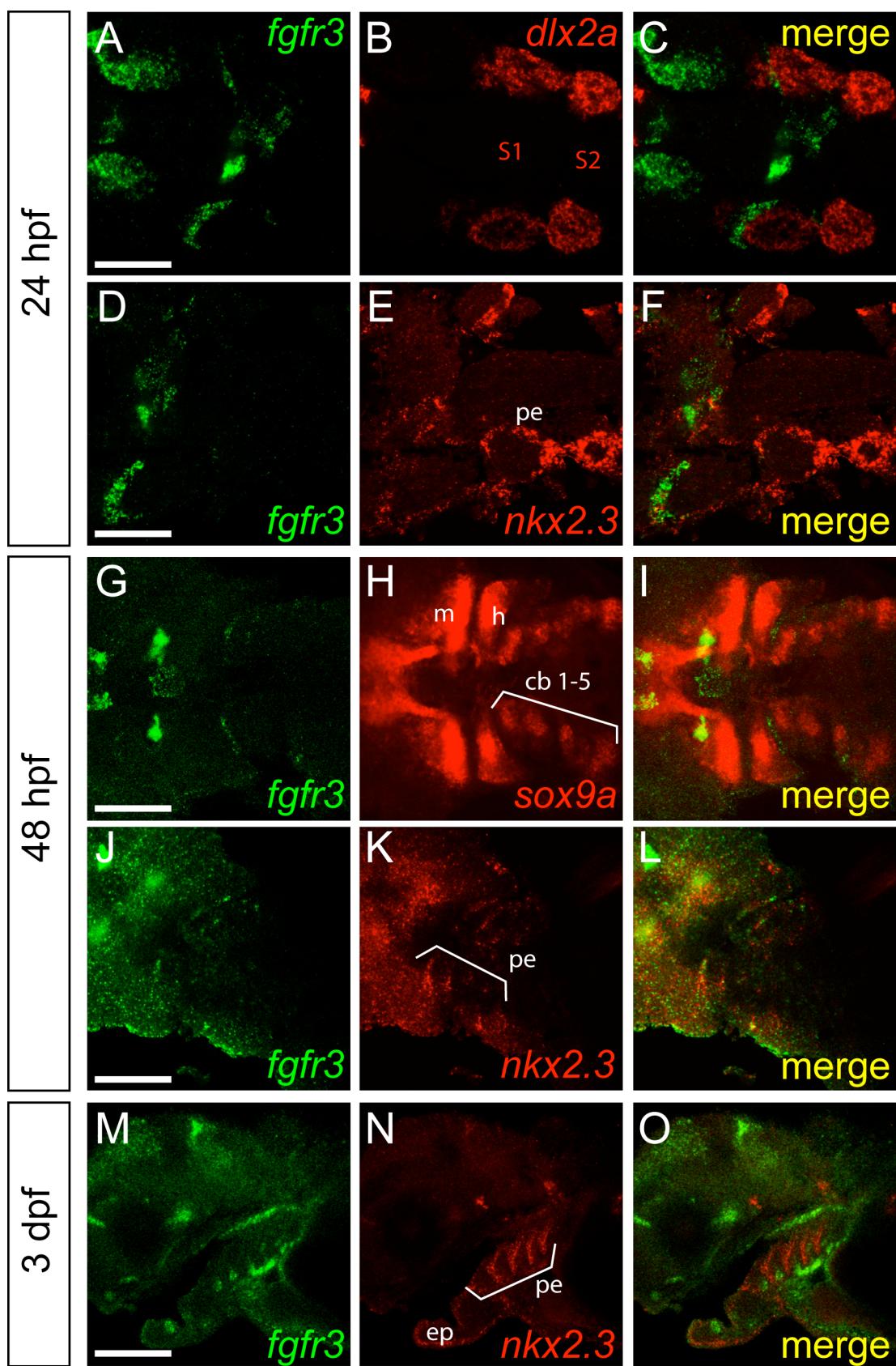
Afin de déterminer avec précision les tissus dans lesquels le récepteur 3 est exprimé, nous avons réalisé des doubles hybridations *in situ* fluorescentes avec différents marqueurs.

A 24 hpf, nous avons confirmé que le récepteur 3 est exprimé dans le diencéphale, mais également dans l'œil (Fig. 22A). De plus, à ce stade, des ARNm *fgfr3* (vert) sont détectés dans des domaines entourant les amas des CCNc marquées par *dlx2a* (rouge ; Fig. 22A-C). On constate également qu'à 24 hpf, les domaines d'expression de *fgfr3* (vert) correspondent à ceux du marqueur de l'endoderme pharyngien (pe) *nkx2.3* (Fig. 22D-F) au niveau de la partie antérieure de la première poche endodermique et que quelques cellules coexpriment les deux gènes.

A 48 hpf, en plus de l'expression dans le cerveau, une faible expression des transcrits *fgfr3* est observée autour des domaines d'expression de *sox9a* (rouge Fig. 22H) dans les chondrocytes des arcs cérotobranchiaux (cb 1-5). Cette expression coïncide avec l'expression de *nkx2.3* au niveau des poches endodermiques (Fig. 22J-L).

A 3dpf, *nkx2.3* (rouge ; Fig. 22N) marque l'endoderme des poches endodermiques mais aussi l'épithélium oral (ep). A ce stade, les transcrits *fgfr3* sont présents fortement dans l'ectoderme oral et, dans la région pharyngienne, faiblement entre les domaines *nkx2.3* (Fig. 22O).

Figure. 22 : *fgfr3* est exprimé dans l'endoderme pharyngien jusqu'à 48 hpf et dans les chondrocytes à 3 dpf. Vue ventrale (A-L), vue latérale (M-O), antérieure à gauche. A 24 hpf, l'expression du récepteur 3 est détectée au niveau des yeux et du diencéphale. On observe également des transcrits *fgfr3* dans la partie antérieure de la première poche endodermique entourant le premier amas des CCNc (S1, A-C). De plus, ce domaine d'expression correspond au domaine d'expression du facteur de transcription *nkx2.3* dans l'endoderme pharyngien (pe ; E) où quelques cellules coexpriment les deux gènes (F). A 48 hpf, l'expression des ARNm *fgfr3* est observée dans des domaines entourant ceux de *sox9a* dans les chondrocytes (G-I) des arcs cérotobranchiaux et dans les mêmes domaines d'expression que *nkx2.3* dans l'endoderme pharyngien (J-L). Toutefois, à 3 jours de développement, l'expression du récepteur 3 ne colocalise plus avec celle de *nkx2.3* dans l'endoderme pharyngien mais l'expression du récepteur se retrouve entre les domaines d'expression du marqueur de l'endoderme (M-O). ep : épithélium oral. Echelle : 100 µm.



10.2 Implication de *fgfr3* dans la chondrogenèse

10.2.1 Le knockdown de *fgfr3* affecte la formation du cartilage

Afin de déterminer si *fgfr3* joue un rôle dans la chondrogenèse, nous avons injecté un morpholino d'épissage contre ce récepteur au stade une cellule et laissé les embryons se développer jusque 4 dpf avant de réaliser un marquage à l'Alcian Blue.

A 4 dpf, les embryons injectés avec un morpholino contrôle présentent un phénotype cartilagineux du type sauvage (Fig. 23A,E). Dans ces morphants, 100% des embryons présentent toutes les pièces de cartilage du viscérocrâne : le cartilage de Meckel (m), le palatocarré (pq), le cératohyoïde (ch), l'hyosymplectique (hs), les arcs cératobranchiaux 1 à 5 (cb 1-5). L'injection du morpholino dirigé contre *fgfr3* engendre la modification des cartilages dans la région pharyngienne de différentes manières. Trois types de profils ont été relevés allant de la modification légère (Fig. 23B,F) à une absence totale de cartilage (Fig. 23D). 40 % des embryons injectés avec MOFgfr3 présentent un raccourcissement de la mandibule formée du cartilage de Meckel et du palatocarré, une modification de l'axe de l'hyoïde et une diminution des cartilages cératobranchiaux (Fig. 23B,E). L'absence des arcs cératobranchiaux n'est observée que dans 44% des morphants *fgfr3*, tandis que la mandibule et l'hyoïde restent inchangés (Fig. 23C,G). De plus, l'absence totale de cartilages pharyngiens est obtenue dans 11% des embryons knockdown pour le récepteur 3 (Fig. 23D).

Afin de confirmer que les effets observés sont bien le résultat de la diminution de l'expression du récepteur 3 et non d'un effet « off-target » du morpholino, nous avons co-injecté avec le MOFgfr3 un morpholino dirigé contre p53 (molécule impliquée dans le mécanisme d'apoptose) afin d'inhiber l'apoptose résultant potentiellement d'effets non spécifiques. Dans ce cas, nous avons obtenu des résultats similaires à l'injection du MOFgfr3 seul : 38% des embryons doublement injectés présentent des défauts légers, 37% des défauts moyens et 25% sont sévèrement affectés. De plus, l'injection de MOp53 seul n'influence pas la formation des cartilages pharyngiens.

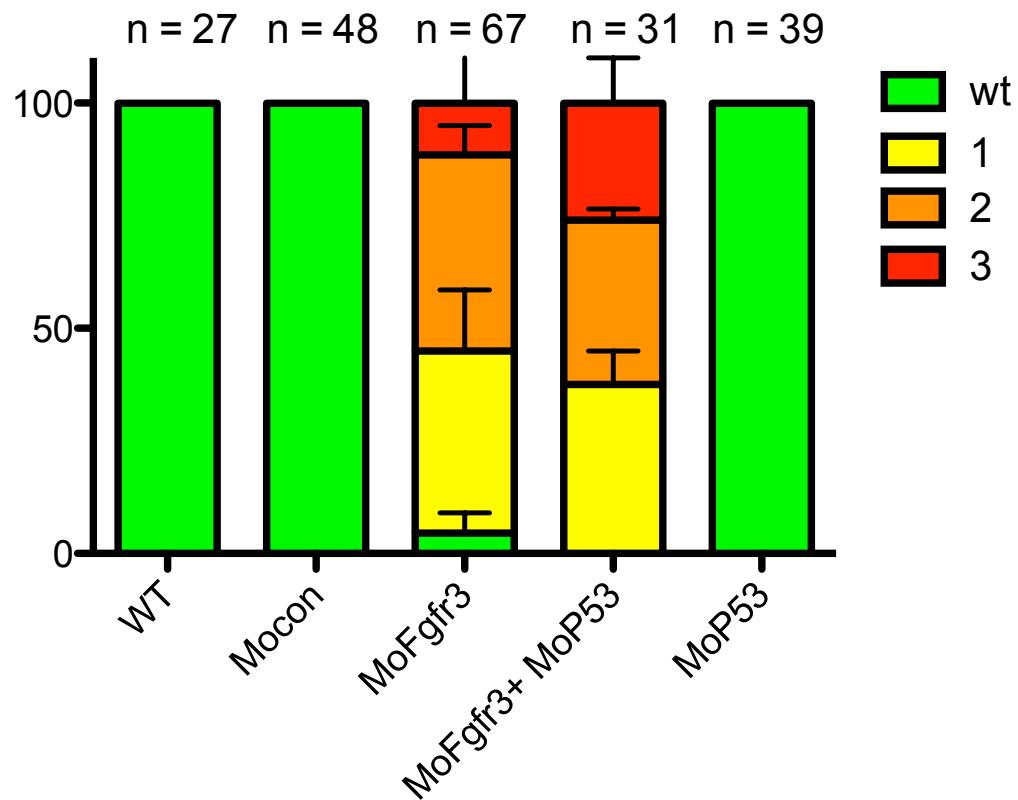
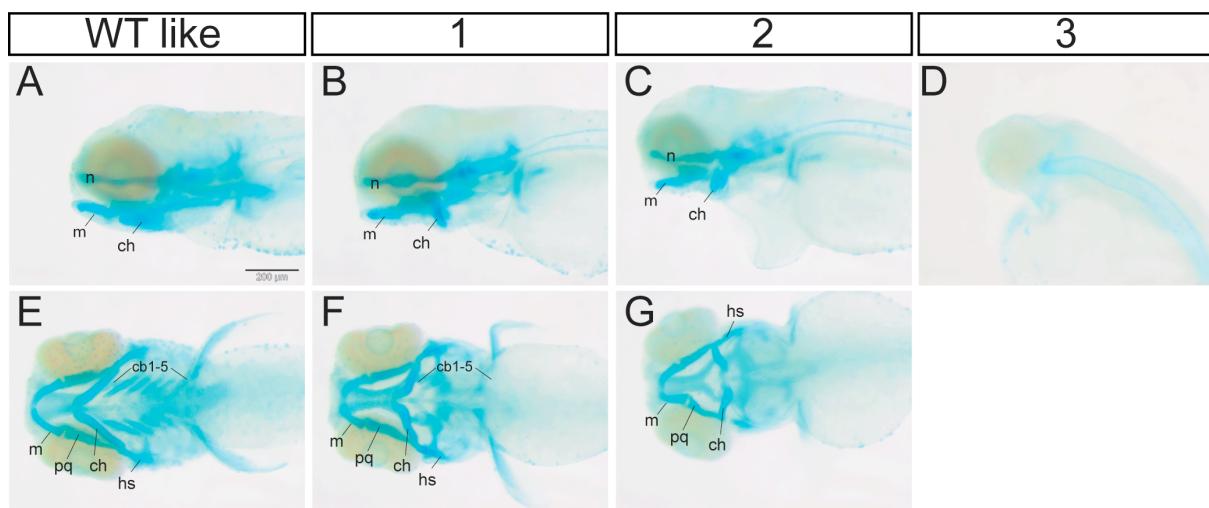


Figure 23 : Le knock down de l'expression de *fgfr3* engendre une modification des éléments cartilagineux de la région pharyngienne. A-D : vue latérale, E-G : vue ventrale. Les embryons non injectés, ceux injectés avec un morpholino contrôle et avec celui dirigé contre *p53* ne subissent aucune modification des différents éléments cartilagineux pharyngiens et présentent un phénotype « sauvage » (A, E ; 1). L'injection du morpholino dirigé contre *fgfr3* seul ou avec MOp53 génère une

réduction de la taille de la mandibule, une modification de l'axe de l'hyoïde (B,F). Dans certains cas, on constate l'absence des arcs cératobrachiaux tant dans les morphants *fgfr3* seul qu'avec MOOp53 (C,G ; 2). De plus, certains embryons présentent une absence totale de tous les éléments cartilagineux de la tête après l'injection de MOFgfr3 ou MOFgfr3+MOOp53 (D ; 3).

Après avoir montré l'implication de *fgfr3* dans la formation des cartilages pharyngiens, il était intéressant de comprendre comment le récepteur 3 influence la chondrogenèse. Pour ce faire, nous avons injecté le morpholino dirigé contre *fgfr3* dans des embryons transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur *fli1*. Ce dernier est un gène exprimé dans les CCNc et dans les cellules des vaisseaux sanguins.

A 48 hpf, les embryons contrôles *fli1*-GFP présentent une forte expression de la GFP au niveau des chondrocytes de la mandibule, de l'hyoïde ainsi que ceux des arcs cératobrachiaux (Fig. 24A). On peut clairement observer le profil strié de la région des arcs branchiaux. A l'opposé, dans les morphants *fgfr3*, l'intensité de la GFP dans la région de la mandibule et de l'hyoïde est réduite par comparaison au contrôle tandis qu'aucune expression n'est observée dans la partie postérieure de la région pharyngienne (Fig. 24B).

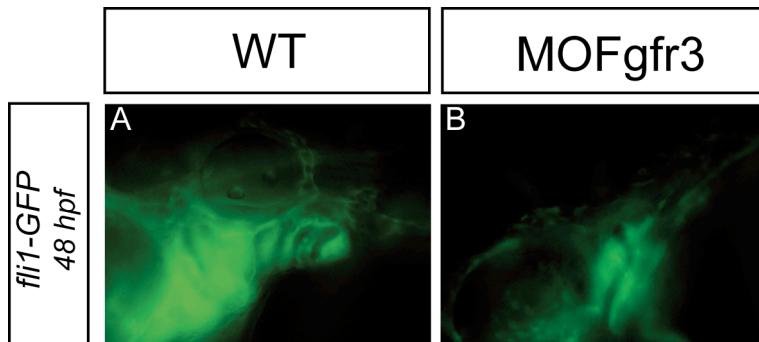


Figure 24 : L'injection de MOFgfr3 réduit l'expression de la GFP dans des embryons transgéniques *fli1*-GFP. Vue latérale, antérieur à gauche. A 48 hpf, les embryons contrôles expriment la GFP sous le contrôle du promoteur *fli1* au niveau des CCNc de la mandibule, de l'hyoïde et présentent le profil strié caractéristique des CCNc au niveau des arcs cératobrachiaux (A). Dans les embryons où l'expression du récepteur 3 est diminuée, l'intensité de la GFP est réduite au niveau de la mandibule et de l'hyoïde tandis que l'expression striée au niveau des arcs cératobrachiaux n'est plus observée (B).

Afin de mieux comprendre comment le récepteur 3 affecte la formation des cartilages pharyngiens, nous avons mené des hybridations *in situ* sur des morphants en utilisant des sondes de marqueurs impliqués dans la chondrogenèse.

10.2.2 Fgfr3 et la migration des CCNc

L'utilisation de la sonde marquant les transcrits *dlx2a* permet de suivre les CCNc lors de leur migration et de leur différenciation. A 24 hpf, les cellules positives pour *dlx2a* forment 3 amas (S1-3) bien distincts qui migrent dans les poches endodermiques pharyngiennes (Fig. 25A,C). Dans les morphants *fgfr3* à 24 hpf, le marquage *dlx2a* est toujours observé (Fig. 25B,D) même si le dernier amas présente un profil légèrement modifié.

A 48 hpf, l'expression de *dlx2a* dans les embryons contrôles est observée dans les chondrocytes de la mandibule (m), de l'hyoïde (h) et des arcs cérotobranchiaux (cb1-5) (Fig. 25E). Au contraire, les embryons knockdown pour *fgfr3* présentent une diminution de la taille des domaines d'expression de *dlx2a* au niveau de la mandibule, de l'hyoïde et une absence quasi totale dans les chondrocytes des arcs cérotobranchiaux (Fig. 25F) dans les morphants à 48 hpf.

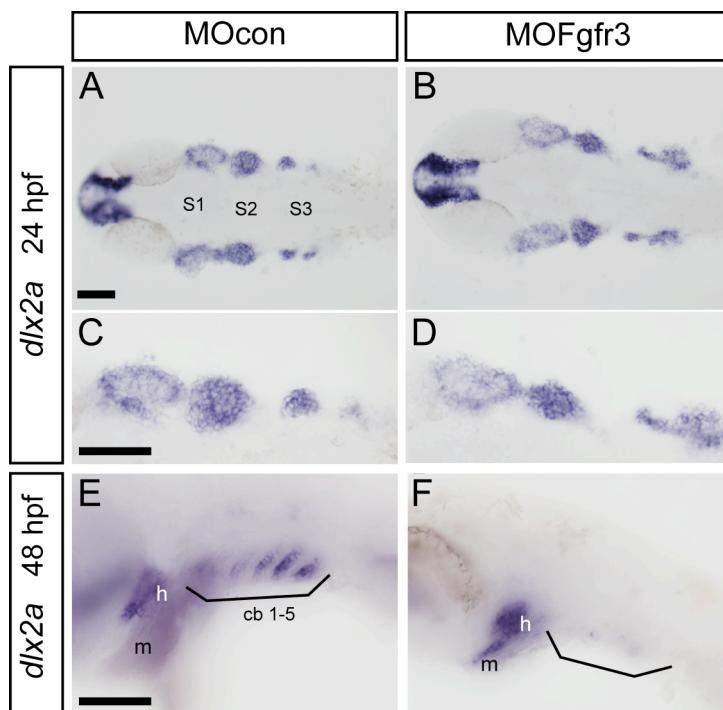


Figure 25 : La diminution d'expression de *fgfr3* engendre la réduction des domaines d'expression de *dlx2a* et son absence dans les arcs cérotobranchiaux à 48 hpf. Antérieur à gauche, vue ventrale (A-D) et vue latérale (E-F). A 24 hpf, les embryons présentent une expression de *dlx2a* en 3 amas bien distincts (S1-3) ainsi qu'une expression dans le cerveau (A,C). Ce profil d'expression est également présent dans les morphants *fgfr3* avec une légère modification du domaine du 3^{ème} amas B,D). L'expression de *dlx2a* à 48 hpf est observée dans les embryons contrôles au niveau des chondrocytes de la mandibule (m), de l'hyoïde (h) et des arcs cérotobranchiaux (cb1-5). Le knockdown de *fgfr3* engendre la réduction de la taille des domaines d'expression de *dlx2a* de la mandibule ainsi que de l'hyoïde tandis que son expression est majoritairement absente dans les CCNc des arcs cérotobranchiaux. Echelle : 100 µm.

10.2.3 Fgfr3 est impliqué dans la condensation et la maturation des chondrocytes

La matrice des cartilages étant majoritairement composée de collagène, l'étude du facteur de transcription *sox9a* contrôlant l'expression du *col2a1* est intéressante. Après 24 heures de développement, *sox9a* est exprimé dans des domaines composés des CCNc, au niveau de la « Midbrain-Hindbrain Boundary » (MHB) et dans le cerveau antérieur (Fig. 26A) chez les embryons contrôles. A 48 hpf et 3 dpf, l'expression est toujours détectable au niveau du cerveau antérieur et postérieur (hb), dans les chondrocytes de la mandibule, de l'hyoïde et des arcs cérotobranchiaux, au niveau de la vésicule otique (ov), dans les bourgeons des nageoires pectorales (fb) ainsi que dans le cartilage de la plaque ethmoïdienne (ep) (Fig. 26C,E).

Après diminution de l'expression du récepteur 3, les embryons présentent un profil d'expression de *sox9a* différent des témoins. A 24 hpf, l'expression des transcrits *sox9a* est fortement réduite dans toutes les structures de l'embryon : les amas des CCNc ne sont que faiblement marqués (Fig. 26B). A 48 hpf, les morphants *fgfr3* présentent des domaines d'expression de *sox9a* réduits au niveau de la mandibule, de l'hyoïde ainsi que de la plaque ethmoïdienne. Aucune expression dans les arcs cérotobranchiaux n'est plus observée dans ce type de morphants sans pour autant affecter les transcrits *sox9a* dans la vésicule otique. A 3 jours de développement, le marquage pour *sox9a* est toujours visible dans les différentes parties du cerveau et la vésicule otique ainsi que dans la mandibule et l'hyoïde mais aucun ARNm de *sox9a* n'est détecté dans les arcs cérotobranchiaux (Fig. 26F)

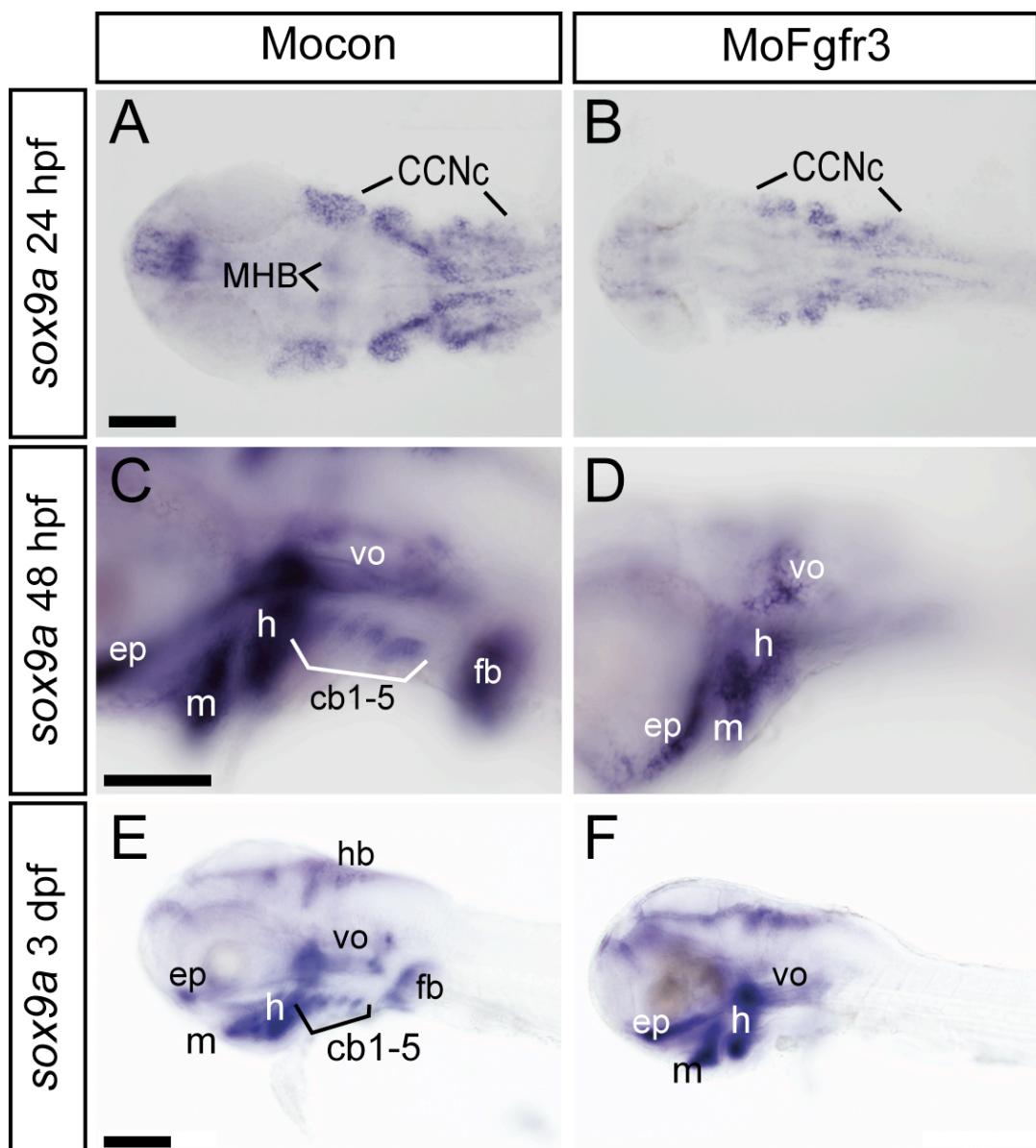


Figure 26 : Fgfr3 influence le niveau d'expression de *sox9a* de 24 hpf à 3 dpf. Antérieur à gauche, vue ventrale (A,B) et vue latérale (C-F). Après 24 heures de développement, les transcrits *sox9a* sont détectés chez les embryons contrôles dans le cerveau antérieur, au niveau de la « Midbrain-Hindbrain Boundary » (MHB) et des amas ce CCNc (A). Dans les morphants *fgfr3*, les domaines d'expression de *sox9a* sont réduits dans toutes les structures exprimant normalement ce gène (B). A 48 hpf, l'expression de *sox9a* n'est plus observée dans les arcs cérotbranchiaux bien que celle dans la mandibule, l'hyoïde, la vésicule otique et la plaque ethmoïdienne soit toujours présente dans des domaines plus réduits (D). Ce type de phénotype est également obtenu lors de l'hybridation *in situ* réalisée à 3 jours de développement sur des morphants *fgfr3* (F). Echelle : 100 µm.

Barx1 est un facteur de transcription impliqué dans la condensation et la différenciation des CCNc ainsi que dans le contrôle de leur expression de *runx2b*. A 48 hpf, les ARNm *barx1* sont observés dans les CCNc des arcs cératobranchiaux, de la mandibule, de l'hyoïde et de la plaque ethmoïdienne. De plus, une expression est visible au niveau du foie des embryons contrôles (Fig. 27A,C,E). A ce stade, le knockdown de *fgfr3* provoque une réduction de la taille des domaines d'expression de *barx1* de la mandibule et de l'hyoïde. De plus, une absence d'expression de *barx1* dans les arcs cératobranchiaux est observée (Fig. 27B,D,F) tandis que l'expression au niveau du foie persiste.

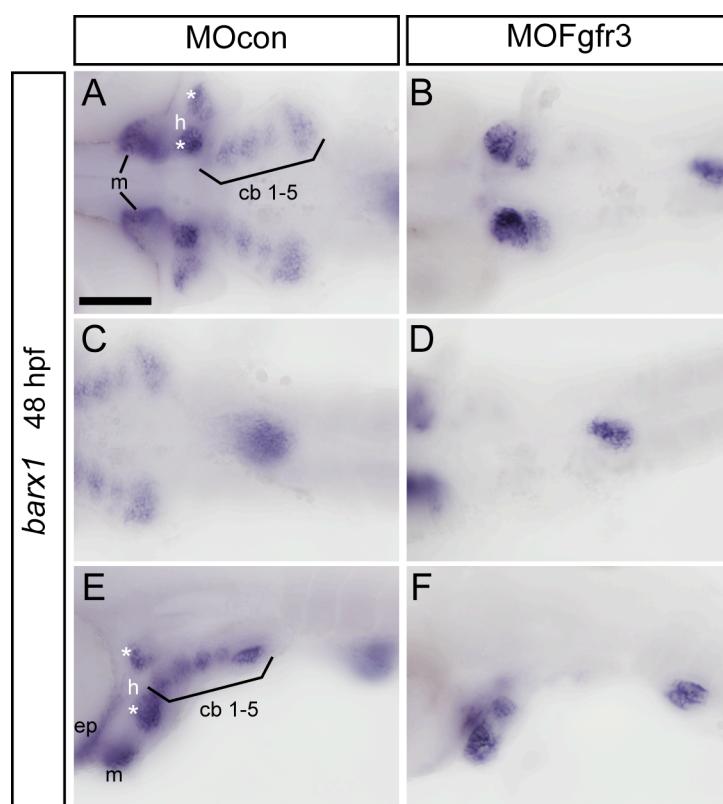


Figure 27 : L'expression de *barx1* est absente au niveau des cératobranchiaux dans les morphants *fgfr3*. Antérieur à gauche, vue ventrale (A-D) et vue latérale (E-F). A 48 heures de développement dans les embryons contrôles, les ARNm de *barx1* sont détectés dans les chondrocytes des arcs cératobranchiaux (cb-1-5), dans ceux de la mandibule (h) et ceux de l'hyoïde (h) mais également au niveau de la plaque ethmoïdienne (ep) (A,C,E). Au même stade de développement, les morphants *fgfr3* montrent une expression de *barx1* dont les domaines sont réduits au niveau de la mandibule et de l'hyoïde. De plus, l'expression de *barx1* dans les arcs cératobranchiaux est absente tandis que celle des cellules dans la région du foie est toujours observée. Echelle : 100 µm.

Le facteur de transcription *Runx2b* contrôle la production de collagène par une voie parallèle à celle de *Sox9a*. En plus du contrôle de l'expression de *col2a1*, *Runx2b* est impliqué dans la maturation tardive des chondrocytes ce qui en fait un des gènes indispensables à la chondrogenèse. Dans les embryons contrôles, *runx2b* est détecté dans les chondrocytes de la région pharyngienne comme on peut le constater sur la Fig. 28A. On observe son expression au niveau de la mandibule, de l'hyoïde formée de l'hyosymplectique (hs) et du céратohyoïde (ch), des arcs cératobrachiaux (cb1-5) et du cleithrum (cl). Ce profil d'expression à 48 hpf est en accord avec celui relevé dans la littérature. L'expression de *runx2b* dans la région pharyngienne est absente lorsque le knockdown du récepteur 3 est réalisé (Fig. 28B). Cependant, l'expression de ce facteur de transcription persiste au niveau du cartilage du cleithrum, d'origine cellulaire différente de celle des cartilages pharyngiens.

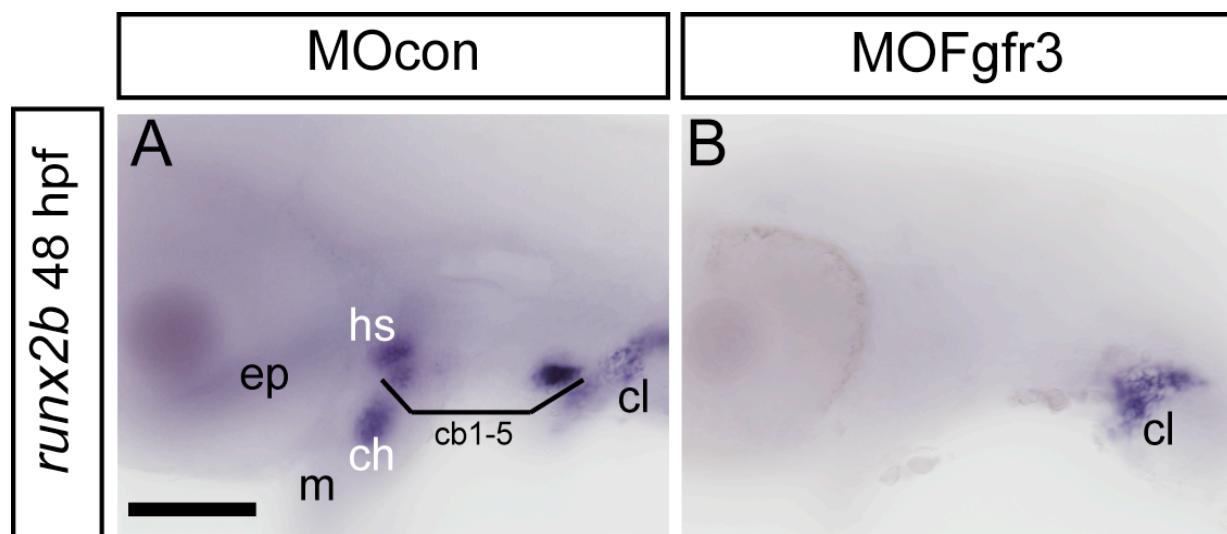


Figure 28 : Fgfr3 est impliqué dans le contrôle de l'expression de *runx2b* à 48 hpf. Antérieur à gauche et vue latérale. A 48 hpf, l'expression sauvage de *runx2b* est observée dans les chondrocytes en maturation de la plaque ethmoïdienne (ep), de la mandibule (m), du cératohyoïde (ch), de l'hyosymplectique (hs), des arcs cératobrachiaux (cb1-5) et du cleithrum (cl). Après le knockdown de l'expression du récepteur 3, les transcrits de *runx2b* sont absents de la région pharyngienne à l'exception du cleithrum (cl). Echelle : 100 µm.

10.3 *Fgfr3* et l'endoderme

L'endoderme pharyngien est un tissu indispensable à la chondrogenèse. Il offre une structure pour la mise en place des cartilages, mais il joue également un rôle crucial pour la différenciation des chondrocytes comme nous l'avons vu précédemment (Dalcq, Pasque et al. 2012).

nkx2.3 est largement utilisé comme un marqueur de l'endoderme. Dans les embryons sauvages comme dans les embryons contrôles, les transcrits de *nkx2.3* sont détectés dès 24 hpf dans l'endoderme pharyngien (pe) entourant les cellules des crêtes neurales crâniennes (Fig. 29A) tout comme à 48 hpf (Fig. 29D). Que ce soit après une simple injection du morpholino dirigé contre le récepteur ou une double injection de ce morpholino avec celui dirigé contre p53, les résultats obtenus sont similaires. A 24 hpf, les simples et doubles morphants présentent une légère réduction de l'expression de *nkx2.3* (Fig. 29B-C). Cependant, à 48 hpf, l'ARNm *nkx2.3* est toujours présent dans l'endoderme pharyngien des morphants. On peut toutefois observer que la morphologie de l'endoderme pharyngien est légèrement modifiée (Fig. 29E, F).

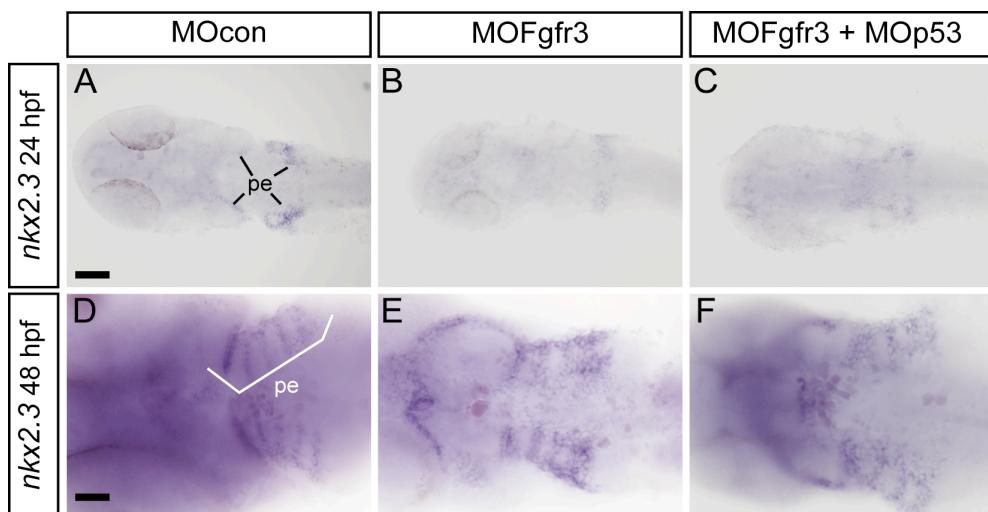


Figure 29 : Profil d'expression de *nkx2.3* dans l'endoderme pharyngien des embryons morphants pour le récepteur 3. Antérieur à gauche et vue ventrale. A 24 hpf dans les embryons contrôles, les transcrits de *nkx2.3* sont présents dans l'endoderme pharyngien (pe) formant des poches (A). Après injection du morpholino dirigé contre *fgrf3* sans ou avec celui contre *p53*, le profil d'expression de *nkx2.3* est maintenu (B,C). Seule une légère réduction est observée en comparaison avec les embryons contrôles. A 48 hpf, dans les embryons dont l'expression est réduite pour le récepteur 3 seul ou avec *p53* (E,F), on n'observe pas de différence significative dans le profil d'expression de *nkx2.3* dans les poches endodermiques par rapport au contrôle (D). Cependant, une légère modification de la forme des poches endodermiques peut être soulignée. Echelle : 100 µm.

10.3.1 Fgfr3 participe à l'activation d'une cascade génétique dans l'endoderme.

Le facteur de transcription Runx3 est un des premiers facteurs de la cascade génétique active dans l'endoderme (Runx3-Egr1-Sox9b-Fsta) et participe au contrôle de l'inhibiteur de la voie des BMP (Dalcq, Pasque et al. 2012). A 48 hpf, dans les embryons sauvages comme dans les contrôles, les ARNm *runx3* sont détectés dans une partie des poches endodermiques (pe), au niveau du cleithrum (cl) et dans le ganglion trigéminal (tg) (Fig. 30A) comme décrit précédemment (Flores, Lam et al. 2006). 48 heures après le knockdown de l'expression du récepteur 3, l'expression de *runx3* reste observable au niveau du cleithrum comme du ganglion trigéminal tandis qu'aucune expression dans l'endoderme pharyngien n'est détectée (Fig. 30B).

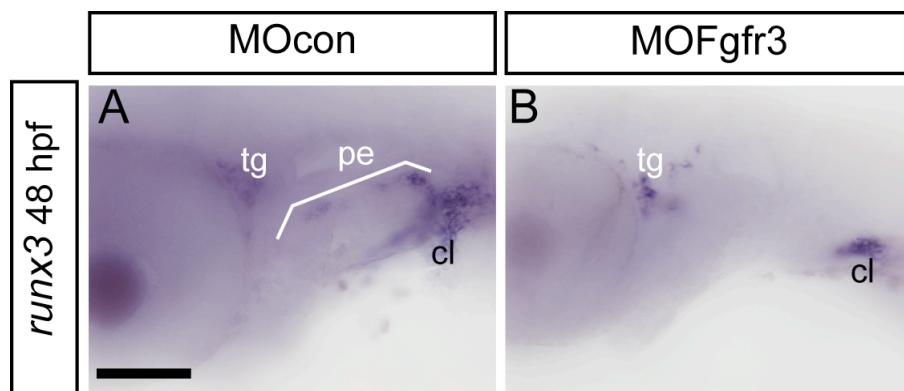
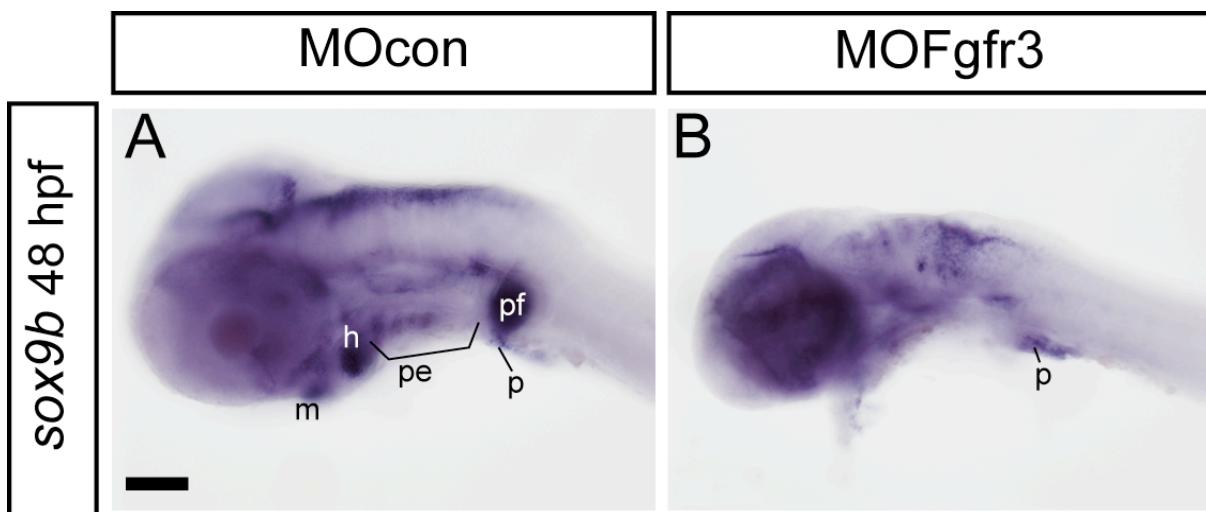


Figure 30: Absence d'expression de *runx3* dans l'endoderme pharyngien après knockdown de *fgfr3*. Antérieur à gauche et vue latérale. A 48 hpf, l'expression de *runx3* dans les embryons contrôles (A) est observée dans une partie de l'endoderme pharyngien (pe), au niveau du cleithrum (cl) et dans le ganglion trigéminal (tg). Dans les morphants *fgfr3*, les transcrits *runx3* de l'endoderme pharyngien sont absents à 48 hpf tandis que ceux du cleithrum (cl) et ceux du ganglion trigéminal (tg) sont toujours présent (B). Echelle : 100 µm.

A 48 hpf, les ARNm de *sox9b* sont détectés dans le cerveau postérieur, le tectum, le pancréas (p), au niveau de la nageoire pectorale (pf), dans l'endoderme pharyngien de la mandibule (m), de l'hyoïde (h) et des arcs cérotbranchiaux (Fig. 31A). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors d'études antérieures (Yan, Willoughby et al. 2005). La diminution d'expression du récepteur 3 dans les embryons (Fig. 31B) engendre l'absence d'expression de *sox9b* dans tout l'endoderme pharyngien tandis que les morphants ne présentent pas de modification du profil d'expression de ce gène dans d'autres structures tels que le pancréas et le cerveau.



Antérieur à gauche et vue latérale. A 48 hpf, l'expression de *sox9b* est détectée dans le cerveau postérieur, le tectum, au niveau de la nageoire pectorale, du pancréas et de l'endoderme pharyngien de la mandibule (m), de l'hyoïde (h) et des arcs cérotobranchiaux (pe) des embryons contrôles (A). Après 48 heures de développement, les morphants du récepteur 3 montrent une absence d'expression de *sox9b* dans tout l'endoderme pharyngien tandis que le profil d'expression de ce gène reste observable dans les autres structures de l'embryon (B). Echelle : 100 μ m.

11 Discussion et conclusions partim Fgfr3

La formation des cartilages pharyngiens chez le zebrafish est le résultat d'une migration suivie d'une différenciation des cellules des crêtes neurales crâniennes au niveau des poches endodermiques. La matrice cartilagineuse est progressivement remplacée par de la matrice osseuse selon le procédé d'ossification endochondrale.

Le rôle du récepteur 3 des Fgf dans ce processus a été largement étudié chez les mammifères mettant en évidence que ce récepteur joue un rôle d'inhibiteur de l'ossification endochondrale (Valverde-Franco, Liu et al. 2004; Eswarakumar and Schlessinger 2007). Les souris *fgfr3^{-/-}* présentent des membres allongés suite à une augmentation de la prolifération et une accumulation des chondrocytes dans les zones de croissance des os longs. A l'inverse, des études réalisées sur des patients humains atteints de nanisme thanatophore, d'achondroplasie ou d'hypochondroplasie ont montré que ces différentes maladies peuvent être reliées à une mutation au niveau du FGFR3 qui le rendent constitutivement actif. Ces mutations provoquent une diminution de la prolifération des chondrocytes et une augmentation de leur apoptose au niveau de la zone de croissance des os longs (Bonaventure and Silve 2005; Baldridge, Shchelochkov et al. 2010) ayant pour effet un raccourcissement de la taille des os longs. En résumé, Fgfr3 participe à la régulation de la zone de prolifération chondrocytaire ; son absence augmente la taille de la zone de prolifération tandis que sa suractivité réduit cette même zone. Cependant, toutes ces études concernaient des stades tardifs du développement où la matrice osseuse est déjà présente et les os longs sont en croissance. Cependant, ces études ne se concentrent pas sur les cartilages et os crâniens. Le rôle de Fgfr3 à des stades de développement plus précoces que dans le modèle murin a été étudié chez le poulet (Havens, Velonis et al. 2008). Cette étude a mis en évidence que la diminution de l'expression du récepteur 3 engendre l'absence des cartilages de Meckel formant la mandibule, suite à un défaut dans la prolifération cellulaire des chondrocytes et à une augmentation de leur apoptose, sans pour autant affecter leur migration.

Dans notre étude, nous avons mis en évidence que ce récepteur est exprimé dans l'endoderme pharyngien à 24 hpf et ce jusque 48 hpf grâce aux expériences de double hybridation *in situ* par fluorescence. Nous observons une colocalisation des transcrits *fgfr3* avec ceux de *nkx2.3*, exprimé dans les poches endodermiques

pharyngiennes. De plus, l'absence de colocalisation entre *fgfr3* et *dlx2a* à 24 hpf ou avec celle de *sox9a* à 48 hpf nous permet d'exclure que ce récepteur est exprimé dans les CCNc à ces stades. De plus, un relevé de la littérature nous informe que ce récepteur est exprimé avant 24 hpf au niveau des différentes parties du cerveau du zebrafish.

Les expériences de diminution d'expression des transcrits *fgfr3*, par injection de morpholino au stade une cellule, génère de sévères défauts au niveau de toutes les pièces cartilagineuses de la région pharyngienne. Des effets non-spécifiques suite à l'injection peuvent être exclus (Robu, Larson et al. 2007) par le fait que lors de la co-injection du MOFgfr3 avec le MOp53, les résultats obtenus ne sont pas significativement différents de ceux obtenus pour le seul morpholino dirigé contre le Fgfr3.

Nous avons montré que Fgfr3 n'affecte pas la migration des CCNc jusqu'à 24 hpf, puisque les transcrits *dlx2a* sont toujours présents dans les morphants. Par contre, l'étude du facteur de maturation précoce des chondrocytes, *sox9a*, nous permet de dire que la voie de signalisation par le Fgfr3 influe sur leur différenciation dès 24 hpf. Ces résultats suggèrent que les cellules des crêtes neurales n'entreraient pas du tout en différenciation malgré le fait qu'elles soient bien en place dans les arcs pharyngiens à 24 hpf. Sur base de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que Fgfr3 joue un rôle avant 24 hpf au niveau des CCNc. A 48 hpf, le knockdown de *fgfr3* provoque l'absence d'expression de *dlx2a* et de *sox9a* dans les domaines des arcs cérotobranchiaux, tandis que ceux de la mandibule et de l'hyoïde sont réduits. L'absence d'expression de ces deux facteurs à 48 hpf pourrait être expliquée par le fait que, comme dans le poulet, le Fgfr3 participe à la prolifération et la survie des CCNc après leur migration et donc que l'absence de signal serait le résultat de l'absence de cellules dans la région pharyngienne. Ce résultat doit être confirmé par un test d'apoptose et de prolifération cellulaire. Cette interprétation serait en accord avec l'observation que le facteur de transcription Runx2b, impliqué lui aussi dans la maturation des chondrocytes, est aussi totalement absent de la région pharyngienne après que l'expression de *fgfr3* ait été diminuée. Une exception concerne ici l'expression dans le cleithrum de *runx2b*, qui est maintenue, reflétant probablement le fait que cet élément se forme par ossification membranaire sans matrice cartilagineuse préalable.

Chez le zebrafish, il a été montré que l'expression de *barx1* est sous le contrôle de la voie des Fgfs (Sperber and Dawid 2008) et participe à la condensation des chondrocytes ainsi qu'à leur différenciation par le contrôle de l'expression de *runx2b*. Nous avons aussi observé une absence d'expression de *barx1* dans la région des arcs cérotobranchiaux et une diminution de la taille des ses domaines d'expression dans la région de la mandibule et de l'hyoïde à 48 hpf. Ceci peut être expliqué par l'absence des CCNc au niveau des arcs cérotobranchiaux tandis que le manque de condensation au niveau de la mandibule et de l'hyoïde expliquerait en partie les défauts morphologiques de ces structures. Notons enfin que nous avons aussi observé une diminution de l'expression du transgène *fli1-GFP* dans les CCNc.

De plus, lors des différentes expériences de knockdown de l'expression du Fgfr3 nous avons observé que celui-ci n'était pas impliqué dans la formation de l'endoderme pharyngien et présentait un profil d'expression de *nkx2.3* normal. Toutefois, un léger défaut dans l'organisation des cellules de l'endoderme pharyngien est observé à 48 hpf. Ce défaut d'organisation peut-être le résultat, soit de l'absence des CCNc au niveau des poches endodermiques, soit de l'abolition de l'expression des différents gènes de la cascade génétique de l'endoderme, *runx3-sox9b*, participant à la différenciation des chondrocytes (Dalcq, Pasque et al. 2012) dans les poches endodermiques après la diminution d'expression du récepteur 3 des Fgfs.

A 3 jours de développement, l'expression de *fgfr3* ne s'observe plus au niveau de l'endoderme pharyngien, mais bien au niveau des chondrocytes. Ce dernier résultat est en accord avec ceux obtenus chez le poulet où le Fgfr3 est exprimé dans les chondrocytes des cartilages.

En conclusion, cette étude préliminaire du rôle du récepteur 3 des Fgfs nous permet de dire que ce récepteur est exprimé dans l'endoderme pharyngien entre 24 et 48 hpf et qu'il est impliqué dans la chondrogenèse des arcs pharyngiens. De plus, ce récepteur est impliqué dans le contrôle de l'expression des gènes (*runx3*, *sox9b*) de la cascade endodermique de régulation de la chondrogenèse. Le changement des domaines d'expression de *fgfr3* à 3 dpf nous laisse penser que ce récepteur joue un autre rôle plus tardif dans le cartilage et certainement dans l'ossification endochondrale comme montré pour les modèles poulet, murin et humain.

DISCUSSION GLOBALE
ET PERSPECTIVES

12 Discussion globale et perspectives

			Fgfr1a & Fgfr2	Fgfr3
Profil d'expression		24 hpf	Endoderme	Endoderme
		48 hpf	Endoderme	Endoderme
		3 dpf	Endoderme	CCNc/chondrocytes
Etudes de fonction	<i>dlx2a</i>	24 hpf	=	=
		48 hpf	=	Diminution de l'expression
	<i>Sox9a</i>	24 hpf	=	Diminution de l'expression
		48 hpf	=	Diminution de l'expression
	<i>Barx1</i>	48 hpf	Diminution de l'expression	Diminution de l'expression
	<i>Runx2b</i>	48 hpf	Absence d'expression	Absence d'expression
	<i>Runx3-egr1-sox9b</i>	48 hpf	Diminution de l'expression	Diminution de l'expression
	<i>Nkx2.3</i>	24 hpf	=	=
		48 hpf	Modification de la forme des poches endodermiques	Modification de la forme des poches endodermiques
	<i>Bmp4</i>	48 hpf	=	?
	<i>Shh</i>	48 hpf	=	?

Nous avons montré par cette étude que les Fgfr 1a, 2 et 3 étaient tous exprimés au niveau de l'endoderme pharyngien jusque 48 hpf de développement. A 3 dpf, les Fgfr1a et Fgfr2 continuent à être exprimés dans l'endoderme pharyngien tandis que le Fgfr3 est exprimé lui dans les CCNc/chondrocytes. De plus, nous avons mis en évidence que les récepteurs 1a et 2 des Fgfs participent au contrôle

de la cascade génétique régulatrice Runx3-Egr1-Sox9b-Fsta présente dans l'endoderme pharyngien et permettant la régulation de la voie des BMP afin d'autoriser l'expression de *runx2b* dans les CCNc en vue de leur maturation tardive. Durant cette période, les étapes de migration et de maturation précoce des chondrocytes ne sont pas affectées par les Fgfr1a et Fgfr2. Nous pouvons affirmer cela par la présence de transcrits *sox9a* dans les morphants correspondants. Ces résultats sont différents de ceux obtenus lors de l'étude préliminaire du récepteur 3 des Fgfs. En effet, lors de nos expériences de « knock-down », nous avons mis en évidence que les CCNc sont toujours présentes jusque 24 hpf, mais qu'elles n'expriment plus le gène *sox9a* important dans la maturation précoce des CCNc. Cet effet pourrait être le résultat d'une activité de Fgfr3 avant 24 hpf, vu que ce dernier est exprimé avant ce stade au niveau des différentes parties du cerveau dont sont originaires les CCNc avant migration. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'entrée en différenciation des CCNc en migration est déjà contrôlée par l'activité du récepteur 3 des Fgfs avant 24 hpf, à l'inverse des deux autres récepteurs étudiés. Les conséquences de l'absence d'expression de *Sox9a* ont été étudiées précédemment dans le mutant *jef* (Yan et al, 2005). Ce mutant présente une absence quasi totale de cartilages crâniens ainsi que des os endochondraux qui en dérivent. De plus, une diminution de l'expression du collagène *col2a1* est observée (Yan 2002). Par contre, l'expression de *dlx2a* est maintenue à 34 et 52 hpf, quoique de manière désorganisée, ainsi que celle de *runx2b* à 48 hpf (Yan, 2005). Il apparaît donc que l'absence de Fgfr3 génère des défauts plus importants dans les CCNc que la simple absence de *Sox9a*, puisque nous observons une diminution des expressions *dlx2a* et *runx2b*. Actuellement, rien ne nous permet de confirmer si les cellules des crêtes neurales crâniennes sont toujours présentes à 48 hpf dans les poches endodermiques des morphants Fgfr3. Seule des études d'apoptose ou de prolifération cellulaire nous permettraient de répondre à cette question. Si l'hypothèse d'absence des CCNc à 48 hpf s'avérait correcte, cela pourrait expliquer la modification de forme des poches endodermiques mais également le fait que ces dernières ne remplissent plus leur fonction (cascade Runx3-Egr1-Sox9b-Fsta) car on ne peut exclure le fait qu'une signalisation existe des CCNc vers l'endoderme pharyngien.

L'absence de modification de l'expression des transcrits BMP4 dans les morphants pour *fgfr1a* et *fgfr2* nous laisse penser que la régulation de la voie des BMP par celle des Fgfs est bien le résultat du contrôle de l'expression de la *Fsta* (inhibiteur des la voie BMP) et non celui d'un contrôle de l'expression des ligands. Nous appuyons cette hypothèse par le fait que lors du knockdown de *fgfr1a* et *fgfr2*, une augmentation de l'expression de *fsta* est observée dans l'endoderme tandis qu'une absence d'expression des *barx1* et *runx2b* est constatée dans les CCNc; ces deux derniers gènes étant notamment régulés par BMP4. Ces résultats mis ensemble et ceux obtenus lors des expériences de rescue croisées nous font penser que l'effet des récepteurs est dû à un niveau de concentration de ceux-ci au niveau de l'endoderme et non pas à une réelle spécificité de liaison aux ligands. Nous étayons cela par le fait que les trois récepteurs (1a, 2 et 3) peuvent chacun lier au moins un même ligand impliqué dans la chondrogenèse (Ornitz, Xu et al. 1996; Zhang, Ibrahimi et al. 2006). Pour confirmer cela, nous devrions injecter les morpholinos dirigés contre les récepteurs 1a et 2 des Fgf avec l'ARNm *fgfr3* mais également réaliser des expériences de rescue de Fgfr3 par les ARNm des récepteurs 1a et 2 des Fgf. De plus, il serait intéressant de contrôler l'expression de *fgfr1a* et *fgfr2* dans les morphants Fgfr3.

Il a été mis en évidence que BMP4 participe au contrôle de la voie de signalisation endothéline dans l'établissement de l'axe dorso-ventral de la région pharyngienne avant 24 hpf (Medeiros and Crump 2012). Une perturbation dans cette voie de signalisation ne permet pas aux CCNc de se différencier correctement et une réduction des cartilages pharyngiens est observée. L'endothéline 1 (*edn1*) est exprimée dans l'endoderme pharyngien aux mêmes stades que le récepteur 3 des Fgf. Dans cette optique, il serait intéressant d'étudier l'influence de la signalisation Fgf par l'intermédiaire de Fgfr3 sur cette signalisation ainsi que sur l'expression de BMP4. Si cette hypothèse venait à se confirmer, cela nous permettrait peut-être d'expliquer comment Fgfr3 participe à la différenciation et maturation précoce des CCNc/chondrocytes. Une autre piste serait que le Fgfr3 participe au contrôle de l'expression de Shh au niveau de l'endoderme pharyngien, à l'inverse des Fgfr1a et Fgfr2, ce qui expliquerait que le Fgfr3 joue un rôle dans la différenciation et maturation précoce des chondrocytes par l'expression des gènes *dlx2a* et *sox9a* tout comme la signalisation Hedgehog. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait étudier l'expression de *shh* dans des morphants *fgfr3*.

Nous pouvons conclure qu'effectivement les 3 récepteurs des Fgfs sont impliqués dans la chondrogenèse des arcs pharyngiens chez le zebrafish. De plus, les Fgfr1a, Fgfr2 et Fgfr3 peuvent avoir des fonctions similaires dans ce processus mais le récepteur 3 jouerait un rôle plus précoce dans ce mécanisme au niveau des CCNc.

MATERIEL ET METHODES

13 Matériel et méthodes

13.1 Le zebrafish

Le zebrafish ou *Danio rerio* est un téléostéen originaire des eaux douces du Nord et du centre de l'Inde. Depuis plusieurs années, il est devenu un modèle d'étude pour le développement des vertébrés, grâce à certains avantages dans sa biologie ou technologiques.

- Un cycle de développement court où les structures essentielles du corps se mettent en place pendant les 24 premières heures.
- Un temps de génération de 3 à 4 mois.
- Un nombre élevé d'œufs par ponte.
- Une fécondation et un développement externes.
- Un génome presque entièrement séquencé et libre d'accès.
- Un élevage aisément accessible avec un coût peu élevé et un espace vital réduit par poisson.
- Un nombre important de mutants décrits.
- Des possibilités de micromanipulations telles que la transgénèse, le « knock-down », la surexpression, les microinjections, etc.

13.2 L'embryogenèse du zebrafish

Charles Kimmel a décrit avec précision les différentes étapes de l'embryogenèse chez le zebrafish (Kimmel, Ballard et al. 1995). Sept étapes ont été mises en évidence (Fig. 32) :

- Zygote : 0-45 min
- Le clivage : 0.7-2.2 hpf
- La blastula : 2.25-5.25 hpf
- La gastrula : 5.25-10 hpf
- La période de segmentation : 10-24 hpf
- La pharyngula : 24-48 hpf
- L'éclosion : 48-72 hpf

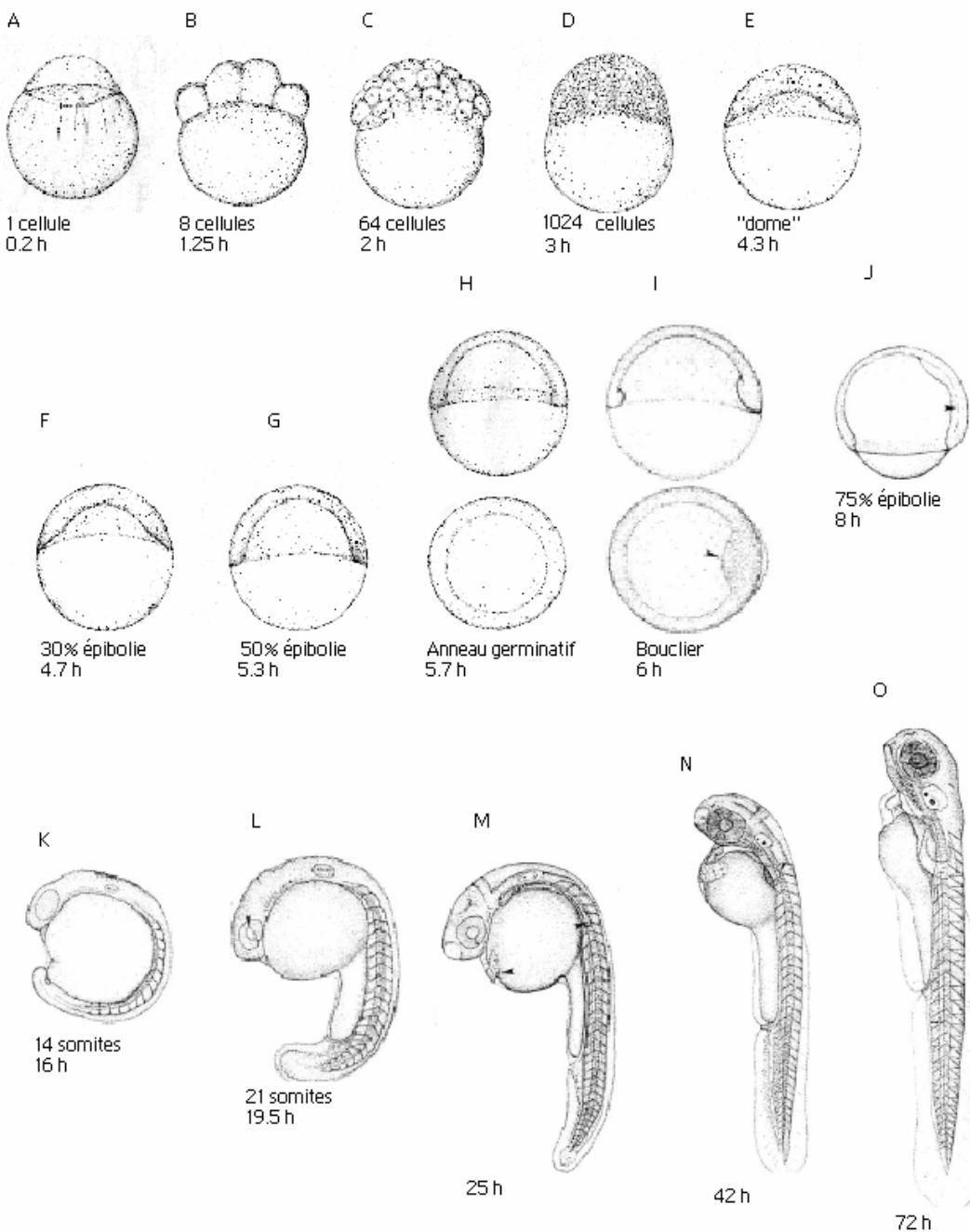


Figure 32 : Développement embryonnaire du zebrafish. (A) Le blastodisque du zygote se situe sur le vitellus, au niveau du pôle animal. (B, C) L'étape de clivage consiste en 6 divisions synchrones produisant 64 blastomères au pôle animal. (D-G) A la transition mi-blastuléenne, les divisions deviennent asynchrones. Le mouvement d'épibolie débute et la blastula devient gastrula à 50% du mouvement accompli. (H-K) En achevant son épibolie, la gastrula subit les mouvements d'involution (formation de l'anneau germinatif), de convergence (formation du bouclier par accumulation de cellules au niveau dorsal) et d'extension pour ensuite entrer dans l'étape de segmentation. (K, L) Etape de segmentation : les premiers organes se forment ainsi que les somites et le cerveau. (M, N) Stade pharyngula : la circulation sanguine se met en place, les nageoires se forment et les pigments apparaissent. (O) Les cartilages crânofaciaux et de la ceinture pectorale se forment ainsi que la vessie natatoire. L'embryon est fonctionnel et la recherche de nourriture débute. (Kimmel, Ballard et al. 1995).

Lorsque l'oeuf est fécondé, on peut observer la première division cellulaire après 45 minutes. Des divisions synchrones des cellules se déroulent tous les quarts d'heure pour former le blastomère composé de cellules totipotentes. A 512 blastomères, la blastula entre en transition mi-blastuléenne et les premiers ARNm zygotiques sont transcrits (Schier and Talbot 2005). A la fin de la période blastula, le mouvement d'épibolie se met en place et la gastrulation débute à 50% d'épibolie. Trois mouvements consécutifs - l'involution, la convergence et l'extension - vont permettre la formation des trois feuillets embryonnaires. Le feuillet superficiel, l'épiblaste donnera plus tard l'ectoderme sous lequel on trouve l'hypoblaste qui formera l'endoderme et le mésoderme. S'ensuit la formation progressive des différents organes essentiels lors de la segmentation. La plaque neurale, partie de l'ectoderme, subit un mouvement d'invagination formant ainsi la quille neurale qui donnera naissance au tube neural. Cette étape est appelée la neurulation. Le mésoderme dorsal formera la chorde axiale et les somites le long du tube neural.

Le stade pharyngula voit la mise en place des organes des sens, de certaines cellules pigmentées, d'une notochorde, d'une série d'arcs pharyngiens, de la différenciation des somites, du cerveau distinct mais aussi l'apparition des nageoires.

L'éclosion et le développement des mâchoires se fait entre 48 et 72 heures après fécondation. A la fin du troisième jour après fécondation, l'embryon devient une larve dont la morphogenèse est quasiment terminée. Au quatrième jour, la larve est autonome tant au niveau de la nage que de la prise de nourriture. La larve continue ensuite sa croissance jusqu'à atteindre le stade juvénile à 30 dpf et deviendra adulte à 90 dpf. A ce moment, la procréation sera possible (Kimmel, Ballard et al. 1995);(Nusslein-Volhard 2002).

13.3 Les vecteurs

a. Le pZL1-ffgfr1

Le pZL1-ffgfr1 est un plasmide utilisé dans le processus de synthèse de sondes antisens et couvrant l'ARNm du récepteur 1a des Fgfs. Sa taille est de 6833 pb et il contient l'ADNc du récepteur 1a entouré des promoteurs pour les ARN polymérases des bactériophages Sp6 et T7. De plus, ce plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline, ce qui permet une sélection des bactéries ayant correctement incorporé le plasmide (Fig. 33).

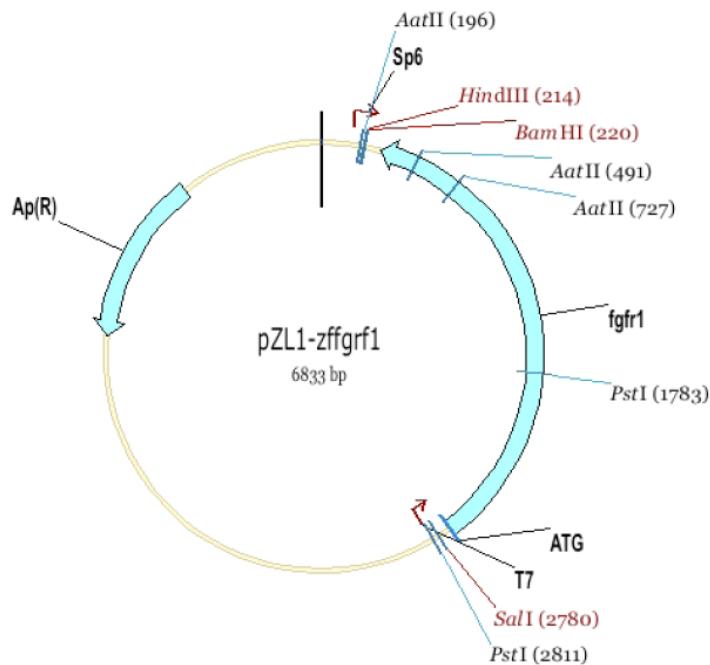


Figure 33 : Plasmide pZL1-zffgfr1. Ce plasmide est utilisé pour la synthèse de sonde de *fgfr1*.

b. Le pZL1-ffgfr2

Le pZL1-ffgfr2 est un plasmide utilisé dans le processus de synthèse de sondes antisens et couvrant l'ARNm du récepteur 2 des Fgfs. Sa taille est de 9085 pb et il contient l'ADNc du récepteur 2 entouré des promoteurs pour les ARN polymérasées des bactériophages Sp6 et T7. De plus, ce plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline, ce qui permet une sélection des bactéries ayant correctement incorporé le plasmide (Fig. 34).

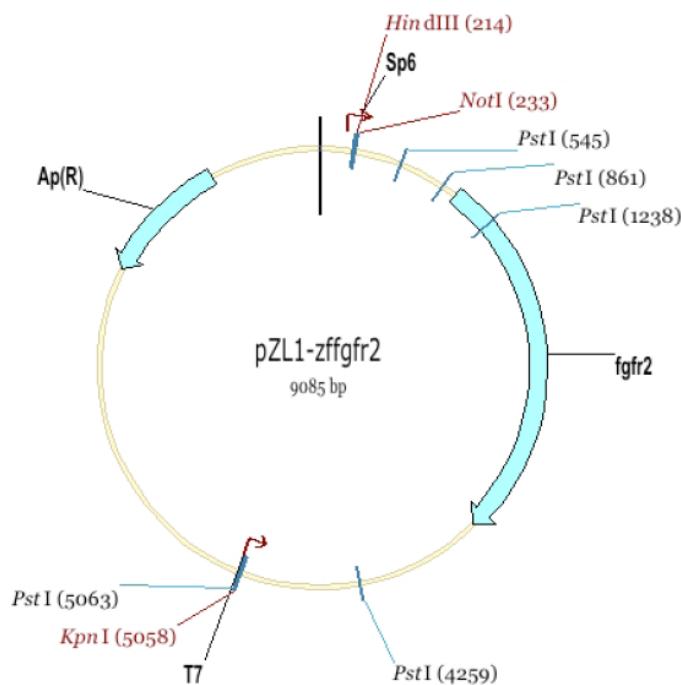


Figure 34 : Plasmide pZL1-zffgfr2. Ce plasmide est utilisé pour la synthèse de sonde de *fgfr2*.

c. Le pZL1-ffgfr3

Le pZL1-ffgfr3 est un plasmide utilisé dans le processus de synthèse de sondes antisens et couvrant l'ARNm du récepteur 3 des Fgfs. Sa taille est de 7309 pb et il contient l'ADNc du récepteur 3 entouré des promoteurs pour les ARN polymérasées des bactériophages T3 et T7. De plus, ce plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline, ce qui permet une sélection des bactéries ayant correctement incorporé le plasmide (Fig. 35).

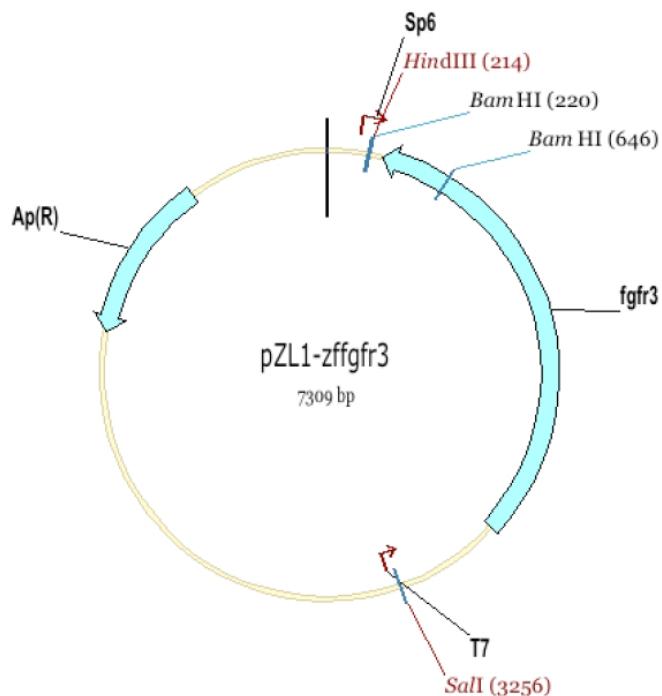


Figure 35 : Plasmide pZL1-zffgfr3. Ce plasmide est utilisé pour la synthèse de sonde de *fgfr3*.

d. Le pBS-zffgfr4

Le pBS-zffgfr4 est un plasmide utilisé dans le processus de synthèse de sondes antisens et couvrant l'ARNm du récepteur 4 des Fgfs. Sa taille est de 3555 pb et il contient l'ADNc du récepteur 4 entouré des promoteurs pour les ARN polymérasées des bactériophages Sp6 et T7. De plus, ce plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline, ce qui permet une sélection des bactéries ayant correctement incorporé le plasmide (Fig. 36).

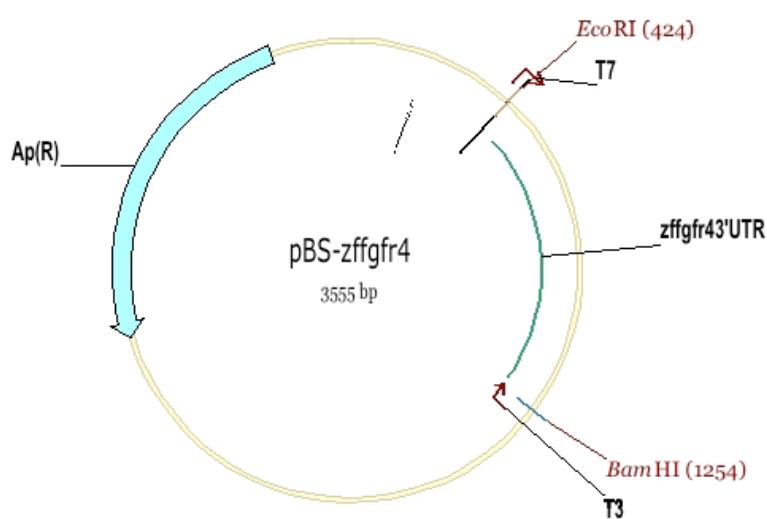


Figure 36 : Plasmide pBS-zffgfr4. Ce plasmide est utilisé pour la synthèse de sonde de *fgfr4*.

13.4 Souches bactériennes

E. Coli DH5α

Génotype : $\Phi 80d/lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsd17 (r_k^-, m_k^+) gal phoA supE44 \lambda^- thi-1 gyrA96 relA1$ (Gibco-BRL™, Grand Island USA).

13.5 Les milieux de culture pour les souches bactériennes

e. Les milieux liquides

- LB : Milieu Luria-Bertani permettant la culture des différentes souches bactériennes à 37°C, sous agitation. Ce milieu se compose de 10 g/l de bactotryptone, de 5 g/l d'extrait de levure, de 10 g/l de NaCl, le tout dans un litre d'eau distillée.
- SOC : Milieu riche dans lequel sont transférées les cellules procaryotes transformées. Ce milieu se compose de 20g/l de bactotryptone, 5g/l d'extrait de levure, 10mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 20 mM de glucose.

f. Les milieux solides

- Ce milieu s'obtient par dissolution à chaud de 15 g d'agar dans un litre de milieu LB. Un antibiotique peut y être ajouté pour sélectionner les bactéries ayant correctement incorporé un plasmide d'intérêt (par exemple 100 µg/ml d'ampicilline au milieu). Ce milieu est coulé à chaud dans des boîtes de Petri et se solidifie par refroidissement.

13.6 Digestion enzymatique

La solution d'ADN à digérer est incubée dans un tampon adéquat avec des enzymes de restriction pendant deux heures à 37°C. Les produits de la digestion sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose de concentration appropriée.

13.7 Extraction au phénol-chloroforme

Cette méthode permet d'éliminer toutes les protéines. La solution d'ADN plasmidien est mélangée avec un volume égal de phénol et de chloroforme pour purifier l'ADN. Cette solution est vortexée quelques secondes, puis centrifugée à vitesse maximale pendant 5 minutes. La phase aqueuse est isolée et à nouveau mélangée avec un volume égal de chloroforme/alcool iso-amylque dans une proportion 24 :1.

La précipitation de l'ADN se fait en ajoutant 2.5 volumes d'éthanol 100% et 0.1 volume de NaAc 3M pH=5.2 à une température de -70°C pendant une heure. La solution est ensuite centrifugée à 4°C pendant 30 minutes. Le culot obtenu est lavé avec 500 µl d'éthanol 70%, puis récupéré par centrifugation à 4°C pendant 15 minutes. Le culot est ensuite récupéré et séché au « speedvac » pour être resuspendu dans 20 µl d'eau bidistillée.

13.8 L'électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse permet la migration de l'ADN, chargé négativement, selon son poids moléculaire soumis à un champ électrique. La concentration en agarose dans le gel est de 1%. L'agarose est dissout dans une solution chaude de TAE 1X pH=7.6 (40 mM Tris, 20 mM acide acétique, 1 mM EDTA). Du cyber-safe est ajouté à la solution pour permettre la visualisation des bandes de migration aux UVs. Le mélange chaud est coulé dans un moule muni d'un « peigne » afin de former les puits. Une fois le gel solidifié, il est placé dans une cuvette remplie de TAE 1X. Les échantillons et du bleu de chargement sont déposés dans les puits. Dans un puits, un marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder) (Eurogentec, Liège, Belgium) est déposé pour avoir un repère lors de l'estimation du poids moléculaire des différents fragments d'ADN. La migration se fait grâce à un courant électrique avec une tension d'une centaine de volts. Après la migration, le gel est observé sur un illuminateur permettant ainsi la visualisation des différents fragments d'ADN.

13.9 La transformation des bactéries

La transformation bactérienne par choc thermique permet le transfert de matériel génétique exogène, ADN plasmidien, dans la bactérie.

Dans un premier temps, des cellules dites compétentes doivent être préparées. Les cellules sont placées dans 500 ml de LB. Lorsque la densité optique à 600 nm de la culture atteint 0.2-0.3, la croissance est arrêtée en plaçant la culture 10 minutes sur glace (la culture doit rester sur glace pour la suite de la transformation). Ensuite, la culture subit une centrifugation. Le culot de cellules est resuspendu dans $\frac{1}{4}$ de volume de MgCl₂ 0.1M et reposé sur glace pendant 5 minutes. Après centrifugation, le culot est resuspendu dans du CaCl₂ 0.1M et reposé sur glace. Finalement, après centrifugation, le culot est resuspendu dans un mélange de CaCl₂/Glycérol 15%. La suspension est aliquotée en volume de 80 à 100 µl et congelé sur carboglace. Ces aliquotes peuvent être conservées à -70°C.

Les cellules compétentes sont dégelées sur glace. Dans chaque aliquote, on ajoute 2 à 5 µl de plasmide que l'on désire insérer dans les bactéries. Les tubes sont directement remis 30 minutes sur glace avant de les incuber deux minutes à 37°C ou 45 secondes à 42°C. Après l'incubation, les tubes sont remis 2 minutes sur glace. Ensuite, 500 µl de SOC à 37°C sont ajoutés à chaque tube. Après 45 à 60 minutes à 37°C sous agitation, 150 µl de suspension bactérienne sont étalés à l'aide d'une tige de verre dans des boîtes de Pétri contenant de l'agar solidifié et l'antibiotique spécifique.

13.10 La minipréparation d'ADN

La minipréparation est une technique qui permet d'extraire de faibles quantités d'ADN plasmidien (100 ng à 20 µg) à partir de bactéries transformées.

Le milieu LB (5 ml) contenant un antibiotique approprié est inoculé avec une colonie et incubé à 37°C sous agitation orbitale pour la nuit. Une fraction de 1.5 ml de préculture bactérienne est centrifugée et le culot bactérien obtenu est resuspendu dans 350 µl de STET (10 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA pH=8, 0.1 M NaCl, 5% Triton X-100). Ensuite, les bactéries sont lysées par l'ajout de lysozyme (10 mg/ml dans 10 mM Tris-HCl pH=8) et les tubes sont plongés dans l'eau bouillante pendant 40 secondes. Une centrifugation est réalisée, ce qui permet la précipitation des

débris cellulaires, des protéines et de l'ADN chromosomique au fond de chaque tube. Seul le surnageant contenant l'ADN plasmidien est récupéré et ce dernier est précipité par l'ajout de 40 µl d'acétate de sodium 2.5 M pH=5.2 et de 420 µl d'isopropanol. Une dernière centrifugation à 4°C permet d'obtenir un culot d'ADN plasmidien. Ce dernier est lavé dans 1 ml d'éthanol 70%, séché et dissous dans de l'eau bidistillée contenant de la RNase (20 µg/ml) (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

13.11 La maxipréparation d'ADN

La maxipréparation permet d'obtenir de plus grandes quantités d'ADN plasmidien. L'isolation de l'ADN plasmidien se fait par lyse alcaline à partir d'une culture beaucoup plus grande dès le départ (200 à 500 ml de culture). Les maxipréparations sont réalisées grâce au kit « Nucleobond® AX500 » (Macherey-Nagel, Germany). La culture est centrifugée à faible vitesse pendant 5 à 10 minutes. La lyse de cellules se fait par resuspension du culot dans 12 ml de tampon S1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH=8). Ensuite 12 ml de tampon S2 (200 mM NaOH, 1% SDS) y sont mélangés et le tout est incubé pendant 5 minutes à température ambiante. L'ajout d'un volume équivalent de tampon S3 (2.8 M KAc pH=5.1) permet la précipitation de l'ADN génomique qui sera éliminé par filtration du mélange. Le surnageant récupéré est passé sur une colonne Nucleobond® AX500 équilibrée auparavant par le tampon N2 (100 mM Tris/H₃PO₄, 15% éthanol, 900 mM KCl, pH=6.3, 0.15% Triton X-100) afin d'y fixer le plasmide. La colonne est ensuite rincée 2 fois avec 16 ml de tampon N3 (100 mM Tris/H₃PO₄, 15% éthanol, 1150 mM KCl, pH=6.3). L'ADN plasmidien est éluté grâce au tampon N5 (100 mM Tris/H₃PO₄, 15% éthanol, 1000 mM KCl, pH=8.5). Sa précipitation se fait avec 0,7 volume d'isopropanol par centrifugation et lavage à l'éthanol 70% avant séchage. Le précipité est resuspendu dans de l'eau bidistillée ou un tampon approprié.

13.12 La microinjection dans les œufs

Méthode

Pour réaliser une injection, les poissons adultes doivent être croisés la veille à raison de deux mâles pour deux femelles. Le lendemain, dès que le cycle lumineux débute, les femelles commencent à pondre les œufs qui sont directement fécondés par les mâles. Les œufs tombent dans le fond du bac de croisement à travers une grille empêchant ainsi les poissons de manger les œufs. Ensuite, ils sont récoltés délicatement et mis dans une boîte de Pétri contenant une lame porte-objet fixe qui servira de support à l'injection. Les œufs fécondés sont alignés tout contre cette lame avant l'injection. Les stades « une » et « deux cellules » sont les stades auxquels l'injection doit avoir lieu (Fig. 6).

Les aiguilles utilisées lors de l'injection sont conçues au laboratoire à partir de fins capillaires de verre soumis à la chaleur et étirés à l'aide d'un appareillage (PB7 needle/electrode puller, Narishige, Japon). Les aiguilles fermées sont alors ouvertes avec une lame de scalpel.

La micro-injection se fait manuellement sous binoculaire par le biais d'un micro-injecteur (PICOSPRITZER®II, Paker Instrumentation, Fairfield, NJ, USA) qui contrôle la pression et le temps d'injection permettant de calibrer le volume de la goutte injectée. Le micro-injecteur est relié à une bomonne d'azote. Dans les expériences réalisées dans cette étude, l'injection se fait uniquement dans le jaune des œufs. Directement après l'injection, les embryons sont placés dans une boîte de Pétri contenant un tampon physiologique E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, 10⁻⁵% de bleu de méthylène) et placés dans un incubateur à 28.5°C pour obtenir une croissance optimale des embryons. Du PTU (Sigma, St. Louis, USA) peut être ajouté au milieu afin d'inhiber la formation de mélanine.

Le « knock-down »

Le « knock-down » est la réduction de l'expression d'un gène spécifique dans un organisme. Cela est obtenu par l'injection d'oligonucléotides antisens : les morpholinos. On utilise cette technique dans le cadre de l'étude de fonction d'un gène d'intérêt, permettant de chercher le phénotype obtenu suite à cette réduction

d'expression. Le « knock-out », abolition totale de l'expression d'un gène, par recombinaison homologue n'est pas encore faisable chez le zebrafish.

Les morpholinos sont des oligonucléotides antisens de synthèse de 18 à 25 pb. Ils sont capables de se lier à une séquence complémentaire d'ARN. Les morpholinos sont composés des quatre mêmes bases que les ARN. Ce qui les différencie, c'est le lien entre ces bases. Dans les morpholinos, les bases sont reliées par un groupement phosphodiamide à un anneau de morpholine tandis que dans l'ARN, les bases sont liées à un ribose par l'intermédiaire d'un lien phosphate.

Deux types de morpholinos sont utilisés :

- Les morpholinos de traduction bloquant la traduction de l'ARNm.
- Les morpholinos de « splicing » bloquant l'épissage correct du pré-ARNm.

Les morpholinos utilisés au sein du laboratoire arrivent sous forme lyophilisée, préquantifiés et stériles (Gene Tools, Oregon, USA). Ils sont resuspendus dans 300 µl de tampon Danieu 1X (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 0.6 mM Ca(NO₃)₂, 5 mM HEPES pH=7.6) et ensuite incubés à 65°C pendant 5 minutes pour obtenir une dilution complète. La concentration idéale est proche de 1 mM.

Dans le cadre de ce travail, trois morpholinos dirigés contre les récepteurs Fgfr1, Fgfr2 et Fgfr3 ont été utilisés. Leur séquence respective est :

tMOFgfr1a : 5'-GCAGCAGCGTGGTCTTCATTATCAT-3' (Scholpp, Groth et al. 2004)

sMOFgfr1a : 5'-ATTCAGTTGCATTCTCACCTGTAAC-3' (Nakayama, Miyake et al. 2008)

5' UTR MOFgfr1a : 5'-CAAAGATCCTCTACATCTGAACCTCC-3' (Thummel, Bai et al. 2006)

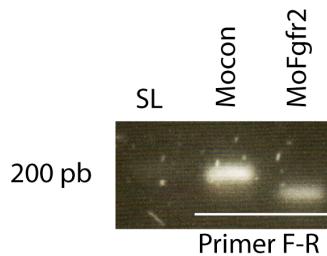
MOFgfr2 : 5'-GCTCAAATGTCTTACCTTCAGGTGC-3'

MOFgfr3 : 5'-AGTGAGGTGTAATGTCTGACCTGTG-3'

Le MOFgfr1 est un morpholino de traduction, tandis que ceux des Fgfr2 et Fgfr3 sont des morpholinos d'épissage.

L'efficacité du morpholino de splicing du récepteur 2 a été testée par RT-PCR en utilisant les oligonucléotides Fgfr2-MOTest-F: 5'-CTGCTAATGACCCTGGCAAC-3'

et Fgfr2-MOtest-R; 5'-AGCTGTCTTGGTCCAGACG-3' permettant de cibler les exons 2 et 3. L'injection du morpholino MoFgfr2 crée un splicing alternatif provoquant la délétion de 22 nucléotides et la production d'une protéine tronquée et inactive.



13.13 La coloration des cartilages à l'Alcian Blue

Les embryons sont fixés au stade 4 dpf dans une solution de PFA 4% à température ambiante pendant deux heures. Ils sont rincés par trois rinçages successifs avec une solution de PBST. La coloration des cartilages est obtenue en plaçant immédiatement les embryons dans une solution d'Alcian Blue 0.3% filtrée (70 ml d'éthanol, 30 ml d'acide acétique) pendant 24 heures à l'abri de la lumière et sous agitation douce.

Les embryons sont ensuite rincés dans de l'éthanol et réhydratés graduellement dans du PBST. La dépigmentation des embryons se fait par l'utilisation d'une solution de 1% NH₃ et 3% H₂O₂ pendant 15 à 45 minutes. Enfin, les embryons sont rincés dans une solution saturée de tétraborate de sodium et conservés dans 100% de glycérol à l'abri de la lumière et à 4°C.

13.14 L'hybridation *in situ* simple visible

Cette méthode permet de visualiser la localisation de l'ARNm transcrit spécifique d'un gène au sein des cellules d'un embryon à un stade de développement déterminé.

a) La synthèse de sondes

Les sondes utilisées sont complémentaires à l'ARNm d'un gène dont on désire étudier l'expression spatiale, ce sont donc des sondes antisens. Une sonde

sens peut être utilisée comme contrôle négatif. La synthèse des sondes se réalise à partir de l'ADN linéarisé par une enzyme de restriction. Il est ensuite purifié par extraction phénol-chloroforme. L'ADN purifié est transcrit par une ARN polymérase (Boehringer, Mannheim, Germany) spécifique en présence de NTPs dont une petite proportion d'UTP sont marqués à la digoxygénine (stérol végétal identifiable par une anticorps spécifique ; sa présence n'affecte pas la capacité d'hybridation de la sonde (Chevalier, Yi et al. 1997).

Le mélange de synthèse est composé de :

- 12 µl d'eau DEPC (Sigma, St. Louis, USA) (eau RNase-free traitée au diethyl pyro carbonate)
- 1 à 2 µg d'ADN linéarisé
- 2 µl de Dig-labelling mix 10X (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA)
- 2 µl de tampon de transcription 10X
- 1 µl d'inhibiteur de Rnase
- 2 µl d'ARN polymérase (SP6 ou T7)

Les échantillons obtenus sont incubés durant deux heures à 37°C avant d'y ajouter 1 µl de DNase I (RNase-free) suivi d'une autre incubation pendant 15 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 1 µl d'EDTA 0.5 M, pH=8 et l'ARN est précipité avec 2.5 µl de LiCl 4 M et 75 µl d'éthanol 100% pendant plusieurs heures à -70°C. Ensuite, le culot est lavé à l'éthanol 70% et resuspendu dans 20 µl d'eau DEPC. Les sondes peuvent être conservées à -70°C après l'ajout de 1 µl d'inhibiteur de RNases et d'un volume de formamide.

La vérification de la synthèse correcte des sondes se fait sur gel de formaldéhyde et de MOPS. Ce gel est composé de 42.5 ml d'eau DEPC dans laquelle on dissout à chaud 0.75 g d'agarose. On ajoute par la suite, 2.75 ml de formaldéhyde et 5 ml de tampon MOPS 10X. 2 µl de sonde, 2 µl d'eau bidistillée et 4 µl de tampon de chargement sont placés pendant 10 minutes à 80°C et ensuite mis sur glace. On ajoute du cybersafe pour visualiser l'ARN avant de déposer sur gel. On charge également un marqueur de poids moléculaire pour l'ARN (Invitrogen, USA).

b) Solutions

- PBS 10X : 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.2 M tampon PO₄ pH=7.3 (0.5 M Na₂HPO₄, 0.5 M Na₂H₂PO₄)
- PBST 1X : PBS 1X, 0.1% Tween 20
- PFA 4% : 2 g de paraformaldéhyde, 5 ml de PBS 10X, 45 ml d'eau bidistillée, 4 µl de NaOH 1 M
- SSC 20X : 3 M NaCl, 0.3 M Na₃Citrate pH=7 (ajustement avec HCl)
- SSCT 2X : SSC 2X, 0.1% de Tween 20
- SSCT 0.2X : SSC 0.2X, 0.1% de Tween 20
- Mix d'hybridation + (Hyb mix +) : 50% de formamide, 5X SSC, 0.1% de Tween 20, 50 µg/ml d'héparine, 500 µg/ml de Torula RNA dans de l'eau bidistillée et ajusté à pH=6 (ajustement avec de l'acide citrique)
- Mix d'hybridation – (Hyb mix -) : 50% de formamide, 5X SSC, 0.1% de Tween 20 dans de l'eau bidistillée et ajusté à pH=6 (ajustement avec de l'acide citrique)
- « Blocking buffer » : 2% de sérum de mouton, 2 mg/ml de BSA (Sigma, St. Louis, USA) dans du PBST
- « Staining buffer » : 10 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl pH=9.5, 1 mM de lévimasol, 0.1% de Tween 20
- « Staining solution » : 3.5 µl de NBT et 3.5 µl de BCIP par ml de « staining solution »
- Solution stop : PBST pH5.5, 1 mM EDTA
- MOPS 10X : 41.8 g de MOPS, 500 ml NaCl 100 mM, 300 ml d'eau bidistillée, 20 ml d'EDTA 500 mM pH=8, complété par de l'eau bidistillée jusqu'à un litre
- TNT : 0.1 M Tris-HCl pH=7.5, 0.15 M NaCl, 0.5% Tween 20
- « Blocking buffer fluo » : TNT avec 0.5% de « blocking powder » provenant du kit Perkin Elmer TSA™ Plus DNP (HRP) System.

c) Préparation des embryons, perméabilisation

Les embryons déchorionnés sont fixés aux stades de développement désirés dans de la PFA 4% pendant deux heures à température ambiante ou durant toute la nuit à 4°C. Plusieurs rinçages successifs sont effectués ensuite pour retirer la PFA en vue de déshydrater graduellement les embryons au méthanol. Celui-ci permet la conservation des embryons à -20°C. Ensuite, les embryons sont réhydratés progressivement dans du PBST et digérés dans la protéinase K (10 à 20 µg/ml)

(Merck, Germany), les rendant ainsi perméables à la sonde. Après hybridation, les embryons sont refixés 20 minutes dans de la PFA et lavés dans du PBST.

d) L'hybridation

Les embryons sont pré-hybridés dans 800 µl d'Hyb mix+ à 65°C pendant deux à cinq heures et hybridés par la suite dans 200 µl d'Hyb mix- contenant 100 à 200 ng de sonde, le tout à 65°C pendant toute la nuit. La sonde s'hybride aux ARNm complémentaires là où ils ont été synthétisés. L'excédant de sonde est éliminé par une série de lavages successifs.

- 1 lavage rapide à 65°C dans du Hyb mix-
- 1 lavage de 15 minutes à 65°C dans 75% d'Hyb mix-/25% SSC 2X
- 1 lavage de 15 minutes à 65°C dans 75% d'Hyb mix-/25% SSC 2X
- 1 lavage de 15 minutes à 65°C dans 25% d'Hyb mix-/75% SSC 2X
- 1 lavage de 15 minutes à 65°C dans 100% SSC 2X
- 2 lavages de 30 minutes à 65°C dans SSC 0.2X / 50% formamide
- 1 lavage de 10 minutes à température ambiante dans 75% SSC 0.2X / 25% PBST
- 1 lavage de 10 minutes à température ambiante dans 50% SSC 0.2X / 50% PBST
- 1 lavage de 10 minutes à température ambiante dans 25% SSC 0.2X / 75% PBST
- 1 lavage de 10 minutes à température ambiante dans 100% PBST

Suite à ces lavages, les embryons sont incubés pendant plusieurs heures dans du « blocking buffer » à température ambiante et ensuite incubés toute la nuit dans une solution d'anticorps anti-DIG couplés à la phosphatase alcaline dilués 5000X dans du « blocking buffer » à une température de 4°C. Le lendemain, huit lavages de 10 minutes dans du PBST et trois de 5 minutes dans du « staining buffer » sont réalisés à température ambiante.

La révélation se produit dans du « staining solution » comprenant les substrats BCIP, NBT à température ambiante et dans l'obscurité. L'apparition de marquage doit être suivie à intervalles réguliers sous binoculaire. Lorsque le marquage est jugé

suffisant, la réaction est arrêtée grâce à la solution stop. Les embryons peuvent être conservés par la suite dans de la PFA 1% et à 4°C.

13.15 L'hybridation *in situ* double fluorescence

L'hybridation *in situ* double fluorescence permet la visualisation des ARNm de deux gènes dans un même embryon. Cette visualisation est possible grâce à des fluorophores différents couplés à des anticorps anti-DIG et anti-DNP. DIG et DNP (étant des molécules qui marquent les sondes) sont utilisés lors de l'hybridation.

Les étapes d'hybridation des sondes sont les mêmes que l'hybridation *in situ* simple visible jusqu'au lavage de 10 minutes dans le PBST.

Dans chaque tube, on ajoute 500 µl de H₂O₂ 2% dans du PBST pendant 60 minutes (dilution 15X). Le but de cette étape est l'inactivation des peroxydases endogènes. Ensuite, 4 lavages de 5 minutes à température ambiante dans 2 ml de TNT sont réalisés. On place dans chaque tube 500 µl de « blocking buffer fluo » pendant 2 heures permettant de bloquer les sites aspécifiques qui ne seront plus reconnus par les différents anticorps. Pendant ce temps d'incubation, une préabsorption des deux anticorps est réalisée. 400 µl de chaque anticorps sont incubés dans 400 µl de « blocking buffer fluo » à température ambiante pendant 2 à 3 heures et sous agitation avec des embryons de stades de développement différents. Dans chaque tube, le « blocking buffer fluo » est retiré et remplacé par 400 µl du surnageant obtenu lors de la préabsorption et le tout est incubé toute la nuit à 4°C ou deux heures à température ambiante. Lors de ces étapes, les tubes doivent être placés dans l'obscurité et ce jusqu'à la fin de la manipulation. 8 lavages successifs de 10 minutes sont ensuite réalisés dans 2 ml de TNT suivi de deux rinçages de 10 minutes dans 2 ml de PBST. Les embryons sont ensuite incubés durant 15 minutes dans 25 µl d'Amplification Diluent 1X (Perkin Elmer Kit). Le marquage des embryons par les fluorophores est réalisé par l'ajout de 50 µl d'Amplification Diluent contenant du tyramide-Cy3 (dilution 1/25) ou FITC (dilution 1/50) pendant 60 minutes à température ambiante. L'ordre dans lequel sont utilisés les fluorophores est fonction de la couleur que l'on désire révéler en premier. Après ce temps d'incubation, on réalise deux lavages successifs de 5 minutes dans du TNT avant de répéter ces étapes à partir de l'inactivation des peroxydases et en utilisant le deuxième fluorophore non utilisé.

Après que le marquage par les deux fluorophores ait été réalisé, des lavages dans du TNT sont effectués pendant une semaine environ afin de supprimer le « bruit de fond » et d'obtenir un marquage net. Les embryons sont conservés dans de la PFA 1% à 4°C une fois les photos réalisées.

13.16 *Images et analyse*

Les photos des hybridations *in situ* visibles et celles des Alcian blue ont été réalisées sur un microscope Nikon® ECLIPSE 90i par le biais du programme NIS-Elements. Les images des hybridations *in situ* fluorescentes ont été prises sur un microscope confocal Leica TCS SP2 muni du programme LCS Leica SP2. Toutes les images ont été analysée et mises en forme via les programmes Adobe Photoshop et Illustrator.

13.17 *Acridine orange*

Afin de détecter la mort cellulaire non spécifique suite à l'injection de morpholino, les embryons ont été plongés dans une solution d'acridine orange de 5µg/ml suivi de 5 lavages successifs dans une solution d'E3. L'observation de la fluorescence et les photos ont été prises sur un microscope Nikon® ECLIPSE 90i avec une fréquence d'excitation de 502 nm.

13.18 *Expérience de Rescue*

Les ARNm humain *FGFR1* ont été synthétisés en utilisant le mMessage mMachine Sp6 Kit (Ambion, TX, USA) à partir d'un clone cDNA full length IRATp970D1237D (IMAGE ID : 3896359) de chez IMAGE. Le clone a été digéré par NotI. Pour les expériences de rescue, 80 pg de ARNm *FGFR1* ont été co-injectés avec les morpholinos dirigés contre les récepteurs 1a et 2 au stade une cellule. L'ARNm *fgfr2* a été obtenu par digestion du plasmide pZL1-zfgfr2 par BamHI et synthétisé au moyen du mMessage mMachine Sp6 Kit (Ambion, TX, USA). 100 pg de cet ARNm ont été co-injectés lors des expériences de knockdown de l'expression de *fgfr1a* et *fgfr2*.

14 Annexes

		lg 1	
z_fgfr1a	MMIMKTTLLLISVLLTQALQSGQ-RPAIQDEA-----	PAEPTSYTLDSGECKLELSCKAKEDTQKVWTKDVLVP	67
h_fgfr1	-MWSWKCLLFWAVLVTLATLCTARPSPTLPEQAQ-----	PWGAPVEVESFLVHPGDLQLRCRLRDVQSINWLRDGVQ	72
z_fgfr2	-----MGSVSRGRP-----	RRGGCG-DPTTDGMF	25
h_fgfr2	-MVSWGFRFICLVVVTMATLSLARPSFLSVEDDTLEPEEPPTKYQISQPEVYVAAPGESLEVRCLLDAAV-ISWTKGVH	1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80	78
z_fgfr1a	LVDGEHTRLRNQDMEIEKVEPADSGLYACFAQGLNSNHTEYFNISVTD-----	EEDEVDSSEEAKLSNDQ--NLPMA	138
h_fgfr1	LAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYACVTSSPGSDTTYSVNVDALPSSEDDDDDDSSEEKETDNTKPNRMPVA	152	
z_fgfr2	A----RGWLIGALLMLTAT-----VSVARPSLKIDLVNTSAEDAIISS--GDEDDETERSSD-VGADG-EQMLR	87	
h_fgfr2	LGPNNNRTVLIGEYLQIKGATPRDSGLYACTASRTVSETWYFMVNVTDAISS--GDEDDETDGAEDFVSENS--NNKRA	153	
	90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160	
		lg 2	
z_fgfr1a	* * : .:*****:*****:*****: * : * .:*****: * : .:*****: * : * :*****:*****:*	PVWAQPDKMEKKLHAVPASKTVKFRQCANGNPTPLKWLNGKEFKRDQRIGGFVKVREHMWTIIMESVVPSDGRGNYTCLV	218
h_fgfr1	PYWTSPKEMKKLHAVPAAKTVKFCPPSGTPNPLRWLKVNGKEFKPDHRIGGYKVRYATWSIIMDSVVPSDGRGNYTCIV	232	
z_fgfr2	PYWTFPKEKKLHAVPAANTVKFRCAAAGGNPKMRWLKNAPKFRDHRIGGYKVRLQHWTLLIMESVVPSDGRGNYTCLV	167	
h_fgfr2	PYWTNTKEMEKLHAVPAANTVKFRCPAGNPMPMTMRWLKGKEFKQEHRIHGIGGYKVRNQHWSLIMESVVPSDGRGNYTCVV	233	
	170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240	
		lg 3	
z_fgfr1a	***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	ENRHGSINHTYLDVVERSPHRPILQAGLPANRATAVGSVDVEFECKVFSDPQPHIQWLKHIEVNGSRYGPGLPVVRALK	298
h_fgfr1	ENEYGSINHTYLDVVERSPHRPILQAGLPANKTVVALGSNEVFMCVKYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPDNLPLYVQILK	312	
z_fgfr2	ENQYGSINHTYLDVVERSPHRPILQAGLPANVTQVGQDAKFVKCVKVSQDAQPHIQWLQHYTKNGSRYGPGLPVVRVLK	247	
h_fgfr2	ENEYGSINHTYLDVVERSPHRPILQAGLPANASTVVGGDVEFVCKVYSDAQPHIQWLKHVEKNGSKYGPGLPVYLKVLK	313	
	250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320	
		Domaine TM	
z_fgfr1a	:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	TAGVNNTDKEMEVLQLQIRNVSLEDAGEYTCLAGNSIGHSHHSAWLTYYKAVP--PTQLPNQTYLEWLIYCVGFLICVMVG	376
h_fgfr1	TAGVNNTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGHSHHSAWLTIVALEALERPAVMTSPLYLEIIIYCTGAFLISCMVG	392	
z_fgfr2	TAGVNNTDKEIEVLYLPNVTFEDAGEYTCLAGNSIGISYHTAWLTVHPAETNPIETDYPPDVETIAIYCIGVFLIACMVV	327	
h_fgfr2	AAGVNNTDKEIEVLYLIRNVTFEDAGEYTCLAGNSIGISFHSAWLTVLPAGREKEITASPDYLEIAIYCIGVFLIACMVV	393	
	330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400	
z_fgfr1a	...:***: .:***.** ** *****: * *****: * : ***:***: * . *** : * : * . * : .:***:***:*	TAVALAKMHSSAKKSDFNSQLAVHKLAKSIPLRRQTVTSVDSSSSMHSGGMLVRPS--RLSSSGSPMLSGVSEYELPQDPR	454
h_fgfr1	SVIVYKMKMKGTKKSDFHQSMAVHKLAKSIPLRRQV--SADSSASMSNVLLVRPS--RLSSSGTPMLAGVSEYELPEDPR	468	
z_fgfr2	IVVVCRMRTSAKKPDFSSQPAVHKLTKIPLRRQTVTSVSSSSSSMSSTPLVRITRRSSAHDDP--IPEYDLPEDPR	403	
h_fgfr2	TVILCRMKNTTKPDFSSQPAVHKLTKIPLRRQTVTSVASSSSSMSNTPLVRITRRLSSTADTPMLAGVSEYELPEDPK	473	
	410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480	
		Domaine catalitique Tyr-kinase	
z_fgfr1a	***:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	WEVQRDRLLVGLKPLGEGCFGQVVLBAAIGLDKDPKPNRVLKVAKMILKSDATEKDLSDLISEMEMMMKIIGKHKNIINLLGA	534
h_fgfr1	WELPDRLLVGLKPLGEGCFGQVVLBAAIGLDKDPKPNRVLKVAKMILKSDATEKDLSDLISEMEMMMKIIGKHKNIINLLGA	548	
z_fgfr2	WEFSRDKLTLGKPLGEGCFGQVVMMAEALGIDKDPKPEAVTVAKMILKDDATEKDLSDLVSEMEMMMKIIGKHKNIINLLGA	483	
h_fgfr2	WEFPDRDKLTLGKPLGEGCFGQVVMMAEAVGIDKDPKPEAVTVAVAKMILKDDATEKDLSDLVSEMEMMMKIIGKHKNIINLLGA	553	
	490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560	
z_fgfr1a	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	CTQDGPLYVIVEFAAKGNLIREYLRVRRPPGMECYCYNPDQVPVENMSIKDLVSCAYQVARGMEYLASKCIIHDLAARNVL	614
h_fgfr1	CTQDGPLYVIVEYASKGNLIREYLRQARRPPGLEYCYNPSHNPQEEQLSKDLVSCAYQVARGMEYLASKCIIHDLAARNVL	628	
z_fgfr2	CTQDGPLYVIVEYASKGNLIREYLRQARRPPGLEYSIDIARVSDEPLTFKDLVSCTYQVARGMEYLASKCIIHDLAARNVL	563	
h_fgfr2	CTQDGPLYVIVEYASKGNLIREYLRQARRPPGMEYSIDINRVPEEQMTFKDLVSCTYQLARGMEYLASKCIIHDLAARNVL	633	
	570.....580.....590.....600.....610.....620.....630.....640	
z_fgfr1a	***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	VTEDNVMKIADFGLARDIHIDYYKKTNTGRLPVKWMPEALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWEIFTLGGSPYPGPVVEELF	694
h_fgfr1	VTEDNVMKIADFGLARDIHIDYYKKTNTGRLPVKWMPEALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWEIFTLGGSPYPGPVVEELF	708	
z_fgfr2	VTEENVMKIADFGLARDINNIDYYKKTNTGRLPVKWMPEALFDRIYTHQSDVWSFGVLMWEIFTLGGSPYPGPVVEELF	643	
h_fgfr2	VTEENVMKIADFGLARDINNIDYYKKTNTGRLPVKWMPEALFDRIYTHQSDVWSFGVLMWEIFTLGGSPYPGPVVEELF	713	
	650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720	
z_fgfr1a	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	KLLKEGHMRDMDPSTCTHELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDRTLSMTSNQEYLDLSVSLDQSPNFPDTRSSCTSS	774
h_fgfr1	KLLKEGHMRDMDPSTCTHELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDRTLSMTSNQEYLDLSVSLDQSPNFPDTRSSCTSS	788	
z_fgfr2	KLLKEGHMRDMDPANCTNELYMMMRDCWHAISSHRPTFKQLVEDLDRILTLATNEEYLDLCAPVEQYSPSPFPDTRSS-CSS	722	
h_fgfr2	KLLKEGHMRDMDPANCTNELYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDRILTLTNEEYLDLSQPLEQYSPSPFPDTRSS-CSS	792	
	730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....800	
z_fgfr1a	*:*****: . . *****: . : . . *	GEDSVFSHADAGEPCLPKPPHPNRGVAFKKR	807
h_fgfr1	GEDSVFSHEPLPEPCLPRHPAQLANG-GLKRR	820	
z_fgfr2	GDDSVFSHDPЛАДЕПCLPKYQ-HINGG--IKT-	751	
h_fgfr2	GDDSVFSPDPMPYEPCLPQYP-HINGS--VKT-	821	
	810.....820.....830...	

BIBLIOGRAPHIE

15 Bibliographie

- (2009). Serveur d'images d'histologie. Paris.
- Akimenko, M. A., M. Ekker, et al. (1994). "Combinatorial expression of three zebrafish genes related to distal-less: part of a homeobox gene code for the head." *J Neurosci* **14**(6): 3475-3486.
- Alexander, J., M. Rothenberg, et al. (1999). "casanova plays an early and essential role in endoderm formation in zebrafish." *Developmental biology* **215**(2): 343-357.
- Arman, E., R. Haffner-Krausz, et al. (1998). "Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(9): 5082-5087.
- Baldridge, D., O. Shchelochkov, et al. (2010). "Signaling pathways in human skeletal dysplasias." *Annual review of genomics and human genetics* **11**: 189-217.
- Bonaventure, J. and C. Silve (2005). "[Hereditary skeletal dysplasias and FGFR3 and PTHR1 signaling pathways]." *Med Sci (Paris)* **21**(11): 954-961.
- Chevalier, J., J. Yi, et al. (1997). "Biotin and digoxigenin as labels for light and electron microscopy in situ hybridization probes: where do we stand?" *J Histochem Cytochem* **45**(4): 481-491.
- Chèvremont, M. (1966). *Notions de Cytologie et Histologie*. Liège.
- Close, R., S. Toro, et al. (2002). "Expression of the zinc finger Egr1 gene during zebrafish embryonic development." *Mech Dev* **118**(1-2): 269-272.
- Colvin, J. S., B. A. Bohne, et al. (1996). "Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3." *Nature genetics* **12**(4): 390-397.
- Crump, J. G., L. Maves, et al. (2004). "An essential role for Fgfs in endodermal pouch formation influences later craniofacial skeletal patterning." *Development* **131**(22): 5703-5716.
- Dalcq (2008). *Rôle du facteur de transcription Egr1 dans le développement des cartilages crâniens chez le zebrafish*, ULg.
- Dalcq, J., V. Pasque, et al. (2012). "RUNX3, EGR1 and SOX9B Form a Regulatory Cascade Required to Modulate BMP-Signaling during Cranial Cartilage Development in Zebrafish." *PloS one* **7**(11): e50140.
- Dalcq, J., V. Pasque, et al. (2012). "Runx3, Egr1 and Sox9b form a regulatory cascade required to modulate BMP-signaling during cranial cartilage development in zebrafish." *PLOS One in press*.
- David, N. B., L. Saint-Etienne, et al. (2002). "Requirement for endoderm and FGF3 in ventral head skeleton formation." *Development* **129**(19): 4457-4468.
- De Moerlooze, L., B. Spencer-Dene, et al. (2000). "An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis." *Development* **127**(3): 483-492.
- Delezoide, A. L., C. Benoist-Lasselin, et al. (1998). "Spatio-temporal expression of FGFR 1, 2 and 3 genes during human embryo-fetal ossification." *Mechanisms of development* **77**(1): 19-30.
- Deng, C., A. Wynshaw-Boris, et al. (1996). "Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth." *Cell* **84**(6): 911-921.
- Deng, C. X., A. Wynshaw-Boris, et al. (1994). "Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization." *Genes & development* **8**(24): 3045-3057.

- Drummond, I. A., P. Rohwer-Nutter, et al. (1994). "The zebrafish egr1 gene encodes a highly conserved, zinc-finger transcriptional regulator." *DNA Cell Biol* **13**(9): 953-961.
- Eswarakumar, V. P., I. Lax, et al. (2005). "Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors." *Cytokine Growth Factor Rev* **16**(2): 139-149.
- Eswarakumar, V. P., E. Monsonego-Ornan, et al. (2002). "The IIIc alternative of Fgfr2 is a positive regulator of bone formation." *Development* **129**(16): 3783-3793.
- Eswarakumar, V. P. and J. Schlessinger (2007). "Skeletal overgrowth is mediated by deficiency in a specific isoform of fibroblast growth factor receptor 3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(10): 3937-3942.
- Flores, M. V., E. Y. Lam, et al. (2006). "A hierarchy of Runx transcription factors modulate the onset of chondrogenesis in craniofacial endochondral bones in zebrafish." *Dev Dyn* **235**(11): 3166-3176.
- Flores, M. V., V. W. Tsang, et al. (2004). "Duplicate zebrafish runx2 orthologues are expressed in developing skeletal elements." *Gene Expr Patterns* **4**(5): 573-581.
- Gospodarowicz, D. (1974). "Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth." *Nature* **249**(453): 123-127.
- Hall, C., M. V. Flores, et al. (2006). "An essential role for zebrafish Fgfrl1 during gill cartilage development." *Mech Dev* **123**(12): 925-940.
- Hatakeyama, Y., R. S. Tuan, et al. (2004). "Distinct functions of BMP4 and GDF5 in the regulation of chondrogenesis." *Journal of cellular biochemistry* **91**(6): 1204-1217.
- Havens, B. A., D. Velonis, et al. (2008). "Roles of FGFR3 during morphogenesis of Meckel's cartilage and mandibular bones." *Dev Biol* **316**(2): 336-349.
- Haworth, K. E., J. M. Wilson, et al. (2007). "Sonic hedgehog in the pharyngeal endoderm controls arch pattern via regulation of Fgf8 in head ectoderm." *Developmental biology* **303**(1): 244-258.
- Hughes-Fulford, M. and C. F. Li (2011). "The role of FGF-2 and BMP-2 in regulation of gene induction, cell proliferation and mineralization." *Journal of orthopaedic surgery and research* **6**: 8.
- Itoh, N. (2007). "The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease." *Biol Pharm Bull* **30**(10): 1819-1825.
- Itoh, N. and M. Konishi (2007). "The zebrafish fgf family." *Zebrafish* **4**(3): 179-186.
- Itoh, N. and D. M. Ornitz (2004). "Evolution of the Fgf and Fgfr gene families." *Trends Genet* **20**(11): 563-569.
- Jackman, W. R., B. W. Draper, et al. (2004). "Fgf signaling is required for zebrafish tooth development." *Dev Biol* **274**(1): 139-157.
- Kan, S. H., N. Elanko, et al. (2002). "Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis." *American journal of human genetics* **70**(2): 472-486.
- Kikuchi, Y., L. A. Trinh, et al. (2000). "The zebrafish bonnie and clyde gene encodes a Mix family homeodomain protein that regulates the generation of endodermal precursors." *Genes & development* **14**(10): 1279-1289.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, et al. (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." *Dev Dyn* **203**(3): 253-310.
- Kimmel, C. B., C. T. Miller, et al. (2001). "Specification and morphogenesis of the zebrafish larval head skeleton." *Dev Biol* **233**(2): 239-257.

- Knight, R. D. and T. F. Schilling (2006). "Cranial neural crest and development of the head skeleton." *Adv Exp Med Biol* **589**: 120-133.
- Kulesa, P. M., C. M. Bailey, et al. (2010). "Cranial neural crest migration: new rules for an old road." *Developmental biology* **344**(2): 543-554.
- Lajeunie, E., S. Heuertz, et al. (2006). "Mutation screening in patients with syndromic craniosynostoses indicates that a limited number of recurrent FGFR2 mutations accounts for severe forms of Pfeiffer syndrome." *Eur J Hum Genet* **14**(3): 289-298.
- Maves, L., W. Jackman, et al. (2002). "FGF3 and FGF8 mediate a rhombomere 4 signaling activity in the zebrafish hindbrain." *Development* **129**(16): 3825-3837.
- McMahon, A. P., J. E. Champion, et al. (1990). "Developmental expression of the putative transcription factor Egr-1 suggests that Egr-1 and c-fos are coregulated in some tissues." *Development* **108**(2): 281-287.
- Medeiros, D. M. and J. G. Crump (2012). "New perspectives on pharyngeal dorsoventral patterning in development and evolution of the vertebrate jaw." *Developmental biology* **371**(2): 121-135.
- Miki, T., D. P. Bottaro, et al. (1992). "Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(1): 246-250.
- Mohammadi, M., G. McMahon, et al. (1997). "Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors." *Science* **276**(5314): 955-960.
- Mundlos, S. and B. R. Olsen (1997). "Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways." *FASEB J* **11**(2): 125-132.
- Nakayama, Y., A. Miyake, et al. (2008). "Fgf19 is required for zebrafish lens and retina development." *Dev Biol* **313**(2): 752-766.
- Nie, X., K. Luukko, et al. (2006). "BMP signalling in craniofacial development." *Int J Dev Biol* **50**(6): 511-521.
- Nishimura, R., K. Hata, et al. (2012). "Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors." *Journal of biochemistry* **151**(3): 247-254.
- Nüsslein-Volhard, C. and R. Dahm (2002). "Zebrafish." 303.
- Nüsslein-Volhard, C. D., R. (2002). *zebrfish*.
- Ornitz, D. M. and N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." *Genome Biol* **2**(3): reviews3005.3001-3005.3012.
- Ornitz, D. M. and N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." *Genome Biol* **2**(3): REVIEWS3005.
- Ornitz, D. M., J. Xu, et al. (1996). "Receptor specificity of the fibroblast growth factor family." *J Biol Chem* **271**(25): 15292-15297.
- Ota, S., N. Tonou-Fujimori, et al. (2010). "FGF receptor gene expression and its regulation by FGF signaling during early zebrafish development." *Genesis* **48**(12): 707-716.
- Partanen, J., L. Schwartz, et al. (1998). "Opposite phenotypes of hypomorphic and Y766 phosphorylation site mutations reveal a function for Fgfr1 in anteroposterior patterning of mouse embryos." *Genes & development* **12**(15): 2332-2344.
- Piotrowski, T., D. G. Ahn, et al. (2003). "The zebrafish van gogh mutation disrupts tbx1, which is involved in the DiGeorge deletion syndrome in humans." *Development* **130**(20): 5043-5052.

- Piotrowski, T. and C. Nusslein-Volhard (2000). "The endoderm plays an important role in patterning the segmented pharyngeal region in zebrafish (*Danio rerio*)."
Dev Biol **225**(2): 339-356.
- Piotrowski, T., T. F. Schilling, et al. (1996). "Jaw and branchial arch mutants in zebrafish II: anterior arches and cartilage differentiation."
Development **123**: 345-356.
- Pitteloud, N., A. Meysing, et al. (2006). "Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause Kallmann syndrome with a wide spectrum of reproductive phenotypes."
Molecular and cellular endocrinology **254-255**: 60-69.
- Powers, C. J., S. W. McLeskey, et al. (2000). "Fibroblast growth factors, their receptors and signaling."
Endocr Relat Cancer **7**(3): 165-197.
- Raible, F. and M. Brand (2001). "Tight transcriptional control of the ETS domain factors Erm and Pea3 by Fgf signaling during early zebrafish development."
Mech Dev **107**(1-2): 105-117.
- Rieckmann, T., I. Kotovic, et al. (2008). "The cell surface receptor FGFR1 forms constitutive dimers that promote cell adhesion."
Exp Cell Res **314**(5): 1071-1081.
- Robu, M. E., J. D. Larson, et al. (2007). "p53 activation by knockdown technologies."
PLoS genetics **3**(5): e78.
- Robu, M. E., J. D. Larson, et al. (2007). "p53 activation by knockdown technologies."
PLoS Genet **3**(5): e78.
- Roessler, E., E. Belloni, et al. (1996). "Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly."
Nat Genet **14**(3): 357-360.
- Roessler, E., Y. Ma, et al. (2009). "Truncating loss-of-function mutations of DISP1 contribute to holoprosencephaly-like microform features in humans."
Hum Genet **125**(4): 393-400.
- Rohner, N., M. Bercsenyi, et al. (2009). "Duplication of fgfr1 permits Fgf signaling to serve as a target for selection during domestication."
Current biology : CB **19**(19): 1642-1647.
- Santagati, F. and F. M. Rijli (2003). "Cranial neural crest and the building of the vertebrate head."
Nature reviews Neuroscience **4**(10): 806-818.
- Sawada, A., M. Shinya, et al. (2001). "Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation."
Development **128**(23): 4873-4880.
- Schier, A. F. and W. S. Talbot (2005). "Molecular genetics of axis formation in zebrafish."
Annu Rev Genet **39**: 561-613.
- Schilling, T. F. and C. B. Kimmel (1994). "Segment and cell type lineage restrictions during pharyngeal arch development in the zebrafish embryo."
Development **120**(3): 483-494.
- Schilling, T. F., T. Piotrowski, et al. (1996). "Jaw and branchial arch mutants in zebrafish I: branchial arches."
Development **123**: 329-344.
- Scholpp, S., C. Groth, et al. (2004). "Zebrafish fgfr1 is a member of the fgf8 synexpression group and is required for fgf8 signalling at the midbrain-hindbrain boundary."
Dev Genes Evol **214**(6): 285-295.
- Schwend, T. and S. C. Ahlgren (2009). "Zebrafish con/disp1 reveals multiple spatiotemporal requirements for Hedgehog-signaling in craniofacial development."
BMC developmental biology **9**: 59.
- Schwend, T. and S. C. Ahlgren (2009). "Zebrafish con/disp1 reveals multiple spatiotemporal requirements for Hedgehog-signaling in craniofacial development."
BMC Dev Biol **9**: 59.
- Shin, D., C. H. Shin, et al. (2007). "Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish."
Development **134**(11): 2041-2050.

- Shinya, M., S. Koshida, et al. (2001). "Fgf signalling through MAPK cascade is required for development of the subpallial telencephalon in zebrafish embryos." *Development* **128**(21): 4153-4164.
- Shum, L., X. Wang, et al. (2003). "BMP4 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy in the endochondral cranial base." *The International journal of developmental biology* **47**(6): 423-431.
- Sleeman, M., J. Fraser, et al. (2001). "Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5." *Gene* **271**(2): 171-182.
- Sperber, S. M. and I. B. Dawid (2008). "barx1 is necessary for ectomesenchyme proliferation and osteochondroprogenitor condensation in the zebrafish pharyngeal arches." *Dev Biol* **321**(1): 101-110.
- Sperber, S. M., V. Saxena, et al. (2008). "Zebrafish dlx2a contributes to hindbrain neural crest survival, is necessary for differentiation of sensory ganglia and functions with dlx1a in maturation of the arch cartilage elements." *Developmental biology* **314**(1): 59-70.
- Sternberg, P. W. and J. Alberola-Illa (1998). "Conspiracy theory: RAS and RAF do not act alone." *Cell* **95**(4): 447-450.
- Stricker, S., R. Fundele, et al. (2002). "Role of Runx genes in chondrocyte differentiation." *Developmental biology* **245**(1): 95-108.
- Thiel, G. and G. Cibelli (2002). "Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1." *J Cell Physiol* **193**(3): 287-292.
- Thisse, B. and C. Thisse (2005). "Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development." *Dev Biol* **287**(2): 390-402.
- Thummel, R., S. Bai, et al. (2006). "Inhibition of zebrafish fin regeneration using in vivo electroporation of morpholinos against fgfr1 and msxb." *Dev Dyn* **235**(2): 336-346.
- Tonou-Fujimori, N., M. Takahashi, et al. (2002). "Expression of the FGF receptor 2 gene (fgfr2) during embryogenesis in the zebrafish *Danio rerio*." *Mechanisms of development* **119 Suppl 1**: S173-178.
- Trokovic, N., R. Trokovic, et al. (2003). "Fgfr1 regulates patterning of the pharyngeal region." *Genes Dev* **17**(1): 141-153.
- Trueb, B., S. C. Neuhauss, et al. (2005). "Fish possess multiple copies of fgfrl1, the gene for a novel FGF receptor." *Biochim Biophys Acta* **1727**(1): 65-74.
- Trueb, B., L. Zhuang, et al. (2003). "Characterization of FGFR-L1, a novel fibroblast growth factor (FGF) receptor preferentially expressed in skeletal tissues." *J Biol Chem* **278**(36): 33857-33865.
- Valverde-Franco, G., H. Liu, et al. (2004). "Defective bone mineralization and osteopenia in young adult FGFR3-/- mice." *Hum Mol Genet* **13**(3): 271-284.
- Walshe, J. and I. Mason (2003). "Fgf signalling is required for formation of cartilage in the head." *Dev Biol* **264**(2): 522-536.
- Weinstein, M., X. Xu, et al. (1998). "FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung." *Development* **125**(18): 3615-3623.
- Wheater, P. R., Young, B., et al. (2001). *Histologie fonctionnelle*.
- Wolpert, L., Beddington, R., and al. (2004). *Biologie du développement : Les grands principes*.
- Xu, X., M. Weinstein, et al. (1998). "Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction." *Development* **125**(4): 753-765.

- Yamaguchi, T. P., K. Harpal, et al. (1994). "fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation." *Genes & development* **8**(24): 3032-3044.
- Yan, Y. L., C. T. Miller, et al. (2002). "A zebrafish sox9 gene required for cartilage morphogenesis." *Development* **129**(21): 5065-5079.
- Yan, Y. L., J. Willoughby, et al. (2005). "A pair of Sox: distinct and overlapping functions of zebrafish sox9 co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development." *Development* **132**(5): 1069-1083.
- Yardley, N. and M. I. Garcia-Castro (2012). "FGF signaling transforms non-neural ectoderm into neural crest." *Developmental biology* **372**(2): 166-177.
- Yayon, A., Y. Zimmer, et al. (1992). "A confined variable region confers ligand specificity on fibroblast growth factor receptors: implications for the origin of the immunoglobulin fold." *Embo J* **11**(5): 1885-1890.
- Yoshida, C. A., H. Yamamoto, et al. (2004). "Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog." *Genes & development* **18**(8): 952-963.
- Zhang, X., O. A. Ibrahim, et al. (2006). "Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family." *J Biol Chem* **281**(23): 15694-15700.
- Zuniga, E., M. Rippen, et al. (2011). "Gremlin 2 regulates distinct roles of BMP and Endothelin 1 signaling in dorsoventral patterning of the facial skeleton." *Development* **138**(23): 5147-5156.