

Thèse de doctorat  
présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences

**Régulation de voies de signalisation par deux  
acteurs de la voie *Nonsense-mediated Decay*,  
Dhx34 et Nbas : le cas particulier de  
l'adénohypophyse**

Laboratoire d'Organogenèse et Régénération, GIGA-Research,  
Faculté des Sciences, Université de Liège

Année académique 2016-2017

Recherche subventionnée par le Fonds pour la formation à la  
Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA) du F.R.S.-  
FNRS et par le Fonds Léon Fredericq

***Auteur*** : Thomas Windhausen

***Promoteur*** : Pr. Marc Muller

***Comité de thèse*** : Pr. Marc Thiry, Pr. Bernard Joris, Pr. Eric Parmentier, Pr. Marc Muller

***Jury de thèse*** : Pr. Marc Thiry (GIGA, Liège), Dr. Isabelle Manfroid (GIGA, Liège), Pr. Eric Bellefroid (ULB, Gosselies), Pr. Jean-Stéphane Joly (Neuro-PSI, Paris), Dr. Albert Beckers (CHU Liège), Pr. Bernard Joris (CIP, Liège), Pr. Marc Muller (GIGA, Liège).



# Avant-propos

Au cours de ce travail de thèse j'ai eu la chance de pouvoir travailler sur deux sujets indépendants portant tous deux sur le développement de l'organisme modèle *Danio rerio*. Le premier est à l'origine basé sur un criblage génétique visant à identifier des gènes régulateurs de l'adénohypophyse. Le laboratoire du Professeur Muller a pu ainsi mettre en évidence plusieurs gènes intéressants dont *dhx34*, un gène peu connu et prédit à l'époque pour coder pour une ARN hélicase. Grâce à une étude préliminaire nous avons pu mettre en évidence que Dhx34 est requis pour le développement correct de l'adénohypophyse chez le poisson zèbre. Il fut par la suite démontré que Dhx34 est impliqué dans la voie de dégradation des ARNm *Nonsense-mediated Decay* (NMD).

La voie NMD cible et dégrade les ARNm contenant un codon Stop au milieu de la séquence codante, et de ce fait joue un rôle crucial dans la prévention de la production de protéines tronquées potentiellement délétères pour l'organisme. Au cours de la dernière décennie, en plus, de ce rôle de « contrôle qualité », il a été démontré que la voie NMD est impliquée dans la régulation de l'abondance de nombreux transcrits physiologiques. L'étude de l'importance de la voie NMD sur le développement et la physiologie est relativement difficile chez les modèles mammifères en raison de la mortalité très précoce des mutants déficients en la voie. En alternative, nous proposons, au cours de ce travail de thèse, une étude de l'impact qu'a l'inactivation de la voie NMD chez le poisson osseux *D. rerio* via une diminution d'expression de deux acteurs centraux de cette voie, Dhx34 et Nbas. Nous nous sommes intéressés tout particulièrement au développement de l'adénohypophyse, qui est aujourd'hui relativement bien connu et dont l'importance physiologique n'est plus à prouver. Ce travail constitue la partie principale de ma thèse et fera l'objet d'une publication future.

Le deuxième sujet auquel je me suis intéressé est le développement osseux chez le poisson zèbre. Dans le cadre de cette étude nous avons entrepris l'étude du rôle de la voie Bmp sur la différenciation et la fonction des cellules productrices des os, les ostéoblastes. Outre l'étude des Bmps, nous avons pour but d'élaborer une méthode d'étude rapide et efficace de troubles squelettiques chez le poisson zèbre, notamment grâce à l'utilisation de lignées transgéniques ainsi qu'au marquage de l'oxyde nitrique (NO). Notre laboratoire s'est en effet rendu compte que les os sont une source importante de NO et que sa quantification permet une évaluation de l'activité métabolique des ostéoblastes. Ce travail fut publié en 2015 dans le journal *Molecules*, bien qu'intégré dans cette thèse, il ne sera pas présenté lors de l'exposé oral (1).





# Remerciements

*Je remercie en premier lieu mes parents sans qui je ne serais pas ici et qui m'ont transmis la fibre scientifique et la soif de connaissances. Un merci tout particulier à Manon qui malgré la durée et ma mauvaise humeur m'a toujours supporté, aidé et remotivé lors de la rédaction de cette thèse.*

*J'aimerais exprimer ma gratitude envers Marc Muller, qui a toujours su se montrer disponible et qui a pu éveiller le scientifique en moi. Merci pour tout ce que tu m'as appris, ta constante bonne humeur, ta bonté ainsi que tes vastes connaissances et pas seulement scientifiques furent très inspirantes pour moi.*

*An English thanks to Joerg, my bone mentor, from whom I learned so much and who allowed me to reach another level in English. I hope that I could get some Talen(t) now. Dans la catégorie mentors, un grand merci à Ben qui m'a beaucoup aidé au début de mon doctorat. Dernière, mais non des moindres, Yobhana tu m'as prise sous ton aile lors de mon mémoire et au début de ma thèse, tu m'as initiée à la recherche scientifique avec la gentillesse qui te caractérise tant, la team hypophyse dont on était les seuls membres me manquera, merci pour tout ce que tu as fait pour moi.*

*J'aimerais m'excuser envers tous les stagiaires qui ont eu le malheur de tomber sous ma coupe, en particulier Jordane, Steeve, Jérémie, Francesca et Thibault ; toutes ces brimades et ces humiliations étaient probablement de trop. Vous avez contribué à cette thèse de manière importante et m'avez fait découvrir la joie du travail en équipe, et je vous en remercie.*

*Je salue bien bas mes compagnons de galère, David et Marine. Depuis les études jusqu'à la fin du doc, ce fut un réel plaisir et même parfois réconfortant de traverser toutes ces épreuves à vos côtés. Ces années de doctorat auraient été bien tristes sans toutes les personnes du labo que je considère aujourd'hui comme des amis : Audrey, Nath, Justine, Aurélie, Tefa, Anne-So, Sarah, Claudia, Alice, Keerthana, Cristina, Stella, Dave, Arnaud, Thanh, Renaud, Oli, François, Yoann, Maxi et tous les autres ; je vous remercie et vous souhaite le meilleur pour l'avenir. Je tiens également à remercier Virginie, la maman du labo, pour tous ses conseils et aides qu'elle m'a apportés pour mes expériences ainsi que pour avoir été ma confidente du balcon. Merci également à Liliane pour sa gentillesse et ses conseils avisés au sujet des poissons.*

*Ces remerciements vont également aux membres de mon comité de thèse pour l'attention qu'ils ont portée à cette thèse. Je suis reconnaissant envers les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Je finis par Steph, Emman, Lila, Adri, Max, Thib (L&M), Ju, Kev, Thierry, Rob, Ken, Andy et Jérôme, vous êtes d'une nécessité vitale pour moi et vous avez constitué une soupape de décompression sans laquelle cette thèse ne se serait pas aussi bien passée.*



# Liste des abréviations

- Acth : adrenoccortictrophine
- AH : adenohypophyse
- ANR : arête neurale antérieure (anterior neural ridge)
- aPD : anterior Pars Distalis
- bHLH basique Hélice-Boucle-Hélice (basic Helix-Loop-Helix)
- Bmp : protéine morphogénique des os (Bone morphogenic protein)
- Cirspr : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- CNC : crête neurale crânienne
- DAF-FM DA : 4-amino- 5- méthylamino- 2', 7' - difluorofluorescéine diacétate
- dpc : jours après coïte (days post coitum)
- dpf : jours après fécondation (days post fecondation)
- EdU : 5-éthynyl-2'-désoxyuridine
- EJC : complexe protéique situé à la jonction exon-exon des ARNm matures (Exon Junction Complex)
- Fgf : Facteur de croissance des fibroblastes (Fibroblast growth factor)
- Fsh : hormone stimulatrice des follicules (Follicles-stimulating hormone)
- Gh : somatotrophine ou hormone de croissance (Growth hormone)
- GTPase : guanosine tri-phosphatase
- Hh : Hedgehog
- hpf : heures après fécondation (hours post fecondation)
- Lh : hormone lutéinisante (Luteinizing hormone)
- M-CSF : facteur de stimulation macrophagique (macrophage colony-stimulating factor)
- MEC : matrice extracellulaire
- MO : morpholino
- Msh : mélanotrophine (Melanotropes-stimulating hormone)
- NH : neurohypophyse
- NICD : partie intracellulaire de Notch (Notch intracellular domain)
- NMD : Nonsense-mediated decay
- NO : oxyde nitrique (nitric oxide)
- NTC : codon de terminaison naturel (natural terminaison codon)
- OPG : ostéoprotégérine
- PI : Pars Intermedia



- pPD : *posterior Pars Distalis*
- Prl : *Prolactine*
- PTC : codon de terminaison pré-mature (*Premature Termination Codon*)
- RANKL : ligand du récepteur activateur de NFκB (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*)
- RNPm : acide ribonucléoprotéique messenger
- RT-qPCR : *Reverse transcription polymerase chain reaction*
- Sl : *Somato*lactine
- SNC : système nerveux central
- SURF : Smg1-UPF1- Facteurs de relargage (*Smg1-UPF1-Release Factors*)
- Talen : *TAL Effectors Nuclease*
- Tsh : thyroïdostimulante (*Thyroid-stimulating hormone*)
- UTR : région de l'ARNm transcrite mais non traduite (*Untranslated Transcribed Region*)



# Table des matières

<b>I. Introduction .....</b>	<b>1</b>
I.1 LE POISSON ZÈBRE.....	2
I.2 LA VOIE NONSENSE-MEDIATED DECAY.....	6
I.3 DHX34 & NBAS .....	16
I.4 L'HYPOPHYSE.....	18
I.5 LA NEUROHYPOPHYSE.....	19
I.6 L'ADÉNOHYPOPHYSE .....	19
<b>Objectifs .....</b>	<b>41</b>
<b>II. Résultats .....</b>	<b>43</b>
II.1 MORPHOLOGIE GÉNÉRALE .....	44
II.2 EFFETS SUR L'ADÉNOHYPOPHYSE.....	44
II.3 MUTANT CRISPR DHX34 .....	53
II.4 PROLIFÉRATION & MORT CELLULAIRE.....	54
II.5 EFFETS SUR D'AUTRES TISSUS .....	56
<b>III. Conclusions &amp; Discussion .....</b>	<b>60</b>
III.1 IMPACTS DÉVELOPPEMENTAUX.....	61
III.2 INTERDÉPENDANCE DES VOIES DE SIGNALISATION .....	73
III.3 ÊTRE NMD OU NE PAS ÊTRE NMD ? .....	75
III.4 PERSPECTIVES .....	77
<b>IV. Matériels &amp; Méthodes .....</b>	<b>80</b>
IV.1 POISSON ZÈBRE.....	81
IV.2 TRAITEMENT CHIMIQUE DES LARVES.....	81
IV.3 MORPHOLINOS.....	82
IV.4 CRISPR .....	83
IV.5 HYBRIDATION IN SITU .....	86
IV.6 COLORATIONS TISSULAIRES.....	90
IV.7 IMMUNOHISTOCHEMIE.....	92
IV.8 EdU .....	93
IV.9 RT-QPCR.....	94
IV.10 BACTÉRIOLOGIE.....	95
IV.11 SOLUTIONS COMMUNES.....	97
<b>V. Sujet annexe .....</b>	<b>98</b>
V.1 INTRODUCTION .....	99
V.2 OBJECTIFS .....	108
V.3 RÉSULTATS.....	109
V.4 CONCLUSION & DISCUSSION .....	112
<b>VI. Bibliographie .....</b>	<b>113</b>





# I. Introduction

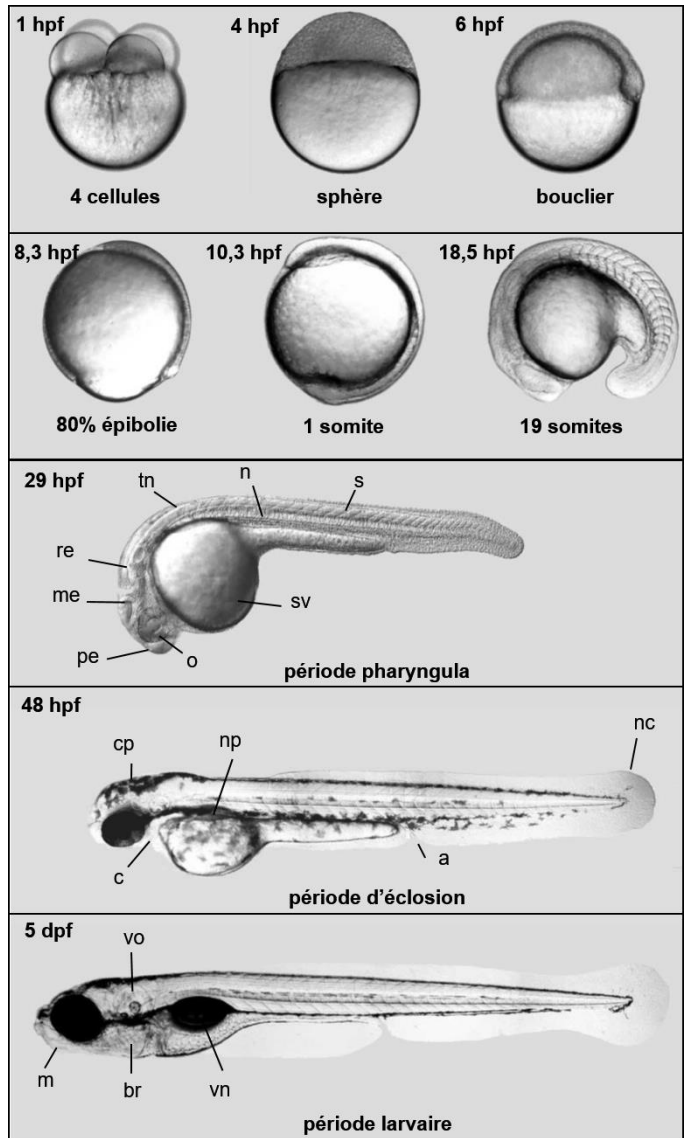
*« Savoir s'étonner à propos est le premier pas  
fait sur la route de la découverte. »*

LOUIS PASTEUR



**Figure I.1: Poisson zèbre**

Photographie de deux poissons *Danio rerio* adultes. Tiré de *Studiophotopro, fotolia.com*



**Figure I.2: Développement du poisson zèbre**

Photographie des étapes clés du développement embryonnaire de *Danio rerio*.

**hpf:** heures après fécondation; **dpf:** jours après fécondation **a:** anus; **br:** branchies; **cp:** cellule pigmentaire; **c:** coeur; **m:** machoire; **me:** mésencéphale; **nc:** nageoire caudale; **np:** nageoire pectorale; **n:** notochorde; **o:** oeil; **pe:** prosencéphale; **re:** rhombencéphale; **sv:** sac vitellin; **s:** somites; **tn:** tube neural; **vn:** vessie natatoire; **vo:** vésicule otique. Adapté de Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D. a, Odenthal, J., van Eeden, F.J., Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P., et al. (1996) *The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio. Development, 123, 1–36.*

Période	h	Description
Zygote	0	œuf nouvellement fécondé
Clivage	0,75	Divisions cellulaires synchrones méroblastiques
Blastula	2,25	Divisions métasynchrones à non synchrones; début de la transcription des gènes zygotiques; formation du feuillet syncytial vitellin; début de l'épibolie.
Gastrula	5,25	Epibolie; Mouvements morphogéniques cellulaires d'involution, de convergence et d'extension formant les feuillets germinatifs et définissant les axes de l'embryon.
Segmentation	10	Formation des somites, des primordia des arcs pharyngiens et des neuromères; début de l'organogenèse; début des premiers mouvements de l'embryon
Pharyngula	24	Stade phylotypique; l'axe du corps de l'embryon se redresse; début de la circulation sanguine; pigmentation; début du développement des nageoires.
Éclosion	48	Organogenèse primaire établie; développement du squelette cartilagineux; éclosion de l'embryon
Jeune larve	72	gonflement de la vessie natatoire; recherche de nourriture; comportements de fuite établis.

**Tableau I.1: Développement embryonnaire du poisson zèbre**

Tableau résumant les différents stades embryonnaires de *Danio rerio*. Adapté de Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) *Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn., 203, 253–310.*

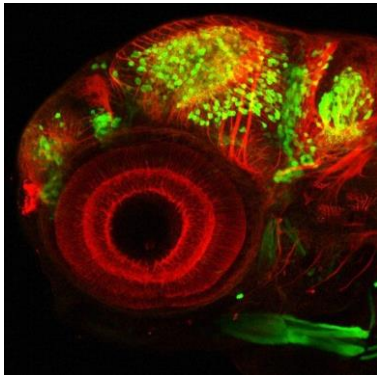
## I.1 Le poisson zèbre

*Danio rerio*, mieux connu sous le nom de poisson zèbre ou « zebrafish », est un téléostéen d'eau douce de la famille des *Cyprinidae* [Figure I.1]. Mesurant entre 2 et 5 cm à l'état adulte, ce poisson osseux fut nommé en raison des cinq bandes bleues longitudinales parcourant ses flancs. Originaire de la région Himalayenne, il est retrouvé en Inde, au Bangladesh, au Népal et dans la péninsule Malaisienne. Ses habitats naturels sont les rizières, les eaux stagnantes ainsi que les cours d'eau à faible débit (données revues dans (2)).

*Danio rerio* possède de nombreuses caractéristiques qui ont permis de le sélectionner comme un organisme modèle de choix pour les études développementales (données revues dans (3)). En tant que vertébré, ses mécanismes génétiques, physiologiques et développementaux sont beaucoup plus proches de l'homme que les modèles invertébrés tels que la drosophile ou le nématode. Son génome a été complètement séquencé, révélant environ 30.000 gènes répartis sur 25 chromosomes autosomes et présentant environ 85% de similarité de séquence avec ceux de l'homme. Grâce notamment à sa petite taille, l'élevage de poissons zèbres est simple et peu onéreux. Dans des conditions optimales, une femelle possède une fécondité élevée et peut donner naissance à plusieurs centaines d'embryons par semaine. Le développement se fait hors de la mère et les embryons sont transparents, ce qui rend l'étude embryonnaire aisée. De plus, le développement est très rapide puisque l'embryogenèse dure 24 heures, l'organogenèse est finie après 5 jours de développement et la maturité sexuelle est atteinte à 3 mois. Le poisson zèbre est également devenu, ces dernières années, particulièrement utile pour les études toxicologiques, pharmacologiques et comportementales (4-6). Les études réalisées ces dernières années ont révélé la remarquable similarité génétique et métabolique entre les poissons et les mammifères, ouvrant la voie pour l'étude de nombreuses pathologies humaines chez le poisson zèbre (7, 8). De plus, une meilleure compréhension de la forte capacité régénérative de ce petit poisson sera, à mon avis, un outil puissant pour l'amélioration de la médecine régénérative.

### I.1.A Etapes clé du développement

Seulement 10 heures après fécondation (hpf), l'embryon commence sa segmentation. L'embryon s'allonge et forme les somites, qui donneront plus tard le derme, les muscles et les vertèbres [Figure I.2 et Table I.1]. De plus, les différentes parties du cerveau (prosencephale, mésencephale et rhombencéphale) commencent à se former

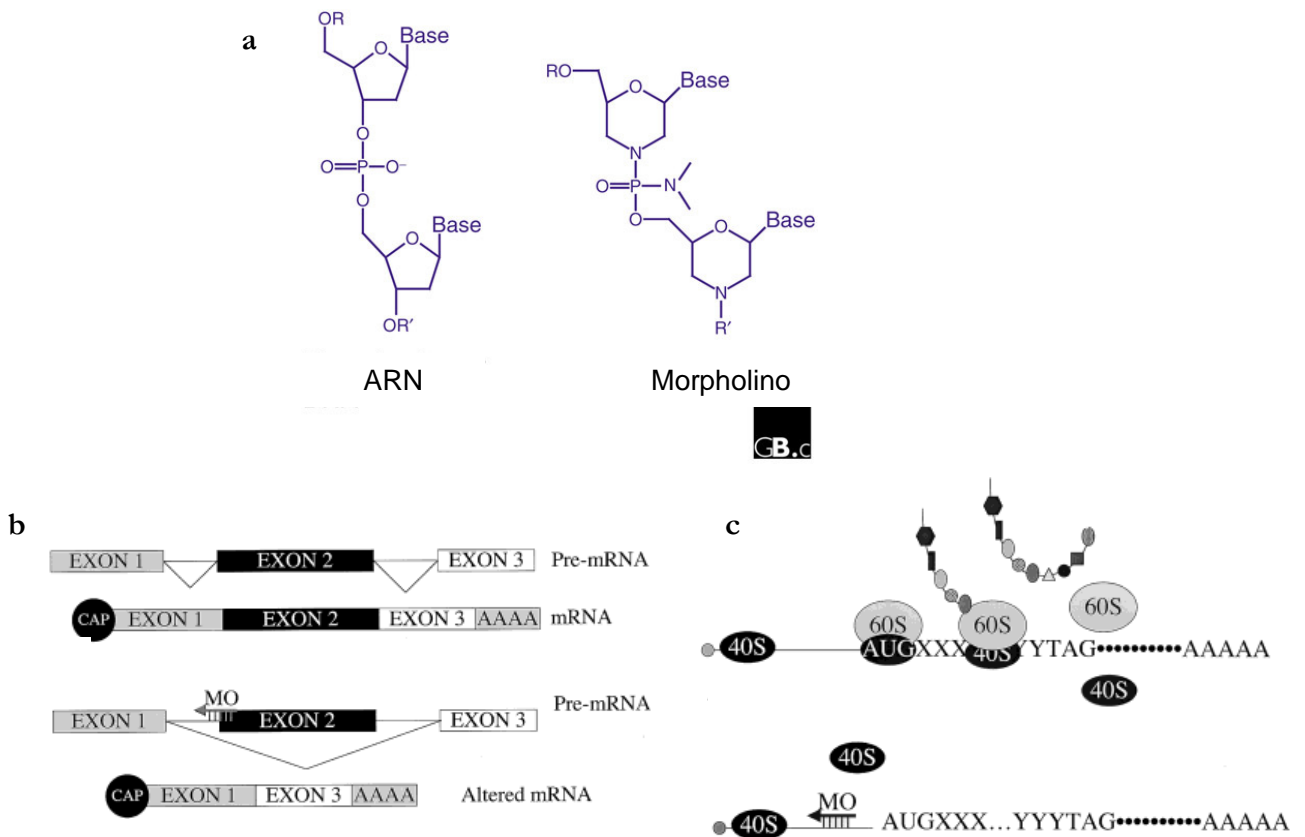


### Figure I.3: Poisson transgénique

Région de la tête d'un poisson zèbre transgénique. Certains neurones de cerveau sont marqués en vert par la GFP exprimée sous le contrôle du promoteur *dlx4/6*. Le marquage rouge correspond à la tubuline marquée par immunohistochimie.

Tiré de

<http://www.cellimagelibrary.org/images/39027>



### Figure I.4: Morpholino

(a) Comparaison d'un oligonucléotide d'ARN avec un oligonucléotide morpholino (MO). Au lieu d'être lié à une molécule de ribose, les bases d'un MO sont liées à un anneau de morpholine à 6 atomes. Ces anneaux de morpholine sont reliés par des groupements phosphodiarnidate non ioniques, au lieu de groupements phosphodiester pour les acides nucléiques classiques. Les bases liées aux anneaux de morpholines sont les mêmes que dans l'ARN. (b) Les morpholinos d'épissage se lient à la jonction entre un intron et un exon (ou entre un exon et un intron) et induisent l'épissage de l'exon (ou la rétention de l'intron) via une perturbation de la mécanique d'épissage. Un tel ARNm altéré est souvent non fonctionnel et rapidement dégradé par la cellule. (c) Un morpholino de traduction se lie à proximité du codon start et empêche stériquement la reconnaissance du codon start par la sous-unité ribosomiale 40S. Tiré de (a) [https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/189/138935/PMC138935\\_gb-2001-2-5-reviews1015-1.png](https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/189/138935/PMC138935_gb-2001-2-5-reviews1015-1.png) (b) et (c) Etker, S.C. and Larson, J.D. (2001) *Morphant technology in model developmental systems*. *Genesis*, 30, 89–93.

(9). Ce stade est également caractérisé par la migration des cellules de la crête neurale et le début de l'organogenèse. A 24 hpf, l'embryon entre dans la phase pharyngula durant laquelle la morphologie des différents vertébrés est comparable (stade phylotypique). Cette période dure environ 20 heures et est caractérisée par l'apparition des bourgeons des nageoires, l'établissement de la circulation sanguine et l'apparition des cellules pigmentaires (mélanocytes). La formation des mâchoires et des nageoires commence aux alentours de 48 hpf. Au même moment a lieu la phase d'éclosion, caractérisée par la sortie de l'embryon hors de son enveloppe protectrice, appelée chorion. A partir du quatrième jour de développement, l'embryon devient une larve et commence à nager ainsi qu'à se nourrir. La larve continue sa croissance et atteint le stade juvénile à 30 jours après fécondation (dpf) et devient adulte à 90 dpf.

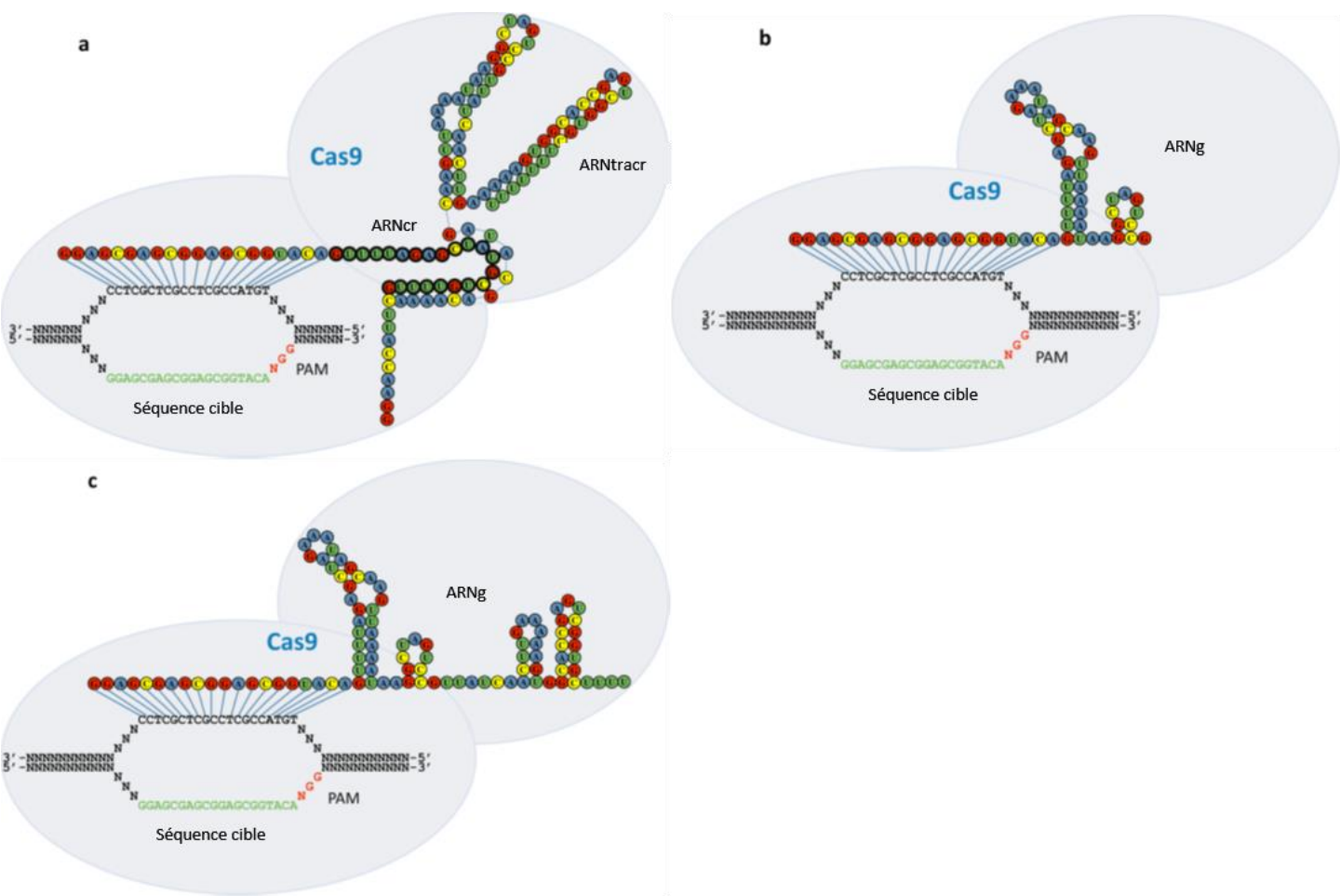
### I.1.B Transgénèse

Les études génétiques chez le poisson zèbre sont grandement facilitées grâce aux nombreuses lignées transgéniques disponibles ainsi qu'aux différentes méthodes capables d'en produire [Figure I.3]. Ainsi, les méthodes de transgénèse utilisant la méganucléase I-Sce-1 ou le système de transposon Tol2 sont couramment utilisées chez le poisson zèbre (données revues dans (3)).

L'avantage de lignées de poissons transgéniques exprimant une protéine fluorescente sous le contrôle d'un promoteur spécifique est l'observation directe de l'expression du transgène à différents stades de développement sur des animaux vivants. Comme discuté plus tard, l'avènement des nouvelles méthodes de modification du génome TALEN et CRISPR ouvrent de nouvelles voies dans l'élaboration de lignées transgéniques (10).

### I.1.C Génétique fonctionnelle

Les morpholinos sont des oligonucléotides antisense de 18 à 25pb synthétisés chimiquement et qui se lient à une séquence complémentaire précise de l'ARN (données revues dans (11)). Structurellement, les morpholinos possèdent les quatre mêmes nucléobases que l'ARN. La différence entre les morpholinos et l'ARN se situe au niveau du noyau de morpholine qui remplace le ribose, ainsi que par le lien entre les différents monomères [Figure I.4]. En effet, les monomères des morpholinos sont reliés par un groupement phosphodiamidate (charge neutre), alors que dans l'ARN les nucléotides sont liés par l'intermédiaire d'un groupement phosphodiester (charge négative). Ces caractéristiques rendent les molécules de morpholino beaucoup plus stables qu'un ARN et résistantes aux nucléases. Il existe deux grandes classes de



### Figure I.5: CRISPR-Cas9

Représentation schématique de la mécanique du système CRISPR-Cas9. (a) Nucléase Cas9 naturelle guidée par deux ARN. L'ARNcr interagit avec la séquence cible de l'ADN (en vert) à proximité d'une séquence PAM (en rouge). L'ARNtracr s'apparie à l'ARNcr et le complexe est reconnu et clivé par la nucléase Cas9 (forme bleu clair). (b) Système ARNg/Cas9 précédemment utilisé *in vitro*. L'ARNg est composé de portions de l'ARNcr et de l'ARNtracr de la version naturelle en (a). (c) Système ARNg/Cas9 actuellement utilisé *in vivo*. Les composants sont similaires à ce qu'on a vu en (b), mis à part qu'ici des séquences additionnelles ont été ajoutées à l'extrémité 3' de l'ARNtracr afin d'améliorer l'efficacité du système. Tiré de Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeb, J.R. and Joung, J.K. (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 31, 227–229.

morpholinos : les morpholinos d'épissage et les morpholinos de traduction. Les morpholinos d'épissage sont destinés à cibler une jonction exon/intron ou intron/exon, afin d'induire respectivement une rétention de l'intron ou une excision de l'exon. Les morpholinos de traduction sont conçus afin de s'hybrider aux alentours du codon Start, afin d'empêcher stériquement le scan de la sous-unité ribosomiale 40S et donc l'initiation de la traduction.

La méthode du TILLING (*Targeting Induced Local Lesion in Genome*) est une méthode de mutagenèse aléatoire (données revues dans (3)). Cette méthode utilise des agents mutagènes, généralement des agents alkylants tel que l'ENU (N-éthyl N-nitrosourée), sur des poissons afin de provoquer des mutations ponctuelles dans les gamètes. Un des grands désavantages de cette méthode est que les poissons qui sont porteurs de la mutation désirée sont également porteurs d'une centaine d'autres mutations (silencieuses ou non). Depuis de nombreuses années, le « *Sanger Institute* » a entrepris le « *Zebrafish Mutation Project* » destiné à produire en masse des mutants et les rendre disponibles pour la recherche scientifique.

Les protéines TAL produites par les bactéries pathogènes du genre *Xanthomonas* sont des protéines capables de se lier spécifiquement à l'ADN en vue de moduler l'expression génique de l'organisme hôte (données revues dans (12)). Les TALEN (*TAL Effectors Nuclease*) sont ses protéines fusion entre une protéine TAL et le domaine catalytique de la nucléase Fok1. Cette dernière fonctionne en dimère pour introduire des cassures double brin dans l'ADN. Les TALENs sont donc utilisées par paires dans le but d'introduire des coupures doubles brins à un endroit précis dans le génome. La réparation de ces cassures de l'ADN se fait soit par ligation d'extrémités non homologues (*non-homologous end joining* : NHEJ) ce qui introduit des insertions ou des délétions, soit par recombinaison homologue.

Le système CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) fut découvert chez les bactéries et les archéobactéries où il sert de mécanisme de défense en inactivant l'ADN exogène provenant de virus ou de plasmides. La méthode de mutagenèse ciblée qui en dérive requiert deux éléments [Figure I.5] (données revues dans (13-15)). Le premier est un ARN spécifique appelé ARN CRISPR (ARNcr) obtenu par la transcription *in vitro* du locus CRISPR, auquel des fragments d'ARN complémentaire à la séquence de l'ADN cible ont été insérés, ce qui confère à cet ARNcr sa spécificité pour le gène ciblé. Le deuxième élément requis est la nucléase Cas9, qui est capable d'induire des coupures double brin dans l'ADN. Afin de guider la Cas9 à la bonne position dans le génome, un ARN CRISPR transactivateur (ARNtracr) est ajouté à l'ARNcr grâce à une boucle de 4 bases, afin de construire un ARN chimérique, appelé l'ARN guide (ARNg), capable de lier la protéine Cas9 et de





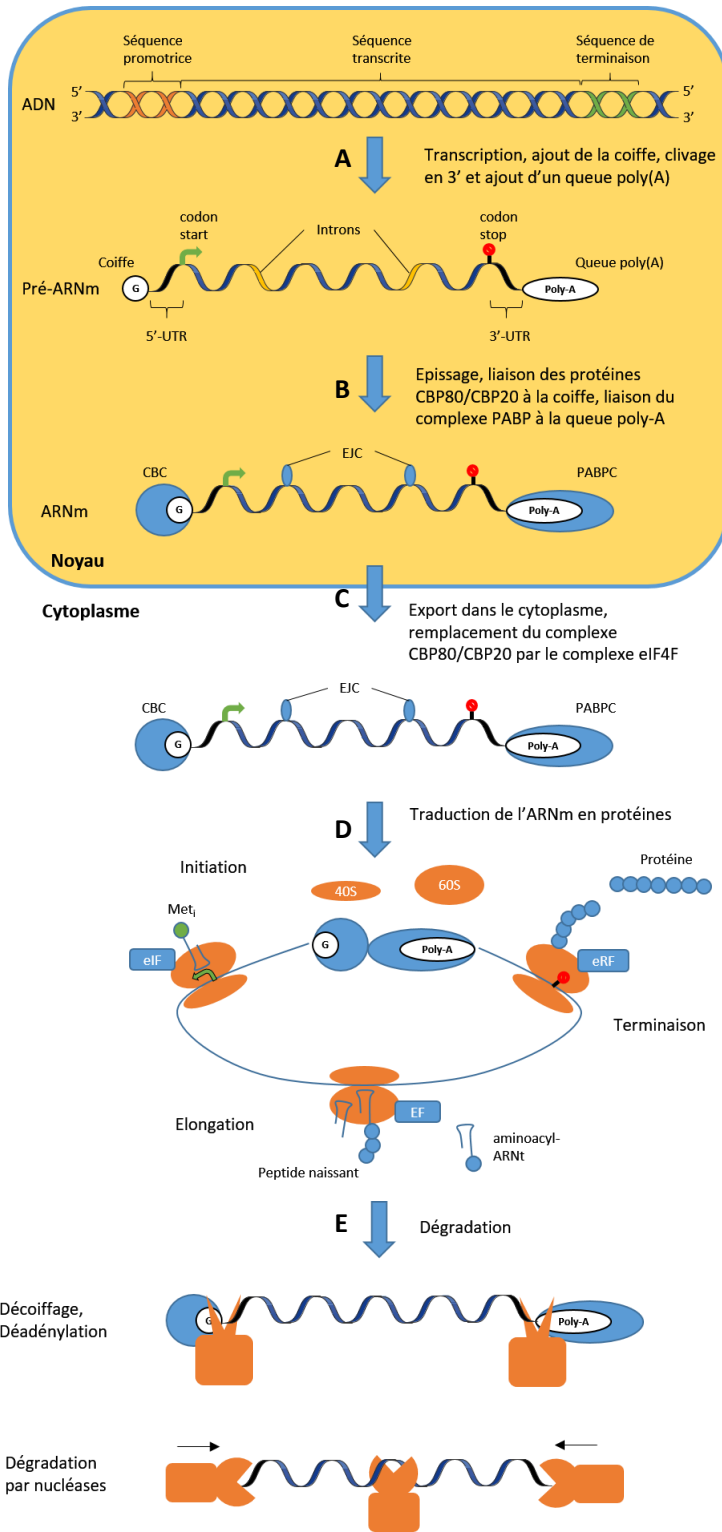
## Introduction

l'amener à l'endroit voulu dans le génome afin d'induire la cassure double-brin. La séquence cible doit être immédiatement adjacente à une séquence NGG (ou parfois NGA), connue sous le nom de la séquence PAM (*protospacer adjacent motif*) et qui sert à fournir un microenvironnement propice à la coupure double brin.

Le développement des nouvelles technologies de mutagenèse ciblée TALEN et CRISPR ouvre de nouvelles voies via l'induction de mutations inactivatrices ou fonctionnelles, l'introduction de transgènes, la permutation de parties de gènes (*swapping*) ainsi que dans la thérapie génique.

## Figure I.6: Vie d'un ARNm

(A) La synthèse d'un pré-ARNm se fait dans le noyau via la transcription d'un gène par l'ARN polymérase II induite par des facteurs de transcription. L'extrémité 5' de l'ARNm nouvellement formé est immédiatement recouverte d'une coiffe. Celle-ci est constituée d'un nucléotide guanine modifié, la 7-méthyl-guanosine triphosphate. L'extrémité 3' contient une séquence de polyadénylation qui va induire l'ajout de nombreuses adénines formant la queue poly(A). Entre la coiffe et le codon start se trouve une région de l'ARN qui ne sera pas traduite en protéine et appelée 5'-UTR (*UnTranslated Region*), une région similaire est localisée entre le codon stop et la queue poly(A). (B) La formation de l'ARNm mature est réalisée suite à l'épissage des régions introniques ainsi qu'à la jonction des exons adjacents; événements marqués par l'adjonction d'un complexe protéique de jonction des exons ou EJC (*Exon Junction Complex*). Les protéines CBP80 et CBP20 s'associent à la coiffe pour former le complexe de liaison à la coiffe ou CBC (*Cap Binding Complex*). De manière similaire un complexe protéique appelé PABPC (*Poly(A) Binding Protein Complex*) s'associe à la queue poly(A). (C) L'ARNm mature est ensuite exporté dans le cytoplasme en vue d'être traduit en protéine. Dans le cytoplasme le CBC change de nature puisque les protéines CBP80 et CBP20 sont remplacées par le complexe eIF4F, constitué de facteurs impliqués dans l'initiation de la traduction (D) La sous-unité ribosomiale 40S en association avec des facteurs d'initiation de la traduction (eIF) va se lier à la coiffe et scanner l'ARNm dans le sens 5'-3' à la recherche du codon start, lorsqu'elle l'a trouvé, la sous-unité 60S la rejoint pour former le ribosome 80S. Au sein de ce dernier, le codon start est reconnu par un ARNt initiateur qui porte le premier acide aminé incorporé, une méthionine. L'étape d'élongation de la chaîne peptidique consiste en la progression du ribosome le long de l'ARNm, chaque codon étant reconnu par un ARNt particulier et permettant l'ajout d'un acide aminé spécifique. Cette étape nécessite des facteurs d'élongation (EF). Notons qu'au cours de son passage, le ribosome va enlever les EJC présents sur l'ARNm. Une fois que le ribosome est arrivé à un codon stop, ce dernier est reconnu par des facteurs de terminaisons (eRF) qui vont permettre la libération de la protéine nouvellement formée ainsi que la dissociation des sous-unités ribosomiales. (E) La dégradation de l'ARNm consiste en la suppression de sa coiffe et de sa queue poly(A) suivie par une dégradation par des nucléases.

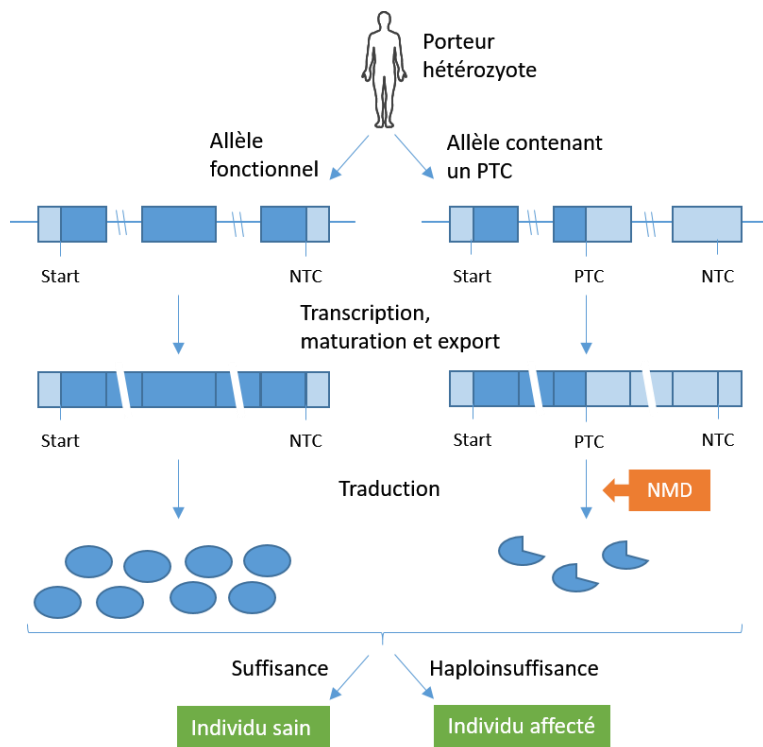


D'après Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and J.D. (2010) *Molecular cell biology 5th Edition*.

## I.2 La voie Nonsense-mediated Decay

Chez les eucaryotes, l'expression génétique fait intervenir une série d'étapes interconnectées et coordonnées, comprenant la transcription, la formation de la coiffe, la polyadénylation, l'épissage, l'export cytoplasmique, la traduction et la dégradation de l'ARNm [Figure I.6]. Afin d'assurer un haut degré de fidélité, différents mécanismes de contrôle de qualité ont émergé (16–18). Parmi ceux-ci, trois grandes voies surveillent le processus de transcription et l'apparition de transcrits aberrants induisant le blocage de la traduction ribosomiale. Le *No-Go Decay* (NGS) (19, 20), le *Non-Stop Decay* (NSD) (21, 22) et le *Nonsense-mediated Decay* (NMD) (23, 24) prennent en charge les ARNm qui présentent, respectivement, des structures secondaires ou des éléments de séquence aberrants, une absence de codon de terminaison ou la présence de codon de terminaison prématuré (PTC). La voie NMD est présente chez tous les eucaryotes étudiés à ce jour : levures, kinétoplastides, ciliés, nématodes, poissons, mouches, oiseaux, souris, humains et plantes (25).

En détectant et en dégradant les ARNm contenant des PTCs, le NMD prévient l'accumulation de protéines tronquées en C-terminal qui pourraient manifester des gains de fonction ou des effets de dominant négatif (26). La voie NMD joue donc un rôle clé dans de nombreuses maladies humaines, dont la  $\beta$ -thalassémie, la mucoviscidose et la dystrophie musculaire de Duchenne, ainsi que dans des cancers qui impliquent des PTCs dans des gènes suppresseurs de tumeurs tels que BRCA1, P53 ou WT1 [Figure I.7] (27). Les effets du NMD sur la manifestation d'une maladie peuvent être néfastes s'il empêche la production d'une protéine tronquée qui pourrait avoir des fonctions résiduelles, ou bénéfiques s'il prévient la synthèse de protéines tronquées toxiques (28). Un exemple d'une maladie dans laquelle l'action du NMD aggrave le phénotype est donné par certaines mutations dans le gène de la dystrophine. En effet, tandis que la plupart des mutations introduisant un PTC conduisent à la myopathie de Duchenne, des mutations introduisant un PTC à la fin de la région codante induisent des phénotypes très variables. Afin d'expliquer cette variabilité, il a été suggéré que les protéines tronquées d'une petite partie seulement de la région C-terminale seraient au moins partiellement fonctionnelles et donc capables de prévenir l'apparition de la maladie (29). Néanmoins, lorsque le NMD cible ces ARNm, il empêche la synthèse de la protéine et induit ainsi la maladie. A l'opposé, la  $\beta$ -thalassémie est un exemple d'une maladie dans laquelle le NMD a un effet bénéfique. En effet, la dégradation par le NMD des ARNm de la  $\beta$ -globine contenant un PTC empêche l'accumulation et la précipitation toxique de protéines tronquées en C-terminal. Dans un contexte hétérozygote, l'allèle sauvage peut fournir un niveau de



**Figure I.7: NMD modulateur de maladie**

La voie NMD joue un rôle crucial dans le développement phénotypique de mutations introduisant un PTC. Un porteur hétérozygote possédant un allèle fonctionnel (à droite) et un allèle contenant un PTC (à gauche). En ciblant les ARNms provenant de l'allèle contenant un PTC, la voie NMD réduit fortement la présence de protéines tronquées. Ce qui peut être bénéfique dans plusieurs cas afin d'éviter l'accumulation de protéines ayant perdu leur fonction, ayant développé une activité de dominant négatif ou ayant acquis de nouvelles fonctions. Par contre l'effet du NMD peut être délétère dans les cas où la protéine tronquée dont l'expression est limitée par le NMD, a conservé les fonctions de la protéine native. Seul l'allèle fonctionnel est donc traduit en protéine, ce qui peut être suffisant ou insuffisant pour assurer une fonction physiologique normale. *D'après Lykke-Andersen, S. and Jensen, T.H. (2015) Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 16, 665–677.*

**Tableau I.2: Sources des PTCs**

Niveau	Origine	Caractéristique
ADN	Mutations non-sens	Substitution de base
	Insertions et délétions	Changement du cadre de lecture suite à l'insertion ou la délétion de nucléotides aléatoires.
	Mutations affectant les signaux d'épissage	Epissage aberrant introduisant couramment des changements de cadre de lecture.
	Réarrangement programmé	Réarrangement de segments ADN des gènes des immunoglobulines ou des récepteurs des cellules T.
ARN	Erreurs au cours de la transcription	Erreur de l'ARN polymérase. Fréquence très basse
	Epissage alternatif non productif	45% des ARNms épissés alternativement sont prédits pour incorporer un PTC dans une de leur forme.
Traduction	Scan fuyant	Les ribosomes passent le AUG initiateur et initient la traduction à un AUG en aval induisant un changement de cadre de lecture. (Observé uniquement chez la levure)
	Changements de cadre de lecture programmés	Erreurs du ribosome lorsqu'il ne change pas de cadre de lecture de manière appropriée.

*D'après Mühlmann, O., Eberle, A.B., Stalder, L. and Zamudio Orozco, R. (2008) Recognition and elimination of nonsense mRNA. Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech., 1779, 538–549.*

$\beta$ -globine presque normal et ainsi prévenir la manifestation de la maladie. Notons toutefois que dans les rares cas où les ARNm contenant un PTC sont insensibles au NMD, la  $\beta$ -thalassémie prend une forme dominante (30, 31). Dans beaucoup de maladies causées par des mutations introduisant un codon de terminaison prématuré, il n'y a aucun traitement disponible. Cependant, dans les cas où le NMD élimine des transcrits qui, sans le PTC, pourraient coder pour une protéine fonctionnelle, des résultats prometteurs ont été obtenus grâce à des molécules permettant au ribosome de ne pas s'arrêter au PTC. Une de ces molécules, l'Ataluren est actuellement commercialisée sous le nom de Translarna™ par PTC Therapeutics et semble permettre le traitement de maladies telles que la dystrophie musculaire de Duchenne ou la fibrose kystique (32–34).

## I.2.A Sources des PTCs

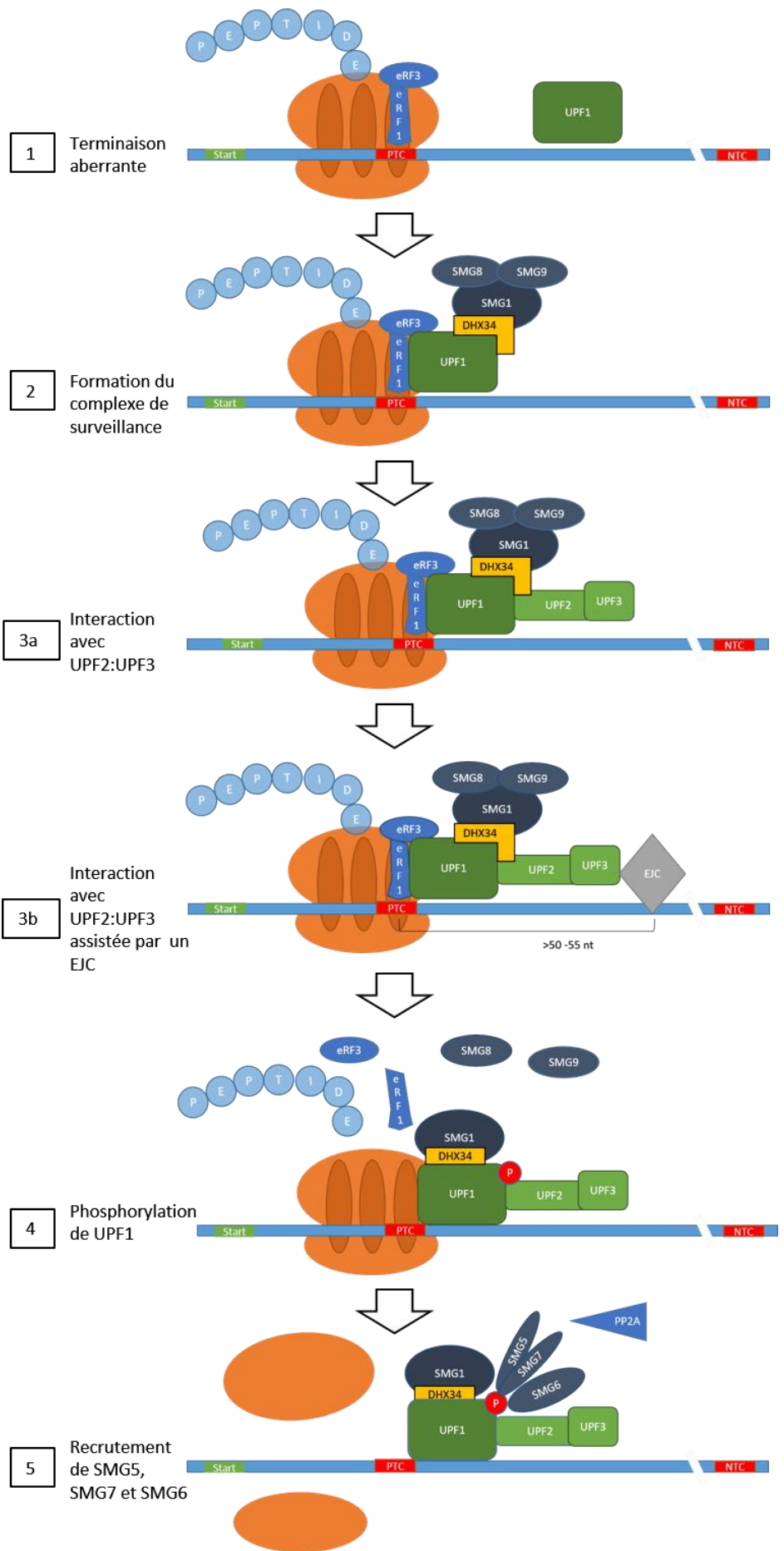
L'incorporation d'un codon Stop (UAA, UAG ou UGA) au sein de la séquence codante peut survenir de diverses manières [Tableau I.2]. Les sources les plus communes sont les mutations ponctuelles non-sens, les changements de cadre de lecture, des erreurs dans le choix du site d'initiation de la traduction ou des mutations qui altèrent les signaux d'épissage (données revues dans (35, 36)). Une autre source de PTCs sont les réarrangements programmés des gènes codant pour les récepteurs des cellules T (TCR) et les immunoglobulines (Ig). En effet, au cours de la maturation des lymphocytes, les gènes codant pour les récepteurs antigéniques (TCR ou Ig) subissent des réarrangements par recombinaison d'éléments d'ADN spécifiques, afin d'augmenter le répertoire de reconnaissance des antigènes. (37). Ces réarrangements peuvent mener à des changements de cadre de lecture introduisant des PTCs et activant la réponse du NMD. Au niveau de l'ARN, des erreurs durant la transcription ainsi que l'épissage alternatif des pré-ARNm peuvent générer des ARNm contenant des PTCs (38–41). Alors que seuls 0.05% à 0.5% des transcrits sont estimés acquérir un PTC via des erreurs au niveau de la transcription, il est estimé qu'un tiers des isoformes produites par épissage alternatif génère une forme ciblée par le NMD (42).

## I.2.B Mécanisme moléculaire

Les premiers facteurs requis pour la voie NMD ont été identifiés grâce à des études génétiques chez *S. cerevisiae* (appelés Upfs, pour *up-frameshift*) et chez *C.elegans* (appelés SMGs, pour *suppressor of morphological defects on genitalia*) (44–48). Les orthologues mammaliens ont ensuite été identifiés sur base de leurs similarités de séquence (49–52). Chez les mammifères, la voie NMD comprend les facteurs UPF1,

## Figure I.8: Mécanisme du NMD

(1) Lorsque la traduction est stoppée au niveau d'un PTC et jugée comme aberrante, UPF1 va être capable de se lier à eRF1 et eRF3 situés dans le ribosome à l'arrêt. (2) Cette association va permettre le recrutement de DHX34, SMG1, SMG8 et SMG9, pour former le complexe de surveillance. DHX34 sert de lien moléculaire entre UPF1 et SMG1. SMG8 et SMG9 inhibent l'activité sérine-thréonine kinase de SMG1. (3) L'activation de la voie NMD est scellée par l'interaction de UPF1 avec le complexe UPF2:UPF3, cette interaction peut être libre (3a) ou être facilitée par la présence d'un EJC à proximité (3b). L'interaction de UPF1 avec UPF2:UPF3, va induire un changement conformationnel de UPF1, la libération de eRF1, eRF3, du peptide nouvellement formé et des sous-unité ribosomiales. (4) Ce changement de conformation va induire la libération de SMG8 et SMG9, et ainsi permettre la phosphorylation de UPF1 par SMG1. (5) Une fois phosphorylé UPF1 va être capable de recruter SMG5, SMG6 et SMG7, qui vont induire la dégradation de l'ARNm et recruter la phosphatase PP2A afin de déphosphoryler UPF1. *D'après Lykke-Andersen, S. and Jensen, T.H. (2015) Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 16, 665–677. & Nicholson, P., Yepiskoposyan, H., Metzger, S., Zamudio Orozco, R., Kleinschmidt, N. and Mühlemann, O. (2010) Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. Cell. Mol. Life Sci., 67, 677–700.*



UPF2, UPF3A, UPF3B, SMG1, SMG5, SMG6, SMG7, SMG8, SMG9, NBAS et DHX34 (53–55).

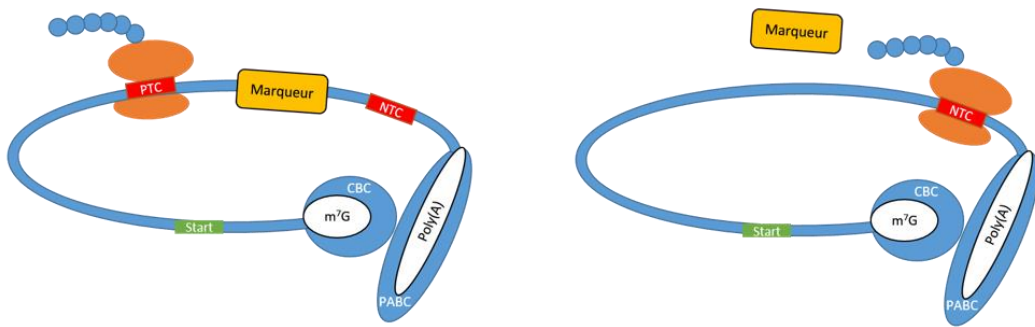
UPF1, UPF2 et UPF3 représentent le cœur de la machinerie du NMD [Figure I.8]. Parmi ceux-ci, UPF1 est le facteur le plus important fonctionnellement, ce qui se traduit par le fait qu'il est le plus conservé (48, 53). UPF1 présente un domaine ATPase capable de lier l'ARN, et un domaine hélicase 5'-3' de l'ARN dépendant de l'ATP (56–58). UPF1 semble se lier à tous les ARNm en cours de traduction de manière transitoire et peu spécifique (données revues dans (36)). UPF2 est capable de se lier simultanément à UPF1 et à UPF3 ; elle sert donc de lien moléculaire entre les deux protéines (59, 60). UPF3 est la moins conservée des protéines UPF, chez les mammifères on retrouve 2 gènes *UPF3*, *UPF3A* et *UPF3B* (aussi appelé *UPF3X* puisqu'il est situé sur le chromosome X) (données revues dans (35)). Malgré leurs similarités, il semble que UPF3B soit plus efficace que UPF3A à déclencher le NMD.

Lorsque qu'un ribosome est arrêté au niveau d'un PTC, UPF1 va s'associer avec les facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3 (*eukaryotic release factor*) ainsi qu'avec SMG1 afin de former le complexe de surveillance SURF (*Smg1-UPF1-Release Factors*) (61, 62). Au sein de ce complexe, la kinase SMG1 est adjointe à 2 protéines qui inhibent sa fonction enzymatique, SMG8 et SMG9. Lorsque UPF1 est lié à eRF1 et eRF3, il présente une conformation fermée ce qui accroît son activité de liaison à l'ARNm par le domaine hélicase mais diminue ses activités ATPase et hélicase. L'activation de la voie NMD est définitivement scellée lorsque UPF1 se lie au complexe UPF2:UPF3 pour former le complexe de dégradation (données revues dans (28, 63)). La liaison de UPF2:UPF3 libère eRF1 et eRF3 et permet d'ouvrir la conformation protéique de UPF1, ce qui diminue sa capacité à lier l'ARN mais accroît ses activités ATPase et hélicase. Le changement de conformation de UPF1 va permettre la libération de SMG8 et SMG9 ; son inhibition étant dès lors levée, la sérine-thréonine kinase SMG1 va induire la phosphorylation de UPF1. L'hélicase à ARN DHX34 sert de lien moléculaire entre UPF1 et SMG1 (64, 65). De plus, elle assure l'interaction de UPF1 avec UPF2. En permettant la phosphorylation et le changement fonctionnel de UPF1, DHX34 joue donc un rôle central dans la transformation du complexe de surveillance en un complexe de dégradation.

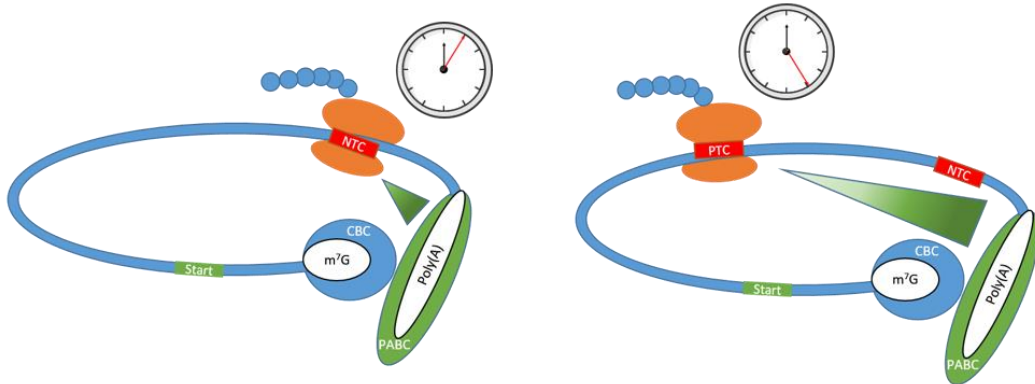
UPF2 et UPF3 sont capables de se lier de manière libre à UPF1 mais la présence d'un complexe de jonction exon-exon à proximité facilite cette interaction. Au cours du processus d'épissage des pré-ARNm chez les vertébrés, un complexe protéique appelé le complexe de jonction exon-exon (EJC) se forme à environs 20-24 nucléotides en amont des jonctions entre exons (données revues dans (28)). Il a été constaté que les facteurs du NMD, UPF2 et UPF3 peuvent s'associer à l'EJC, ce qui suggère un rôle



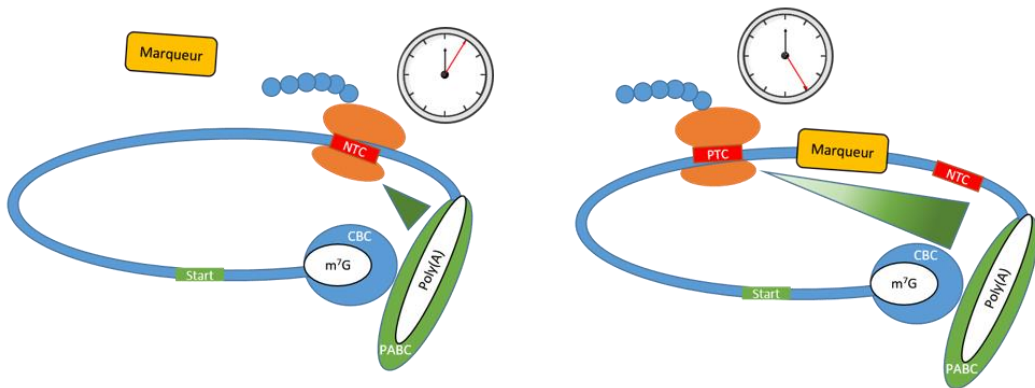
### (A) Modèle du marqueur en aval



### (B) Modèle de la terminaison aberrante



### (C) Modèle Unifié



Terminaison normale

Terminaison déclenchant le NMD

### Figure I.9: Modèles de détections d'un PTC par le NMD

(A) Le modèle du marqueur en aval, postule qu'un marqueur moléculaire est déposé le long de l'ARNm en amont du codon stop naturel. Ce marqueur est enlevé par le passage du ribosome et la terminaison se déroule normalement. Par contre, lorsque l'évènement de terminaison a lieu en amont de ce marqueur, celui-ci déclenche la réponse NMD. (B) Le modèle de la terminaison aberrante postule que l'arrêt de la terminaison au niveau d'un NTC est assez différent de la terminaison au niveau d'un PTC pour déclencher la voie NMD. La différence pourrait résulter par exemple de la proximité des protéines associées à la queue poly(A) (PABC) et/ou au fait que la terminaison au niveau d'un NTC est plus rapide que lorsqu'elle survient au niveau d'un PTC. (C) En fait, les deux types de modèles cités précédemment ne sont pas mutuellement exclusifs et ont mené à l'apparition d'un troisième modèle dit « unifié ». D'après Shyu, A.-B., Wilkinson, M.F. and van Hoof, A. (2008) *Messenger RNA regulation: to translate or to degrade*. EMBO J., 27, 471–481. & Brogna, S., McLeod, T. and Petric, M. (2016) *The Meaning of NMD: Translate or Perish*. Trends Genet., 32, 395–407.



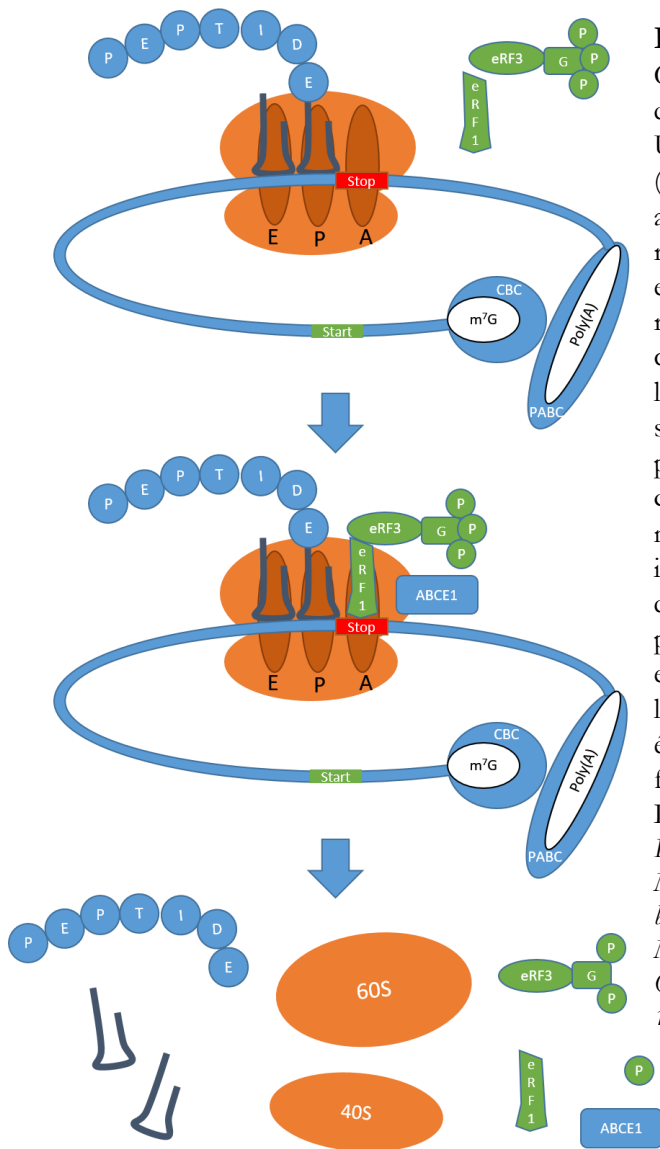
majeur de l'EJC dans la mécanique du NMD. Les EJC localisés au sein d'un ORF sont enlevés lors du passage du ribosome sur l'ARNm. Par contre, lorsque la traduction s'arrête prématurément au niveau d'un PTC, la présence d'un EJC à plus de 25 nucléotides en aval facilite grandement l'interaction de UPF2 et UPF3 avec UPF1 en raison de leur proximité. Il est toutefois important de noter que plusieurs études font état de voies NMD UPF2- et UPF3- indépendantes (66-68).

La version phosphorylée de UPF1 va recruter les protéines SMG5, SMG6 et SMG7 qui sont responsables de la dégradation de l'ARNm cible et provoquent la déphosphorylation de UPF1 (données revues dans (35)). Il a été suggéré que SMG7 est capable de se lier à la version phosphorylée de UPF1 et d'interagir avec SMG5 (69-71). Le complexe SMG5:SMG7 semble être impliqué dans la déphosphorylation de UPF1 via le recrutement de la phosphatase PP2A. De plus, le complexe SMG5:SMG7 induit la dégradation de l'ARNm via le recrutement du complexe d'ubiquitination et de déadénylation CCR4-NOT (72). SMG6 se lie également à UPF1 et possède des activités phosphodiesterase et nucléase (73). SMG6 agit donc comme une endonucléase capable de cliver un ARNm aberrant à proximité du PTC (74, 75).

Longtemps on a pensé que seuls les ARNm liés au complexe CBP80:CBP20 (*Cap Binding Protein*) pouvaient être la cible du NMD, ce qui implique que le processus devait se réaliser au cours d'un tour de traduction préliminaire (*pioneer round of translation*) potentiellement au sein du noyau, puisque dans le cytoplasme le complexe CBP80:CBP20 est remplacé par le complexe eIF4F, un facteur favorisant la traduction protéique. Or il a été démontré que le NMD peut aussi cibler des ARNm associés au complexe eIF4F ; la question de savoir où se déroule la voie NMD reste donc encore ouverte (76, 77).

## I.2.C Détection d'un ARN PTC+

La détection d'un codon Stop aberrant est une étape dépendante de la traduction impliquant le couplage entre le ribosome arrêté au codon stop et un signal en cis situé en aval sur l'ARNm (données revues dans (36)). Ce couplage va mener au recrutement des acteurs du NMD formant un complexe de surveillance et en sa transformation en un complexe de dégradation menant à l'élimination de l'ARNm. Malgré de nombreuses excellentes études, les mécanismes moléculaires par lesquels la voie NMD fait la distinction entre une cible et un transcrit normal ne sont pas encore parfaitement compris. Plusieurs modèles ont été décrits, mais peuvent être classés en 2 catégories [Figure I.9] (données revues dans (78, 79)).



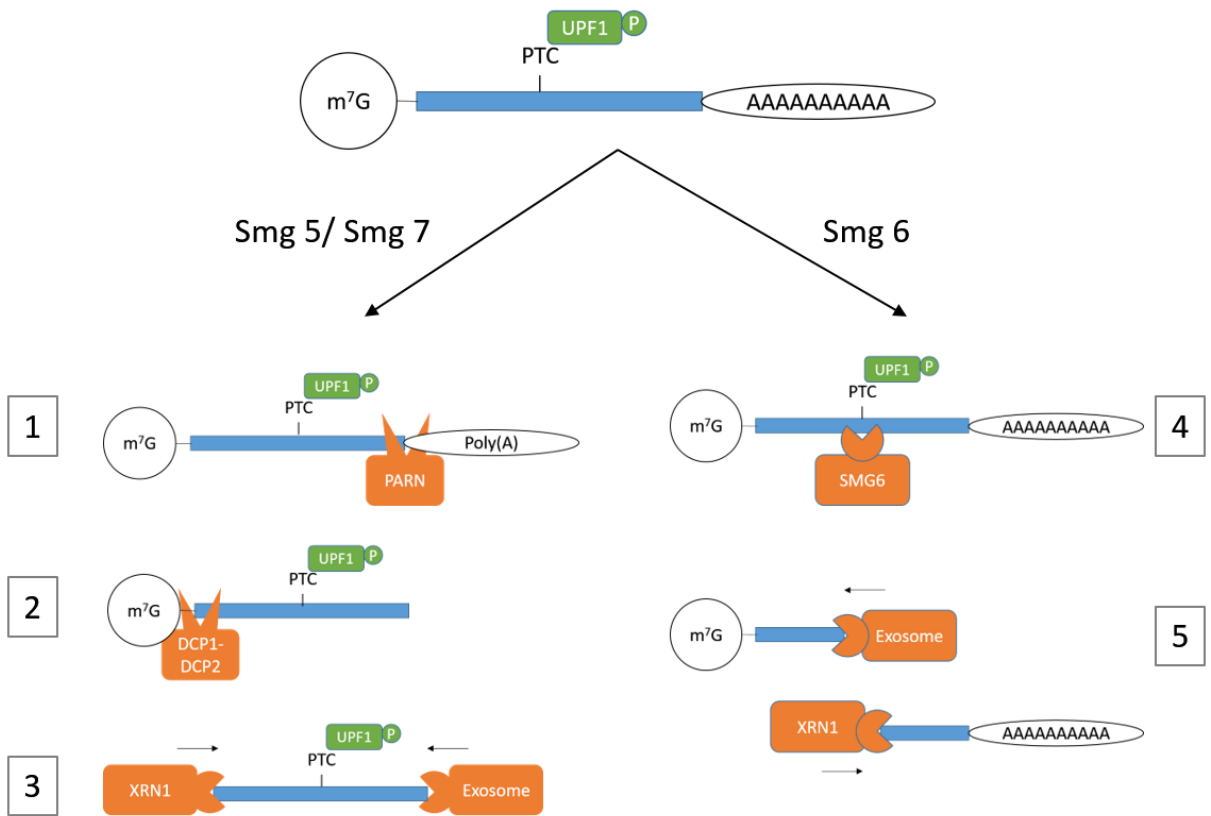
### Figure I.10: Terminaison de la traduction

Chez les eucaryotes la synthèse peptidique s'achève lors de la reconnaissance d'un codon stop (UAA, UAG ou UGA) dans le site A du ribosome (données revues dans (29)). La libération du polypeptide nouvellement formé ainsi que la dissociation des deux sous-unités ribosomiales requièrent les facteurs de libération eRF1 et eRF3. eRF1 reconnaît le codon Stop dans le site ribosomal A, après quoi un changement de conformation lui permet d'induire l'hydrolyse de la liaison qui maintient la chaîne polypeptidique associée au site P du ribosome et ainsi permettre la libération du polypeptide nouvellement formé. eRF3 est une GTPase qui va fournir l'énergie nécessaire à l'activité de eRF1 au niveau du ribosome. Plusieurs autres protéines influencent également la terminaison de la traduction, dont la protéine cytoplasmique qui se lie à la queue poly(A) de l'ARNm PABPC. Via son interaction avec eRF3, PABPC stimule la libération du peptide naissant et le recyclage des sous-unités ribosomiales. PABPC peut également lier le complexe eIF4F lié à la coiffe, ce qui force l'ARNm à prendre une conformation en boucle.

La dissociation du ribosome est induite par ABCE1. D'après Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and J.D. (2010) *Molecular cell biology 5th Edition*. & He, F. and Jacobson, A. (2015) *Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story*. *Annu. Rev. Genet.*, 49, annurev-genet-112414-054639.

La première peut être appelée le modèle du marqueur protéique en aval. Ce modèle postule un rôle central pour un marqueur protéique (constitué d'une ou plusieurs protéines) est lié à l'ARNm en amont du codon de terminaison normal (NTC). Lors d'une traduction normale, le passage du ribosome va enlever ce marqueur protéique et ainsi prévenir l'activation du NMD. Dans le cas d'un ARNm contenant un PTC, le ribosome s'arrête prématurément et le marqueur protéique est toujours présent en aval de cet arrêt. C'est la présence de ce marqueur qui va permettre le recrutement de facteurs du NMD et ainsi déclencher la dégradation de l'ARNm. Ce type de mode de détection de PTCs est utilisé par *Saccharomyces cerevisiae* chez qui des ARNm contiennent des séquences DSE (*d*ownstream *s*equences *e*lements) dans la partie 3' de l'ARNm en amont du codon stop naturel (données revues dans (80)). La protéine Hrp1p est capable de se lier à ces séquences DSE et constitue donc un marqueur protéique capable de déclencher la réponse NMD s'il n'est pas déplacé par le passage du ribosome. Chez les vertébrés, le meilleur exemple de ce type de modèle est le modèle de l'EJC. Par le passé, une vue prédominante était que l'arrêt traductionnel à moins de 50 - 55 nucléotides en amont d'un EJC était l'unique déterminant de la détection d'un PTC par le NMD. Suite à la description de nombreuses exceptions à cette règle, il est plus cohérent de penser que la présence d'un EJC en aval d'un codon de terminaison facilite l'activation de la voie NMD, mais n'est pas le seul déterminant.

La seconde catégorie peut être nommée le modèle de la terminaison aberrante. Ce modèle postule que la terminaison normale de la traduction mène à une condition particulière du RNPm, ce qui mène à la stabilisation de l'ARNm. Dans le cas d'une terminaison au niveau d'un PTC, cette condition du RNPm n'est pas remplie ou mène à un environnement anormal, ce qui déclenche l'activation du NMD. Le représentant de ce type de modèle est le modèle du faux-3'UTR, qui postule que la distance entre l'arrêt de la traduction et le complexe protéique associé à la queue poly(A) serait une condition pour le déclenchement du NMD. La conformation en boucle que prend le RNPm via l'interaction du complexe associé à la coiffe (CBC ou le complexe eIF4F) avec eRF3 qui est associé au ribosome et PABPC sur la queue poly(A) pourrait fournir un tel environnement. Plusieurs études semblent en effet indiquer que le complexe protéique associé à la queue poly(A) PABPC (*p*oly(*A*)-*b*inding *p*rotein *c*omplex) jouerait un rôle antagoniste au NMD, puisque l'ajout artificiel d'un PABPC à proximité d'un PTC permet d'inactiver la dégradation par le NMD (données revues dans (81)). D'autres études ont prouvé que les protéines associées à la coiffe (CBC et eIF4E) interagissent également avec UPF1 et promeuvent le NMD en facilitant la liaison de UPF1 à UPF2 (données revues dans (81)). De plus, il semble que le processus de terminaison au niveau d'un PTC serait notablement plus lent qu'au niveau d'un NTC.



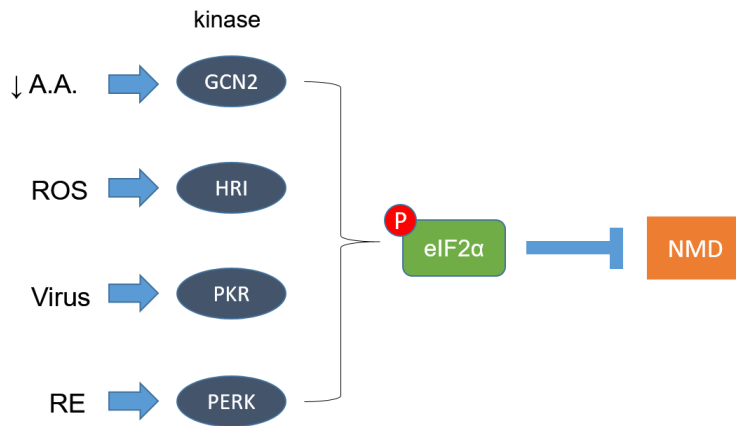
### Figure I.11: Dégradation des ARNm ciblés

Une fois marqué pour la dégradation, représenté ici par la version phosphorylée de UPF1, les protéines SMG5, SMG6 et SMG7 sont recrutées et induisent au moins deux voies de dégradation de l'ARNm ciblé. La voie induite par SMG5 et SMG7 implique une suppression de la queue poly(A) par le complexe de déadénylation PARN (1), ce qui expose l'extrémité 3' aux exonucléases 3'-5' de l'exosome (3). La coiffe est enlevée grâce à l'action des protéines DCP1-DCP2, (2) ce qui permet l'action exonucléasique 5'-3' de XRN1 (3). La voie induite par SMG6, se base sur le fait que SMG6 est une endonucléase qui induit une coupure à proximité du PTC (4), les extrémités résultantes sont dégradées par l'exosome et XRN1 (5). D'après Schoenberg, D.R. (2011) *Mechanisms of endonuclease-mediated mRNA decay*. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2, 582-600. & He, F. and Jacobson, A. (2015) *Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story*. *Annu. Rev. Genet.*, 49, annurev-genet-112414-054639.

Enfin, l'ensemble des données récoltées a mené au modèle d'Oliver Mühlemann, qui a pour avantage d'être évolutivement cohérent et permet d'unifier les différents modèles. Le modèle « unifié » postule que la décision de l'activation de la voie NMD est basée sur une compétition entre UPF1 et PABPC pour la liaison à eRF3 qui est lié au ribosome au niveau d'un codon de terminaison (données revues dans (35, 82)). Selon ce modèle, un évènement de terminaison est défini comme correct si le ribosome est arrêté assez près de l'extension poly(A) afin de fournir une interaction suffisante de eRF3 avec PABPC, ce qui mènerait à une libération rapide du polypeptide nouvellement formé et à la dissociation des deux sous-unités ribosomiales. A contrario, lorsque la distance entre le ribosome arrêté à un codon de terminaison et la queue poly(A) est trop grande pour assurer une interaction efficace avec PABPC, eRF3 va se lier à UPF1. L'ajout de DHX34, SMG1 et de ses deux inhibiteurs SMG8 et SMG9 va permettre de former le complexe de surveillance SURF. Lors de cette étape, nommée l'étape de marquage, PABPC peut encore être remplacé par UPF1 et ainsi éviter le déclenchement de la voie NMD. Le recrutement de UPF2 et UPF3 va sceller l'activation de la voie NMD en transformant le complexe de surveillance en un complexe de dégradation. L'interaction de UPF2:UPF3 avec UPF1 peut être facilitée et promue par la présence d'un marqueur protéique en aval, tel que l'EJC. Leur interaction avec UPF1 va induire la libération de SMG8 et SMG9 de SMG1 et ainsi lui permettre de phosphoryler UPF1. Suite à cette phosphorylation, eRF1 et eRF3 vont être libérés et le ribosome dissocié. Enfin, la forme phosphorylée de UPF1 va pouvoir recruter SMG5, SMG6 et SMG7, ce qui va mener à la dégradation de l'ARNm.

## I.2.D Dégradation de la cible

Une fois phosphorylé, UPF1 va recruter les protéines Smg5, Smg6 et Smg7 et ainsi déclencher la dégradation de l'ARNm ciblé [Figure I.11]. SMG5 et SMG7 induisent une dégradation exonucléasique en provoquant une déadénylation suivie d'un décoiffage (données revues dans (28, 35)). La suppression de la queue poly(A) est réalisée chez les mammifères par le complexe protéique PARN (*Poly(A)-specific ribonuclease*). La perte de la queue poly(A) expose l'ARNm à une dégradation dans le sens 3'-5' par l'exosome. Suite à la déadénylation, le complexe de décoiffage DCP1:DCP2 enlève le 7-méthyl guanosine (<sup>m7</sup>G), laissant l'extrémité 5' du transcrit en proie à une dégradation 5'-3' par l'exonucléase XRN1, via un mécanisme encore incertain mais impliquant le recrutement de PNCR2. A cette dégradation exonucléasique, s'ajoute une dégradation endonucléasique induite par SMG6 ; le clivage de l'ARNm par SMG6 ne semble pas être dépendant d'une séquence nucléotidique particulière mais survient en général à proximité du PTC. Les fragments résultants seront ensuite dégradés respectivement par l'exosome et XRN1.



**Figure I.12: Régulation du NMD par des voies de réponse aux stress.**

De nombreuses voies de réponse aux stress sont capables de diminuer transitoirement l'activité de la voie NMD. Ces voies répondent à la carence en acides aminés, à la présence excessive d'espèces réactives oxygénées, à une infection virale ou à un stress du réticulum endoplasmique. Toutes ces voies ont la capacité d'induire une protéine kinase spécifique capable de phosphoryler eIF2 $\alpha$ . Une fois phosphorylé eIF2 $\alpha$  est capable de diminuer l'activité du NMD, par un mécanisme encore incertain, mais probablement en partie dû à son effet inhibiteur de la traduction. *D'après Karam,R., Wengrod,J., Gardner,L.B. and Wilkinson,M.F. (2013) Regulation of nonsense-mediated mRNA decay: Implications for physiology and disease. Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech., 1829, 624–633.*

**Tableau I.3: Cibles naturelles du NMD**

ARNm	Caractéristique
sélénoprotéines	UGA peut être reconnu comme un codon pour une sélénocystéine ou en tant que PTC, en fonction de la concentration de sélénium endogène.
uORFs	Le codon de terminaison du uORF peut être reconnu comme un PTC à moins qu'une séquence stabilisatrice soit présente à proximité.
long 3' UTRs	Sont capables de déclencher le NMD même en l'absence de PTC.
Transposons et rétrovirus	Observé chez la levure et les mammifères.
Bicistroniques	Observé uniquement chez la levure
Pseudogènes transcrits.	Observé uniquement chez la levure

*D'après Mühlmann,O., Eberle,A.B., Stalder,L. and Zamudio Orozco,R. (2008) Recognition and elimination of nonsense mRNA. Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech., 1779, 538–549.*

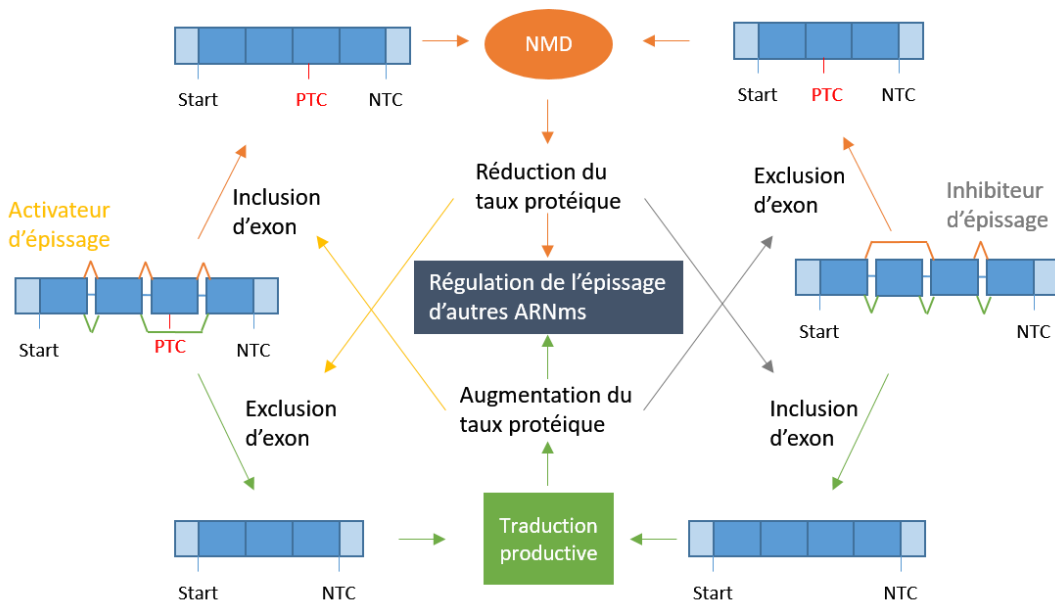
Ainsi, chez les mammifères, la dégradation des ARNm cibles du NMD implique un processus endo- et/ou exonucléasique. De manière très intéressante, il a été montré que des acteurs du NMD (UPF1, UPF3, SMG5 et SMG7) sont retrouvés dans les P-bodies (données revues dans (28, 35)). Le cas de SMG6 prête plus à discussion puisqu'il semble se retrouver dans des P-bodies particuliers (83). Les P-bodies sont des granules cytoplasmiques enrichis en acteurs de la déadénylation, du décoiffage, de la dégradation 5'-3' ainsi qu'en l'exonucléase 5'-3' XRN1. Cette constatation laisse à penser que la voie de dégradation des ARNm cibles du NMD survient dans ces corps cytoplasmiques particuliers.

### **I.2.E Régulation du NMD**

La réponse de la voie NMD semble être variable suivant le type cellulaire, le tissu ou même l'individu considéré. L'organisme a donc développé différents mécanismes de régulation de la voie NMD (84, 85). L'un de ces mécanismes est une boucle de rétrocontrôle négative, le NMD régulant négativement le taux protéique d'acteurs de sa propre voie (84). Une autre façon que l'organisme a développé pour réguler le NMD est via des microARNs. Il a été en effet prouvé que l'abondance de UPF1 peut être réduite par l'induction de miR-128 dans le système nerveux des souris, du xénope et de la poule (86, 87). Cette réduction du NMD s'accompagne d'une augmentation de l'abondance des cibles du NMD ; ce circuit de régulation miR128/NMD semble être un moyen de contrôle du développement et de la fonction du système nerveux. Un dernier exemple est l'action du facteur de traduction eIF2 $\alpha$ , dont la forme phosphorylée est capable de diminuer la transcription des acteurs du NMD, et donc diminuer l'activité de la voie (85). La phosphorylation de eIF2 $\alpha$  peut être induite par l'activation des réponses à certains stress cellulaires [Figure I.12].

### **I.2.F Rôles physiologiques**

En plus de dégrader les ARNm aberrants contenant un PTC, le NMD participe également au fonctionnement normal d'une cellule en régulant l'abondance de certains ARNm physiologiques (données revues dans (35, 43)). En effet, des études effectuées chez la levure, la drosophile et l'homme ont révélé que le NMD contrôle directement ou indirectement l'abondance de 3 à 10% du transcriptome normal. Parmi les cibles « naturelles » du NMD, c'est-à-dire des cibles ne résultant pas d'erreurs au niveau ADN, ARN ou protéique, on retrouve principalement des ARNm possédant un intron dans la région 3' non traduite (3'-UTR), un ORF localisé en amont de la région codante principale (uORF) ou une région 3'-UTR particulièrement longue [Tableau I.3]. Les ARNm provenant de transposons, de rétrovirus ou de pseudogènes

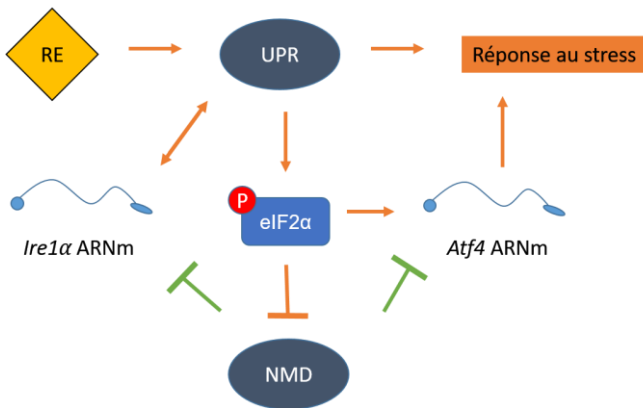
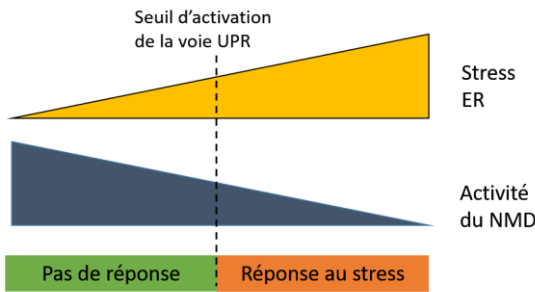


**Figure I.13: AS-NMD**

Certains activateurs ou répresseurs de l'épissage sont capables d'auto-réguler leur quantité protéique via l'induction d'un épissage alternatif de leur propre pré-mARNs. Lorsqu'un facteur d'épissage est présent en grande quantité dans la cellule, il est capable de réduire sa propre concentration protéique en induisant la production d'ARNMs qui seront dégradés par le NMD. Les activateurs de l'épissage réalisent cela en stimulant l'inclusion d'un exon contenant un PTC, alors que les inhibiteurs d'épissage produisent un ARNm PTC+ par exclusion d'un exon. Un tel système de régulation fine de la quantité relative d'activateurs et d'inhibiteurs de l'épissage a probablement vu le jour étant donné leur importance capitale puisqu'ils agissent sur tous les pré-ARNMs de la cellule. *D'après Karousis, E.D., Nasif, S. and Mublemann, O. (2016) Nonsense-mediated mRNA decay: novel mechanistic insights and biological impact. Wiley Interdiscip. Rev. RNA, 7, 661–682.*

**Figure I.14: Unfolded Protein Response**

Modèle de contrôle de la voie de réponse UPR (*Unfolded Protein Response*) par la voie NMD. La voie UPR détecte et répond au stress du réticulum endoplasmique (RE) induit par l'accumulation de protéines incorrectement repliées dans le RE. En conditions normale, c'est-à-dire lorsqu'il n'y a pas ou peu de protéines incorrectement repliées (UP), le NMD réduit la quantité de protéines impliquées dans la voie UPR en ciblant les ARNm de certains de ses acteurs tels que *Ire1a*. La fraction des acteurs de la voie UPR tout de même produite va répondre à l'accumulation de protéines incorrectement repliées et induire la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ . La version phosphorylée de eIF2 $\alpha$  va permettre de diminuer la transcription d'acteurs du NMD et donc diminuer la répression du NMD sur la voie UPR. De ce fait plus le stress RE est important, plus la voie NMD est réprimée et plus la réponse UPR est importante. En d'autres termes, la voie NMD permet de définir un seuil d'activation et empêche l'activation de la réponse au stress de manière inopinée, ce qui serait délétère pour la cellule. Le NMD réprime également l'expression de ATF4 tandis que eIF2 $\alpha$  l'active. ATF4 est un facteur de transcription impliqué dans une réponse générale des stress appelée ISR (*Integrated Stress Response*).



*D'après Karousis, E.D., Nasif, S. and Mublemann, O. (2016) Nonsense-mediated mRNA decay: novel mechanistic insights and biological impact. Wiley Interdiscip. Rev. RNA, 7, 661–682. & Lykke-Andersen, S. and Jensen, T.H. (2015) Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 16, 665–677. & Karam, R., Wengrod, J., Gardner, L.B. and Wilkinson, M.F. (2013) Regulation of nonsense-mediated mRNA decay: Implications for physiology and disease. Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech., 1829, 624–633.*



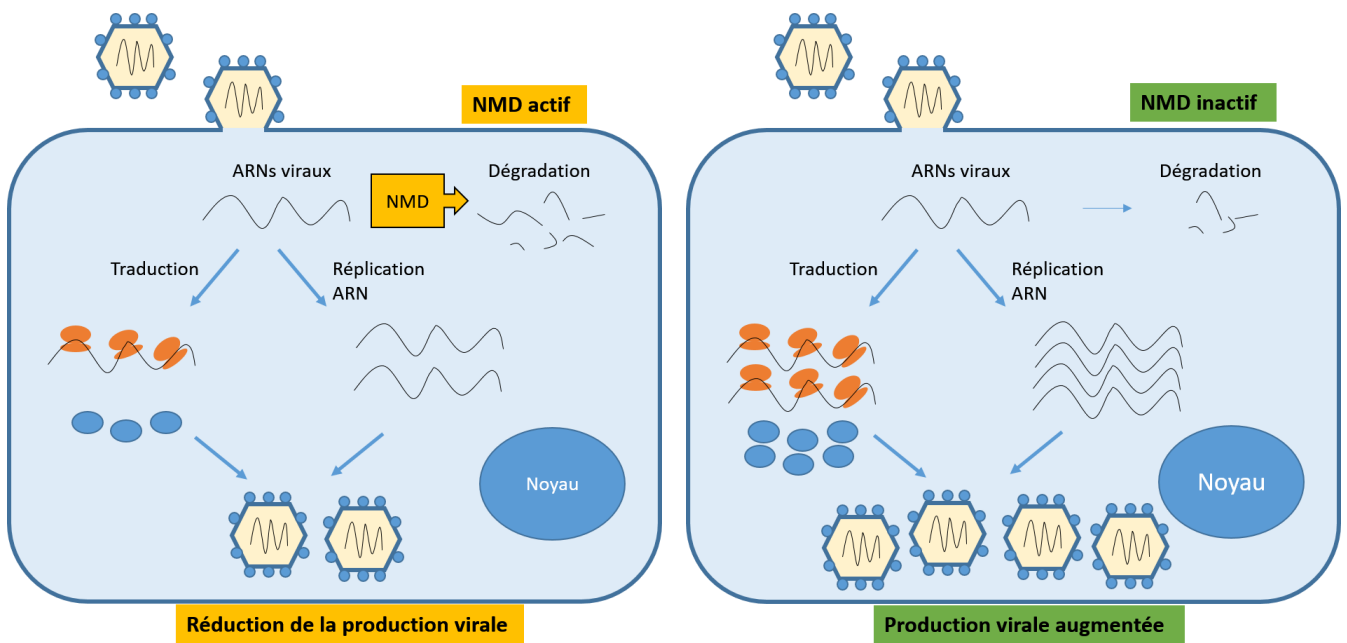
sont également des cibles du NMD. Un cas particulier très intéressant est celui des ARNm codant pour les sélénoprotéines, en effet ces ARNm contiennent des codons UGA qui induisent l'incorporation de sélénocystéine lorsque le taux de sélénium est important. Par contre, lorsque le taux de sélénium est faible, le codon est interprété comme un PTC et est donc ciblé par le NMD.

### ***AS-NMD***

Le NMD peut également être couplé à la mécanique de l'épissage alternatif dans un processus auto-régulé appelé RUST (*Regulated Unproductive Splicing and Translation*) ou AS-NMD (*Alternative splicing - Nonsense mediated decay*) [Figure I.13] (données revues dans (81, 88, 89)). Certaines protéines impliquées dans la régulation de l'épissage peuvent moduler l'épissage de leur propre pré-ARNm afin d'induire la production d'ARNm non productif contenant un PTC, qui sera dégradé par le NMD. Par exemple, à une forte concentration, l'activateur de l'épissage SRSF2 va se lier à son propre pré-ARNm et altérer son épissage pour favoriser la production d'une version de son ARNm contenant un PTC, qui sera rapidement dégradée par le NMD ; en conséquence la concentration de SRSF2 diminue. Lorsque sa concentration passe en dessous d'un certain seuil, SRSF2 n'agit plus sur son épissage, un ARNm complet est produit et la protéine est produite normalement. Ce genre de régulation post-transcriptionnelle se retrouve chez les gènes codant pour des facteurs d'épissage dont des protéines riches en sérine-arginine (SR) ou les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP).

### ***Modulation de la réponse aux stress***

La voie NMD semble jouer un rôle modulateur dans les réponses aux stress cellulaires. Elle régule l'abondance de nombreux transcrits impliqués dans certains de ces processus et de ce fait établit un seuil de réponse (données revues dans (36, 81)). L'un de ces processus est le UPR (*Unfolded Protein Response*), qui est un mécanisme qui se déclenche lorsque des protéines qui ne sont pas correctement repliées s'accumulent dans le réticulum endoplasmique [Figure I.14]. En conditions normales, le NMD cible et dégrade les ARNm d'acteurs de l'UPR, évitant ainsi un potentiel déclenchement inopiné de la réponse UPR. Lorsque les protéines mal repliées s'accumulent dans le réticulum endoplasmique, la réponse UPR est initiée, le contrôle du NMD inhibé et une forte réponse au stress est déclenchée. Lors du retour à la normale, le NMD reprend son fort contrôle des ARNm des acteurs de l'UPR. En ciblant des ARNm codant pour des acteurs de ce mécanisme de stress, le NMD semble donc définir un seuil de réponse du UPR, processus qui peut conduire à l'apoptose si la durée et l'intensité du stress est trop longue. Parmi les autres réponses aux stress régulées par le NMD, citons l'hypoxie, les dérégulations osmotiques et la carence en acides aminés.



**Figure I.15: NMD un mécanisme de défense contre les infections virales**

Le NMD est capable de cibler et dégrader le génome viral des alphavirus à ARN+, et donc limite l'infection virale. Lorsque le NMD est inactivé, la quantité de génome viral est supérieure, la production de protéines virales et la réplication de l'ARN+ viral est augmentée, et par conséquent la production et le relargage de nouveaux virus est plus importante. *D'après Karousis, E.D., Nasif, S. and Muhlemann, O. (2016) Nonsense-mediated mRNA decay: novel mechanistic insights and biological impact. Wiley Interdiscip. Rev. RNA, 7, 661–682.*

## ***Réplication virale***

Le NMD semble jouer un rôle protecteur dans le cas d'infection par des virus à ARN (+) [Figure I.15]. Etant donné que ce genre de virus utilise la machinerie post-transcriptionnelle pour se répliquer, il n'est pas étonnant que ce rôle protecteur ait émergé (données revues dans (81)). Ce mécanisme, découvert chez les plantes, semble également prendre place chez l'homme, chez qui la réplication des virus de la forêt de Semliki (SFV) et Sindbis (SINV) est restreinte par le NMD. Malheureusement, à chaque mécanisme de défense élaboré par l'organisme, certains virus arrivent à acquérir une parade. Ainsi le virus du sarcome de Rous (RSV) a développé des éléments de séquences permettant à ses ARNs d'échapper au NMD, tandis que les virus T-lymphotropique humain ainsi que celui de l'hépatite C inhibent purement et simplement la voie NMD, en induisant l'expression de protéines virales compromettant la réponse du NMD.

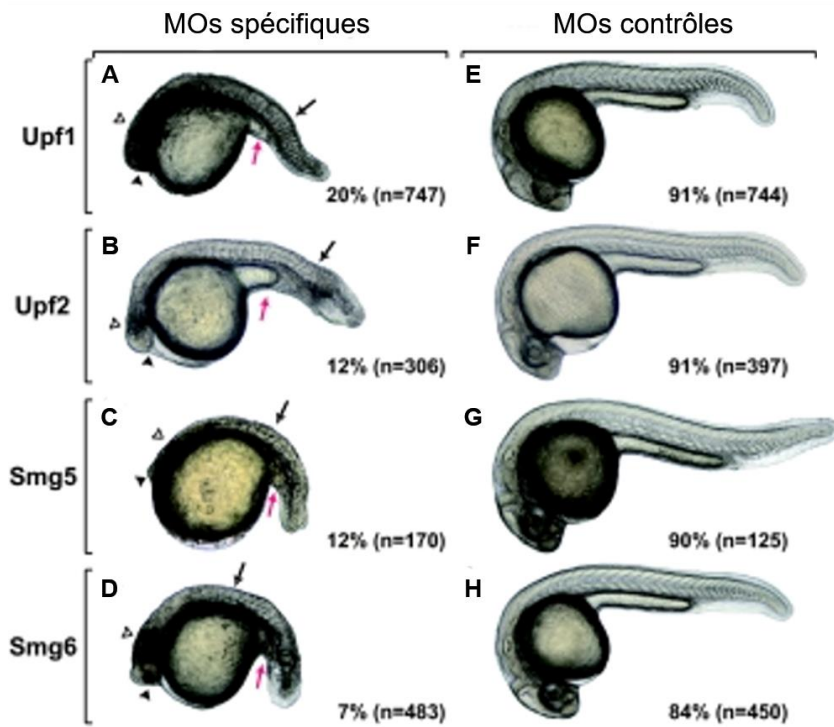
## ***Fonctions annexes des acteurs du NMD***

Au cours des dernières années, on s'est rendu compte que certains acteurs du NMD jouent également des rôles dans d'autres mécanismes. Par exemple, UPF1 est également impliqué dans une autre voie de dégradation des ARNm par l'intermédiaire de la protéine Staufen-1 (SMD : *STAU1-mediated mRNA decay*)(90). Dans cette voie, STAU1 va se lier à des sites de liaison spécifiques situés dans la région 3'UTR de la cible et recruter UPF1 afin d'induire la dégradation de l'ARN. Le SMD cible principalement les ARNm contenant des structures double brin dans la région 3'UTR. Etant donné que le NMD et le SMD utilisent tous deux UPF1, il semble qu'il y ait une certaine compétition entre les deux voies de dégradation des ARNm. Un autre exemple est l'implication de SMG6 dans la maintenance des télomères (données revues dans (28)). En effet l'inhibition de SMG6 mène à un raccourcissement des télomères ainsi qu'à la sur-expression des transcrits télomériques. De plus, SMG6 interagit directement avec la télomérase.

## **I.2.G Génétique fonctionnelle**

Suivant l'organisme considéré, l'importance du NMD varie considérablement, ce qui se constate par la diversité des phénotypes observés dans les différents organismes suite à l'inactivation d'acteurs du NMD. Il semble cependant que la voie NMD ait une importance particulière pour le développement neural.

Chez *Caenorhabditis elegans*, les gènes SMG1, SMG2 (UPF1), SMG3 (UPF2), SMG4 (UPF3), SMG5, SMG6 et SMG7 ne sont pas nécessaires au développement normal mais, comme leur nom l'indique, la perte fonctionnelle d'un de ces facteurs résulte en



**Figure I.16: Le NMD est essentiel au cours du développement du poisson zèbre.**

Vue latérale d'embryons de 24 hpf injectés avec un morpholino de traduction ciblant *upf1* (A), *upf2* (B), *smg5* (C) ou *smg6* (D). (E-H) Embryons injectés avec le morpholino contrôle correspondant. Les embryons sélectionnés pour les morphants sont les plus représentatifs des embryons moyennement à fortement affectés. Les morphants présentent une large nécrose au niveau du système nerveux (pointe de flèche vide), un sous développement des yeux (pointe de flèche pleine), une morphogenèse anormale des somites (flèche noire) et une perturbation dans l'extension du sac vitellin (flèche rouge). Le pourcentage des embryons survivants à 5 dpf est indiqué en dessous de chaque embryon. Le nombre total d'embryons injectés est indiqué en parenthèse. Barre d'échelle= 200  $\mu$ m.

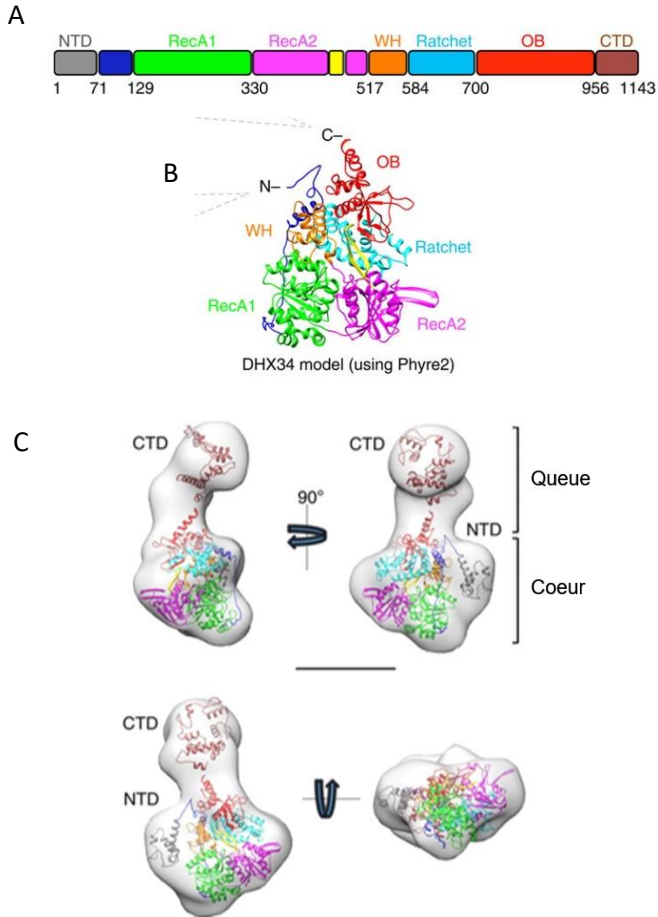
D'après Wittkopp, N., Huntzinger, E., Weiler, C., Saulière, J., Schmidt, S., Sonawane, M. and Izaurralde, E. (2009) Nonsense-mediated mRNA decay effectors are essential for zebrafish embryonic development and survival. *Mol. Cell. Biol.*, 29, 3517–3528.

des défauts morphologiques au niveau de l'appareil reproducteur (44, 91, 92). La perte de SMGL-1 (NBAS) ou SMGL-2 (DHX34) mène cependant à la mort précoce des embryons. Chez *Drosophila melanogaster*, UPF1 et UPF2 sont requis pour le développement larvaire alors que UPF3 ou SMG-1 ne le sont pas (93-95). Ces observations suggèrent que le NMD peut fonctionner dans certains cas de manière indépendante de SMG1 et UPF3 chez cette espèce.

Il a été montré chez *D. rerio* que la diminution d'expression de UPF1 via morpholino mène à un retard de croissance ainsi qu'à de nombreux défauts développementaux au niveau des yeux, du cerveau (principalement à la frontière entre le mésencéphale et le rhombencéphale) et des somites [Figure I.16] (96). De plus, le taux de mortalité atteint 80% après 5 jours post fécondation. Des défauts similaires ont été constatés suite à l'injection de morpholinos ciblant *Upf2*, *Smg5* ou *Smg6* (96). Le « knock-down » de *Smg7* mène principalement à des défauts au niveau du cerveau, tel qu'un cerveau allongé. La diminution d'expression de *upf3a* mène à de faibles défauts au niveau de la formation du cerveau, tandis que celle de *smg1* ou *upf3b* ne conduit à l'apparition d'aucun défaut morphologique visible.

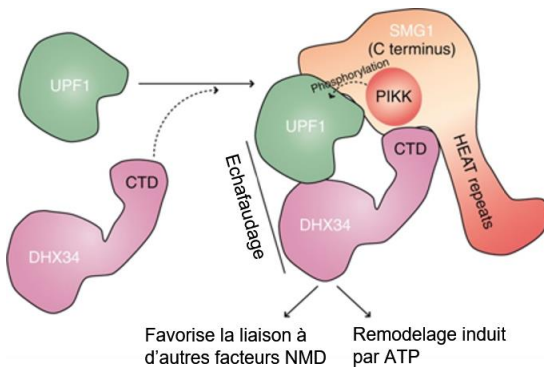
Les souris (*Mus musculus*) ayant subi un « knock-out » de UPF1 ne présentent aucune activité du NMD et meurent très précocement (3,5 jours après coït en culture) (97). L'importance du NMD pour la viabilité des embryons murins est confirmée par les mutants KO pour SMG-1 et UPF2 qui meurent à respectivement 8,5 jours et 9,5 jours embryonnaires (98, 99). Grâce à des « knock-out » conditionnels de UPF2 chez la souris, il a été montré que l'absence de ce facteur est nécessaire pour le maintien des cellules souches, des progéniteurs hématopoïétiques et des cellules de Sertoli, ainsi que pour la différenciation terminale des cellules du foie (données revues dans (81)). Un « knock-out » conditionnel de SMG6 dans une culture de cellules souches embryonnaires de souris, a montré que ces cellules sont incapables de se différencier. De plus, le « knock-down » de UPF3B chez la souris a montré que l'inhibition du NMD mène à une augmentation de la prolifération des progéniteurs neuronaux aux dépens de leur capacité de différenciation (données revues dans (36)). Ainsi il semble que, chez la souris du moins, des gènes cibles du NMD soient impliqués dans de nombreux processus de prolifération et de différenciation.

Chez l'homme, divers troubles induits par des mutations inactivatrices d'acteurs de la voie NMD ont été répertoriés (données revues dans (43)). Des mutations dans les gènes UPF3B ou UPF2 sont liés à des troubles neuro-développementaux, tel qu'un retard mental, l'autisme ou la schizophrénie. UPF3B est en plus associé avec des malformations faciales. De plus, des mutations affectant l'épissage du gène UPF1 ont été corrélés avec des cas d'adénocarcinomes du pancréas.



### Figure I.17: Architecture de l'hélicase DHX34

(A) Schéma représentant les différents domaines fonctionnels de DHX34, les limites de chaque domaine sont indiquées par le numéro du résidu. Les domaines ont été nommés à partir de la structure de Prp43 et basés sur les prédictions obtenues en utilisant PHYRE2. Les domaines sont NTD (gris), RecA1 (vert), RecA2 (rose), winged-helix (WH) (orange), Ratchet (bleu ciel), OB-fold (rouge) et CTD (brun). Le domaine RecA2 contient une petite boucle  $\beta$  antiparallèle représentée en jaune. (B) Modèle tridimensionnel en ruban de Dhx34 obtenu en utilisant PHYRE2 comme modèle. (C) Quatre vues de la structure de DHX34 d'une résolution de 24-Å obtenue par microscopie électronique représentée en tant que densité transparente dans laquelle le modèle tridimensionnel a été ajustée. Barre d'échelle= 5 nm. Tiré de Melero,R., Hug,N., López-Perrote,A., Yamashita,A., Cáceres,J.F. and Llorca,O. (2016) *The RNA helicase DHX34 functions as a scaffold for SMG1-mediated UPF1 phosphorylation.* *Nat. Commun.*, 7, 10585.



### Figure I.18: Modèle moléculaire de la fonction de DHX34 dans le NMD

DHX34 fonctionne en tant que lien moléculaire pour UPF1 et SMG1, amenant les deux protéines dans la bonne orientation et plaçant UPF1 en face du domaine kinase de SMG1. Le domaine CTD de DHX34 est essentiel afin de maintenir le complexe SMG1-UPF1-DHX34 ensemble. DHX34 pourrait aussi contribuer à la phosphorylation de UPF1 en facilitant l'interaction de UPF1 avec d'autres acteurs du NMD et le remodelage du complexe NMD. Tiré de Melero,R., Hug,N., López-Perrote,A., Yamashita,A., Cáceres,J.F. and Llorca,O. (2016) *The RNA helicase DHX34 functions as a scaffold for SMG1-mediated UPF1 phosphorylation.* *Nat. Commun.*, 7, 10585.

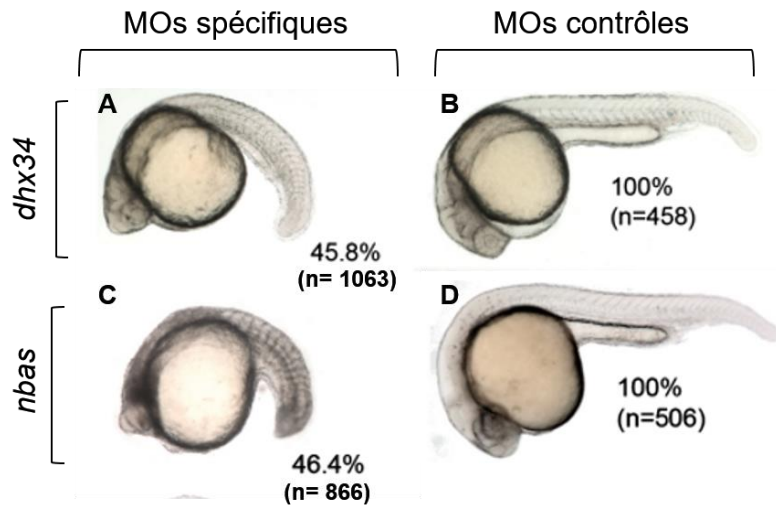
Le NMD est bien plus qu'un « simple » mécanisme de contrôle de qualité des ARNm, son implication dans le contrôle de l'expression de nombreux gènes essentiels lui confère une importance capitale pour le développement et la survie de l'organisme. Encore obscures, ces fonctions sont d'un intérêt capital tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué puisque le NMD joue un rôle important dans de nombreuses maladies humaines.

### I.3 Dhx34 & Nbas

SMGL-1 et SMGL-2 (pour *SMG lethal*) sont deux acteurs du NMD récemment découverts chez *Caenorhabditis elegans* grâce à une analyse génomique par ARN interférence (ARNi). Ces deux acteurs sont très conservés chez les autres eucaryotes testés à ce jour (excepté la levure) et référés respectivement sous les noms Nbas et Dhx34 (54). Dhx34 et Nbas sont impliqués dans la boucle de rétro-contrôle négatif du NMD (voir section « Régulation du NMD ») (100). Upf1, Dhx34 et Nbas semblent co-réguler une proportion significative de transcrits physiologiques chez *Caenorhabditis elegans* (~70%), *Danio rerio* (~87%) et l'homme (~47%) (100), ce qui suggère fortement que ces dits transcrits sont régulés par la voie NMD. Parmi ces transcrits physiologiques, certains codent pour des facteurs impliqués dans la régulation des voies de réponse cellulaire au stress ainsi que dans le trafic membranaire.

NBAS (*neuroblastoma amplified sequence*) fait partie de la super famille de gènes SEC39 et a été découvert pour être amplifié dans les neuroblastomes chez l'humain. Il est un composant du complexe syntaxin 18 impliqué dans le transport rétrograde de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique (101–103). Chez l'homme, des mutations dans le gène NBAS sont associés avec le syndrome SOPH (MIM 614800) induisant un retard de croissance, des anomalies squelettiques, une atrophie du nerf optique, une peau lâche et sénile ainsi qu'une anomalie au niveau des granulocytes (Pelger-Huët) (104, 105). De plus, des mutations dans le gène NBAS sont associées avec une insuffisance hépatique aiguë et récurrente (105, 106).

DHX34 (*DEAH box protein 34*) est une hélicase à ARN DEAH (Asp-Glu-Ala-His) ATP-dépendante faisant partie de la famille de protéines DExH/D, qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP afin de modifier les complexes ARN-ARN, ARN-protéine et/ou ARN-ADN (107–109). Les hélicases de la famille DEAH sont caractérisées par la présence de 8 motifs particuliers : les motifs I et II appelés motifs Walker A et B sont les sites de liaison du NTP, le plus souvent de l'ATP (110). Il a été suggéré que le motif II est impliqué dans l'hydrolyse du NTP. Les motifs Ia, Ib, IV et V semblent être impliqués dans la liaison à l'ARN. Les motifs III et VI permettent de connecter l'hydrolyse du



**Figure I.19: Dhx34 est requis pour le développement embryonnaire du poisson zèbre.**

(A et C) L'injection de morpholino altérant l'épissage de *dhx34* ou *nbas* mène à une variété de défauts développementaux à 24 hpf caractérisé par un raccourcissement de l'axe antéro-postérieur, une malformation des somites et une importante réduction de la taille de la tête. (B et D) Embryons injectés avec le morpholino contrôle correspondant. Le nombre en dessous de chaque embryon indique le pourcentage d'embryons avec le phénotype observé. Le nombre entre parenthèses représente le nombre total d'embryons analysés.

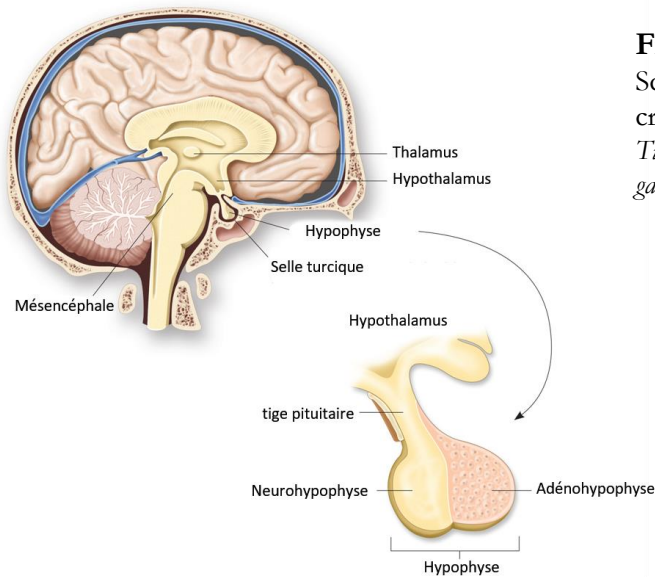
D'après Anastasaki, C., Longman, D., Capper, A., Patton, E.E., Cáceres, J.F. and Cáceres, J.F. (2011) *Dhx34 and Nbas function in the NMD pathway and are required for embryonic development in zebrafish*. *Nucleic Acids Res.*, 39, 3686–3694.



NTP avec les changements conformationnels nécessaires à l'activité hélicase. Structuellement, DHX34 prend une conformation organisée en deux domaines, un cœur hélicoïdal adjoint d'une queue constituée par la partie C-terminale de la protéine **[Figure I.17]** (65).

Dans des cellules humaines en culture, il a été mis en évidence que DHX34 se lie de manière directe à l'ARN et que l'hydrolyse de l'ATP renforçait cette association (64). De plus, DHX34 sert de pont moléculaire afin d'amener SMG1 à proximité de la version hypophosphorylée de UPF1, permettant à ces deux partenaires d'interagir et ainsi conduire à la phosphorylation de UPF1 **[Figure I.18]** (65). DHX34 semble être un acteur crucial de la voie NMD, puisqu'il co-immunoprécipite avec d'autres acteurs de la voie NMD dont UPF3, SMG6, SMG7 et SMG9, certains composants de l'EJC, la protéine associée à la coiffe CBP80, ainsi qu'avec des facteurs de dégradation des ARNm. Son recrutement au sein du complexe de surveillance SURF va induire la dissociation de eRF3 et de SMG9 ainsi que le recrutement de UPF2 et de eIF4A3 ce qui va amener à la phosphorylation de UPF1 et la formation du complexe de dégradation (64).

Chez le poisson zèbre, de manière similaire aux autres acteurs du NMD, *Dhx34* et *Nbas* sont des facteurs maternels et sont exprimés de manière ubiquitaire dès le début du développement embryonnaire (96, 111). De plus, la diminution d'expression *dhx34* ou *nbas* induit des défauts similaires à ceux décrits lors de l'inactivation d'autres acteurs du NMD, à savoir des problèmes de développement de la tête, des yeux et des somites **[Figure I.19]**.

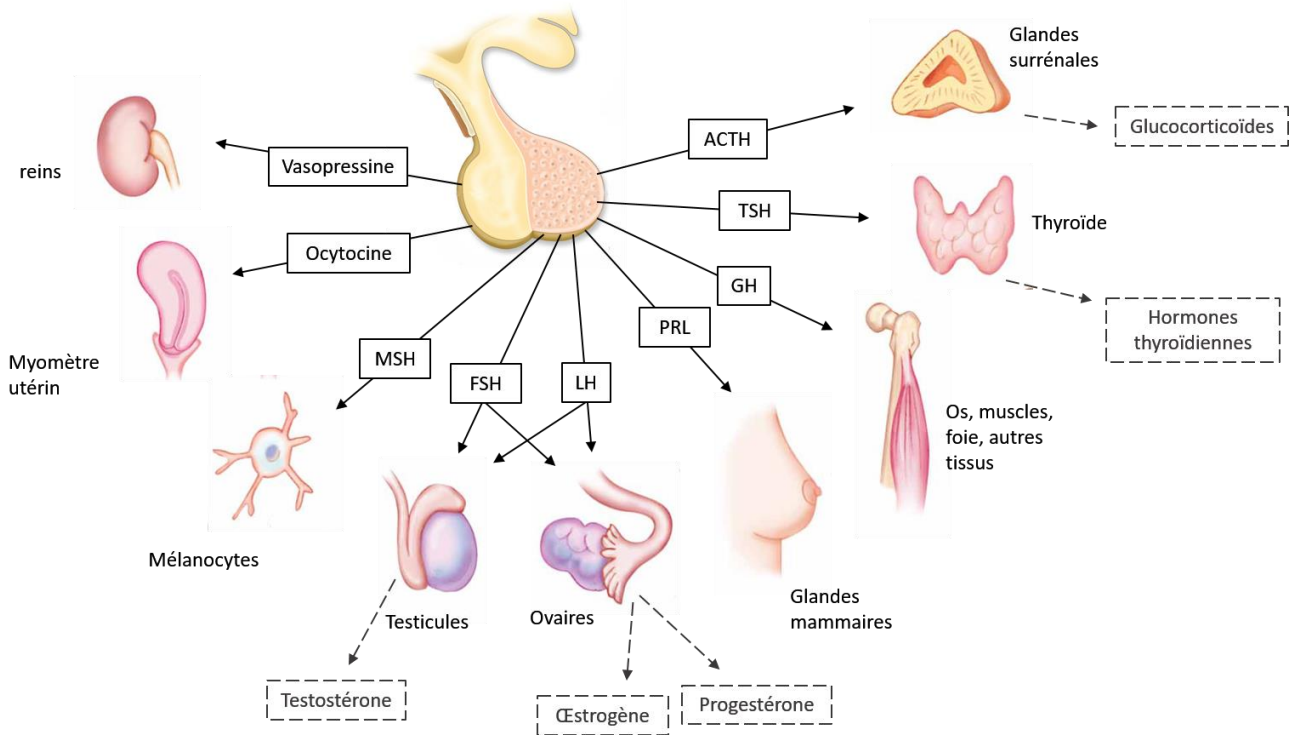


### Figure I.20: L'hypophyse chez l'humain

Schéma représentant l'hypophyse dans la boîte crânienne humaine. Partie antérieure orientée à droite.

Tiré de <http://biology-forums.com/>

[gallery/14755\\_28\\_08\\_12\\_1\\_42\\_27\\_82361629.jpeg](http://biology-forums.com/gallery/14755_28_08_12_1_42_27_82361629.jpeg)



### Figure I.21: Fonctions de l'hypophyse

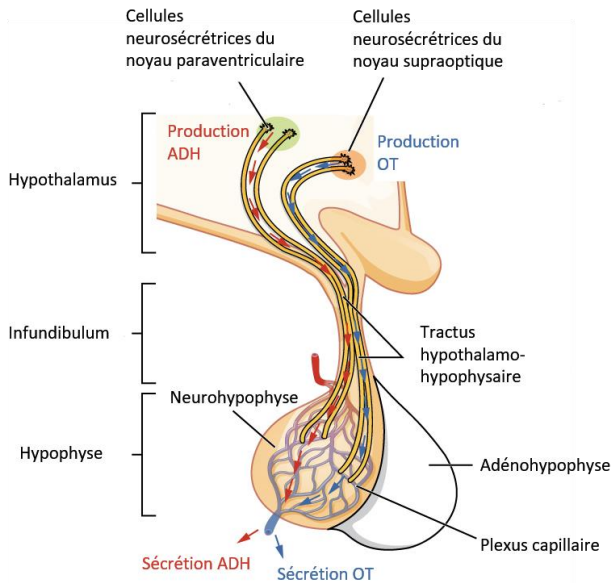
Schéma représentant la diversité des fonctions de l'hypophyse chez l'homme. Les différentes hormones hypophysaires produites par le lobe antérieur (adénohypophyse) et le lobe postérieur (neurohypophyse) sont représentées en noir entourées d'un cadre plein. Ces hormones hypophysaires ont une action (flèche noire pleine) sur divers tissus, chez certains elles provoquent la production/libération (flèches grises à tirets) d'autres hormones (représentées en gris entourées d'un cadre en tirets). ACTH: adrénocorticotrophine; TSH: thyrotrophine; GH: hormone de croissance; PRL: prolactine; LH: hormone lutéinisante; FSH: hormone stimulatrice des follicules; MSH: mélanotrophine. La neurohypophyse est responsable de la libération de la vasopressine et de l'ocytocine. La vasopressine cible les reins, les glandes sudoripares et l'appareil circulatoire afin de réguler la balance ionique. L'ocytocine cible la couche musculaire lisse (myomètre) de l'utérus de la femme afin de déclencher les contractions utérines lors de l'accouchement. L'adénohypophyse produit et sécrète l'ACTH, la TSH, la GH, la PRL, la LH, la FSH et la MSH. L'ACTH cible les glandes surrénales afin d'induire la production de glucocorticoïdes qui régulent le métabolisme et la réponse aux stress. La TSH cible la glande thyroïde afin de stimuler la sécrétion des hormones thyroïdiennes. La GH cible le foie, les os et les muscles afin d'induire la production d'IGF (insulin-like growth factor) qui stimule la croissance et augmente le métabolisme. La PRL cible les glandes mammaires afin de déclencher la production de lait. La LH cible les gonades afin de stimuler la production d'hormones sexuelles. La FSH cible les gonades afin de stimuler la production de gamètes. La MSH cible les mélanocytes afin d'induire la production de mélanine. D'après [http://biology-forums.com/gallery/14755\\_07\\_10\\_12\\_2\\_57\\_14\\_93061933.jpeg](http://biology-forums.com/gallery/14755_07_10_12_2_57_14_93061933.jpeg)

## I.4 L'hypophyse

Egalement appelée glande pituitaire, l'hypophyse est une petite glande endocrine située à la face ventrale du diencephale et logée dans une petite cavité osseuse du sphénoïde nommée selle turcique [Figure I.20] (112). Grâce à sa connexion directe avec le système nerveux central (SNC) via l'hypothalamus, l'hypophyse fait le lien entre le SNC et le système endocrinien et, par son rôle de chef d'orchestre, régule de nombreuses fonctions essentielles telles que la croissance somatique, l'osmorégulation, la réponse aux stress et la reproduction [Figure I.21]. A cette fin, elle sécrète dans la circulation sanguine plusieurs hormones, représentant les médiateurs non nerveux par lesquels le SNC communique avec le reste du corps (113). La sécrétion de toutes les hormones hypophysaires est directement contrôlée par l'hypothalamus, lui-même sous l'influence de stimuli nerveux des centres supérieurs du SNC. Il existe également un rétro-contrôle lié au taux d'hormones circulantes produites par les glandes hypophyso-dépendantes. De ce fait, l'hypophyse joue un rôle central dans l'intégration des fonctions des systèmes nerveux et endocriniens (113). Une caractéristique majeure de l'hypophyse est sa plasticité, puisqu'elle doit être capable de moduler constamment sa sécrétion hormonale afin de s'adapter aux besoins quotidiens et de pouvoir faire face aux changements physiologiques majeurs tels que la naissance, la puberté ou la grossesse (114). La glande pituitaire représente une structure exclusive de l'embranchement des Chordés et est présente chez tous les vertébrés étudiés à ce jour (115, 116).

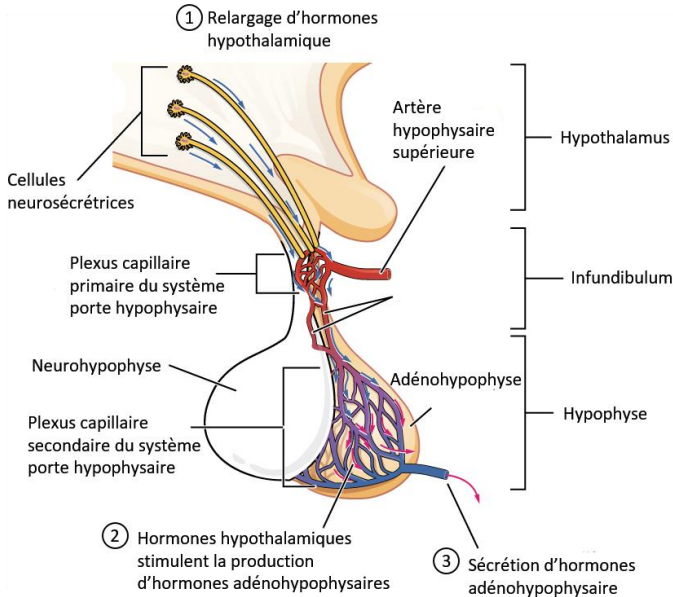
L'hypophyse est constituée de deux parties, l'adénohypophyse et la neurohypophyse, dont l'origine embryologique, les fonctions et les mécanismes de contrôle sont différents (113). Chez les vertébrés, la neurohypophyse constitue le lobe postérieur de l'hypophyse, elle se forme à partir de l'ectoderme neural et représente la partie neuro-sécrétrice de l'hypophyse. L'adénohypophyse quant à elle, prend son origine dans l'ectoderme oral et constitue la partie glandulaire endocrine; elle comprend toujours un lobe antérieur et, chez de nombreux vertébrés, un lobe intermédiaire (112). Chez l'homme, le lobe intermédiaire est rudimentaire, la majorité des mélanotropes étant retrouvés dans la peau (114). Chez la plupart des vertébrés, le primordium de l'adénohypophyse forme une structure appelée poche de Rathke. Celle-ci se développe par l'invagination dorsale de l'ectoderme oral en direction du diencephale ventral contenant le primordium de l'hypothalamus (117).

Le développement de l'hypophyse est un processus aujourd'hui relativement bien connu. La preuve la plus marquante de cet achèvement est que Hidetaka Suga et ses collaborateurs ont réussi à produire une adénohypophyse tridimensionnelle et fonctionnelle *in vitro* (118). Grâce à diverses conditions de culture ainsi qu'à



**Figure I.22: La neurohypophyse**

Schéma représentant la neurohypophyse et sa relation avec l'hypothalamus chez les mammifères. Les hormones vasopressine (ADH) et ocytocine (OT) sont produites par des cellules neurosécrétrices de l'hypothalamus. Ces hormones sont ensuite envoyées vers la neurohypophyse via le tractus hypothalamo-hypophysaire, où elles seront sécrétées dans la circulation sanguine. *D'après <http://cnx.org/contents/FPtK1zmb@6.27:IgqATiKA@3/The-Pituitary-Gland-and-Hypoth>*



**Figure I.23: L'adénohypophyse**

Schéma représentant l'adénohypophyse et sa relation avec l'hypothalamus chez les mammifères. La sécrétion des hormones adénohypophysaires est un processus comprenant 3 étapes. (1) L'hypothalamus produit des hormones, tels que les libérines, spécifiques d'un type cellulaire endocrine adénohypophysaire. (2) Lorsqu'elles atteignent leur type endocrine cible, les hormones hypothalamiques vont réguler la production d'hormones adénohypophysaires. (3) Finalement les hormones adénohypophysaires vont être sécrétées dans la circulation sanguine. *D'après <http://cnx.org/contents/FPtK1zmb@6.27:IgqATiKA@3/The-Pituitary-Gland-and-Hypoth>*

l'utilisation de nombreux facteurs de croissance, cette équipe a réussi à produire une adénohypophyse formant une poche de Rathke et contenant de nombreuses cellules endocrines. Bien que l'adénohypophyse produite ne soit pas parfaite, cette avancée ouvre la porte à de nombreuses applications, notamment en médecine régénérative.

## I.5 La neurohypophyse

La neurohypophyse (NH), aussi appelée *pars nervosa*, sécrète deux hormones, la vasotocine (appelée vasopressine chez les mammifères) et l'isotocine (l'ocytocine des mammifères) [Figure I.22]. La partie neuroendocrine de la neurohypophyse est constituée de terminaisons nerveuses neurosécrétrices, tandis que les pituicytes, les cellules de la neurohypophyse, sont apparentées aux cellules gliales du cerveau et ont surtout une fonction de support. Ces terminaisons nerveuses proviennent des noyaux supraoptiques, suprachiasmatiques et paraventriculaires de l'hypothalamus (119, 120). Les noyaux supraoptiques et suprachiasmatiques produisent la vasopressine tandis que l'ocytocine est produite par les noyaux paraventriculaires (121). Chez les mammifères, l'ocytocine est connue pour induire la contraction de différents types de muscles lisses durant la reproduction (tractus reproductif, utérus et glandes mammaires). La vasopressine a comme fonction principale d'induire la rétention d'eau par les reins, elle joue également un rôle d'hypertenseur léger en provoquant la vasoconstriction des artérioles (112). Chez les poissons, l'isotocine et la vasotocine sont également impliquées dans le maintien de la balance ionique ainsi que lors de la ponte (112). Liées à des glycoprotéines, ces hormones hypothalamiques descendent le long des axones de l'axe hypothalamo-hypophysaire, jusqu'à la neurohypophyse où elles sont stockées dans les parties terminales distendues des axones. Leur libération est directement contrôlée par les influx nerveux descendant de l'hypothalamus en suivant le trajet des axones (113).

## I.6 L'adénohypophyse

L'adénohypophyse (AH) est la partie endocrine de l'hypophyse, elle est composée de deux lobes, la *pars distalis* (PD) qui comprend une partie antérieure (aPD) et une partie postérieure (pPD) et la *pars intermedia* (PI) (112).

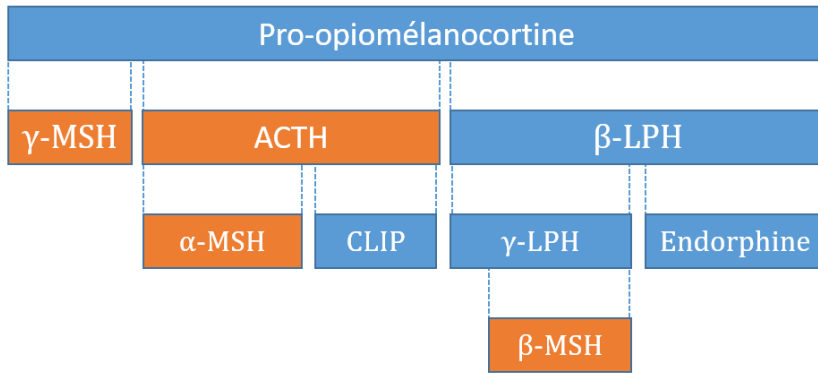
L'adénohypophyse mature contient classiquement 6 types cellulaires endocrines, qui sont définis par l'hormone qu'ils produisent et sécrètent [Figure I.23] :

- Les cellules **corticotropes** sécrètent l'adrénocorticotrophine (Acth) sous l'effet de la corticolibérine (CRH : *Corticotropin-Releasing Hormone*) et dans une



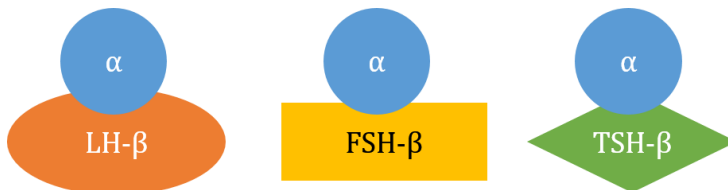
moindre mesure de la vasopressine, provenant respectivement de l'hypothalamus et de la neurohypophyse. La sécrétion d'Acth est inhibée par les glucocorticoïdes. Elle est nécessaire à la croissance des glandes surrénales et stimule les glandes cortico-surrénales à produire des glucocorticoïdes, ainsi que certaines hormones sexuelles stéroïdiennes (androgènes). Les glucocorticoïdes, dont principalement le cortisol, jouent un rôle majeur dans la réponse de l'organisme aux stress (119, 122).

- Les cellules **lactotropes** sécrètent la prolactine (Prl), qui suivant le vertébré considéré agit sur divers processus tels que l'osmorégulation, le développement de certaines structures ectodermiques et tégumentaires, le métabolisme et la reproduction. Chez les mammifères, elle favorise principalement la croissance et la sécrétion des glandes mammaires. Chez les poissons, la prolactine est largement impliquée dans la régulation de l'homéostasie sel/eau en modulant la rétention ionique et la prise d'eau par les organes osmorégulateurs. La sécrétion de la prolactine est induite par le peptide de libération de la prolactine (PrRP : *Prolactin-releasing peptide*) et inhibée par la dopamine, toutes deux produites par l'hypothalamus. (119, 123, 124).
- Les cellules **thyrotropes** sécrètent la thyrotrophine (Tsh), qui agit sur la glande thyroïdienne en influençant sa croissance, la morphologie de ses cellules, le métabolisme de l'iode et la synthèse des hormones thyroïdiennes (L-thyroxine (T4) et L-triiodothyronine (T3)). La sécrétion de Tsh est stimulée principalement par la thyrolibérine (TRH : *Thyrotropin-releasing hormone*) produite par l'hypothalamus, et inhibée par des taux élevés d'hormones T3 et T4 circulantes (119, 125).
- Les cellules **somatotropes** sont responsables de la sécrétion de l'hormone de croissance (Gh). L'hormone de croissance, également appelée somatotrophine, active la croissance générale et osseuse, le transport des acides aminés, la transcription et la synthèse protéique ; elle stimule la lipolyse dans les adipocytes et augmente la glycémie. La majorité de ses effets sont dus à IGF-1 (« *Insulin-like growth factor 1* ») dont elle provoque la synthèse par le foie. La sécrétion de l'hormone de croissance est stimulée par la somatolibérine (GHRH : *Growth-Hormone Releasing Hormone*) et inhibée par la somatostatine, principalement produites par l'hypothalamus (119, 126).
- Les cellules **gonadotropes** sécrètent les gonadotrophines, l'hormone lutéinisante (Lh) et l'hormone stimulatrice des follicules (Fsh), qui régulent le développement des gonades et stimulent la gamétogenèse ainsi que la production d'hormones sexuelles. La sécrétion des gonadotrophines est principalement activée par la gonadolibérine (GnRH : *Gonadotropin-Releasing*



**Figure I.24: Produits du gène de la *pro-opiomélanocortine (pomc)***

Le gène de la pro-opiomélanocortine code pour un précurseur polypeptidique. Ce précurseur va subir une série de modifications post-traductionnelles, avant d'être clivé par protéolyse afin de produire une famille de polypeptides ayant des activités très diverses. Parmi les produits du gène *pomc* on retrouve l'ACTH produit par les corticotropes ainsi que les  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  MSH produites par les mélanotrope (en bleu), mais aussi la  $\beta$ -endorphine, la lipothrophine et CLIP. D'après Gong, R. (2012) *The renaissance of corticotropin therapy in proteinuric nephropathies. Nat. Rev. Nephrol.*, 8, 122–128.



**Figure I.25: Les hormones LH, FSH et TSH ont une sous-unité  $\alpha$  commune**

Représentation schématique de l'hormone lutéinisante (LH), de l'hormone stimulatrice des follicules (FSH) et de la thyrotrophine (TSH). Ces trois hormones sont des hormones hétérodimériques possédant une sous-unité  $\alpha$  commune codée par le gène *cga* et une sous-unité  $\beta$  spécifique. D'après Treier, M., Gleiberman, A.S., O'Connell, S.M., Szeto, D.P., McMabon, J.A., McMabon, A.P. and Rosenfeld, M.G. (1998) *Multi-step signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. Genes Dev.*, 12, 1691–1704.



*Hormone*) provenant de l'hypothalamus et inhibée par des taux élevés d'hormones gonadiques (119, 127).

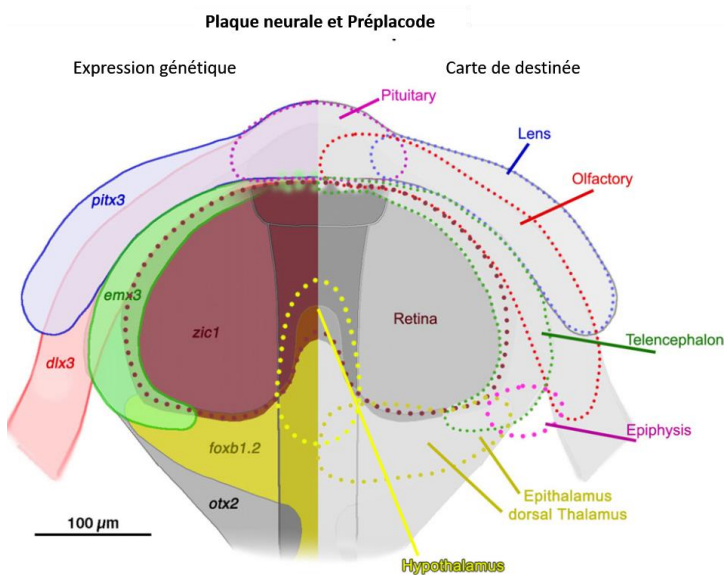
- Les cellules **mélanotropes** sécrètent la mélanotrophine (Msh), qui stimule la production de mélanine par les mélanocytes. Chez les poissons, elle induit également l'extension des mélanocytes. Son rôle semble être négligeable chez la plupart des mammifères, sauf chez certains animaux arctiques chez lesquels la mélanotrophine semble être responsable des changements entre pelage d'été et d'hiver (112).

En plus de ces 5 types cellulaires endocrines, l'AH des téléostéens possède un type cellulaire particulier : les **somatolactotropes** qui sécrètent la somatolactine (128–130). Cette hormone, apparentée à la prolactine et à l'hormone de croissance, semble être impliquée dans divers processus physiologiques tels que le métabolisme du calcium et du phosphate, la régulation acide-base, la maturation des gonades, la synthèse de stéroïdes, le contrôle de la lipolyse, la prolifération et la maturation des chromatophores et la mobilisation d'énergie en cas de stress et d'exercices (131–138). L'expression et la sécrétion de la somatolactine peuvent être induites par la gonadolibérine (GnRH) et réprimées par la dopamine (139–141).

En plus des différentes lignées endocrines, l'AH contient des cellules folliculo-stellaires. Ces cellules sont disséminées dans toute l'AH, grâce à leur cytoplasme allongé et aux diverses projections cytoplasmiques. Les cellules folliculo-stellaires forment un réseau de soutien et de communication pour les cellules adénohypophysaires (données revues dans (142)).

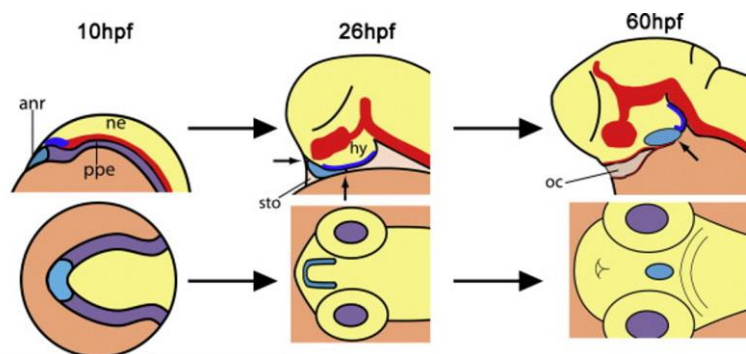
Remarquons que l'Acth et la Msh sont toutes deux produites par clivage d'un précurseur codé par le gène de la pro-opiomélanocortine (*pomc*) [Figure I.24]. En plus d'être exprimé dans l'adénohypophyse, le gène *pomc* est également exprimé dans des neurones spécifiques du noyau arqué de l'hypothalamus en vue de produire la  $\beta$ -endorphine ainsi que les hormones lipotropes (122). Les hormones Fsh, Lh et Tsh sont des hormones hétérodimériques qui présentent une sous unité  $\alpha$  commune codée par le gène *cga* (*glycoprotein hormones, alpha polypeptide*) et une sous-unité  $\beta$  spécifique [Figure I.25] (143).

Comme c'est le cas chez les mammifères, les différentes lignées des cellules endocrines dans l'AH mature des téléostéens sont distribuées selon une configuration spatiale bien précise : la *pars distalis* antérieure (aPD) contient les lactotropes et les corticotropes, tandis que les somato-, thyro-, somatolacto-, et gonadotropes sont localisées dans la partie postérieure de la *pars distalis* (pPD). Finalement, les mélanotropes de la *pars intermedia* (PI) constituent le lobe postérieur de l'AH (données revues dans (144)).



**Figure I.26: Structuration de la plaque neurale antérieure et des préplacodes.**

Schéma représentant un embryon de poisson zèbre en fin de la gastrulation présenté en vue dorsale, partie antérieure dirigée vers le haut de l'image. Sur la moitié gauche de l'embryon, sont représentés les domaines d'expression de gènes démarqués par des zones colorées. *pitx3*: bleu; *dlx3b*: rouge; *emx3*: vert; *zic1*: marron; *foxb1.2*: jaune; *otx2*: gris. Sur la partie droite de l'embryon sont représentés les différentes destinées cellulaires démarquées par des lignes en pointillées. On constate que les zones des différentes destinées cellulaires sont définies par le recouvrement ou non des domaines d'expression des gènes présentés à gauche. Les précurseurs de l'adénohypophyse (rose) expriment *dlx3b* et *pitx3*. Les précurseurs des cristallins (bleu) expriment *pitx3* seul ou *pitx3* et *dlx3b*. Les précurseurs olfactifs (rouge) expriment *dlx3b* et *pitx3* ou *dlx3b* seul. Les précurseurs du télencéphale (vert) expriment *emx3* ou *emx3* et *zic1*. Les précurseurs de la rétine (marron) expriment *zic1*. Les précurseurs du diencephale (jaune) expriment *foxb1.2*. La structure plus sombre dans la région médiane indique le mésoderme axial. Tiré de Toro, S. and Varga, Z.M. (2007) Equivalent progenitor cells in the zebrafish anterior preplacodal field give rise to adenohypophysis, lens, and olfactory placodes. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 18, 534–542.



**Figure I.27: Ontogenèse de l'AH chez le poisson zèbre.**

Schéma représentant l'ontogenèse de l'adénohypophyse (AH) chez le poisson zèbre. Embryon présenté à 10, 26 et 60 hpf en vue latérale (panel du haut) et en vue ventrale (panel du bas), partie rostrale dirigée vers la gauche. L'adénohypophyse est en bleu clair, l'ectoderme neural (ne) en jaune et l'ectoderme pré-placodal (ppe) en mauve. La région représentée en rouge représente le domaine d'expression de *shha*, tandis que la région bleu représente le domaine d'expression de *fgf3*. Les flèches noires sur le panel du haut indiquent l'AH. anr: arête neurale antérieure; hy: hypothalamus; oc: cavité orale; sto: ectoderme stomodéal. A la fin de la gastrulation (10 hpf), les progéniteurs de l'AH sont localisés dans l'anr, la partie la plus antérieure de la ppe. Durant le développement, ces cellules de l'anr se rassemblent pour former la placode de l'AH, qui devient une structure visible dès 19 hpf. La placode de l'AH adopte une conformation en fer à cheval. La placode commence à être internalisée dans la tête dès 26 hpf; mouvement qui coïncide avec la formation de la cavité orale. L'AH atteint sa position finale entre 48 et 72 hpf, et adopte une conformation sphérique. Tiré de Pogoda, H.M. and Hammerschmidt, M. (2009) How to make a teleost adenohypophysis: molecular pathways of pituitary development in zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 312, 2–13.

## I.6.A Origine & Formation

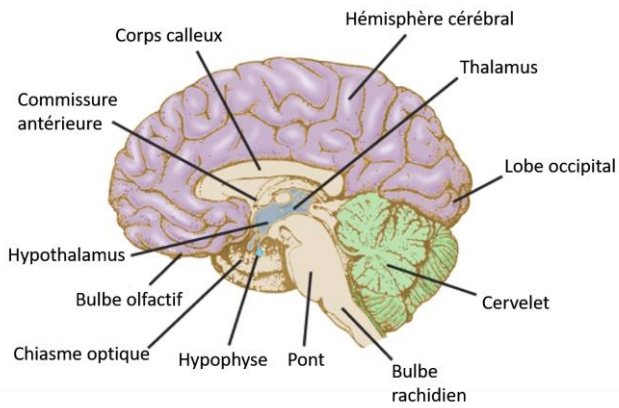
L'origine de la placode pituitaire semble être similaire chez tous les vertébrés. Chez les mammifères, les oiseaux, les amphibiens et les poissons, les cellules adénohypophysaires sont dérivées des cellules ectodermiques localisées dans la marge antérieure de la plaque neurale, nommée l'arête neurale antérieure (*anterior neural ridge* : ANR) (145-147).

Chez le poisson zèbre, à la fin de la gastrulation, l'ANR va commencer à exprimer les gènes *distal-less* *dlx3b* et *dlx4b* (148). Ce domaine, appelé pré-placode, va ensuite se spécifier pour donner notamment les placodes adénohypophysaire, olfactive et otique [Figure I.26] (revus dans (149)). Au sein de la pré-placode *dlx*-positive, l'expression de *pitx3* va permettre de définir un domaine équivalent donnant naissance aux précurseurs de l'adénohypophyse ou des cristallins suivant la concentration du ligand Hedgehog provenant du diencephale que les cellules reçoivent (élevé pour former des cellules adénohypophysaires, faible pour des cellules du cristallin) (149, 150). Par la suite, *pitx3* va continuer d'aider à définir la placode adénohypophysaire, tandis que les gènes *dlx* vont permettre de la restreindre (149, 150). De plus, grâce à des expériences de destinée cellulaire, il apparaît que les placodes olfactives et les cristallins émergent des domaines latéraux de la placode tandis que l'adénohypophyse dérive de la région médiane (149).

La spécification des cellules de la placode adénohypophysaire, marquée par l'expression du marqueur pan-adénohypophysaire *lhx3*, ne commence qu'aux alentours de 18 hpf [Figure I.27] (151-154). A 24 hpf, l'AH a pris la forme d'un fer à cheval à la marge antérieure du système nerveux central (SNC) (151, 154). Les cellules médianes du fer à cheval constituant la future *pars distalis* (lobe antérieur), tandis que les régions plus latérales vont former la *pars intermedia* (lobe intermédiaire) (155). Au cours de la migration cellulaire, les cellules de ces 2 régions latérales vont se regrouper pour former la partie postérieure de l'AH, le lobe intermédiaire. Dès 25 hpf, la distinction entre partie antérieure et postérieure de l'AH peut se faire morphologiquement par microscopie à contraste interférentiel et génétiquement via l'expression des facteurs de transcription *nkx2.2a* et *pax7* marquant respectivement la *pars distalis* et la *pars intermedia* (155).

Aux alentours de 26 hpf, l'AH va être internalisée caudalement, l'amenant dans sa position finale entre l'hypothalamus et la cavité orale (152, 154). Ce déplacement de la glande n'est pas dû à une migration active des cellules adénohypophysaires, mais est dirigée par les mouvements nécessaires à la formation de la cavité orale (152, 154). Ceux-ci comprennent une invagination de la région postérieure de l'ectoderme

(A) Humain



(B) Poisson zèbre

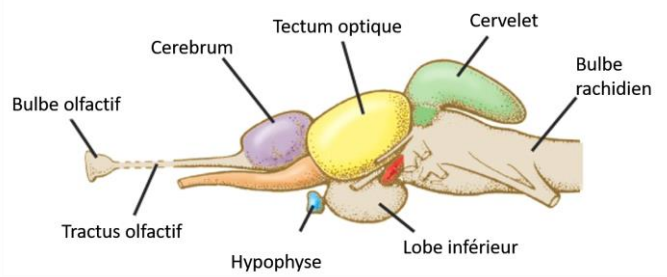


Figure I.28: Comparaison du cerveau humain avec le cerveau d'un poisson.

Schéma comparant le cerveau d'un poisson téléostéen avec celui d'un humain. Patie antérieure dirigée vers la gauche. Tiré de Randall, D.J., Burggren, W.W., French, K. and Eckert, R. (2002) *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations* W.H. Freeman and Co.

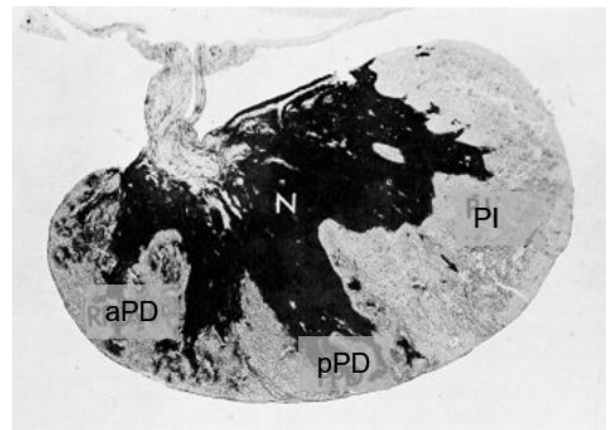
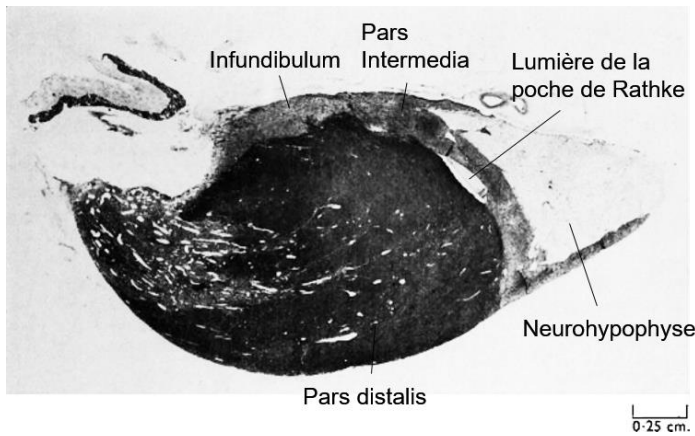
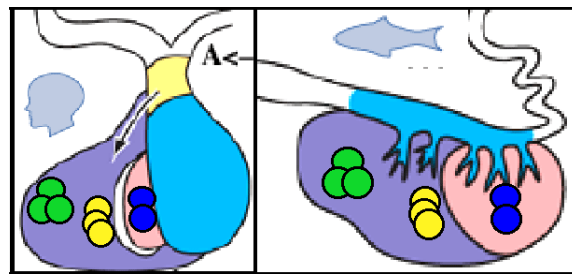


Figure I.29: Comparaison de l'hypophyse humaine et avec celle des poissons.

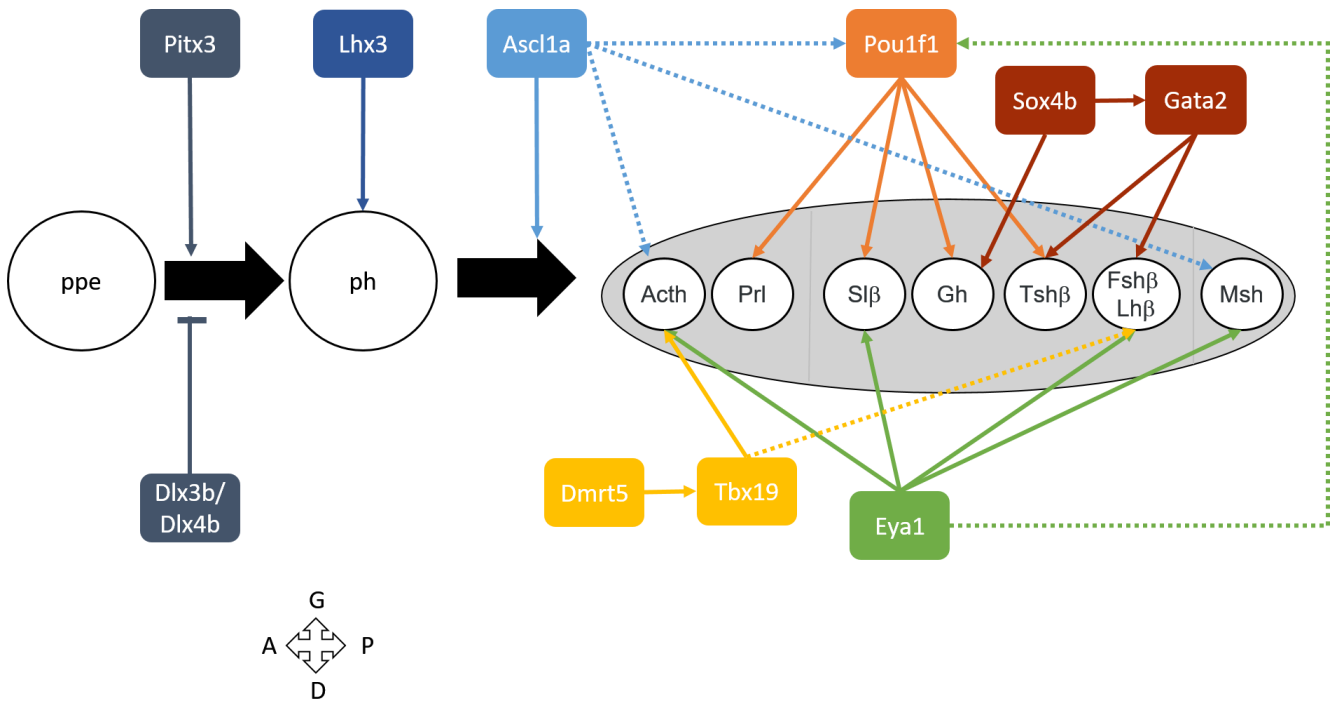
Dans le panel du haut sont présentés des schémas de l'hypophyse humaine (à gauche) et des poissons (à droite). La *pars distalis* de l'AH (en mauve) présente un domaine antérieur (cellules vertes) et un domaine postérieur (cellules jaunes). La *pars intermedia* (en rose) représente le troisième domaine de l'AH (cellules bleues foncés). Lors de sa formation, l'AH de l'homme présente une structure appelée poche de Rathke, provenant du repliement de l'ectoderme. Chez le poisson, un tel repliement n'a pas lieu. La neurohypophyse (en bleu ciel) forme un lobe bien distinct chez l'homme, alors qu'elle est étroitement associée à l'AH chez les poissons. Chez l'homme, l'hypophyse est reliée à l'hypothalamus par l'infundibulum (en jaune), chez les poissons un telle structure n'existe pas et l'hypophyse est accolée à l'hypothalamus. Dans le panel du bas, sont représentés des coupes histologiques d'une hypophyse de mammifère (à gauche) et d'un poisson (à droite). La coupe histologique de mammifère est une section sagittale d'une hypophyse de bovin colorée à l'hématoxyline et éosine. La coupe histologique de poisson est une section sagittale de l'hypophyse d'un *Fugu stictonotus* colorée à l'aldéhyde fuschine- fast green et magnifiée 125x. aPD: *anterior Pars Distalis*; pPD: *posterior Pars Distalis*; PI: *Pars Intermedia*; N: neurohypophyse. Tiré de Liem, K.F. and Walker, W.F. (2001) *Functional anatomy of the vertebrates: an evolutionary perspective* Harcourt College Publishers. & Bradbury, S. (1973) *The Pineal and the Hypophysis (Pituitary Gland)*. *Hewer's Textb. Histol. Med. Students*, 10.1016/B978-0-433-14703-9.50021-4. & Chiba, A. and Honma, Y. (1974) *Cell Types in the Adenohypophysis of the Puffer, Fugu stictonotus, with Special Reference to the Basophils in the Pars Distalis*. *Arch. Histol. Jpn.*, 36, 291-305.

stomodéal et sa fusion avec l'épithélium de l'intestin antérieur en vue de former un appareil digestif continu. Ceci laisse l'AH dans une position sub-épithéliale, dorsale à la voûte orale et ventrale à l'hypothalamus (152, 154). Au cours du développement squelettique, la glande pituitaire sera logée dans une cavité du neuro-crâne et séparée de la cavité orale par des cellules synthétisant du collagène mais ne formant pas de pièce cartilagineuse à proprement parler (156).

De nombreuses études indiquent que le développement de l'hypothalamus et celui de l'hypophyse sont interdépendants (données revues dans (157)). La communication croisée entre ces deux structures est indispensable pour la prolifération, la différenciation et l'expression hormonale des lignées endocrines composant l'AH. Outre les neuro-hormones contrôlant sa sécrétion hormonale, le développement de l'AH est dépendant de signalisations de longue portée émanant de l'hypothalamus, tel que celle de Hedgehog ou des Fibroblast Growth Factors comme nous le verrons dans les sections suivantes (152, 153, 155, 158).

Au sein de l'AH, la distribution spatiale des différentes lignées endocrines est loin d'être due au hasard, en fait les cellules endocrines sont organisées en un réseau homotypique, facilitant la réponse physiologique aux stimuli (données revues dans (159)(142)). La différenciation des différentes lignées cellulaires adénohypophysaires se déroule dans un ordre temporel et spatial bien établi, qui commence lorsque les cellules sont toujours organisées en placode au sein de l'ANR (152). Les premières à se différencier sont les lactotropes, marquées par l'expression de la prolactine (*prl*) aux alentours de 22 hpf (152). Ensuite, aux alentours de 23 hpf, ce sont les somatolactotropes exprimant la somatolactine (*sl $\beta$* ) qui se différencient (130). A partir de 24 hpf, elles sont suivies par les cellules marquées par le gène de la pro-opiomélanocortine (*pomc*), à savoir les corticotropes et les mélanotropes (152). Notons toutefois qu'en l'absence de marqueur permettant de distinguer entre les mélanotropes et les corticotropes, il est difficile de distinguer les deux populations autrement que par leur position respective dans l'AH (aPD et PI). Les somatotropes exprimant l'hormone de croissance (*gh*) et les thyrotropes exprimant la thyrotrophine (*tsh $\beta$* ) se différencient entre 36 et 42 hpf (152, 160). Les dernières, les gonadotropes ne commencent à se différencier qu'à partir de 72 hpf et sont marquées par l'hormone stimulatrice des follicules (*fsh $\beta$* ) et l'hormone lutéinisante (*lh $\beta$* ) (161).

Le développement de l'AH des téléostéens présente 3 différences notables par rapport aux autres vertébrés [Figure I.28 et I.29]. La plus frappante est l'absence de formation d'une poche de Rathke. Chez les autres vertébrés, la poche de Rathke se forme par repliement causé par le recourbement céphalique du mésencéphale ainsi que par l'élargissement du prosencéphale (162, 163). Ces mouvements entraînent une



**Figure I.30: Résumé des facteurs de transcription impliqués dans le développement de l'AH.**

Schéma représentant l'implication des facteurs de transcription majeurs dans le développement de l'AH de *Danio rerio*. Au sein de la pré-placode ectodermique (ppe), la placode hypophysaire (ph) va être définie grâce à l'induction par le facteur de transcription Pitx3 et la restriction par les facteurs Dlx3b et Dlx4b (gris foncé). Les cellules de la placode vont adopter la destinée adénohypophysaire marquée par l'expression de *lhx3* (bleu foncé). Grâce à l'action de Ascl1a (bleu clair), les cellules adénohypophysaires vont pouvoir s'engager dans une des destinées conduisant aux différentes lignées endocrines. Plus tard, Ascl1a a potentiellement un rôle dans l'expression du gène *pomc* par les corticotropes (Acth) et les mélanotropes (Msh). Pou1f1 (en orange) permet la différenciation des lactotropes (Prl), des somatolactotropes (Slβ), des somatotropes (Gh) et des thyrotropes (Tshβ). Eya1 (en vert) est nécessaire à la différenciation des corticotropes, des somatolactotropes (Slβ), des gonadotropes (Fshβ et Lhβ) et des mélanotropes. Eya1 semble être également requis pour la maintenance de l'expression de *pou1f1*. Remarquons que seuls les somatolactotropes nécessitent Pou1f1 et Eya1. Le facteur de transcription Sox4b (en bordeaux) est nécessaire à la différenciation des somatotropes, et via son contrôle de Gata2 (en bordeaux), des thyrotropes et des gonadotropes. Via l'induction de Tbx19 (en jaune), Dmrt5 (en jaune) permet de promouvoir les corticotropes et de restreindre les gonadotropes. Les différentes lignées endocrines sont représentées par la ou les hormone(s) qu'elles produisent. L'adénohypophyse est présentée en vue ventrale, partie antérieure vers la gauche. Adapté de Pogoda, H.M. and Hammerschmidt, M. (2009) How to make a teleost adenohypophysis: molecular pathways of pituitary development in zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 312, 2–13.



réorientation des cellules adénohypophysaires passant d'un arrangement antéro-postérieur à une configuration dorso-ventrale. Chez le poisson zèbre, aucune structure similaire à une poche n'est formée, puisque le recourbement céphalique s'effectue plus dorsalement que ce qui se passe chez les autres vertébrés (152, 154). Ceci implique que les cellules adénohypophysaires conservent leur orientation antéro-postérieure originelle. La seconde différence à remarquer par rapport aux autres vertébrés est que les neurohormones de l'hypothalamus ciblant l'AH des téléostéens ne passent pas par un système vasculaire porte. L'AH des téléostéens est directement innervée par des fibres neurosécrétrices déversant leurs messagers chimiques à proximité des cellules endocrines cibles (164), la neurohypophyse recouvre l'entièreté de l'AH sans former de lobe postérieur. La troisième grande différence est que les téléostéens ne possèdent pas d'infundibulum à proprement parler. Ainsi, contrairement aux amniotes chez qui l'hypophyse est suspendue à l'hypothalamus via la pointe de l'infundibulum appelée tige pituitaire, l'hypophyse des vertébrés inférieurs est accolée à l'hypothalamus (112).

## I.6.B Facteurs de transcription

Au cours de leur différenciation, les cellules adénohypophysaires expriment et requièrent un panel dynamique de facteurs de transcription relativement bien documenté. Ainsi, un progéniteur placodaire pluripotent va se spécifier en un précurseur adénohypophysaire, puis se différencier en une cellule endocrine mature déterminée. Ceci est possible grâce à l'expression séquentielle et spécifique de facteurs de transcription définissant la voie de différenciation [Figure I.30].

### *Pitx3*

Les facteurs à homéodomaines *Pitx*, homologues du gène *bicoïd* de la drosophile, sont connus pour leur implication dans l'établissement de l'asymétrie gauche-droite et sont des morphogènes importants dans le développement de divers organes (données revues dans (165)).

Chez le poisson zèbre, *pitx3* (*paired-like homeodomain 3*) est exprimé en fin de gastrulation (10hpf) au niveau de la plaque neurale antérieure (150), dans laquelle le domaine d'expression de *pitx3* chevauche partiellement celui des facteurs de transcription *dlx3b* et *dlx4b*. A ce stade, *pitx3* définit, au sein de la plaque neurale antérieure, un domaine d'équivalence qui va pouvoir ensuite être induit en cristallin ou en hypophyse. L'absence de *pitx3* empêche donc la formation de la placode hypophysaire. Entre 10,5 et 16hpf, la placode hypophysaire est induite par la signalisation Hedgehog, exprime *pitx3* et est restreinte par *dlx3b* et *dlx4b*. En effet le blocage de l'expression de *dlx3b* et *dlx4b* mène à une expansion de la placode





hypophysaire. A 24hpf, outre son expression dans toutes les cellules hypophysaires, *pitx3* est également exprimé dans les précurseurs du cristallin, le mésenchyme de la tête, le diencéphale ventral, les premiers arcs branchiaux, ainsi que dans les somites.

Chez la souris, *Pitx3* est exprimé dans les neurones dopaminergiques du cerveau moyen, le mésenchyme oculaire et le cristallin, mais pas dans l'hypophyse (166, 167). Cependant, les gènes *Pitx1* et *Pitx2* sont exprimés dans l'AH et semblent être partiellement redondants dans la maintenance des progéniteurs endocriniens. Plus tard, ils semblent également être impliqués dans le contrôle du nombre de cellules endocrines différenciées ainsi que dans la fonction des thyrotropes (données revues dans (114)).

### ***Lhx3***

Le gène *lhx3* (*LIM homeobox 3*) est un facteur de transcription de la famille de gènes LIM homeobox, exprimé dans l'adénohypophyse dès l'induction de la placode pituitaire à 18,5 hpf (151). *lhx3* est exprimé dans toutes les cellules de l'adénohypophyse et ce jusqu'à 4 dpf, et est donc couramment utilisé comme marqueur de celle-ci (153, 156, 161, 168). Comme ses orthologues des autres vertébrés, en plus de son expression dans l'adénohypophyse, le gène *lhx3* est également exprimé dans la glande pinéale, le cerveau supérieur, la moelle épinière ventrale ainsi qu'au niveau de la rétine (151, 169–171).

Malgré sa grande utilisation comme marqueur de l'AH, aucune étude n'a à ce jour décrit les fonctions et interactions de *Lhx3* chez le poisson zèbre. Herzog W. et Hammerschmidt M. clament cependant que l'inactivation de *lhx3* induit la perte de toutes les cellules hypophysaires, à l'exception de quelques cellules exprimant *pomc* (168).

Chez les mammifères, trois facteurs de transcription « *Lim homeobox* » sont importants dans le développement de l'AH, LHX2, LHX3 et LHX4 (données revues dans (114, 117)). L'inactivation de *Lhx2* chez la souris mène à des malformations cérébrales et des défauts dans la formation de l'infundibulum et de la neurohypophyse. Au niveau de l'AH, la perte de LHX2 mène à une poche de Rathke de morphologie altérée contenant moins de cellules endocrines. *Lhx3* et *Lhx4* sont exprimés dans le primordium adénohypophysaire dès les premières étapes de la formation de la poche de Rathke (9,5 dpc). Alors que l'expression de *Lhx4* disparaît après la formation des différents lobes (15,5 dpc), *Lhx3* reste exprimé dans la glande chez l'adulte. L'absence de LHX3 chez la souris induit une létalité postnatale accompagnée d'une poche de Rathke rudimentaire présentant des défauts évidents de différenciation des différentes lignées endocrines. Chez l'homme, les personnes atteintes d'une mutation homozygote dans



*LHX3* présentent une déficience hormonale pituitaire multiple accompagnée d'anomalies cervicales. Comme les mutants murins *Lhx3*, les mutants *Lhx4* meurent peu après la naissance, cependant, bien qu'hypoplasique, l'AH contient toutes les lignées endocrines. En fonction du type de mutation, les patients atteints de défauts dans le gène *LHX4* présentent différents degrés de déficiences hormonales pituitaires. Il semble que lors des premières étapes de la formation de l'AH, *LHX3* et *LHX4* aient un rôle redondant dans la maintenance des progéniteurs, et que plus tard *LHX3* soit impliqué dans la différenciation endocrine (données revues dans (114, 117)).

### ***Ascl1a***

*Ascl1a* (*achaete-scute family bHLH transcription factor 1a*) est un facteur de transcription bHLH (*basic Helix- Loop- Helix*) exprimé dans la placode hypophysaire dès 18 hpf. *ascl1a* est exprimé dans toutes les cellules hypophysaires jusqu'à 72 hpf, ensuite son expression se restreint à la partie antérieure de la *pars distalis* ainsi qu'à la *pars intermedia* ; suivant un profil d'expression semblable à celui du gène *pomca* (172). En plus de son expression hypophysaire, *ascl1a* est également exprimé dans la rétine, l'intestin et le diencephale.

*Ascl1a* semble être requis peu après l'induction de la placode hypophysaire dans les événements de spécification de la placode. En effet, l'absence de *Ascl1a* mène à la formation d'une adénohypophyse rudimentaire, ne contenant aucune lignée endocrine. De plus, *ascl1a* semble être requis pour la survie d'une partie des cellules hypophysaires. Les cellules restantes semblent être bloquées à un stade de précurseur exprimant *lhx3* et *pitx3* de manière relativement normale, tandis que d'autres marqueurs tel que *pou1f1* sont perdus (172). Il semble donc y avoir deux populations endocrines, la première pour laquelle *ascl1a* est nécessaire pour sa différenciation et sa survie, la deuxième ne nécessitant *ascl1a* que pour sa différenciation. Il est envisageable que *ascl1a* ne soit nécessaire que pour la première population, tandis que le problème de différenciation de la deuxième pourrait ne résulter que de l'absence d'un autre facteur de transcription tel que *pou1f1*. Il est intéressant de remarquer que le promoteur du gène *pomca* (exprimé par les corticotropes et les mélanotropes) contient des séquences consensus des facteurs de transcription bHLH (E-boxes) permettant l'activation transcriptionnelle. Combiné avec le profil d'expression à partir de 3 jours, ces données laissent à penser à un rôle de *ascl1a* dans la régulation du gène *pomca*.

L'homologue murin, *Ascl1* est surtout connu pour son rôle dans la neurogenèse et la gliogenèse du système nerveux central et périphérique (173). Récemment il a été prouvé que *Ascl1* est exprimé dans l'AH et joue un rôle dans la régulation des corticotropes (174, 175). De plus, de nombreuses études chez les mammifères indiquent une corrélation entre la signalisation Notch et *Ascl1* (176–180).



## ***Pou1f1***

Le gène *pou1f1* (*POU class 1 homeobox 1*), anciennement appelé *pit1*, est un gène spécifique à l'adénohypophyse, son expression débute à 18 hpf dans les cellules précurseurs des lactotroques, somatotroques, somatolactotroques et thyrotroques (130, 160). Ces lignées endocrines requièrent l'activité transcriptionnelle de Pou1f1 pour leur différenciation et sont définies comme les lignées Pou1f1-dépendantes (130, 160, 168). Ceci est similaire à la fonction de son orthologue murin et humain, dont la déficience mène à l'absence de lactotroques, somatotroques et thyrotroques (181-186). De plus, de manière comparable à ce qui se passe chez la souris, les poissons zèbre déficients en Pou1f1 développent un nanisme sévère, dû à une absence d'hormone de croissance (160, 181, 182). Cependant quelques différences entre les mammifères et les poissons sont à noter : premièrement, la souris possède une lignée de thyrotroques indépendante de Pou1f1 localisée dans la pointe rostrale de l'AH (187). Deuxièmement, chez le poisson zèbre l'expression de Pou1f1 est initiée bien plus tôt que chez la souris, ce qui est probablement dû à la nécessité de bénéficier du rôle osmorégulateur de la prolactine à l'éclosion chez les poissons (160). Troisièmement, chez le poisson zèbre l'inactivation de Pou1f1 mène à une trans-différenciation de la lignée Pou1f1 vers les lignées *pomc* et gonatotroques, ce qui n'est pas observé chez la souris.

## ***Eya1/Six***

Le gène *eya1* (*EYA transcriptional coactivator and phosphatase 1*) est un homologue du gène *eye absent* (*eya*) de la drosophile, où il est requis notamment pour la différenciation et la survie des progéniteurs des yeux (188). *eya1* est exprimé dès 10 hpf dans toute la pré-placode ectodermique, y compris la plaque neurale antérieure dont dérive l'adénohypophyse (156). Au cours de la spécialisation des placodes (10,5-16 hpf), *eya1* est principalement exprimé au niveau de la placode olfactive. Ce n'est qu'à partir de 18 hpf, que son expression augmente dans les précurseurs hypophysaires. *eya1* est exprimé dans toutes les cellules de l'AH et ce jusqu'à ce que son expression diminue sensiblement à partir du troisième jour de développement.

Du point de vue fonctionnel, *eya1* est requis pour la différenciation des corticotroques, somatolactotroques, gonatotroques et mélanotroques ; définissant ainsi la lignée Eya1-dépendante. De manière intéressante, la lignée Eya1-dépendante est complémentaire à la lignée Pou1f1-dépendante à l'exception des somatolactotroques qui requièrent les deux facteurs afin de se différencier. De plus Eya1 semble nécessaire au maintien de l'expression de *pou1f1*. Ainsi, l'absence de Eya1 (mutant *aal*) induit une perte progressive de l'expression de *pou1f1* ce qui mène à la perte des somatotroques et thyrotroques. Les lactotroques, quant à eux ne semblent pas être affectés par la perte de



Pou1f1. L'expression des gènes *lhx3* et *pitx3* semble également être affectée par l'absence de *eya1*, puisque dans les mutants *eya1* leur expression semble décroître plus rapidement que chez les poissons sauvages. Contrairement à ce qui a pu être observé dans d'autres tissus, *Eya1* n'est pas impliqué dans la survie cellulaire de l'AH (156, 189).

Souvent, les protéines *Eya* peuvent s'associer à la famille de facteurs de transcription *Six*, encodés par des orthologues du gène *sine oculis* (*so*) de la drosophile (190, 191). La liaison des protéines *Eya* aux facteurs *Six* permet de moduler l'activité transcriptionnelle de ces derniers. Trois gènes *six* ont été décrits comme exprimés dans l'AH : *six1*, *six3a* et *six4.1*. Cependant, jusqu'à présent seule la fonction de *six1* fut étudiée : bien que la coopération avec *eya1* reste incertaine, *six1* semble être impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire hypophysaire (156).

Chez les souris, le « *knock-out* » de *Eya1* est létal et mène à une formation fortement altérée des oreilles, reins, thymus, thyroïde, parathyroïdes ainsi que des placodes crâniennes (192–194). Dans tous ces tissus, *Eya1* semble être impliqué dans la différenciation et la survie cellulaire. Seul, *Eya1* ne présente pas de fonction au niveau de l'AH, cependant le double « *knock-out* » *Eya1/Six1* présente une hypoplasie hypophysaire (191). Chez l'homme, des mutations dans le gène *EYA1* mènent aux syndromes BOR1 (dysplasie branchio-oto-rénale) (OMIM 113650) et BOS1 (dysplasie branchio-otique) (OMIM 602588) caractérisés par des anomalies des arcs branchiaux, des malformations de l'appareil auditif menant à la surdité, ainsi que par la présence ou non d'anomalies rénales (195–197).

### ***Sox4b & Gata2***

Les facteurs de transcription de la famille SOX (*Sry-related HMG box*) sont largement et dynamiquement exprimés au cours de l'embryogenèse et sont impliqués dans de nombreux processus développementaux, tels que le développement de la crête neurale, la neurogenèse du SNC, le développement des gonades mâles, ainsi que la chondrogenèse (données revues dans (198)). Les facteurs *sox* sont également connus pour leur implication dans la maintenance et la différenciation des cellules souches pluripotentes (199). Chez la souris, *Sox2* et *Sox3* sont exprimés dans le diencéphale ventral où ils activent l'expression de *Shh*, *Six3* et *Six6* (données revues dans (114)). L'absence de SOX2 ou de SOX3 altère l'évagination de l'infundibulum et réduit la prolifération des cellules le composant. En conséquence de cette atteinte hypothalamique, la poche de Rathke adopte une conformation bifurquée, et la glande pituitaire présente un nombre de cellules réduit. Alors que les effets de SOX3 sur le développement de l'AH semblent être uniquement dus à son action sur l'hypothalamus, SOX2 joue en plus un rôle spécifique dans le tissu pituitaire, puisque





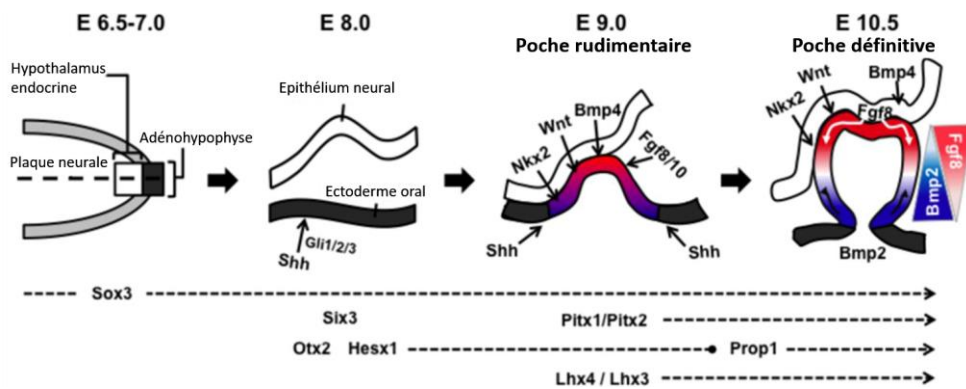
lorsque l'on induit sa perte spécifiquement dans la poche de Rathke, on constate une réduction du taux prolifératif des progéniteurs adénohypophysaires.

Chez le poisson zèbre, aucune fonction pituitaire n'est à ce jour connue pour Sox2 ou Sox3, par contre le facteur Sox4b est impliqué dans la différenciation des thyrotropes et des gonadotropes (161). A 24 hpf, *sox4b* est détecté dans l'ANR contenant les futures cellules adénohypophysaires. A 30 hpf, *sox4b* est clairement exprimé dans une majorité des cellules de la placode adénohypophysaire, avant d'être restreint aux thyrotropes à 48 hpf. La diminution d'expression de *sox4b* induite par injection de morpholino spécifique, mène à la diminution du nombre de thyrotropes, de somatotropes et de gonadotropes tandis que les autres cellules endocrines ne semblent pas affectées. De plus, les événements d'induction et de spécification de l'AH ne semblent pas être affectés par le manque du facteur Sox4b puisque l'expression de *lhx3* et *pou1f1* est comparable aux embryons contrôles. Les effets de Sox4b sur les thyrotropes et les gonadotropes de Sox4b sont dépendants de son contrôle de l'expression du facteur de transcription Gata2, tandis que les effets de Sox4b sur les somatotropes semblent en être indépendants. Chez la souris, Gata2 permet d'activer l'expression de *Cga* et, en synergie avec Pou1f1, induit l'expression de *Tsh $\beta$*  (183, 200).

### ***Dmrt5***

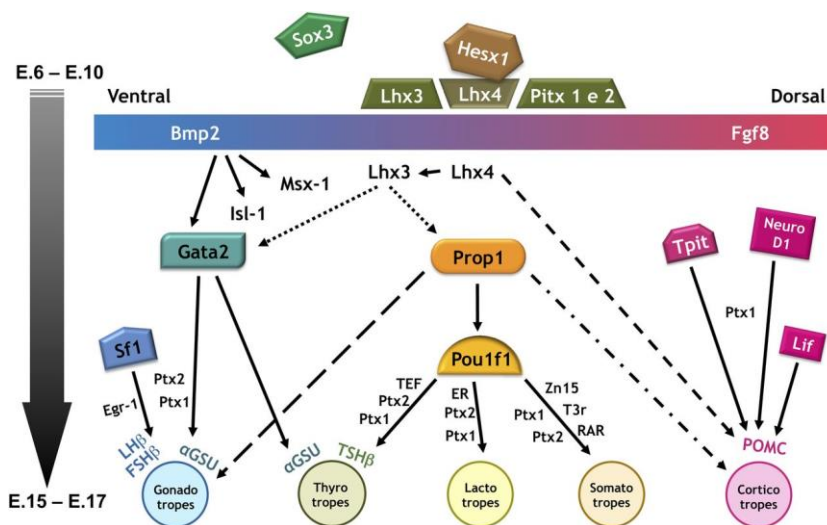
Les gènes *dmrt* (*doublesex and mab3 related transcription factor*) codent pour des facteurs de transcription largement impliqués dans la détermination et le dimorphisme sexuels (201–205). Chez les vertébrés, la majorité des gènes *dmrt* sont exprimés dans les gonades en formation. De plus, certains gènes tels que *dmrt5* sont impliqués dans le développement des tissus nerveux (206, 207). En plus de ces fonctions, Dmrt5 est également impliqué dans la différenciation terminale des corticotropes et des gonadotropes (208).

Aux alentours de 10 hpf, *dmrt5* est exprimé dans la région dorsale de l'ANR, mais est exclu du primordium adénohypophysaire (208). Ce n'est qu'à partir de 24 hpf que *dmrt5* est exprimé dans la partie antérieure de l'adénohypophyse. A ce stade, *dmrt5* est également exprimé dans le prosencéphale et dans le mésencéphale. L'absence de Dmrt5 n'influe pas sur la taille de l'adénohypophyse et les marqueurs de spécification *pou1f1* et *eya1/six1b* sont exprimés de manière normale. Cependant, le nombre de corticotropes est réduit, tandis que les gonadotropes sont augmentés, de manière telle qu'il est fortement probable que les cellules qui ne se sont pas différenciées en corticotropes soient devenues des gonadotropes. De plus, la perte de Dmrt5 induit une diminution du nombre de lactotropes due à la mort d'une partie d'entre elles, ainsi qu'à une localisation aberrante de certaines. En somme, bien qu'il ne soit pas requis pour l'induction ou la spécification de l'AH, Dmrt5 exprimé dans la partie antérieure



**Figure I.31: Ontogenèse de l'AH chez les mammifères**

La partie la plus antérieure de la plaque neurale donne naissance à l'adénohypophyse et la région médiane adjacente constitue l'hypothalamus endocrine. Chez la souris, à environ E8 (âge embryonnaire), l'ectoderme oral prolifère en réponse à la signalisation SHH. Les facteurs de transcription SIX3, OTX2 et HEX1 ainsi que la voie de signalisation SHH participent dans la formation de la ligne médiane et du SNC. La prolifération continue à environ E9 en réponse à la signalisation de l'épithélium neural avec l'expression de BMP4, WNT2 et NKX2. C'est à ce stade que l'ectoderme oral commence à s'invaginer pour former une poche rudimentaire, qui exprime LHX3, LHX4, PITX1 et PITX2. Exprimé au bord de la poche de Rathke, la signalisation de BMP2 s'oppose à celle de FGF8 provenant de l'épithélium neural. Ainsi, un gradient dorso-ventral BMP2-FGF8 est défini, et détermine l'activation de gènes spécifiques dans chaque groupe de cellules en fonction de leur position au sein de la poche de Rathke. Tiré de e Moraes,D.C., Vaisman,M., Conceição,F.L. and Ortiga-Carvalho,T.M. (2012) Pituitary development: A complex, temporal regulated process dependent on specific transcriptional factors. J. Endocrinol., 215, 239–245.



**Figure I.32: Résumé des facteurs de transcription impliqués dans le développement de l'AH chez les mammifères.**

En réponse au gradient dorso-ventral BMP2-FGF8, les lignées endocrines de l'AH sont déterminées par l'activation et la répression de facteurs de transcription spécifiques. Les flèches pleines indiquent une activation de l'expression; les flèches en pointillés indiquent un rôle inconnu dans l'activation de l'expression; les flèches en tirets indiquent un rôle non défini; les flèches combinant des tirets et des points indiquent l'action d'un facteur important dans la maintenance d'une fonction cellulaire sur le long terme. BMP2, bone morphogenic protein 2; EGR1, early growth response 1; ER, oestrogen receptor; FGF8, fibroblast growth factor 8; GATA2, GATA-binding protein 2; HESX1, HESX homeobox 1; ISL1, ISL LIM homeobox 1; LHX3, LIM homeobox 3; LHX4, LIM homeobox 4; LIF, leukaemia inhibitory factor; MSX1, msh homeobox 1; NeuroD1, neurogenic differentiation 1; POU1F1, POU class 1 transcription factor 1; PITX1, paired-like homeodomain 1; PITX2, paired-like homeodomain 2; POMC, pro-opiomelanocortin; PROP1, prophet of Pit-1; RAR, retinoic acid receptor; SF1, steroidogenic factor 1; T3r, thyroid hormone nuclear receptor; TEF, thyrotrope embryonic factor; TPIT, T-box 19; Zn15, zinc finger protein Zn15. Tiré de e Moraes,D.C., Vaisman,M., Conceição,F.L. and Ortiga-Carvalho,T.M. (2012) Pituitary development: A complex, temporal regulated process dependent on specific transcriptional factors. J. Endocrinol., 215, 239–245.

de l'AH, est impliqué dans le choix de la destinée entre les corticotropes et les gonadotropes, ainsi que dans la maintenance des lactotropes. Son action promotrice des corticotropes et restrictive des gonadotropes semble avoir lieu via l'induction du facteur de transcription *tbx19* dans la *pars distalis* antérieure (208).

Chez la souris, le facteur de transcription TBX19, également appelé Tpit, est un régulateur positif des corticotropes et mélanotropes (209). De plus, il semble restreindre les gonadotropes et les thyrotropes de la pointe rostrale indépendants de POU1F1.

### ***Autres facteurs***

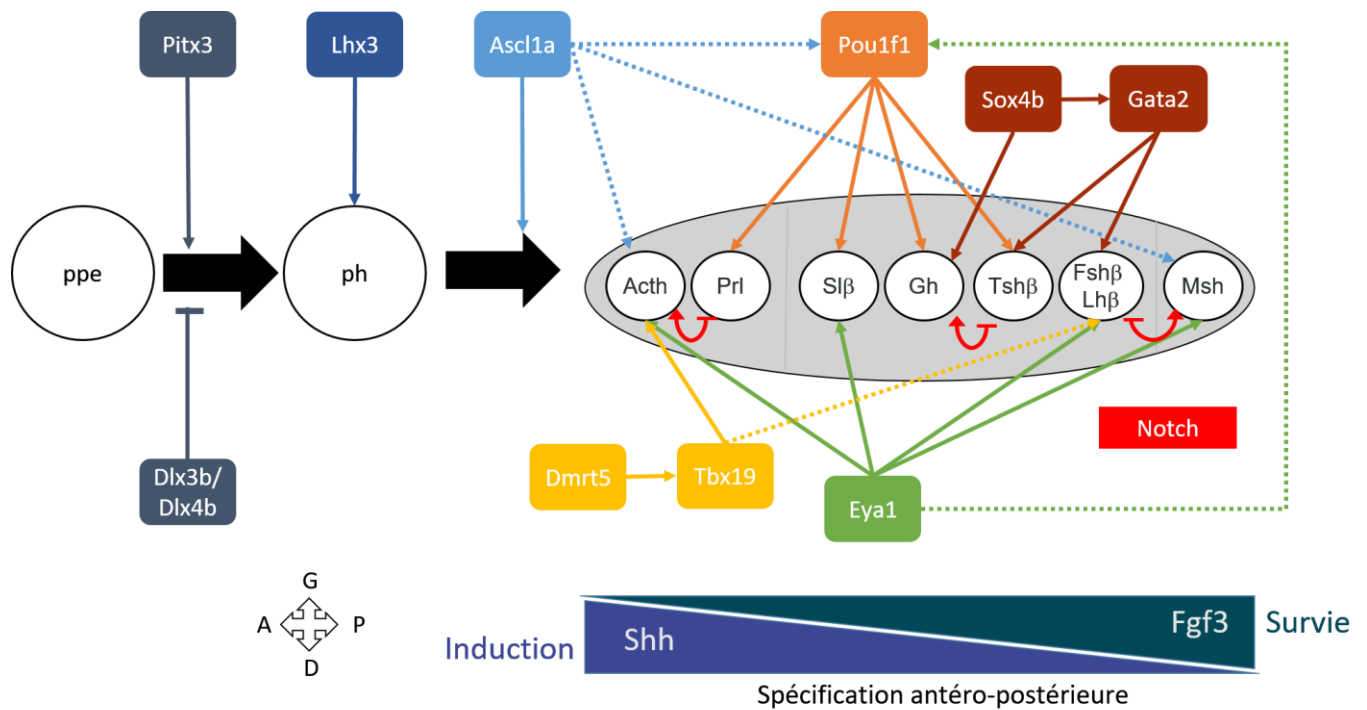
En plus des facteurs de transcription précités, les facteurs *neurod1*, *pax6b*, *nkx2.2a* et *pax7a* sont également exprimés dans l'AH du poisson zèbre. A l'heure actuelle, aucune donnée disponible ne permet de confirmer leur fonction précise dans le développement de l'AH chez le poisson zèbre, nous ne pouvons donc que nous baser sur les données obtenues chez le modèle murin.

Le facteur de transcription bHLH (*basic helix- loop-helix*) NEUROD1 permet d'induire l'expression de *Pomc* par les corticotropes, mais ne semble pas être nécessaire à leur différenciation (210, 211). PAX6 est nécessaire à l'établissement de l'axe ventro-dorsal dans l'AH en permettant de promouvoir les lignées endocrines dorsales (somatotropes et lactotropes) et de restreindre les lignées ventrales (thyrotropes et gonadotropes) (212, 213). Chez la souris, PAX7 joue un rôle permissif pour la spécification des mélanotropes par TBX19 (214). Chez le poisson zèbre, *nkx2.2a* et *pax7a* sont exprimés respectivement dans la *pars distalis* et dans la *pars intermedia* (153, 155, 215). De plus leurs domaines d'expression sont directement dépendants des signalisations Hh et Fgf provenant du diencephale.

Chez les mammifères, plusieurs autres facteurs de transcription sont également connus pour être impliqués dans la formation de la glande adénohypophysaire ; citons principalement HESX1, ISL-1 et PROP1 [Figure I.31 et I.32]

## **I.6.C Voies de signalisation**

Comme nous l'avons vu, un nombre important de facteurs de transcription impliqués dans la spécification et la différenciation des lignées endocrines de l'AH sont bien connus. La voie de différenciation dans laquelle un précurseur adénohypophysaire va s'engager est déterminée par une communication intercellulaire intense. Cette communication fait intervenir la signalisation de courte portée Notch, mais aussi les signalisations de longue portée Hedgehog et Fgf provenant du SNC [Figure I.33]. Il



**Figure I.33: Résumé des facteurs de transcription et des voies de signalisation impliqués dans la formation de l'AH.**

Schéma représentant l'implication des facteurs de transcription majeurs et des principales voies de signalisation dans le développement de l'AH de *Danio rerio*. Voir la figure I.28 pour les explications sur les facteurs de transcription. Le domaine de la pré-placode ectodermique (ppe) établi par Pitx3 et restreint par Dlx3b et Dlx4b, est induit en placode hypophysaire (ph) grâce à l'induction de la voie Shh (mauve) provenant du diencéphale voisin. Peu après la signalisation Fgf3 (vert foncé) provenant du télencéphale va permettre aux cellules adénohypophysaires de s'engager dans une voie de différenciation endocrine et promeut leur survie. Plus tard, les signalisations Shh et Fgf3 produites par le SNC respectivement antérieurement et postérieurement à l'AH, vont permettre de définir un double gradient inversé de signalisation, établissant un axe de spécification antéro-postérieure. Ainsi le domaine antérieur de l'AH reçoit un taux élevé de signalisation Shh et un faible niveau de signalisation Fgf3, tandis que le partie la plus postérieure de l'AH reçoit un faible niveau de signalisation Shh et un taux élevé de signalisation Fgf3. Dans chaque domaine, la voie de signalisation Notch (rouge) va permettre de définir le nombre relatif de chaque lignée endocrine. Par exemple, dans la partie antérieure de l'AH, la voie Notch restreint le nombre de lactotropes au profit des corticotropes via le processus d'inhibition latérale. Les différentes lignées endocrines sont représentées par la ou les hormone(s) qu'elles produisent. L'adénohypophyse est présentée en vue ventrale, partie antérieure vers la gauche. *Adapté de Pogoda, H.M. and Hammerschmidt, M. (2009) How to make a teleost adenohypophysis: molecular pathways of pituitary development in zebrafish. Mol. Cell. Endocrinol., 312, 2–13.*

est important de garder à l'esprit que les différentes voies de signalisation sont interdépendantes et complémentaires. Par exemple, lors de la structuration de l'AH, les signalisations Hedgehog et Fgf proviennent de deux sources opposées, ceci induit un double gradient morphogène permettant l'établissement des différents domaines adénohypophysaires. Au sein de ces domaines, la signalisation Notch permet d'établir la balance adéquate entre les différentes lignées endocrines. En plus de leur rôle dans la structuration et la différenciation des cellules adénohypophysaires, les voies de signalisation sont également impliquées dans l'induction de l'AH, la survie et la prolifération des différentes cellules adénohypophysaires.

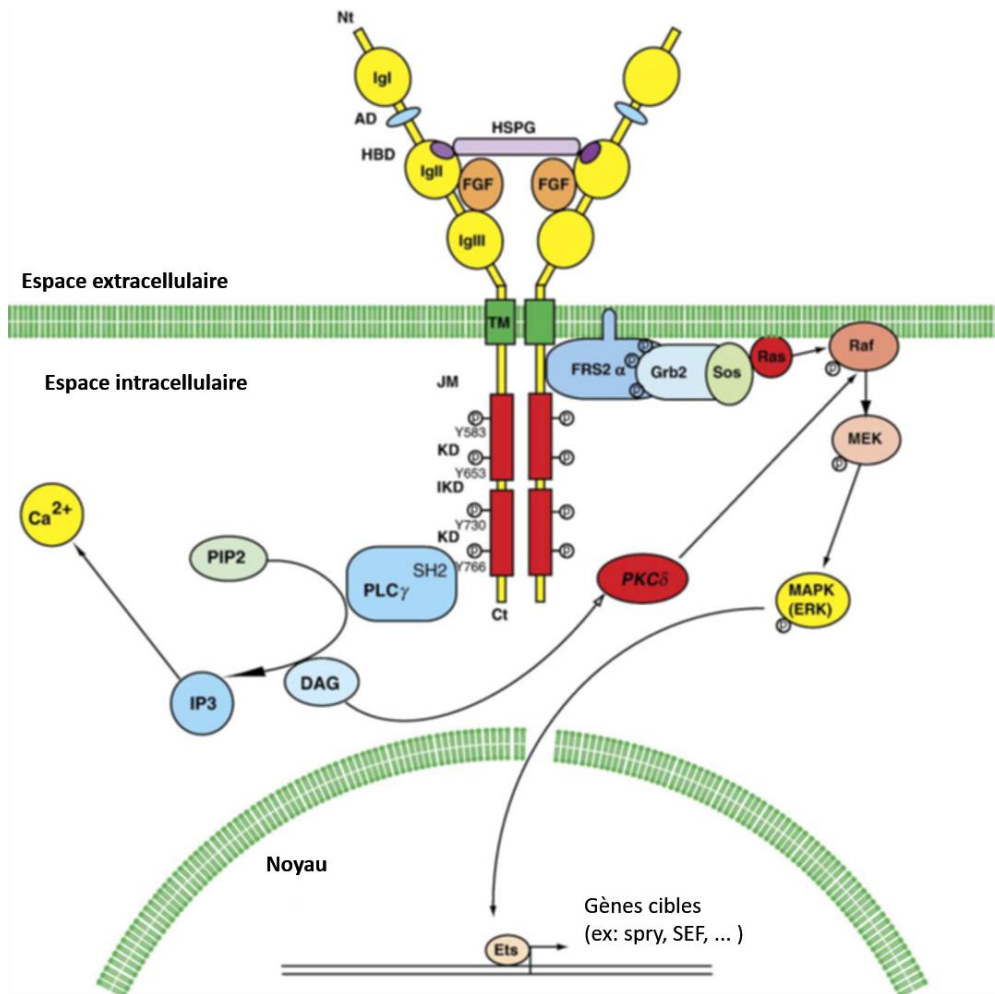
### ***Fibroblast growth factor (Fgf)***

La voie de signalisation des facteurs de croissance des fibroblastes (Fgf) utilise des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase associés à un protéoglycane à héparan sulfate [Figure I.34]. L'interaction ligand-récepteur provoque la dimérisation des récepteurs, ce qui induit la phosphorylation de nombreux résidus tyrosines des domaines intracellulaires. Ces résidus phosphorylés vont permettre l'interaction et l'activation de protéines adaptatrices cytoplasmiques, qui vont déclencher de nombreuses voies de transduction du signal dont principalement la voie des Ras -MAP kinases (données revues dans (216, 217)).

La voie Fgf est impliquée dans de nombreux processus développementaux tels que la morphogenèse et l'induction tissulaire, la migration, le maintien et la différenciation cellulaire (données revues dans (218)).

Chez la souris, l'infundibulum produit au moins 3 ligands de la famille Fgf, Fgf8, Fgf10 et Fgf18 (219, 220). La perte de signalisation Fgf induit une poche de Rathke rudimentaire présentant un grand nombre de cellules apoptotiques (220, 221). Cette observation suggère un rôle de Fgf dans la morphogenèse, la survie et la prolifération des cellules de l'AH. De plus, il a été démontré via des expériences de gain de fonction que la signalisation Fgf induit la prolifération et la différenciation des types endocrines dorsaux de l'AH (corticotropes et mélanotropes) et est contrée par la signalisation Bmp2 qui promeut les types ventraux (thyrotropes, gonadotropes, somatotropes et lactotropes) (222). Il incombe donc à la signalisation Fgf un rôle dans la spécification des cellules adénohypophysaires.

Chez le poisson zèbre, *fgf3* est exprimé à la fin de la gastrulation (10 hpf) dans le télencéphale, situé à proximité des cellules de la placode de l'ANR (158, 223). Ensuite, aux environs de 18 hpf, l'expression de *fgf3* dans le télencéphale va s'atténuer et apparaître dans la région ventrale de l'hypothalamus, très proche de la placode adénohypophysaire (158, 223). A 26 hpf, l'expression diencéphalique de *fgf3* est bordée



**Figure I.34: La voie de signalisation Fgf**

Les récepteurs FGF (FGFRs) sont des protéines modulaires comprenant trois domaines immunoglobulines (IgI, IgII et IgIII). IgI et IgII sont séparés par un domaine acide (AD). IgII comprend un domaine de liaison à l'héparine (HBD). Le domaine IgII est suivi par un domaine transmembranaire unique (TM), un domaine juxtamembranaire (JM) et deux domaines kinase (KD) interrompus par un domaine interkinase (IKD). En liaison à un protéoglycan héparine sulfate (HSPG) les ligands FGF se lient aux domaines IgII et IgIII des FGFR. Ceci résulte en la dimérisation de deux FGFRs et en leur transactivation par la phosphorylation de résidus tyrosine spécifiques. Les deux voies de transductions principales impliquent la phospholipase C-g (PLCg) et la kinase Ras/MAP. Le domaine SH2 de la PLCg interagit avec Y766 phosphorylée du récepteur actif. La PLCg activée va hydrolyser le phosphatidyl- inositol-4,5-diphosphate (PIP2) en inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). IP3 va permettre la libération de calcium, tandis que DAG active la protéine kinase C-γ (PKCγ). La PKCγ activée va phosphoryler Raf et ainsi stimuler la voie des MAP kinases indépendamment de Ras. La voie principale de l'activation des MAP kinase, implique l'interaction de FRS2a avec le domaine JM du FGFR. Cette protéine est activée par phosphorylation et va ensuite activer Grb2 liée à Sos, un facteur d'échange nucléotidique impliqué dans l'activation de Ras. Une fois activé, Ras va activer Raf, qui va stimuler MEK, qui va finalement phosphoryler la MAP kinase ERK. Cette dernière va passer dans le noyau et phosphoryler des facteurs de transcription spécifiques de la famille Ets, qui vont activer l'expression de gènes cibles. Tiré de *Thisse, B. and Thisse, C. (2005) Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. Dev. Biol., 287, 390–402.*

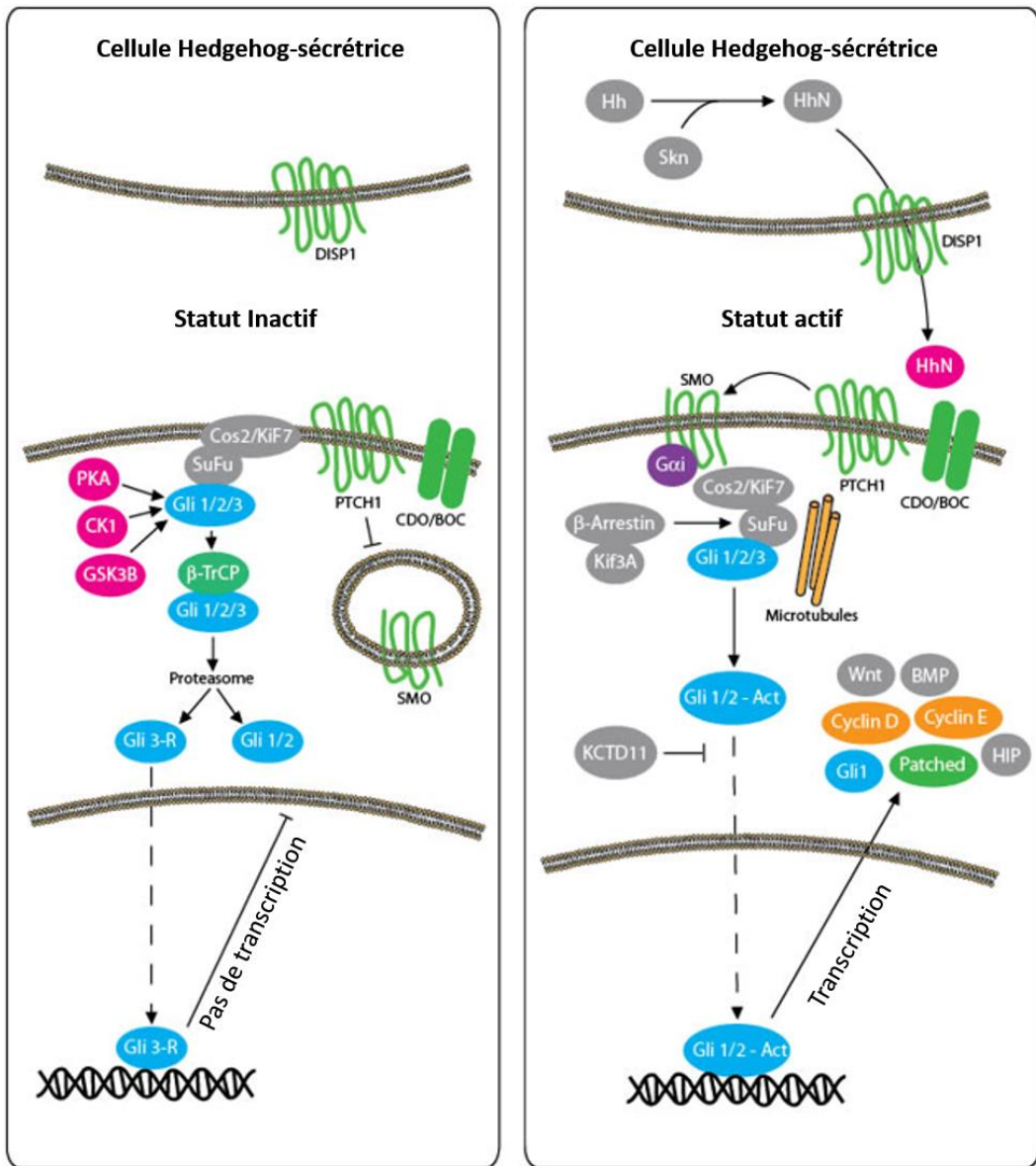
antérieurement par les cellules de l'adénohypophyse qui sont dans la configuration en fer à cheval caractéristique de ce stade (119, 158). Plus tard, l'AH va migrer au sein de l'embryon, positionnant les cellules adénohypophysaires antérieurement par rapport à la région tubérale postéro-ventrale de l'hypothalamus, source du ligand Fgf3. Cette disposition spatiale soumet les lignées endocrines postérieures de l'AH à une signalisation Fgf plus intense que les antérieures.

De manière concordante avec son profil d'expression, la signalisation de Fgf3 est requise lors des premières étapes de la formation de l'AH afin de permettre la spécification et la survie des progéniteurs adénohypophysaires. Plus tard, cette signalisation permettra de promouvoir les lignées endocrines postérieures et sera donc impliquée dans la différenciation antéro-postérieure de l'AH.

Les embryons *lia*, homozygotes pour une mutation inactivatrice de *fgf3*, démontrent une induction normale de la placode adénohypophysaire ainsi que la formation d'un organe de forme et de taille normales comparées aux embryons sauvages (158, 168). Cependant l'absence de signalisation *fgf3* provenant normalement du diencéphale (initiée à 18hpf) empêche l'initiation de l'expression de marqueurs précoces telle que celle des facteurs de transcription *lhx3* et *pou1f1* (survient normalement aux alentours de 19hpf) (158, 168). De plus, en l'absence Fgf3, les précurseurs endocriniens sont incapables de se différencier puisqu' aucune expression hormonale adénohypophysaire ne peut être détectée à aucun stade (158, 168). L'utilisation de fortes doses de l'inhibiteur Fgfr, SU5402, à des stades précoces, a permis de confirmer ces résultats (155). Aux alentours de 25hpf, les précurseurs hypophysaires entrent en apoptose, potentiellement en raison d'un rôle anti-apoptotique joué par la signalisation Fgf3 (158). Il apparaît donc que la signalisation Fgf3 provenant du diencéphale ventro-postérieur est absolument nécessaire pour la spécification des progéniteurs adénohypophysaires. Le rôle de la signalisation Fgf3 télencéphalique lors de l'induction de la placode est quant à elle moins claire (158).

La diminution d'expression de *fgf3* via injection de morpholino ou par utilisation de concentrations faibles de l'inhibiteur SU5402, a permis de prouver qu'en plus de son importance pour la spécification des progéniteurs adénohypophysaire, la signalisation Fgf3 permet d'établir d'un gradient morphogène antéro-postérieur. Un taux élevé de signalisation Fgf3 est nécessaire à la différenciation des lignées endocrines postérieures, principalement des mélanotropes, mais aussi dans une moindre mesure des somatotropes (155, 224). Ces expériences ont également permis de montrer que la signalisation Fgf induit l'expression de facteurs de transcription dans l'AH tel que *pax7* qui permet de définir la *pars intermedia* et s'oppose à *nkx2.2a* qui est induit par la signalisation Hh dans la *pars distalis* (155).





**Figure I.35: Voie de signalisation Hh**

Avant de pouvoir être excrétées et jouer leur rôle de ligand, les protéines Hedgehog doivent subir une série d'étapes post-traductionnelles qui consistent en un clivage protéolytique suivi de deux modifications lipidiques. L'excrétion du ligand mature requiert la protéine transmembranaire Disp (**D**ispached) et la protéine sécrétée Scube2 (**S**ignal peptide, **C**UB domain, **E**GF-like 2). Les protéines Hh sont liées par le récepteur transmembranaire Ptc (**P**atched) 1 ou 2, liaison facilitée par des co-récepteurs tels que Cdon (**C**ell-**a**dhesion-**m**olecule-related), Boc (**B**ioregional **C**don-binding protein) et Gas1 (**G**rowth **a**rrest **s**pecific 1), et inhibée par la protéine Hhip qui entre en compétition avec Patched pour la liaison du ligand. La liaison de Hh à Patched va permettre de lever la répression qu'exerce Patched sur la protéine transmembranaire Smo (Smoothened) et ainsi déclencher la cascade signalétique menant à la modulation transcriptionnelle des gènes cibles de Hh. Chez les vertébrés, l'expression des gènes cibles de la voie Hh est modulée par les trois facteurs de transcription de la famille des Gli. En l'absence de signalisation Hh, Gli2 et Gli3 subissent une protéolyse partielle les transformant en des répresseurs transcriptionnels. La signalisation Hh va inhiber la production de ces formes répressives, mais aussi induire la formation de formes activatrices de la transcription. Contrairement à Gli2 et 3, Gli1 ne fonctionne que sous forme activatrice. Un régulateur clé de la signalisation Hh intracellulaire en aval de Smo est la protéine Sufu (Suppressor of Fused), qui est associée aux microtubules. Grâce à la kinésine Kif7 (Kinesin family member 7), Sufu contrôle le taux protéique, l'activité et la distribution des facteurs de transcription Gli. Tiré de <https://www.novusbio.com/hedgehogpathway.html>



Plusieurs indices laissent à penser que la signalisation Fgf3 pourrait induire une partie de ses effets via le contrôle de l'expression du facteur de transcription *ascl1a*. Les défauts de spécification et l'apoptose des progéniteurs rappellent le phénotype des mutants *pia* déficient en *ascl1a* (158, 172). L'expression de *fgf3* dans les mutant *ascl1a*, est inchangée comparée aux contrôles, alors que les mutants *fgf3* présentent une diminution de l'expression de *ascl1a* au niveau de l'hypophyse. De plus, l'implantation dans le diencéphale de billes recouvertes de ligand Fgf3 à 18 hpf, permet de restaurer l'expression de *ascl1a* dans les mutants *pia* tandis que l'expression de *pou1f1* reste indétectable (172).

### ***Hedgehog (Hh)***

La voie de communication cellulaire Hedgehog (Hh) est particulièrement impliquée dans les processus de prolifération et différenciation cellulaire ainsi que dans la spécification tissulaire. Découverte chez la drosophile pour son rôle essentiel sur la segmentation et la structuration des ailes, la voie Hedgehog est, chez les vertébrés, essentielle pour l'établissement de l'asymétrie gauche-droite, pour la formation de presque tous les organes dont le système nerveux, les muscles, le squelette, les membres, la peau, les poumons, les glandes endocrines, les intestins et les yeux, ainsi que pour la régénération tissulaire (225). Alors que la drosophile possède 1 gène hedgehog (*hh*), l'humain en compte 3 (Sonic hedgehog (*Shh*), Desert hedgehog (*Dhh*) et Indian hedgehog (*Ihh*)) et le poisson zèbre 5 (*shha*, *shhb*, *dhh*, *ihha* et *ihhb*) (226). Lorsque la voie Hh est inactive, c'est-à-dire en l'absence de ligands, le récepteur Patched (Ptch) inhibe la protéine transmembranaire Smoothed (Smo), certaines protéines Gli subissent une protéolyse partielle les transformant en des répresseurs transcriptionnels [Figure I.35]. Lorsque des ligands Hh sont liés par le récepteur Ptch, la répression de Smo est levée, ce qui empêche la protéolyse des Gli, qui jouent dès lors le rôle d'activateurs transcriptionnels. La liaison récepteur-ligand est facilitée par des co-récepteurs et inhibée par Hhip qui entre en compétition avec Patched pour la liaison du ligand (225).

Chez l'homme, une perte d'activité de la voie Hedgehog est la cause de différentes anomalies à la naissance tels que l'holoprosencéphalie (HPE), la polydactylie, des défauts cranio-faciaux et des malformations squelettiques tandis qu'une activation inappropriée de la voie est souvent constatée dans certains cancers tels que les carcinomes des cellules basales, les médulloblastomes et les rhabdomyosarcomes (227, 228). L'holoprosencéphalie s'accompagne dans les cas les plus graves d'une cyclopie et d'une absence totale de la glande hypophysaire. Cette absence glandulaire mène évidemment à des privations hormonales, telles que celle de l'adrénocorticotrophine



et de l'hormone de croissance qui résultent respectivement en une hypoplasie adrénale et à des individus de petite taille (229, 230).

Chez la souris, outre son implication dans le développement de l'infundibulum qui se répercute sur le positionnement et le développement de l'AH, la voie Hh a un effet direct sur le tissu adénohypophysaire (231, 232). Les embryons de souris sur-exprimant l'antagoniste de Shh, Hhip, dans la poche de Rathke ou l'ectoderme oral montrent une hypoplasie sévère de l'hypophyse, et présentent une perte des lignées endocrines ventrales (se différenciant tardivement) tandis que la spécification des lignées dorsales (se différenciant plus précocement) est maintenue. A contrario, lorsque Shh est exprimé de manière ectopique dans la poche de Rathke, on observe une hyperplasie de l'AH présentant une expansion des types cellulaires ventraux (233). Ces données adjointes à celles des expériences de perte de fonction des Gli, ont permis de prouver que la signalisation de Shh est impliquée dans le caractère prolifératif des cellules adénohypophysaires (233, 234). De plus, cette réponse différente entre les lignées dorsales et ventrales suggère une implication de Shh dans les événements dirigeant la spécification des lignées adénohypophysaires.

Chez le poisson zèbre, la signalisation Hedgehog est requise dans un premier temps pour l'induction de la placode hypophysaire, ensuite elle est impliquée avec la signalisation Fgf3 dans l'établissement d'un gradient morphogène permettant la spécification des cellules endocrines de l'AH le long de l'axe antéro-postérieur. Cette spécification différentielle des précurseurs adénohypophysaires en fonction du niveau de signalisation Hh est interprétée et modulée grâce aux facteurs de transcription Gli. De plus, il est envisageable qu'elle ait une implication dans la prolifération cellulaire comme il a été décrit chez son homologue murin.

Les mutations inactivant sévèrement la voie Hedgehog, telles que celles au niveau des gènes encodant la protéine transmembranaire Smoothened, du facteur de transcription Gli2 ou du modulateur Dzip, induisent une absence complète de l'adénohypophyse, la formation d'un cristallin ectopique en lieu et place de l'AH ainsi qu'une augmentation de la taille de la placode olfactive (150, 152, 153). Cette observation suggère une trans-différenciation des cellules des placodes (153, 235). Un phénotype similaire peut être observé par inhibition chimique de la voie Hedgehog via l'utilisation de cyclopamine, un inhibiteur spécifique de la protéine transmembranaire Smoothened. En effet, l'inhibition de la voie Hh entre 10 et 15 hpf bloque la formation de l'AH. Par contre, une inhibition plus tardive induit des problèmes de spécification des cellules endocrines ; ce qui nous révèle l'existence d'une fonction supplémentaire de la voie Hh dans la différenciation endocrine (153, 215). A l'inverse, la surexpression de *shha* mène à une augmentation du nombre de



cellules adénohypophysaires, bloque la formation des cristallins et induit l'expression de gènes hypophysaires dans les précurseurs du cristallin (150, 152).

La comparaison du mutant *syu*, déficient en la protéine *Shha*, avec les effets précoces de la cyclopamine ou avec les autres mutants de la voie Hh précités, suggère qu'un ligand autre que *Shha*, entre en jeu (153). En effet, contrairement à ces derniers, le mutant *syu* présente généralement quelques cellules endocrines différenciées et ne forme pas de cristallin ectopique (153). Les profils d'expression obtenus pointent *Shhb* comme le ligand candidat le plus probable (153). Cependant, étant donné la gravité du phénotype observé chez les mutants *syu*, il apparaît que le ligand Hh majeur pour la formation de l'AH soit *Shha*, tandis que *Shhb* serait cantonné à un rôle mineur, voir redondant.

Le profil d'expression de gènes tels que *ptch1* ou *nkx2.2a*, des gènes cibles de la signalisation Hh, permet de rendre compte de l'intégration des signaux Hedgehog par les cellules hypophysaires. Ainsi, il a été démontré que les cellules de la pré-placode hypophysaire répondent à la signalisation Hh dès 16 hpf, soit 1 à 2h avant l'expression du premier marqueur adénohypophysaire, *lhx3* (153). *shha* et son paralogue *shhb* sont exprimés dans le cerveau dès 16 hpf, avant de s'étendre dans d'autres parties du cerveau, dont l'hypothalamus, à partir de 18 hpf (152, 153). Il apparaît donc que la source de ligands Hh auxquels répondent les cellules de la pré-placode hypophysaire est le diencéphale, probablement l'hypothalamus étant donné sa proximité. Ce n'est qu'ensuite, entre 30 et 36 hpf, que les gènes *shh* commencent à être exprimés dans l'ectoderme oral et dans l'intestin antérieur (152, 153). A 45 hpf, lorsqu'elle a atteint sa position finale, l'AH est soumise aux signaux Hh provenant ventralement de la cavité orale et de l'intestin antérieur et dorsalement de l'hypothalamus. L'hypothalamus étant la source de ligands Hh la plus proche de l'AH, il apparaît que les cellules situées dans la partie antéro-dorsale de l'AH sont exposées aux plus fortes concentrations de ligand *Shh* à partir de 30hpf (153).

Les signalisations en gradient de Hh et Fgf permettent indépendamment mais de manière complémentaire l'une de l'autre, d'établir les deux sous-domaines de l'AH (155). La formation de la *pars distalis* et la différenciation des lignées endocrines antérieures requièrent un taux élevé du signal Hh et un niveau faible de signalisation Fgf, tandis que la formation de la *pars intermedia* ainsi que la différenciation des lignées endocrines postérieures requièrent un faible taux de signalisation Hh et un niveau élevé de signalisation Fgf (155). Les somatotropes sont la seule lignée endocrine à être sensible à des changements de niveau des deux voies de signalisation Hh et Fgf ; ceci pourrait s'expliquer par leur position médiane dans l'AH (155). Il est probable que les signalisations en gradient de Hh et Fgf influencent la structuration de l'AH via une

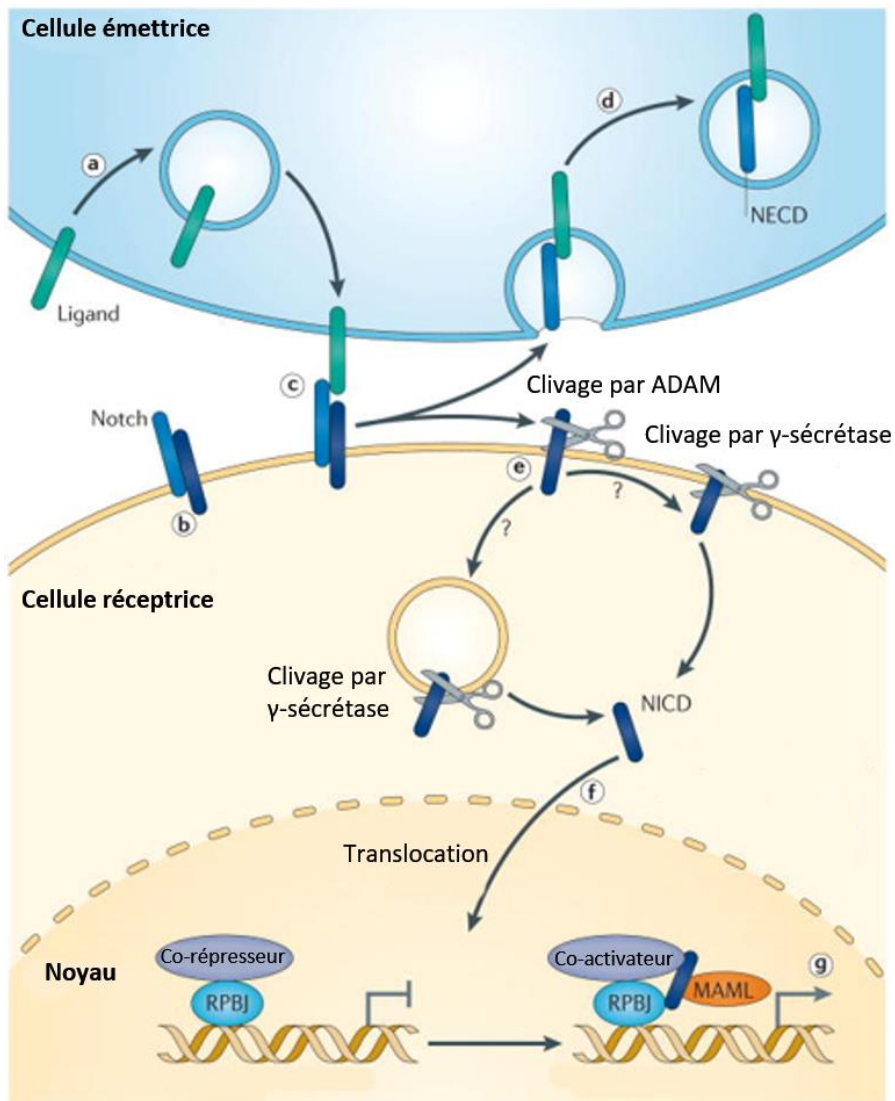


régulation de nombreux facteurs de transcription spécifiques influant sur la différenciation des précurseurs, mais aussi via une régulation de la prolifération et de la survie des précurseurs endocrines (155).

L'adénohypophyse exprime de nombreux facteurs de transcription en réponse à la signalisation Hedgehog : *pax6a* est exprimé dans toute l'AH, *nkx2.2a* est exprimé dans la partie antérieure et de manière complémentaire *pax7* est exprimé dans la partie postérieure (155). L'expression des facteurs de transcription *nkx2.2a* et *pax7* rend compte des différents niveaux de signalisation Hh, ainsi un niveau élevé de signalisation Hh est requis pour l'activation de l'expression de *nkx2.2a* et la répression de *pax7* dans la *pars distalis* (155). Une preuve supplémentaire que la signalisation Shh promeut les destinées antérieures dans l'AH est fournie par l'expérience consistant à insérer des micro-billes recouvertes de ligand Shh à proximité de la région postérieure de l'AH en formation (155). Cette source postérieure de Hh mène à l'expression ectopique de *nkx2.2a* dans la *pars intermedia*.

Les cellules qui répondent aux signaux Hh modulent leur réponse via l'expression de différents facteurs de transcription à doigts de zinc de la famille des Gli (236). Les vertébrés comptent généralement 3 gènes Gli, le poisson zèbre est une exception puisqu'il en compte 4 ; le gène *gli2* possède une version a et une b (215). En fonction du niveau de signalisation Hh perçu par la cellule, l'induction de différentes protéines Gli induit différentes réponses cellulaires allant de la prolifération à la survie cellulaire en passant par l'expression de facteurs de transcription définis (237, 238). Au niveau de l'AH, *gli1*, *gli2a*, *gli2b* mais pas *gli3*, sont responsables des réponses différentielles des cellules adénohypophysaires en fonction du taux de signalisation Hh perçu (215). A partir de 30hpf, *gli1*, *gli2a* et *gli2b* ont des domaines d'expression distincts et complémentaires au sein de l'AH, *gli1* étant exprimé dans la partie antérieure et les *gli2* dans la partie postérieure (215). Gli1 semble jouer le rôle d'activateur des destinées endocrines antérieures, tandis que Gli2a et Gli2b participeraient à la répression des lignées postérieures; mettant une fois de plus le caractère antériorisant de la signalisation Hh en évidence (215).

En résumé, en plus de son rôle primordial dans l'induction de la placode adénohypophysaire, il apparaît que la signalisation Hh agit en tant que morphogène afin de guider la différenciation le long de l'axe antéro-postérieur au sein de l'AH (153, 215). De plus, elle pourrait agir en tant que mitogène, agissant sur la prolifération cellulaire, comme c'est le cas lors de la neurogenèse (153, 239).



### Figure I.36: Voie de signalisation Notch

Modèle de la signalisation Notch canonique. La voie de signalisation Notch est une signalisation paracrine, faisant intervenir une cellule « émettrice » qui présente le ligand de Notch (le « signal ») à une cellule « réceptrice » qui exprime le récepteur Notch. (a) Les ligands de Notch (en vert), tels que les protéines Delta ou Jagged, sont des protéines transmembranaires présentes à la surface de cellules. Lorsqu'ils sont inactifs, ces ligands peuvent être endocytés pour être réactivés plus tard par un mécanisme encore incertain. (b) Le récepteur Notch est synthétisé en tant qu'une protéine unique, puis clivé dans l'appareil de Golgi (non représenté) pour former un hétérodimère à la surface de la cellule. L'hétérodimère Notch est constitué d'une partie extracellulaire (NECD) et d'une partie intracellulaire (NICD) (c) Interaction entre le ligand d'une cellule « émettrice » et le récepteur Notch d'une cellule « réceptrice ». (d) Suite à cette interaction les deux parties du récepteur Notch vont être séparées: le NECD va être endocyté par la cellule « émettrice ». (e) La partie du récepteur restante sur la cellule réceptrice va être clivée par une protéine ADAM (*disintegrin and metalloproteinase domain-containing*), puis par une  $\gamma$ -sécrétase. La localisation précise du clivage par la  $\gamma$ -sécrétase est controversé et peut intervenir soit au niveau de la membrane plasmique soit dans une vésicule d'endocytose. (f) Une fois clivé le NICD va migrer dans le noyau. (g) Dans le noyau, le NICD va permettre de déplacer le complexe de répression lié RBPJ (*recombining binding protein suppressor of hairless*) (= CBF1), et former un complexe avec lui, complexe stabilisé par la protéine MAML (*Mastermind-like protein*). Le NICD recrute également des co-activateurs afin d'initier la transcription des gènes cibles de Notch. Adapté de Ablaes, J.-L., Breunig, J. J., Eisch, A. J. and Rakic, P. (2011) *Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain*. *Nat. Rev. Neurosci.*, 12, 269–83.



## **Notch**

La voie de signalisation Notch est une voie de communication cellulaire de courte portée, nécessitant l'interaction du récepteur Notch situé à la surface d'une cellule avec le ligand membranaire situé sur une cellule voisine (données revues dans (240)). Lorsque le récepteur Notch d'une cellule est activé par la liaison d'un ligand Delta ou Jagged sur une cellule voisine, il induit le clivage du domaine intracellulaire de Notch (NICD) [Figure I.36]. Ce dernier peut alors passer dans le noyau et s'associer avec le facteur de transcription Cbfl/Rbp-jk et ainsi activer l'expression de gènes cibles tels que les facteurs bHLH HES (Her chez le poisson zèbre). En l'absence du NICD dans le noyau, le facteur de transcription CBF1/RBP-jk agit comme répresseur via des co-facteurs tels que N-COR. L'activation de la voie Notch dans une cellule réduit la production de ligand dans cette dernière, ce qui l'empêche d'induire l'activation de Notch dans les cellules voisines. La voie Notch est connue pour présenter trois modes d'actions majeurs au cours du développement embryonnaire: l'inhibition latérale, la formation de frontière et l'attribution de destinées cellulaires (241). Chez l'homme, des dérégulations de la voie Notch induisent des maladies dégénératives et sont souvent associées avec des cancers. Chez la souris, des études de perte de fonction de membres de la voie ou de gènes cibles *Hes* ont démontré que la voie Notch est nécessaire pour maintenir les progéniteurs dans un état indifférencié et leur permettre de proliférer. De plus, la voie Notch semble être impliquée dans l'activation de l'expression de *Prop1* et donc à la différenciation des lignées dépendante de *Pou1f1* (données revues dans (114)).

Chez le poisson zèbre, l'induction ainsi que le développement de la placode adénohypophysaire sont indépendants de la signalisation Notch (242). Par contre, la signalisation Notch est requise pour la spécification des lignées endocrines via la régulation, probablement par inhibition latérale, du nombre relatif des différents types cellulaires hormonaux au sein de chacun des trois domaines de l'adénohypophyse (aPD, pPD et PI) (242). La signalisation de courte portée Notch semble donc spécifier le destin cellulaire dans des populations de précurseurs endocrines soumis aux mêmes taux de signalisation longue portée tels que Hedgehog et Fgf (242).

La perte de signalisation Notch peut être étudiée grâce à l'utilisation des mutants *mind bomb* (*mib*), incapables d'ubiquitiner et d'internaliser Delta, ou via l'utilisation d'inhibiteurs chimiques tels que le DAPT, inhibant l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase et donc le clivage du domaine intracellulaire de Notch (NICD) (243, 244). Au niveau de l'AH, la perte de signalisation Notch induit une augmentation du nombre de lactotropes au détriment de corticotropes dans la partie antérieure de la *pars distalis*, une augmentation de thyrotropes et une perte des somatotropes dans la partie postérieure



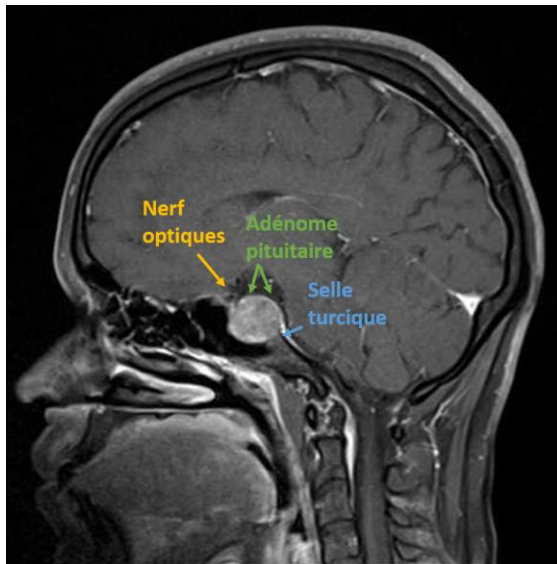
de la *pars distalis* ainsi qu'une diminution du nombre de mélanotropes dans la *pars intermedia* (242, 245). A l'inverse, la sur-activation de la signalisation Notch mène à l'effet opposé, à savoir une diminution du nombre de lactotropes et de thyrotropes, ainsi qu'à une augmentation des corticotropes, gonadotropes et mélanotropes (242). Remarquons que la modification de la signalisation Notch n'influe pas sur l'expression des marqueurs *lhx3* ou *pitx3* ce qui indique que la signalisation Notch n'est pas impliquée dans l'initiation de la placode pituitaire ni dans la régulation du nombre de cellules adénohypophysaires (242). De plus, l'inactivation de la voie Notch ne semble pas affecter l'expression des facteurs de transcription *pou1f1*, *eya1*, *six1b* ou *sox4b* responsables de la différenciation endocrine de l'AH (245).

L'inhibition chimique de la signalisation Notch à différents stades du développement a permis de déterminer qu'elle est absolument nécessaire entre 12 et 16 hpf (242). En dehors de cette fenêtre temporelle, l'influence de Notch est moins claire, mais semble être requise au moins jusqu'à 48 hpf pour une spécification endocrine correcte (242, 245).

Dès 19 hpf, les cellules adénohypophysaires expriment de nombreux ligands (*dla*, *dlb* et *dld*) et récepteurs (*notch1a*, *notch1b* et *notch5*) de la voie Notch. A partir de 36 hpf, l'expression des gènes delta et notch diminue graduellement pour s'éteindre aux alentours de 48 hpf. A ce jour, deux gènes cibles de la voie Notch *her4.1* et *hey1* (homologues des gènes *Hes5* et *Hey1* de la souris) furent détectés dans l'AH dès 19 hpf. L'inhibition de l'expression de ces gènes ne permettant de retrouver que partiellement le phénotype obtenu lors de l'inactivation de la voie Notch, il est probable que d'autres effecteurs soient responsables de la spécification cellulaire par Notch (245). Il est intrigant de remarquer qu'après 48 hpf, stade après lequel la signalisation Delta-Notch semble être éteinte, les cellules de l'AH continuent à proliférer et l'adénohypophyse croît de manière importante jusqu'au stade adulte. Il est donc suggéré que les précurseurs endocrines ayant été dirigés vers une destinée endocrine par la signalisation Delta-Notch auraient la capacité de proliférer (242).

## **I.6.D Maladies humaines hypophysaires**

Des défauts dans le processus de développement de l'AH ou des dérégulations lors de la maintenance de la glande peuvent mener à un manque de cellules endocrines résultant en un déficit hormonal ou alors mener à une croissance anormale de cellules adénohypophysaires menant à un adénome hypophysaire (données revues dans (117)).



**Figure I.37: Adénome hypophysaire**

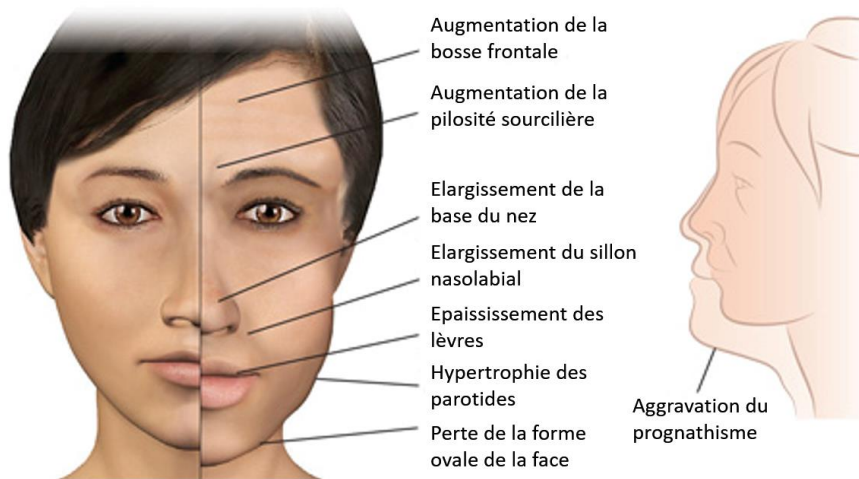
Scan IRM en vue sagittale montrant un macroadénome hypophysaire (prolactinome) chez un humain. L'adénome est indiqué par des flèches vertes, les nerfs optiques par des flèches jaunes et la selle turcique en bleu. Coupe sagittale T1 C+. Tiré de <https://radiopaedia.org/articles/pituitary-macroadenoma-1>

La déficience en hormone hypophysaire peut être d'origine congénitale, environnementale ou traumatique. Elle peut n'affecter qu'une seule hormone, le plus couramment l'hormone de croissance, ou être due à un manque de plusieurs hormones hypophysaires (données revues dans (117, 246)). Lorsqu'il n'est pas léthal, l'hypopituitarisme congénital est souvent associé à des troubles hétérogènes tels que :

- l'holoprosencéphalie (HPE) caractérisée par une séparation incomplète (voire nulle) des hémisphères et ventricules cérébraux
- l'hypoplasie de la fente palatine et/ou une dysplasie septo-optique (SOD) caractérisée par l'hypoplasie des nerfs optiques
- une agénésie septale et des malformations cérébrales de la ligne médiane (données revues dans (117)).

Cette association de troubles n'est pas étonnante si l'on prend en compte la position médiane de l'hypophyse dans la tête, l'interdépendance développementale et fonctionnelle de l'hypophyse avec ses structures voisines (yeux, cerveau, cavité orale, etc...) ainsi que le nombre de facteurs impliqués dans la formation de l'hypophyse qui sont aussi impliqués dans la formation de ces dits tissus. Il est très important de noter qu'une très grande proportion de l'hypopituitarisme congénital est à ce jour d'origine génétique (ou épigénétique) inexpliquée. Ainsi, seuls 5-10% des cas peuvent être reliés à une mutation dans un gène connu pour avoir une incidence dans le développement de l'axe hypothalamo-hypophysaire (données revues dans (117)).

Les adénomes hypophysaires sont généralement des néoplasies d'origine monoclonales et relativement fréquents puisqu'ils touchent 0,8 personne sur 1000 et constituent jusqu'à 15-20% des tumeurs intracrâniennes (données revues dans (247)). Heureusement, ils sont le plus souvent bénins et n'adoptent que rarement un caractère métastatique ; lorsque c'est le cas les chances de survie sont faibles (données revues dans (248)). Le fait que les adénomes hypophysaires ne deviennent que rarement malins est très intéressant. Bien que le mécanisme protecteur ne soit pas encore tout à fait élucidé, il semble que certains facteurs induisant la croissance tumorale soient aussi responsables de l'induction du mécanisme de sénescence dans les cellules tumorales (données revues dans (247)). La sénescence résulte en un blocage de la prolifération cellulaire tout en permettant à la cellule de rester viable et de conserver ses fonctions physiologiques. Les troubles induits par les adénomes hypophysaires sont liés à la surexpression de l'hormone produite par la lignée endocrine incriminée ou à l'augmentation de la taille de la glande induisant sa compression et une pression sur les tissus environnants **[Figure I.37]** (données revues dans (247)). On classe les adénomes pituitaires en fonctionnels et non-fonctionnels, les adénomes fonctionnels sont dans la plupart des cas des néoplasies des corticotropes, des lactotropes, des



### Figure I.38: Acromégalie

Représentation des principales modifications faciales attendues chez un patient atteint d'une acromégalie. Tiré de <https://www.pituitarysociety.org/patient-education/pituitary-disorders/acromegaly/what-is-acromegaly>

somatotropes ou des thyrotropes (données revues dans (248)), tandis que les adénomes non-fonctionnels résultent généralement d'une néoplasie des gonadotropes (249). Parmi les adénomes fonctionnels, citons les prolactinomes résultant de la néoplasie des lactotropes et menant à un taux de prolactine trop élevé ; la maladie de Cushing causée par un excès d'adrénocorticotrophine (ACTH) dû à un adénome corticotropique ; et l'acromégalie induite par une surexpression de l'hormone de croissance due à la néoplasie des somatotropes [**Figure I.38**] (250–252).





# Objectifs

*« However beautiful the strategy, you should occasionally  
look at the results. »*

**Sir Winston Churchill**



## Objectifs

La voie Nonsense-mediated decay (NMD) est loin d'être un simple mécanisme de contrôle de qualité traductionnel. Le nombre important de transcrits physiologiques dont elle régule l'abondance suggère une implication beaucoup plus vaste, notamment au cours de la croissance embryonnaire. Etant donné la létalité chez les mammifères et la distance évolutive des invertébrés, peu d'études ont eu l'occasion d'adresser l'importance développementale du NMD chez les vertébrés de manière globale. Le poisson zèbre est un modèle de choix pour une telle étude, puisqu'il est un vertébré bien connu chez lequel il existe un nombre important de méthodes d'inactivation génétique différentes. Ainsi, ce travail a comme objet l'étude de l'impact de l'inactivation de la voie NMD sur la formation de l'adénohypophyse au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre. Nous avons choisi d'étudier le rôle du NMD sur l'adénohypophyse (AH) pour trois raisons : la bonne connaissance de son développement, sa simplicité et son importance. Premièrement, le développement de l'AH est un processus relativement bien connu et la fonction des acteurs majeurs est bien décrite. Le développement d'une AH fonctionnelle est dépendant de 3 voies de signalisation et de 5 facteurs de transcription majeurs, de plus l'AH est une petite glande comprenant un nombre restreint de cellules, ce qui en fait un organe relativement simple d'étude. Simple, mais non moins importante, produisant 8 hormones différentes, l'adénohypophyse est le régulateur de nombreux processus physiologiques et est la cause de nombreuses maladies chez l'homme.

Pour réaliser cette étude, nous avons choisi d'inactiver la voie NMD au moyen de 2 morpholinos différents ciblant les ARNm codants pour *Dhx34*, un acteur majeur de la voie. Les morpholinos permettent d'induire une diminution d'expression des gènes ciblés, nous permettant ainsi de réduire l'activité de la voie NMD sans l'abolir. Afin de valider que les effets obtenus via le « *knock-down* » de *dhx34* sont dus à l'inactivation du NMD et non à une activité particulière de *Dhx34*, nous avons choisi d'inactiver un autre acteur de la voie NMD, *Nbas*, au moyen d'un morpholino spécifique. Finalement afin de confirmer que les résultats obtenus avec ces morpholinos ne sont pas dus à un effet aspécifique, nous avons généré une lignée mutante déficiente en *Dhx34*.

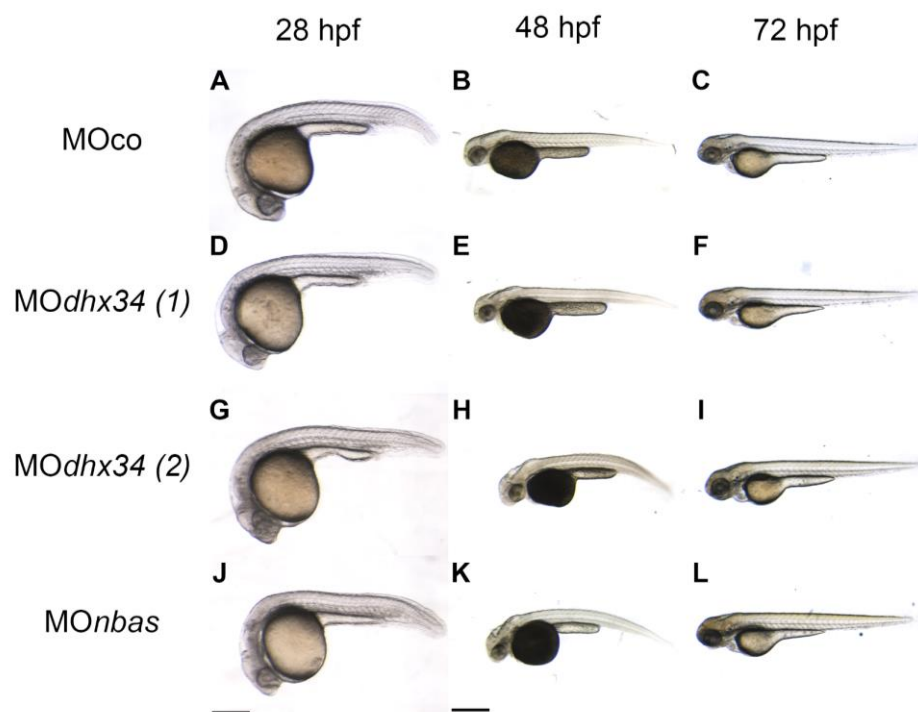
Notre but premier est donc d'étudier le développement embryonnaire de l'AH lorsque la voie NMD est inactivée. Pour ce faire, nous avons, dans un premier temps, analysé la différenciation et l'expression hormonale des différentes lignées endocrines de la glande en formation. Ensuite nous avons réalisé une étude des facteurs de transcription et des voies de signalisation impliqués dans le développement de l'adénohypophyse. Au cours de cette étude, nous avons analysé l'expression des gènes d'intérêt de manière qualitative grâce à la technique d'hybridation *in situ* et à l'utilisation de lignées transgéniques et de manière quantitative par RT-qPCR.



## II. Résultats

*“L'expérience est une observation provoquée  
dans le but de faire naître une idée.”*

**Bernard Claude**



**Figure II.1: Morphologie générale**

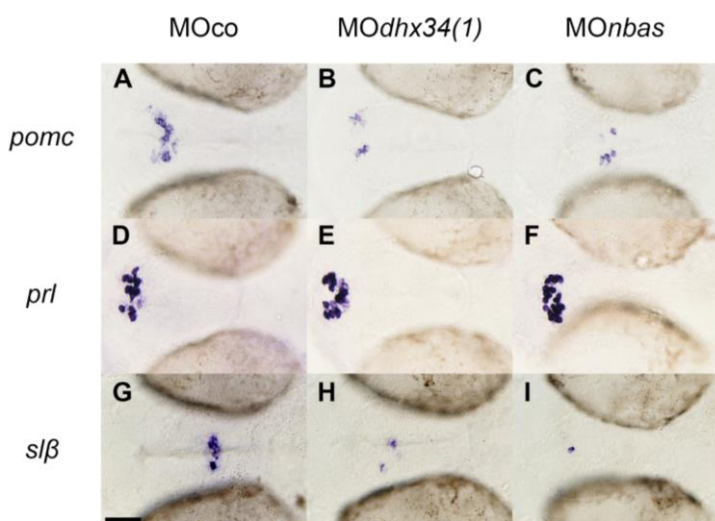
Morphologie générale des embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A-C), 4 ng de *MOdhx34(1)* (D-F), 3,5 ng de *MOdhx34(2)* (G-I) ou 2 ng de *MONbas* (C, F et I). Embryons à 28 hpf (A, D, G et J), 48 hpf (B, E, H et K) et 72 hpf (C, F, I et L). Les embryons sont présentés en position latérale, partie rostrale orientée à gauche.

(A, D, G et J) Barre d'échelle située en J = 500  $\mu$ m. (B, C, E, F, H, I, K et L) Barre d'échelle située en K = 200  $\mu$ m

	Mortalité < 24 hpf	Mortalité > 24 hpf	Survivants 72 hpf	Mortalité %
NI	184	0	1902	8,82
MOco	224	6	3155	6,79
<i>MOdhx34(1)</i>	189	6	3003	6,10
<i>MOdhx34(2)</i>	144	4	1458	9,23
<i>MONbas</i>	115	1	1504	7,16

**Table II.1: Mortalité des embryons**

Le nombre d'embryons morts avant et après 24hpf a été compté et mis en relation avec le nombre d'embryons survivants à 72 hpf afin de calculer la mortalité de chaque condition exprimée en pourcentage. **NI**: embryons non injectés; ***MOdhx34(1)***: embryons injectés avec 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34*; ***MONbas***: embryons injectés avec 2 ng de morpholino ciblant *nbas*.



**Figure II.2: Expression hormonale à 28 hpf (ISHa)**

Expression hormonale de l'adénohypophyse à 28 hpf révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNm de la *pro-opiomélanocortine a* (A-C), de la *prolactine* (D-F) et de la *somatolactine  $\beta$*  (G-I). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A, D et G), 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (B, E et H) ou 2 ng de morpholino ciblant *nbas* (C, F et I). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche.

Barre d'échelle = 50  $\mu$ m

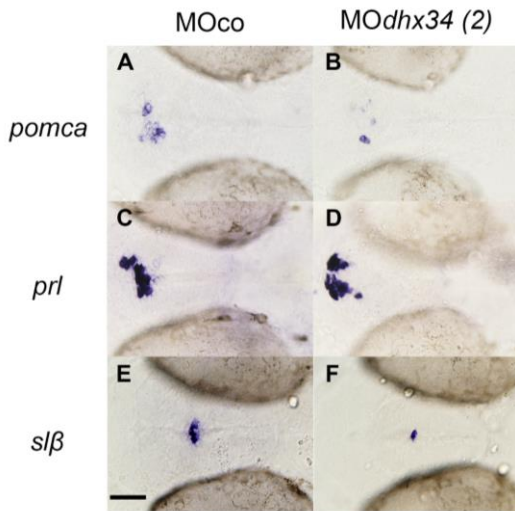
## II.1 Morphologie générale

Afin d'entamer notre étude, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux effets morphologiques généraux qu'engendre l'injection d'une quantité modérée de morpholino ciblant *dhx34* (1 et 2) ou *nbas*. Ainsi l'injection de 4 ng de morpholino *dhx34(1)*, 3,5 ng de morpholino *dhx34(2)* ou 2 ng de morpholino *nbas* mène, comparativement aux embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle, à une réduction de la taille de la tête et des yeux à 28 hpf [Figure II.1]. A 48 hpf, ces défauts sont couramment adjoints d'une courbure de la queue suggérant des défauts au niveau des somites ou de la notochorde. A 72 hpf, les embryons injectés avec le MO*dhx34(1)*, le MO*dhx34(2)* ou le MO*nbas* sont difficilement distinguables des embryons injectés avec le morpholino contrôle. Nous avons également constaté que l'injection des morpholinos ne mène pas à une augmentation significative du pourcentage de mortalité, jusqu'à au moins 72 hpf, par rapport aux embryons injectés avec le morpholino contrôle ou par rapport aux embryons non injectés [Table II.1]. Les défauts morphologiques que nous constatons ici ressemblent à ceux décrits dans une étude précédente, mais sont cependant nettement moins sévères (111). De plus, Anastasaki et al. constatent une mortalité embryonnaire bien plus élevée (20% à 24 hpf) que nous. Ces différences sont certainement dues à la quantité très supérieure (8 ng) de morpholino utilisée dans l'étude publiée.

## II.2 Effets sur l'adénohypophyse

### II.2.A Expression hormonale

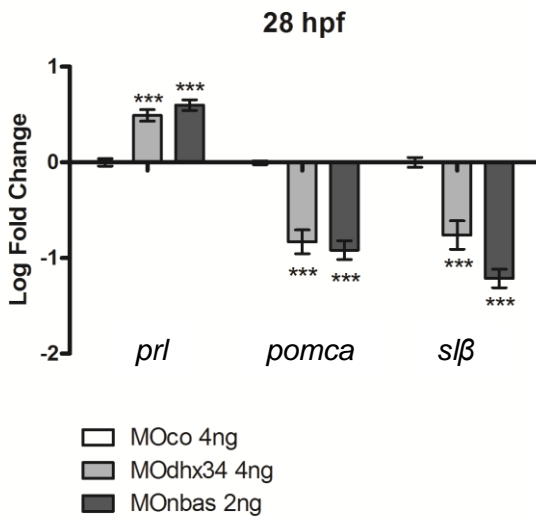
La placode hypophysaire, renfermant les progéniteurs des futures lignées endocrines, est détectable à partir de 18 hpf grâce à l'expression du marqueur *lhx3*. Les premières cellules endocrines matures à se différencier, caractérisées par leur expression hormonale, sont les lactotropes, les somatolactotropes, les corticotropes et les mélanotropes (119). Cette différenciation s'effectue entre 22 et 24 hpf, ainsi en se plaçant à 28 hpf on peut évaluer la différenciation précoce de ces différentes lignées endocrines. Au cours de son développement, l'AH va subir une internalisation dirigée par la formation de la cavité orale pour atteindre sa position finale aux alentours de 60 hpf (144). Pendant cette internalisation, les cellules adénohypophysaires, organisées principalement sous forme de placode, s'organisent sous forme d'un fer à cheval aux alentours de 24 hpf, avant de prendre leur conformation ovoïde finale dès 40 hpf. Nous avons comparé l'expression des différents gènes hormonaux dans des embryons



**Figure II.3: Expression hormonale à 28 hpf (ISHb)**

Expression hormonale de l'adénohypophyse à 28 hpf révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNms de la *pro-opiomélanocortine a* (A et B), de la *prolactine* (C et D) et de la *somatolactine β* (E et F). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A, C et E) ou 3,5 ng de morpholino (2) ciblant *dhx34* (B, D et F). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche.

Barre d'échelle= 50 μm



**Figure II.4: Expression hormonale à 28 hpf (qPCR)**

Expression hormonale de l'adénohypophyse à 28 hpf analysée par RT-qPCR et permettant de quantifier les ARNms de la *pro-opiomélanocortine a*, de la *prolactine* et de la *somatolactine β*. Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle, 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* ou 2 ng de morpholino ciblant *nbas*. Cette quantification fut réalisée en triplicat sur 3 injections différentes. Les résultats ont été normalisés grâce au gène *rpl13a*

\*\*\*= P<0,001

28 hpf	Condition	Dim. (%)	Nor. (%)	Aug. (%)
<i>pomca</i>	MOdhx34 (1)	84	16	0
	MOnbas	96	4	0
	MOdhx34 (2)	100	0	0
<i>prl</i>	MOdhx34 (1)	0	54	46
	MOnbas	16	50	34
	MOdhx34 (2)	0	60	40
<i>slβ</i>	MOdhx34 (1)	92	8	0
	MOnbas	98	2	0
	MOdhx34 (2)	100	0	0

**Table II.2: Comptage des classes phénotypiques hormonales à 28 hpf**

Pourcentage d'embryons présentant une expression des gènes *pomca*, *prl* ou *slβ* diminuée, normale ou augmentée par rapport aux embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle. **MOdhx34 (1)**: embryons injectés avec 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34*; **MOnbas**: embryons injectés avec 2 ng de morpholino ciblant *nbas*, **MOdhx34 (2)**: embryons injectés avec 3,5 ng de morpholino (2) ciblant *dhx34*. Pour chaque condition 50 embryons ont été considérés. Dim.: diminution; Nor.: normal; Aug.: augmentation.



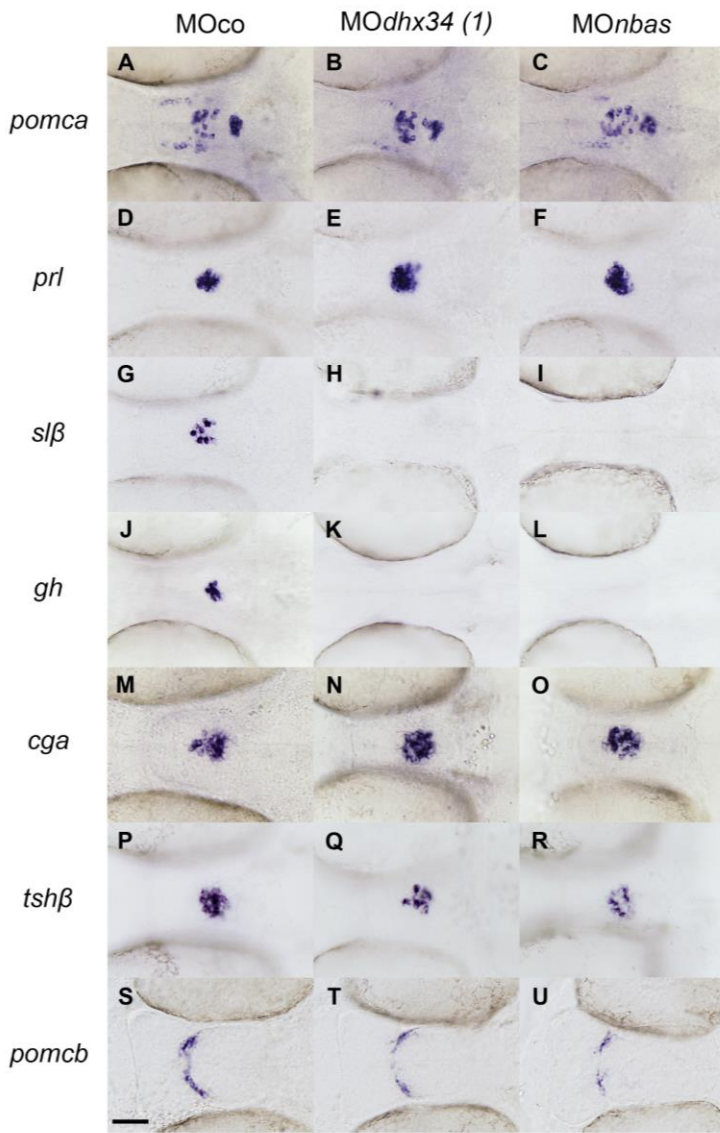
## Résultats

contrôles avec celle d'embryons injectés avec les MO*dhx34*(1), MO*nbas* ou MO*dhx34*(2) par hybridation *in situ*. Sur base de ces résultats, les larves ont été réparties entre expression faible, normale ou plus élevée. Finalement, le niveau d'expression de chaque ARNm a été déterminé par RT-qPCR.

Lorsque l'on injecte 4 ng de MO*dhx34*(1), 2 ng de MO*nbas* ou même 3,5 ng du MO*dhx34*(2), nous constatons dès 28 hpf une perturbation de la différenciation des lignées endocrines de l'AH [Figures II.2, 3 et 4]. A ce stade, le gène de la *pro-opiomélanocortine a* (*pomca*) est exprimé dans la partie antérieure de la placode hypophysaire [Figure II.2 A ; Figure II.3 A]. Nous observons une nette diminution, aussi bien dans les morphants *dhx34* que *nbas*, de l'expression de *pomca* à 28hpf [Figure II.2 B et C ; Figure II.3 B ; Table II.2]. Seules quelques cellules en positions plus latérales maintiennent cette expression. Le gène *pomca* code pour le précurseur de l'Acth et de la Msh synthétisées respectivement par les corticotropes et les mélanotropes ; cependant en l'absence d'un marqueur discriminant, il ne nous est pas possible de distinguer entre ces deux populations. Il fut cependant postulé que les corticotropes occupent une position centrale dans la placode tandis que les mélanotropes seraient localisés latéralement (224). Etant donné que les quelques cellules restantes dans les morphants semblent être restreintes à deux domaines latéraux distincts, il n'est pas impossible que ces cellules soient des mélanotropes. Ceci impliquerait donc que les corticotropes seraient plus sensibles à l'inactivation des gènes *dhx34* ou *nbas*. Cette diminution d'expression de *pomca* fut confirmée grâce aux expériences de RT-qPCR, qui permettent d'évaluer la diminution à environ 40% par rapport aux contrôles [Figure II.4].

Les lactotropes, marqués par l'expression de la prolactine (*prl*), sont comme les corticotropes localisés dans la partie médiane de la placode [Figure II.2 D ; Figure II.3 C]. L'injection des morpholinos ne mène pas à un changement drastique de l'expression de *prl*, notons toutefois qu'environ 40% des embryons injectés présentent un nombre de lactotropes légèrement plus élevé que les contrôles [Figure II.2 E et F ; Figure II.3 D ; Table II.2]. Ceci se traduit en RT-qPCR par une augmentation de l'expression totale du gène de la prolactine [Figure II.4].

Le troisième type de cellules endocrines présent à ce stade sont les somatolactotropes, situées medio-postérieurement au sein de la placode. Le nombre de ces cellules est sensiblement diminué lors du « knock-down » des gènes *dhx34* ou *nbas* [Figure II.2 H et I ; Figure II.3 F ; Table II.2] et les morphants présentent une expression du gène codant pour la somatolactine  $\beta$  (*sl $\beta$* ) de moitié moins importante que celle des embryons contrôles [Figure II.4].



**Figure II.6: Expression hormonale à 48 hpf (ISHb)**

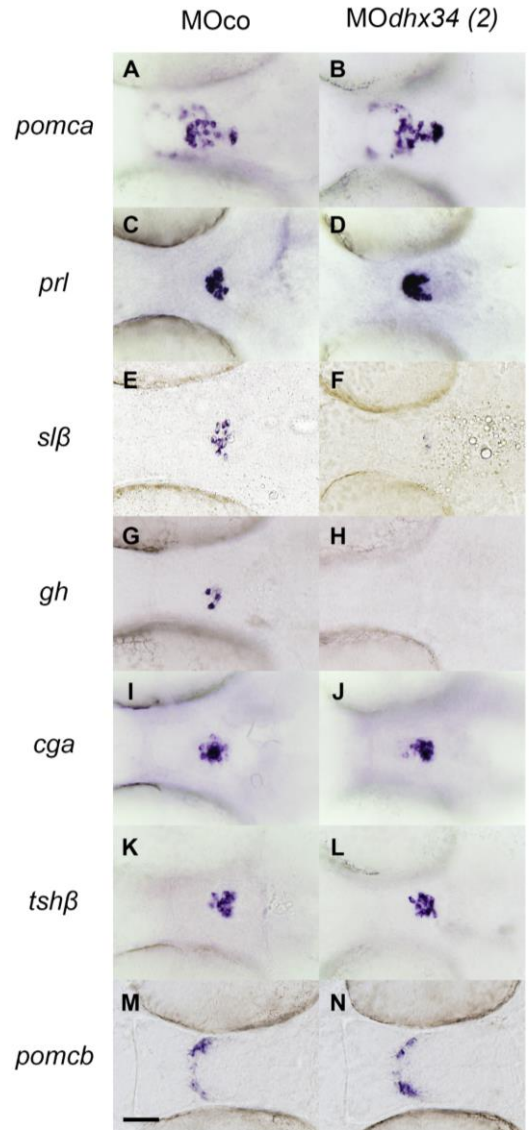
Expression hormonale de l'adénohypophyse à 48 hpf révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNms de la *pro-opiomélanocortine a* (A et B), de la *prolactine* (C et D), de la *somatolactine β* (E et F), de la *somatotrophine* (G et H), de *cga* (I et J), de la *thyrotrophine β* (K et L) et de la *pro-opiomélanocortine b* (M et N). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A, C, E, G, I, K et M), 3,5 ng de morpholino (2) ciblant *dhx34* (B, D, F, H, J, L et N). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche.

Barre d'échelle= 50 μm

**Figure II.5: Expression hormonale à 48 hpf (ISHa)**

Expression hormonale de l'adénohypophyse à 48 hpf révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNms de la *pro-opiomélanocortine a* (A-C), de la *prolactine* (D-F), de la *somatolactine β* (G-I), de la *somatotrophine* (J-L), de *cga* (M-O), de la *thyrotrophine β* (P-R) et de la *pro-opiomélanocortine b* (S-U). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A, D, G, J, M, P et S), 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (B, E, H, K, N, Q et T) ou 2 ng de morpholino ciblant *nbas* (C, F, I, L, O, R et U). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche.

Barre d'échelle= 50 μm

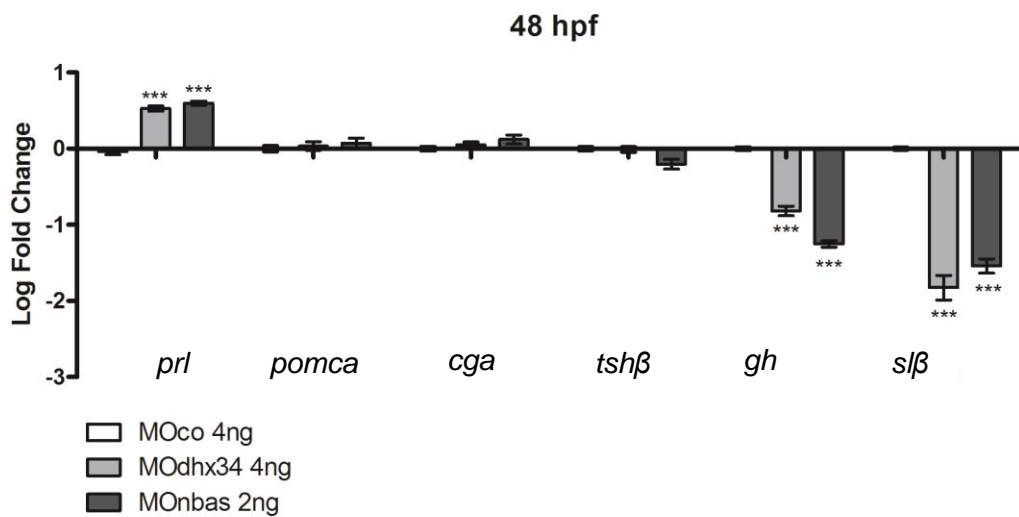


## Résultats

Nous avons donc pu constater que les deux morpholinos ciblant *dhx34* induisent des défauts pituitaires similaires, ces défauts sont donc très probablement bien spécifiques à la diminution d'expression de *dhx34*. De surcroît, il apparaît que l'injection des morpholinos ciblant *dhx34* ou *nbas* induit des effets similaires sur l'AH, ce qui suggère que ceux-ci sont dus à un blocage d'une fonction commune de ces deux gènes, la voie NMD. De plus, le « *knock-down* » de ces gènes ne semble pas affecter la formation de la placode hypophysaire mais mène à une perturbation de la différenciation précoce des corticotropes, mélanotropes, lactotropes et somatolactotropes.

Voyons maintenant ce qui se passe à 48 hpf, stade caractérisé par l'expression hormonale de toutes les lignées endocrines adénohypophysaires, exception faite des gonadotropes. A ce stade, l'hypophyse est en train de migrer au sein de la tête de l'embryon et a déjà pris une forme ovoïde. Comme nous pouvons le constater [Figure II.5 et II.6], l'expression de *pomca* est maintenant divisée en trois domaines, le plus antérieur correspond à des neurones hypothalamiques exprimant le précurseur polypeptidique afin de produire la  $\beta$ -endorphine, le second correspond aux corticotropes situés dans la aPD (« *anterior Pars Distalis* »), tandis que le troisième domaine correspond à la PI (« *Pars Intermedia* ») où sont localisés les mélanotropes. Comparé à la réduction constatée à 28 hpf, il apparaît sur nos analyses ISH et RT-qPCR que l'expression de *pomca* est revenue à la normale dans les morphants, peu importe le domaine considéré [Figure II.5 B et C ; Figure II.6 B ; Table II.3 ; Figure II.7]. A contrario, l'augmentation du nombre de lactotropes déjà constatée à 28 hpf, dans les morphants comparés aux contrôles, est encore nettement renforcée à 48hpf [Figure II.5 E et F ; Figure II.6 D ; Table II.3], ce qui induit une augmentation de l'expression de *prl* d'environ 1,5 fois par rapport aux embryons contrôles [Figure II.7]. Notons que les corticotropes semblent être plus éparpillées que chez les contrôles, cela est sans doute dû au nombre de lactotropes plus élevé.

Les somatolactotropes et les somatotropes, exprimant respectivement la somatotrophine (*gh*) et la somatolactine (*sl $\beta$* ) sont fortement réduits en nombre par rapport aux embryons contrôle [Figure II.5 G-L ; Figure II.6 E-H ; Table II.3], ce qui se traduit par une diminution d'expression de 50% de *gh* et de 70% de *sl $\beta$*  en RT-qPCR [Figure II.7]. Le gène *cga* code pour la sous-unité  $\alpha$  commune aux hormones exprimées par les thyrotropes (Tsh) et les gonadotropes (Fsh et Lh). L'injection des morpholinos ciblant *dhx34* ou *nbas*, ne semble pas modifier l'expression ni le nombre de cellules exprimant *cga* [Figure II.5 M-O ; Figure II.6 I et J ; Table II.3], tandis que les thyrotropes sont légèrement réduits en nombre [Figure II.5 P-R ; Figure II.6 K et L ; Table II.3]. Ceci suggère que le nombre de cellules *cga+/*tsh $\beta$** , les précurseurs supposés des gonadotropes, est légèrement augmenté. Chez le poisson zèbre, le gène de la *pro-opiomélanocortine* possède deux homologues, *pomca* et *pomcb*. Ce dernier gène ne fut



**Figure II.7: Expression hormonale à 48 hpf (qPCR)**

Expression hormonale de l'adénohypophyse à 28 hpf analysée par RT-qPCR et permettant de quantifier les ARNm de la *pro-opiomélanocortine a*, de la *prolactine*, de la *somatolactine β*, de la *somatotrophine*, de *cga* et de la *thyrotrophine β*. Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle, 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* ou 2 ng de morpholino ciblant *nbas*. Cette quantification fut réalisée en triplicat sur 3 injections différentes. Les résultats ont été normalisés grâce au gène *rhp13a*

\*\*\*= P<0,001

48 hpf	Condition	Dim. (%)	Nor. (%)	Aug. (%)
<i>pomca</i>	MOdhx34 (1)	8	72	20
	MOnbas	10	68	22
	MOdhx34 (2)	4	78	18
<i>prl</i>	MOdhx34 (1)	0	24	76
	MOnbas	0	19	81
	MOdhx34 (2)	0	12	88
<i>slβ</i>	MOdhx34 (1)	88	12	0
	MOnbas	92	8	0
	MOdhx34 (2)	98	2	0
<i>gh</i>	MOdhx34 (1)	92	8	0
	MOnbas	74	26	0
	MOdhx34 (2)	94	6	0
<i>cga</i>	MOdhx34 (1)	8	74	18
	MOnbas	6	64	30
	MOdhx34 (2)	10	56	34
<i>tshβ</i>	MOdhx34 (1)	58	42	0
	MOnbas	59	34	3
	MOdhx34 (2)	72	28	0
<i>pomcb</i>	MOdhx34 (1)	2	94	4
	MOnbas	4	90	6
	MOdhx34 (2)	0	88	12

**Table II.3: Comptage des classes phénotypiques hormonales à 48 hpf**

Pourcentage d'embryons présentant une expression des gènes *pomca*, *prl*, *slβ*, *gh*, *cga*, *tshβ* et *pomcb* diminuée, normale ou augmentée par rapport aux embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle. **MOdhx34 (1)**: embryons injectés avec 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34*; **MOnbas**: embryons injectés avec 2 ng de morpholino ciblant *nbas*, **MOdhx34 (2)**: embryons injectés avec 3,5 ng de morpholino (2) ciblant *dhx34*. Pour chaque condition 50 embryons ont été considérés. Dim.: diminution; Nor.: normal; Aug.: augmentation.

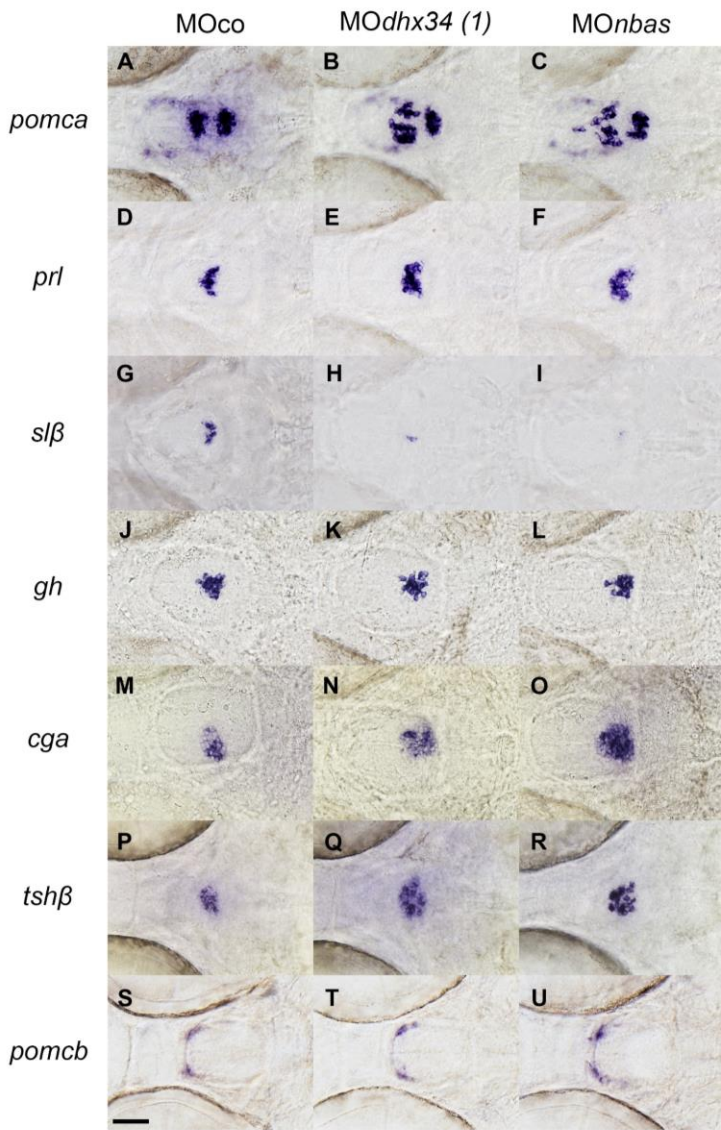
que récemment découvert et par conséquent que très peu étudié, afin d'être complet nous l'avons donc ajouté à notre analyse. Nous constatons que son expression borde l'AH et est vraisemblablement localisée dans l'hypothalamus [Figure II.5 S ; Figure II.6 M]. Le « *knock-down* » des deux acteurs de la voie NMD, ne semble pas modifier son expression [Figure II.5 T et U ; Figure II.6 N et Table II.3].

Il est très intéressant de remarquer qu'à ce stade, les lignées endocrines les plus touchées par l'inactivation de *dhx34* ou *nbas* sont les lignées dépendantes du facteur de transcription Pou1f1 : les lactotropes, somatolactotropes, somatotropes et thyrotropes. De plus, il semble y avoir une induction de la lignée localisée dans la partie antérieure de la *pars distalis*, tandis que les lignées postérieures sont réprimées.

A 72 hpf, l'AH a atteint sa position finale dans l'embryon et exprime toutes ses hormones, bien que les gonadotrophines ne soient exprimées que par très peu de cellules. La diminution d'expression de *dhx34* ou de *nbas* mène à une augmentation du nombre de cellules exprimant *pomca* dans seulement 60% des cas [Figure II.8 A-C ; Figure II.9 A et B ; Table II.4], ce qui est suffisant pour induire une augmentation visible en RT-qPCR [Figure II.10]. Cette augmentation semble être principalement le fait d'un accroissement du nombre de corticotropes, bien qu'une augmentation du nombre de mélanotropes ne soit pas à exclure. Similairement à ce que l'on a pu voir à 28 et 48 hpf, le nombre de lactotropes est augmenté chez les morphants par rapport aux embryons contrôles [Figure II.8 D-F ; Figure II.9 ; Table II.4] ; les expériences de RT-qPCR permettent de confirmer que cette augmentation du nombre de cellules productrices est accompagnée par une expression de la prolactine (*prl*) plus forte [Figure II.10]. En contrepartie, le nombre de somatolactotropes et leur production hormonale est, comme aux stades précédant, fortement diminuée et se limite à une ou deux cellules [Figure II.8 G-I ; Figure II.9 E et F ; Table II.4 ; Figure II.10]. A contrario, les somatotropes qui étaient fortement diminués à 48 hpf, semblent avoir récupéré un nombre de cellules presque comparable à celui des contrôles [Figure II.8 J-L ; Figure II.9 E et F ; Table II.4] ; ce qui se traduit par une expression hormonale légèrement diminuée mais proche du contrôle [Figure II.10].

L'injection des morpholinos ciblant *dhx34* ou *nbas*, mène à une forte augmentation du nombre de cellules exprimant *cga*, accompagnée d'une augmentation du nombre de thyrotropes [Figure II.8 M-R ; Figure II.9 I-L ; Table II.4] ; résultats confirmés par un accroissement de l'expression de ces gènes [Figure II.10]. Nous n'avons malheureusement pas été capables de marquer les gonadotropes en ISH, nous avons toutefois pu détecter une forte augmentation de l'expression de la sous-unité  $\beta$  de l'hormone lutéinisante (Lh) par RT-qPCR [Figure II.10]. Etant donné l'augmentation du nombre de cellules *cga* positives et l'augmentation consécutive de l'expression de





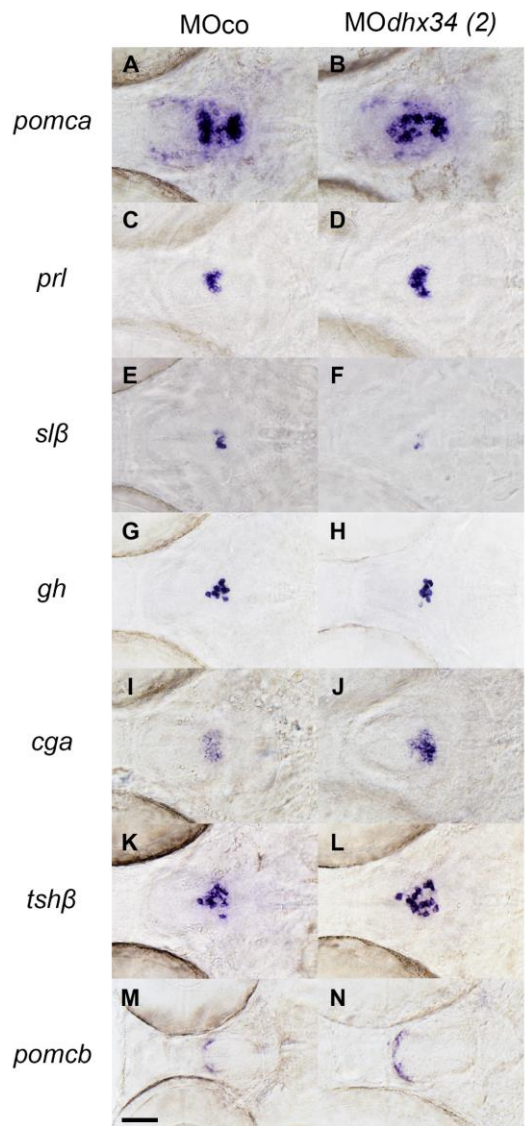
**Figure II.8: Expression hormonale à 72 hpf (ISHa)**

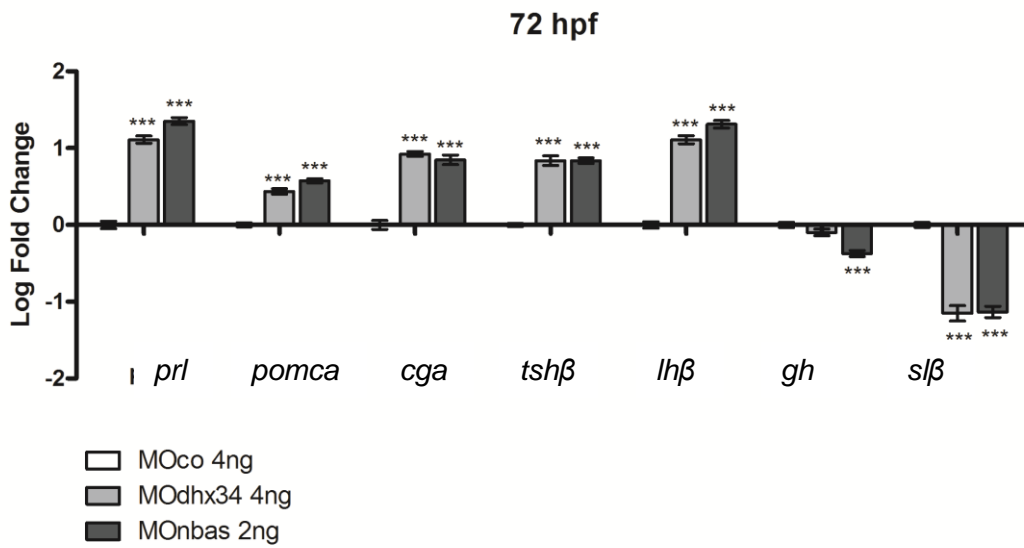
Expression hormonale de l'adénohypophyse à 72 hpf révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNms de la *pro-opiomélanocortine a* (A-C), de la *prolactine* (D-F), de la *somatolactine β* (G-I), de la *somatotrophine* (J-L), de *cga* (M-O), de la *thyrotrophine β* (P-R) et de la *pro-opiomélanocortine b* (S-U). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A, D, G, J, M, P et S), 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (B, E, H, K, N, Q et T) ou 2 ng de morpholino ciblant *nbas* (C, F, I, L, O, R et U). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche. Barre d'échelle= 50 μm

**Figure II.9: Expression hormonale à 72 hpf (ISHb)**

Expression hormonale de l'adénohypophyse à 72 hpf révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNms de la *pro-opiomélanocortine a* (A et B), de la *prolactine* (C et D), de la *somatolactine β* (E et F), de la *somatotrophine* (G et H), de *cga* (I et J), de la *thyrotrophine β* (K et L) et de la *pro-opiomélanocortine b* (M et N). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A, C, E, G, I, K et M), 3,5 ng de morpholino (2) ciblant *dhx34* (B, D, F, H, J, L et N). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche.

Barre d'échelle= 50 μm





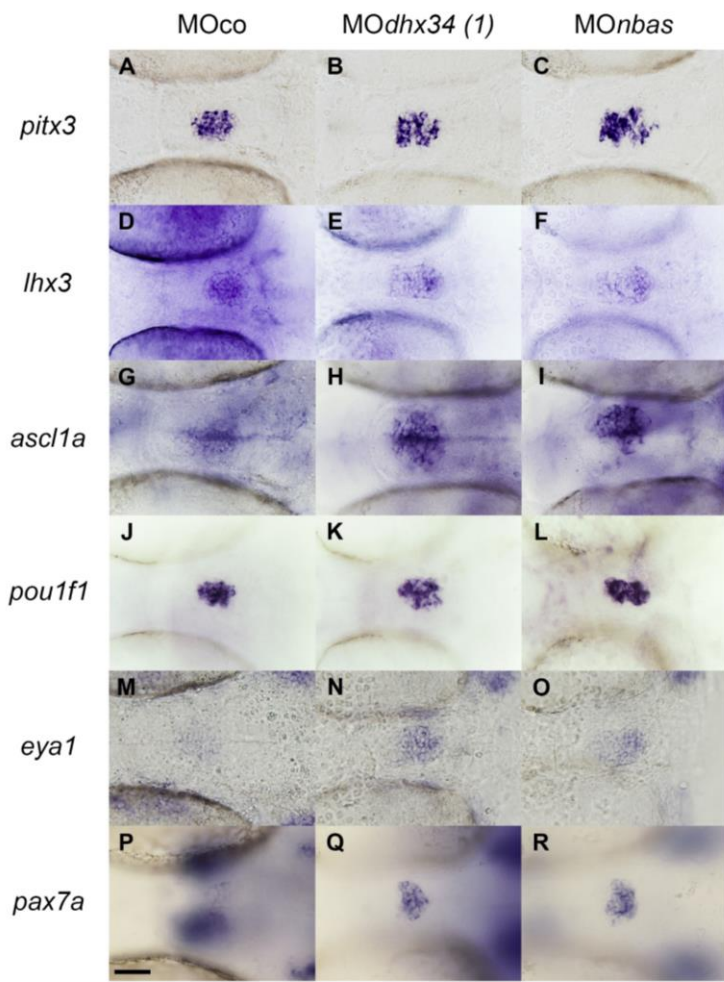
**Figure II.10: Expression hormonale à 72 hpf (qPCR)**

Expression hormonale de l'adénohypophyse à 28 hpf analysée par RT-qPCR et permettant de quantifier les ARNm de la *pro-opiomélanocortine a*, de la *prolactine*, de la *somatolactine β*, de la *somatotrophine*, de *cga* et de la *thyrotrophine β*. Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle, 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* ou 2 ng de morpholino ciblant *nbas*. Cette quantification fut réalisée en triplicat sur 3 injections différentes. Les résultats ont été normalisés grâce au gène *rlp13a*. \*\*\*= P<0,001

72 hpf	Condition	Dim. (%)	Nor. (%)	Aug. (%)
<i>pomca</i>	MOdx34 (1)	0	38	62
	MOnbas	0	42	58
	MOdx34 (2)	2	33	65
<i>prl</i>	MOdx34 (1)	0	16	84
	MOnbas	0	26	74
	MOdx34 (2)	0	18	82
<i>slβ</i>	MOdx34 (1)	86	14	0
	MOnbas	94	6	0
	MOdx34 (2)	97	3	0
<i>gh</i>	MOdx34 (1)	18	82	0
	MOnbas	32	68	0
	MOdx34 (2)	22	78	0
<i>cga</i>	MOdx34 (1)	0	20	80
	MOnbas	0	24	76
	MOdx34 (2)	0	8	92
<i>tshβ</i>	MOdx34 (1)	0	41	59
	MOnbas	0	34	66
	MOdx34 (2)	0	28	72
<i>pomcb</i>	MOdx34 (1)	0	100	0
	MOnbas	0	88	12
	MOdx34 (2)	26	74	0

**Table II.4: Comptage des classes phénotypiques hormonales à 48 hpf**

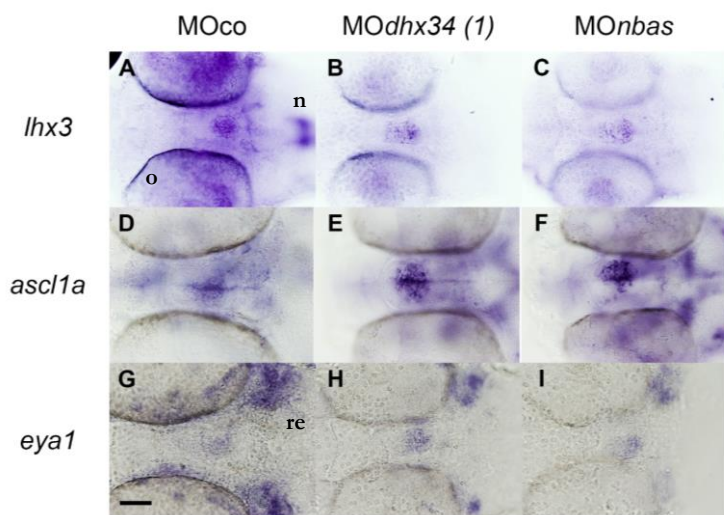
Pourcentage d'embryons présentant une expression des gènes *pomca*, *prl*, *slβ*, *gh*, *cga*, *tshβ* et *pomcb* diminuée, normale ou augmentée par rapport aux embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle. **MOdx34 (1)**: embryons injectés avec 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34*; **MOnbas**: embryons injectés avec 2 ng de morpholino ciblant *nbas*, **MOdx34 (2)**: embryons injectés avec 3,5 ng de morpholino (2) ciblant *dhx34*. Pour chaque condition 50 embryons ont été considérés. Dim.: diminution; Nor.: normal; Aug.: augmentation.



**Figure II.11: Facteurs de transcription (ISHa)**

Expression des facteurs de transcription majeurs régulant la formation de l'adénohypophyse à 48 hpf révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNm de *pitx3* (A-C), de *lhx3* (D-F), de *ascl1a* (G-I), *pou1f1* (J-K), *eya1* (M-O) et *pax7a* (P-R). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A, D, G, J, M et P), 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (B, E, H, K, N et Q) ou 2 ng de morpholino ciblant *nbas* (C, F, I, L, O et R). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche.

Barre d'échelle= 50 µm



**Figure II.12: Facteurs de transcription (ISHa)**

Vue plus large de l'expression de facteurs de transcription *lhx3* (A, B et C), *ascl1a* (D, E et F) et *eya1* (G, H et I) à 48 hpf révélée par hybridation *in situ* visible. Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A, D et G), 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (B, E et H) ou 2 ng de morpholino ciblant *nbas* (C, F et I). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche. o: oeil; n: notochorde; re: rhombencéphale.

Barre d'échelle= 50 µm



## Résultats

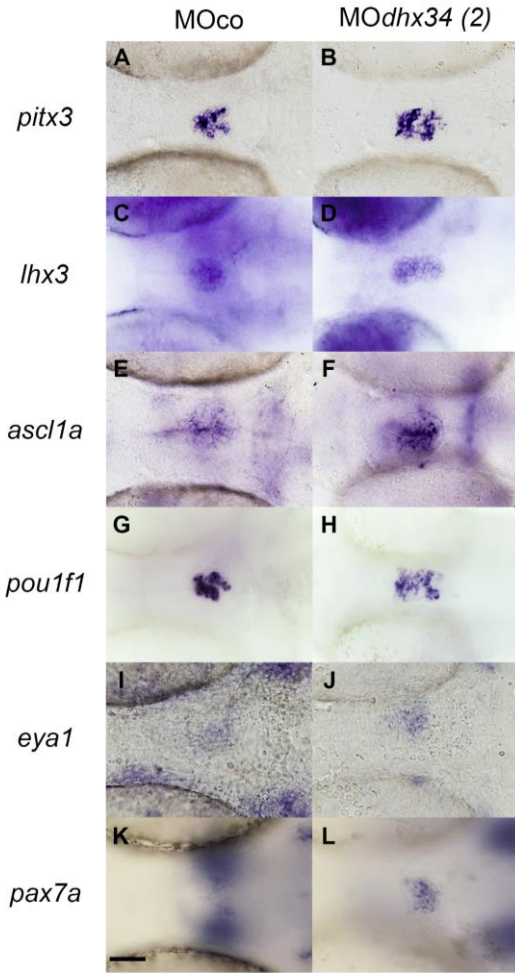
la sous-unité  $\beta$  de la Lh, nous pouvons raisonnablement penser que les morphants présentent un nombre de gonadotrope accru. L'expression du gène *pomcb* est quant à elle inchangée lors du « knock-down » du gène *dhx34* ou *nbas* [Figure II.8 S-U ; Figure II.9 M et N ; Table II.4]. Nous avons donc pu constater que la diminution d'expression de *dhx34* ou de *nbas* via l'injection de morpholinos spécifiques mène à 72 hpf à une augmentation conséquente du nombre de cellules endocrines de l'AH, à l'exception des somatolactotropes qui sont fortement diminuées et des somatotropes qui ont retrouvé un nombre presque normal de cellules.

En résumé, nous avons pu prouver que le blocage de la voie NMD via l'inhibition de la traduction de deux de ses effecteurs, Dhx34 et Nbas, mène à des perturbations importantes du développement endocrinien de l'AH. Tout au long de la formation hypophysaire, deux effets sont constants : l'augmentation du nombre de lactotropes et la diminution du nombre de somatolactotropes. Etant donné la parenté de ces deux lignées sur le plan évolutif, l'on pourrait penser à une transdifférenciation des précurseurs somatolactotropes en lactotropes. Le blocage de la voie NMD résulte en fin de compte à une hyperplasie de la glande pituitaire accompagnée d'une déficience en hormone somatolactotrope à 72hpf. La situation est plus complexe et plus intéressante à 48 hpf. En plus de l'induction des lactotropes dans la apD et la répression des somatolactotropes dans la pPD, une diminution des somatotropes, et des thyrotropes est observée. Toutes ces lignées nécessitent le facteur Pou1f1 pour se différencier, nos résultats suggèrent donc une antériorisation des lignées Pou1f1-dépendantes à ce stade.

Pour avancer un peu plus dans la compréhension des mécanismes moléculaires influencés par la voie NMD, nous avons étudié la dérégulation éventuelle de certains facteurs de transcription par rapport à d'autres.

### II.2.B Facteurs de transcription

Continuons donc notre étude par l'analyse des principaux facteurs de transcription impliqués dans la formation de l'AH. Afin d'évaluer au mieux ce qui se passe lors de la différenciation endocrine, nous avons décidé de travailler à un stade intermédiaire de la formation adénohypophysaire, c'est-à-dire à 48 hpf. Pitx3 et Lhx3 sont tous deux exprimés dès les premières étapes de la formation de la placode pituitaire, et ce dans toutes les cellules de la future glande. Ces deux facteurs de transcription sont reconnus pour être impliqués dans l'induction de l'AH. Grâce à l'établissement de leur profil d'expression, nous constatons de manière très intéressante que l'injection des morpholinos *dhx34* ou *nbas* mène à un accroissement du nombre total de cellules adénohypophysaires [Figure II.11 A-F ; Figure II.13 A-D ; Table II.5]. Remarquons au



### Figure II.13: Facteurs de transcription (ISHb)

Expression des facteurs de transcriptions majeurs régulant la formation de l'adénohypophyse à 48 hpf révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNms de *pitx3* (A et B), de *lhx3* (C et D), de *ascl1a* (E et F), *pou1f1* (G et H), *eya1* (I et J) et *pax7a* (K et L). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A,C,E,G,I et K) ou 3,5 ng de morpholino (2) ciblant *dhx34* (B, D, F, H, J et L). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche.

Barre d'échelle= 50  $\mu$ m

### Table II.5: Comptage des classes phénotypiques des facteurs de transcription

Pourcentage d'embryons présentant une expression des gènes *pitx3*, *lhx3*, *ascl1a*, *pou1f1*, *eya1* et *pax7a* diminuée, normale ou augmentée par rapport aux embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle. **MOdhx34 (1)**: embryons injectés avec 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34*; **MONbas**: embryons injectés avec 2 ng de morpholino ciblant *nbas*, **MOdhx34 (2)**: embryons injectés avec 3,5 ng de morpholino (2) ciblant *dhx34*. Pour chaque condition 30 embryons ont été considérés. Les lignes marquées d'un astérisque dépasse 100%, cela est dû à l'approximation à l'unité appliquée. Dim.: diminution; Nor.: normal; Aug.: augmentation.

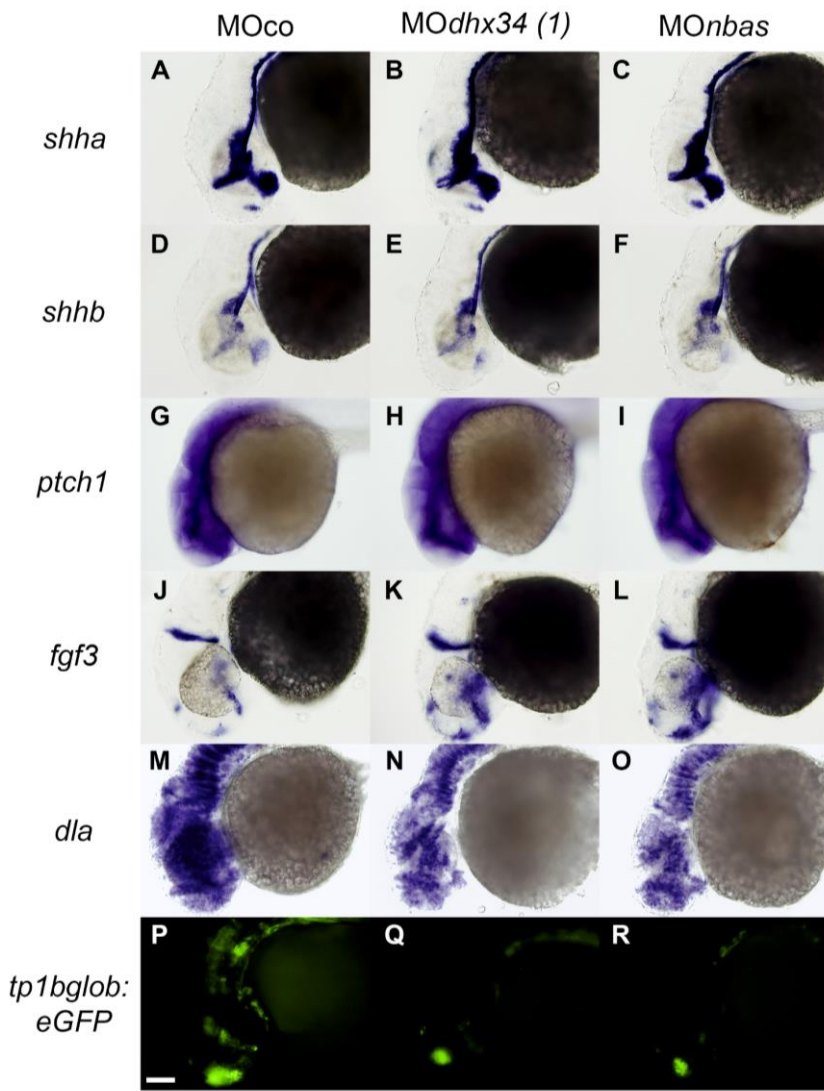
48 hpf	Condition	Dim. (%)	Nor. (%)	Aug. (%)
<i>pitx3</i>	MOdhx34 (1)	0	27	73
	MONbas	0	13	87
	MOdhx34 (2)	0	20	80
<i>lhx3</i>	MOdhx34 (1)	0	33	67
	MONbas	0	17	83
	MOdhx34 (2)	0	23	77
<i>ascl1a</i>	MOdhx34 (1)	0	37	63
	MONbas	0	23	77
	MOdhx34 (2)	0	30	70
<i>pou1f1</i>	MOdhx34 (1)	10	27	63
	MONbas	3	30	67
	MOdhx34 (2)	17	27	57*
<i>eya1</i>	MOdhx34 (1)	3	10	87
	MONbas	0	13	87
	MOdhx34 (2)	7	17	77*
<i>pax7a</i>	MOdhx34 (1)	0	7	93
	MONbas	0	3	97
	MOdhx34 (2)	0	10	90

## Résultats

passage que l'expression de *lhx3* dans les yeux, le cerveau et la notochorde semble être sensiblement réduite dans les morphants comparés aux embryons contrôles [Figure II.12 A-C]. *ascl1a* code pour un facteur de transcription impliqué dans la spécification des cellules endocrines au sein de la placode, plus tard il a été suggéré qu'il pourrait également être impliqué dans la régulation du gène *pomca*. De manière similaire à *lhx3* et *pitx3*, lorsque l'on inhibe l'expression de *dhx34* ou *nbas*, *ascl1a* est exprimé dans un nombre de cellules adénohypophysaires plus important comparé aux contrôles, ce qui implique une augmentation du nombre de cellules adénohypophysaires [Figure II.11 G-I ; Figure II.13 E-F ; Table II.5]. Notons que l'expression encéphalique de *ascl1a* semble être augmentée [Figure II.12 D- F].

*Pou1f1* et *Eya1* agissent de manière complémentaire afin d'induire la différenciation endocrine de l'AH. Chacun étant responsable de la différenciation de lignées endocrines spécifiques, à l'exception des somatolactotropes qui requièrent les deux facteurs de transcription. Nous observons que les morphants *dhx34* et *nbas* présentent une augmentation de l'expression de *pou1f1* et *eya1* comparés aux embryons contrôles [Figure II.11 J-O ; Figure II.13 G-J ; Table II.5]. Ces augmentations ne semblent pas se restreindre à un domaine particulier de l'AH, ce qui suggère qu'un autre déterminant entre en jeu dans la dérégulation de la balance hormonale observée. Remarquons la diminution d'expression de *eya1* dans le cerveau postérieur (rhombencéphale) des morphants [Figure II.12 G-H]. Au niveau de l'AH, le gène *pax7a* est décrit comme étant exprimé dans la *pars intermedia*, et représente donc un marqueur postérieur de l'AH. Les embryons injectés avec les morpholinos ciblant *dhx34* ou *nbas* présentent clairement une expression de *pax7a* accrue comparée aux contrôles [Figure II.11 P-R ; Figure II.13 K et L ; Table II.5]. Comme nous avons vu que le nombre de mélanotropes dans la PI n'est pas affecté, il semble que le nombre de précurseurs exprimant *pax7a* est accru chez les morphants. De plus il apparaît que l'expression neuronale de *pax7a* est réduite chez les morphants comparés aux contrôles.

En résumé, le blocage de la voie de dégradation des ARNm NMD, via la déplétion de *dhx34* ou *nbas*, induit une augmentation du nombre de cellules adénohypophysaires, et ce dans tous les domaines de celle-ci. De plus, il semble que la formation du SNC soit également altérée. Dans un contexte développemental, ceci a une grande importance puisque le SNC, et en particulier l'hypothalamus, a un rôle majeur dans la formation de l'adénohypophyse, via notamment la production de ligands Hh et Fgf. Bien que très instructive, l'analyse des facteurs de transcription ne nous permet pas d'expliquer totalement les événements déclencheurs menant aux altérations endocrines observées lors de l'absence de *Dhx34* ou *Nbas*. Par conséquent, une étude



**Figure II.14: Voies de signalisation à 28 hpf**

Activité des voies de signalisation régulant la formation de l'adénohypophyse à 28 hpf révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNms de *sonic hedgehog a* (A-C), de *sonic hedgehog b* (D-F), de *patched 1* (G-I), *fgf3* (J-K) et *deltaA* (M-O). L'activité canonique de la voie Notch fut évaluée grâce au transgénique *tp1bglab:eGFP* (P-R). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A, D, G, J, M et P), 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (B, E, H, K, N et Q) ou 2 ng de morpholino ciblant *nbas* (C, F, I, L, O et R). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche.

Barre d'échelle= 100 µm

28 hpf	Condition	Dim. (%)	Nor. (%)	Aug. (%)
<i>shha</i>	MOdxx34 (1)	0	90	10
	MONbas	0	93	7
	MOdxx34 (2)	3	90	7
<i>shhb</i>	MOdxx34 (1)	3	93	3*
	MONbas	10	90	0
	MOdxx34 (2)	0	100	0
<i>ptch1</i>	MOdxx34 (1)	0	87	13*
	MONbas	0	90	0
	MOdxx34 (2)	0	80	20
<i>fgf3</i>	MOdxx34 (1)	3	10	87
	MONbas	7	0	93
	MOdxx34 (2)	3	7	90
<i>dla</i>	MOdxx34 (1)	70	30	0
	MONbas	77	23	0
	MOdxx34 (2)	93	7	0
<i>tp1bglab:eGFP</i>	MOdxx34 (1)	80	20	0
	MONbas	93	7	0
	MOdxx34 (2)	100	0	0

**Table II.6: Comptage des classes phénotypiques des voies de signalisation**

Pourcentage d'embryons présentant une expression des gènes *shba*, *shhb*, *ptch1*, *fgf3*, *dla* ainsi que du transgène *tp1bglab:eGFP* diminuée, normale ou augmentée par rapport aux embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle. **MOdxx34 (1)**: embryons injectés avec 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34*; **MONbas**: embryons injectés avec 2 ng de morpholino ciblant *nbas*; **MOdxx34 (2)**: embryons injectés avec 3,5 ng de morpholino (2) ciblant *dhx34*. Pour chaque condition 30 embryons ont été considérés. Les lignes marquées d'un astérisque dépasse 100%, cela est dû à l'approximation à l'unité appliquée. Dim.: diminution; Nor.: normal; Aug.: augmentation.

des voies de signalisation contrôlant la formation adénohypophysaire semble être requise.

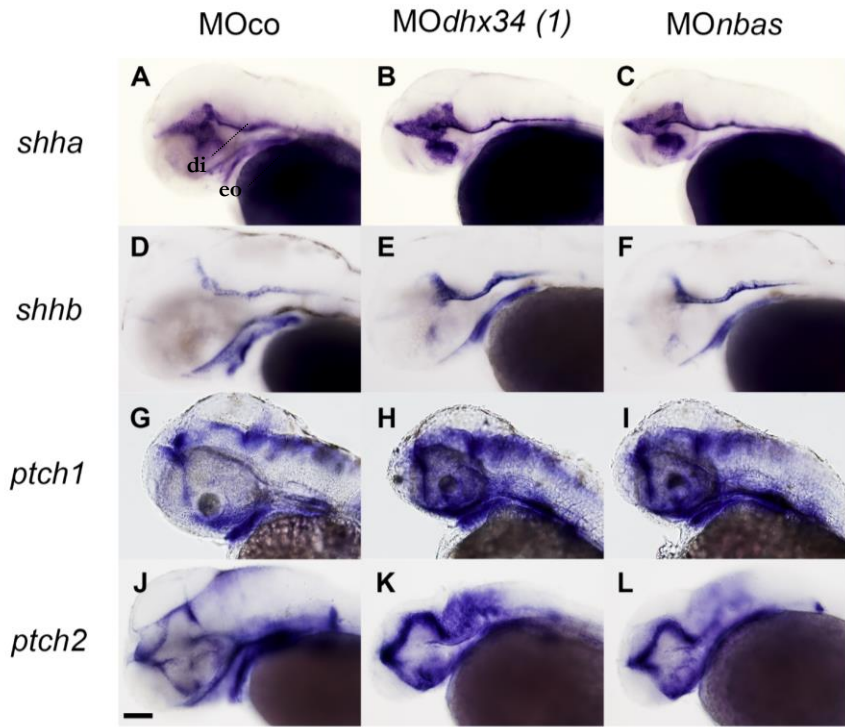
## II.2.C Voies de signalisation

Chez le poisson zèbre, deux voies de longue portée, Shh et Fgf3, et une voie de courte portée, Notch, sont nécessaires au développement pituitaire. Le SNC produit les ligands Shha et Shhb à proximité de la partie antérieure de l'AH en formation, tandis que la source du ligand Fgf3 est postérieure. Ceci induit l'établissement d'un double gradient morphogène permettant d'établir un axe de différenciation antéro-postérieur. Ainsi, les cellules situées dans la aPD, telles que les lactotropes, sont soumises à une forte signalisation Hh et à une faible signalisation Fgf, tandis que les mélanotropes situés dans la partie la plus postérieure de l'AH reçoivent un haut niveau de signalisation Fgf et un faible taux de signalisation Hh. Au sein d'une population de progéniteurs soumis à un même niveau de signalisation de longue portée, tels que les futurs corticotropes et lactotropes, la signalisation de courte portée Notch va permettre de définir la balance de différenciation entre ces lignées endocrines.

Le gène *patched 1* (*ptch1*), est une cible directe de la signalisation Hh et constitue donc un gène rapporteur de son activité. Grâce à l'établissement de son profil d'expression lors des étapes de différenciation précoces des cellules endocrines (28 hpf), il apparaît que la signalisation Hedgehog n'est pas altérée par l'injection des morpholinos *dhx34* ou *nbas* comparés aux contrôles [Figure II.14 G-I ; Table II.6]. Renforçant cette idée, l'expression des gènes codants pour les ligands *shha* et *shhb* par le SNC chez les embryons injectés avec le morpholino ciblant *dhx34* ou *nbas* est similaire à celle des embryons injectés avec le morpholino contrôle [Figure II.14 A-F ; Table II.6]. Par contre, nous avons pu constater que le gène codant pour le ligand Fgf3 est sensiblement augmenté chez les morphants *dhx34* et *nbas* comparés aux embryons contrôles [Figure II.14 J-L ; Table II.6]. Il fut préalablement déterminé qu'une surexpression de ligand Fgf3 induit une augmentation de la signalisation des « Fibroblast growth factors », ainsi nous pouvons raisonnablement penser que la surexpression de *fgf3* que nous constatons ici induit une augmentation de la voie qu'il active (158).

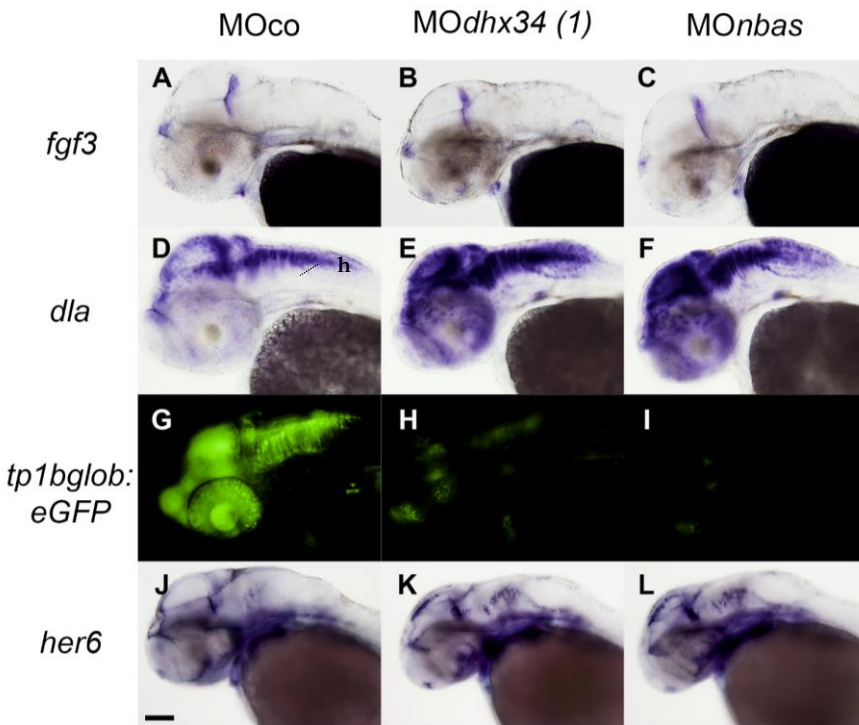
Terminons notre étude des voies de signalisation à 28 hpf par l'étude de la voie Notch, grâce à l'injection des différents morpholinos dans des zygotes de la lignée transgénique *Tg(tp1bglob: eGFP)*. Basée sur le promoteur *tp1* du virus d'Epstein Bar et de la  $\beta$ -globuline, ce transgène permet d'évaluer *in vivo* l'activité de la voie canonique de Notch grâce à la production de eGFP. En comparaison avec les embryons injectés avec le morpholino contrôle, les embryons injectés avec le morpholino *dhx34* ou *nbas*





**Figure II.15: Voies de signalisation à 48 hpf (A)**

Activité des voies de signalisation régulant la formation de l'adénohypophyse à 28 hpf révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNms de *sonic hedgehog a* (A-C), de *sonic hedgehog b* (D-F), de *patched 1* (G-I) et de *patched 2* (J-K). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A, D, G et J), 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (B, E, H et K) ou 2 ng de morpholino ciblant *nbas* (C, F, I et L). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche. di: diencephale; eo: ectoderme oral. Barre d'échelle= 100  $\mu$ m



**Figure II.16: Voies de signalisation à 48 hpf (B)**

Activité des voies de signalisation régulant la formation de l'adénohypophyse à 28 hpf révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNms de *fgf3* (A-C), de *deltaA* (D-F) et de *her6* (J-K). L'activité canonique de la voie Notch fut évaluée grâce au transgénique *tp1bglob::eGFP* (G-I). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A, D, G et J), 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (B, E, H et K) ou 2 ng de morpholino ciblant *nbas* (C, F, I et L). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche. h: hypothalamus. Barre d'échelle= 100  $\mu$ m

présentent une expression de la GFP bien plus restreinte [Figure II.14 P-R ; Table II.6]; ce qui indique une diminution de l'activité de la voie canonique Notch. Afin de voir si cette diminution d'activité est due à une modification de l'expression de ligands, nous avons testé l'expression du gène *dla* codant pour le ligand DeltaA [Figure II.14 M-O ; Table II.6]. Nous constatons que les morphants *dhx34* et *nbas* présentent une expression de *dla* fortement diminuée comparés aux embryons contrôles. Ces expériences nous enseignent donc que la diminution du taux de protéine Dhx34 ou Nbas, induit à 28 hpf une augmentation de la signalisation Fgf3, une diminution de la signalisation Notch tandis que la signalisation Shh est inchangée.

A 48 hpf, la signalisation Hedgehog est clairement augmentée dans tout l'embryon lorsque l'on injecte les morpholinos ciblant *dhx34* ou *nbas*, comme le prouve la nette augmentation de l'expression des gènes *patched 1* et *2* (*ptch1* et *ptch2*) [Figure II.15 G-L ; Table II.7]. Cette augmentation de l'activité de la voie Hedgehog est probablement due à une augmentation de l'expression des gènes codants pour les ligands Shha et Shhb. L'expression de *shha* chez les embryons injectés avec le morpholino *dhx34* ou *nbas* est augmentée dans le diencephale et plus particulièrement dans l'hypothalamus comparée aux contrôles [Figure II.15 A-C ; Table II.7]. Chez les morphants, *shhb* est lui aussi plus abondant dans le cerveau [Figure II.15 D-F ; Table II.7]. Il est intéressant de remarquer que malgré leur augmentation céphalique, l'expression de *shha* et de *shhb* dans l'ectoderme oral est diminuée, probablement en raison d'un sous-développement tissulaire. Il est à noter que, tandis que l'influence de la signalétique Hedgehog provenant du diencephale sur le développement de l'AH ne fait aucun doute, celle de l'ectoderme oral n'est que supposée (153). En effet les événements d'induction de l'AH par la signalisation Hedgehog ont lieu avant que *shha* et *shhb* ne soient exprimés dans l'ectoderme oral (à environ 36 hpf) ; la signalisation Shh provenant de l'ectoderme oral ne peut donc avoir d'influence que sur les fonctions tardives de la voie Hh sur l'AH, c'est-à-dire au cours la différenciation antéro-postérieure des lignée endocrines.

Contrairement à l'augmentation constatée à 28 hpf, à 48 hpf l'expression de *fgf3* chez les embryons amoindris en Dhx34 ou en Nbas est similaire à celle observée chez les embryons contrôles [Figure II.16 A-C ; Table II.7]. Il semble donc qu'entre 28 et 48 hpf, la signalisation *fgf3* ait retrouvé un niveau normal. L'analyse de la lignée transgénique *tp1bglob:eGFP* démontre quant à elle une diminution de la signalisation canonique de Notch [Figure II.16 G-I ; Table II.7]. Diminuée à 28 hpf, la production de ligand Delta A est également fortement modifiée à 48 hpf, puisqu'ici les morphants présentent une augmentation générale, notamment au niveau de l'hypothalamus [Figure II.16 D-F ; Table II.7]. L'analyse de l'expression d'un autre marqueur de l'activité de la voie Notch, *her6*, semble être légèrement augmentée, notamment dans le cerveau lorsque l'on diminue l'expression de *dhx34* ou *nbas* [Figure II.16 J-L ; Table II.7]. Le gène *her6*

48 hpf	Condition	Dim. (%)	Nor. (%)	Aug. (%)
<i>shha</i>	<b>MOdhx34 (1)</b>	0	20	<b>77</b>
	<b>MOnbas</b>	0	10	<b>90</b>
	<b>MOdhx34 (2)</b>	0	17	<b>83</b>
<i>shhb</i>	<b>MOdhx34 (1)</b>	7	27	<b>67*</b>
	<b>MOnbas</b>	0	7	<b>93</b>
	<b>MOdhx34 (2)</b>	0	13	<b>87</b>
<i>ptch1</i>	<b>MOdhx34 (1)</b>	0	33	<b>67</b>
	<b>MOnbas</b>	0	27	<b>73</b>
	<b>MOdhx34 (2)</b>	0	23	<b>77</b>
<i>ptch2</i>	<b>MOdhx34 (1)</b>	0	37	<b>63</b>
	<b>MOnbas</b>	3	30	<b>67</b>
	<b>MOdhx34 (2)</b>	0	13	<b>87</b>
<i>fgf3</i>	<b>MOdhx34 (1)</b>	13	<b>87</b>	0
	<b>MOnbas</b>	20	<b>80</b>	0
	<b>MOdhx34 (2)</b>	10	<b>90</b>	0
<i>dla</i>	<b>MOdhx34 (1)</b>	0	7	<b>93</b>
	<b>MOnbas</b>	3	7	<b>90</b>
	<b>MOdhx34 (2)</b>	0	10	<b>90</b>
<i>her6</i>	<b>MOdhx34 (1)</b>	0	40	<b>60</b>
	<b>MOnbas</b>	3	27	<b>70</b>
	<b>MOdhx34 (2)</b>	0	33	<b>67</b>
<i>tp1bglob: eGFP</i>	<b>MOdhx34 (1)</b>	<b>90</b>	10	0
	<b>MOnbas</b>	<b>93</b>	7	0
	<b>MOdhx34 (2)</b>	<b>97</b>	3	0

**Table II.7: Comptage des classes phénotypiques des voies de signalisation**

Pourcentage d'embryons présentant une expression des gènes *shha*, *shhb*, *ptch1*, *fgf3*, *dla* ainsi que du transgène *tp1bglob: eGFP* diminuée, normale ou augmentée par rapport aux embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle. **MOdhx34 (1)**: embryons injectés avec 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34*; **MOnbas**: embryons injectés avec 2 ng de morpholino ciblant *nbas*, **MOdhx34 (2)**: embryons injectés avec 3,5 ng de morpholino (2) ciblant *dhx34*. Pour chaque condition 30 embryons ont été considérés. Les lignes marquées d'un astérisque dépasse 100%, cela est dû à l'approximation à l'unité appliquée. Dim.: diminution; Nor.: normal; Aug.: augmentation.



## Résultats

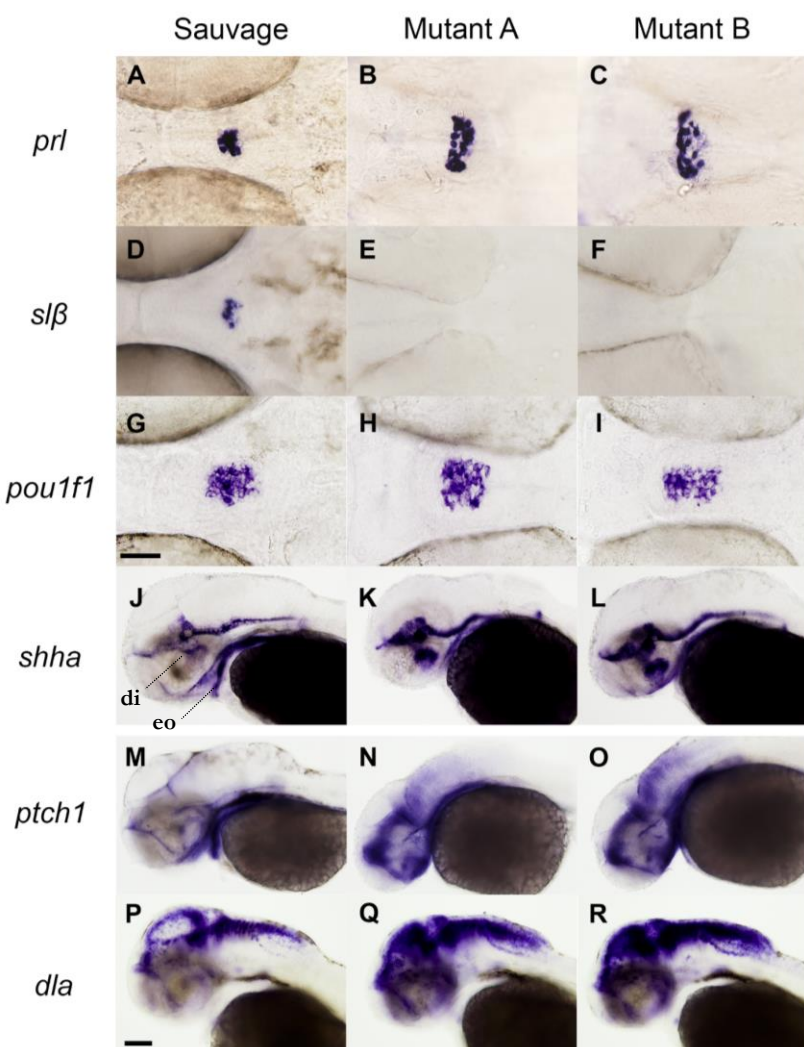
du poisson zèbre est l'homologue du gène Hes1 de la souris, qui est connu pour être impliqué dans la formation de l'adénohypophyse (253). Les gènes homologues au gène *hairy* de la drosophile sont des cibles bien connues de la signalisation Notch, canonique ou non. Il semble y avoir une contradiction dans l'activité de la voie Notch puisque nous constatons une augmentation de l'expression de *deltaA*, une diminution du transgène *tp1bglob:eGFP* et une légère augmentation de *her6* ; la voie Notch est connue pour ses diverses formes de voies non-canoniques, des expériences supplémentaires devront donc faire la lumière sur l'activité de ces différentes formes dans le cadre de l'inactivation de *dhx34* ou *nbas*.

Il apparaît donc que le blocage de la voie NMD, via le « knock-down » des gènes *dhx34* ou *nbas*, induit une forte altération de la dynamique de toutes les voies de signalisation impliquées dans la formation de l'adénohypophyse. Comparable aux contrôles lors des premières étapes de la formation de l'AH, la signalisation Hedgehog est exacerbée entre 28 et 48 hpf chez les morphants. Ceci est très intéressant puisque lors des premières étapes du développement de l'AH, la signalisation Hh est responsable de l'induction de la placode hypophysaire. Ainsi l'absence de modification de l'induction placodaire colle parfaitement avec une signalisation Hh normale à 28 hpf. Lors des étapes ultérieures, le double gradient morphogène induit par Shh et Fgf3 détermine la différenciation des différentes lignées endocrines le long de l'axe antéro-postérieur. Une augmentation de la signalisation Hh à cette étape devrait donc promouvoir les lignées antérieures et réprimer les lignes postérieures. Le cas de nos morphants correspond très bien à cette situation : l'augmentation de la signalisation Hh a lieu entre 28 et 48 hpf, et induit une augmentation du nombre de lactotropes dans la partie antérieure et une diminution des lignées postérieures, exception faite des gonadotropes et mélanotropes. L'autre déterminant de l'axe antérieur-postérieur, *fgf3* est stable à cette étape, mais est augmenté lors des étapes précoces de formation de l'AH au cours desquelles la signalisation Fgf est requise afin de promouvoir la spécification des précurseurs adénohypophysaires et la survie cellulaire. La signalisation Notch n'est requise pour la formation de l'AH que lors des étapes précoces du développement de l'AH, puis s'éteint aux alentours de 48 hpf. Notre analyse des embryons injectés avec les morpholinos *dhx34* ou *nbas* démontre que la voie Notch est réprimée lors de ces dites étapes précoces. Bien que l'augmentation du nombre de lactotropes et la diminution de somatotropes correspondent à ce qui a été décrit lors de l'inhibition précoce de Notch, elle ne peut expliquer tous les effets observés. Aucune des modifications d'activité des voies de signalisation ne peut expliquer seule les effets observés lors de la diminution d'expression de *dhx34* ou *nbas*. Il apparaît donc évident que les défauts endocriniens de l'AH sont dus à une dérégulation de la dynamique des voies de signalisation régissant son développement.



**Figure II.17: Mutants *dhx34***

Schéma représentant la protéine Dhx34 sauvage (WT) de 1150 acides aminés, la protéine Dhx34 tronquée produite par la lignée mutante A (MA) de 145 acides aminés et la protéine Dhx34 tronquée produite par la lignée mutante B (MB) de 142 acides aminés. Les différents domaines protéiques sont indiqués par diverses couleurs: NTD (gris), RecA1 (vert), RecA2 (rose), winged-helix (WH) (orange), Ratchet (bleu ciel), OB-fold (rouge) et CTD (brun). Le domaine RecA2 contient une petite boucle  $\beta$  antiparallèle représentée en jaune. Adapté de Melero, R., Hug, N., López-Perrote, A., Yamashita, A., Cáceres, J.F. and Llorca, O. (2016) *The RNA helicase DHX34 functions as a scaffold for SMG1-mediated UPF1 phosphorylation*. *Nat. Commun.*, 7, 10585



**Figure II.18: Mutants *dhx34* à 48 hpf**

Détermination des effets de deux mutations inactivatrices de *dhx34* sur le développement de l'adénohypophyse à 48 hpf révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNm de la prolactine (A-C), de la somatolactine  $\beta$  (D-F), de *pou1f1* (G-I), de *sonic hedgehog a* (J-L), de *patched 1* (M-O) et de *delta A* (P-R). Embryons sauvages (A, D, G, J, M et P), embryons homozygotes pour la mutation A de *dhx34* (B, E, H, K, N et Q) ou embryons homozygotes pour la mutation B de *dhx34* (C, F, I, L, O et R). Les embryons A à I sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche. Les embryons J à R sont présentés en vue latérale, partie rostrale orientée à gauche. Barre d'échelle = 100  $\mu$ m (A-I barre d'échelle en G; J- R barre d'échelle en P). di: diencéphale; eo: ectoderme oral

### II.3 Mutant CRISPR *dhx34*

Basée sur l'utilisation de morpholinos, notre étude a l'avantage de ne pas bloquer totalement le NMD et ainsi d'offrir un moyen d'étude dans le cas où une inhibition complète de la voie serait létale, comme c'est le cas chez le modèle murin. Malheureusement, la méthode de diminution d'expression par injection de morpholinos n'est pas infaillible et mène dans de nombreux cas à des défauts non spécifiques. Le fait que nous ayons observé les mêmes effets en utilisant deux morpholinos différents ciblant *dhx34* réduit fortement le risque que les défauts observés résultent d'un effet aspécifique des morpholinos. De plus, les mêmes effets ont été observés en bloquant l'expression d'un autre facteur du NMD, *Nbas*. Néanmoins, nous avons préféré confirmer nos résultats par l'établissement d'une lignée mutante pour le gène *dhx34*, tout en nous permettant de répondre à la question de savoir si le blocage total de la voie NMD est létal chez le poisson zèbre. Si ce n'est pas le cas, le mutant nous permettra de savoir si les résultats que nous avons obtenus sont spécifiques au « knock-down » de *dhx34* ou s'ils résultent d'un effet indésirable causé par l'injection des morpholinos.

Grâce à la méthode de mutagenèse dirigée CRISPR/Cas9, nous avons pu établir deux lignées mutantes (nommée A et B) pour le gène *dhx34*, qui contiennent un codon STOP dans la séquence codante [Figure II.17]. Les embryons homozygotes pour la mutation (A ou B) présentent des effets similaires à ce que nous avons constaté avec les morpholinos. En premier lieu, les embryons mutants homozygotes pour l'une ou l'autre mutation survivent au moins jusqu'au troisième jour de développement. De plus, ils présentent une morphologie similaire aux morphants, caractérisée par une réduction de la taille de la tête et des yeux ainsi qu'une queue souvent courbée (non montré). Ensuite, au moyen de ces lignées mutantes, nous avons validé quelques points essentiels de notre analyse. Pour ce faire, nous avons testé l'expression des gènes hormonaux transcrits par les lactotrope (*prl*) et les somatolactotrope (*slβ*) à 48 hpf [Figure II.18 A-F]. Augmentées chez les morphants, les cellules exprimant la prolactine sont largement augmentées en nombre chez les embryons homozygotes pour la mutation *dhx34*. Les mutants présentent également une forte diminution du nombre de somatolactotrope, ce qui confirme le phénotype endocrine que nous avons observé avec les morpholinos. Ensuite nous avons voulu confirmer l'altération de l'expression du facteur de transcription *Pou1f1* ; on constate que similairement à ce que nous avons pu observer avec les morpholinos, les embryons homozygotes pour l'une des deux mutations inactivatrices de *dhx34* présentent une augmentation du nombre de cellules exprimant *pou1f1* [Figure II.18 G-I]. Afin de valider les causes de cette perturbation hormonale, nous avons testé l'expression de l'activité de la voie



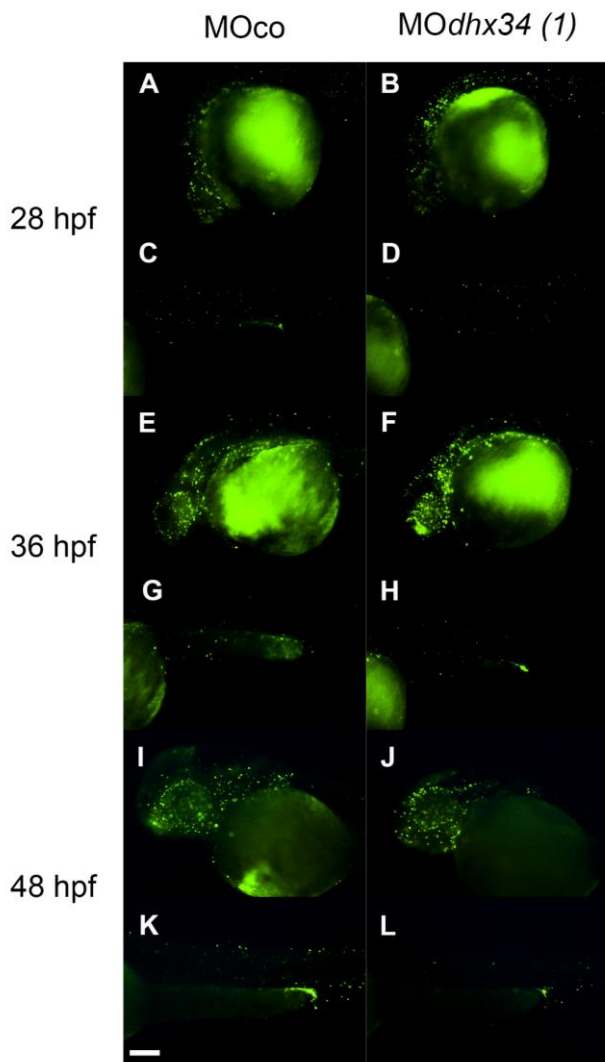
Sonic Hedgehog ainsi que l'expression du ligand Delta A à 48 hpf [Figure II.18 J-R]. Nous constatons que les mutants *dhx34* présentent une augmentation de la production du ligand Shha par le diencéphale et une réduction dans l'ectoderme oral, ainsi qu'une augmentation de la signalisation Hedgehog comme rapportée par l'expression de *patched 1 (ptch1)* [Figure II.18 J-O]. De plus, similairement à ce que l'on a observé avec les morpholinos, l'expression du ligand Notch Delta A est sensiblement augmentée chez les mutants *dhx34* à 48 hpf [Figure II.18 P-R].

Les lignées mutantes pour *dhx34* nous ont donc permis de déterminer premièrement que contrairement à ce que l'on pouvait présumer des études menées chez la souris et les études préliminaires chez le « zebrafish » (96), le NMD chez le poisson zèbre n'est pas vital pour la vie embryonnaire, et deuxièmement que le phénotype adénohypophysaire que l'on a pu observer avec les morpholinos est bien spécifique à l'absence de Dhx34.

## II.4 Prolifération & Mort cellulaire

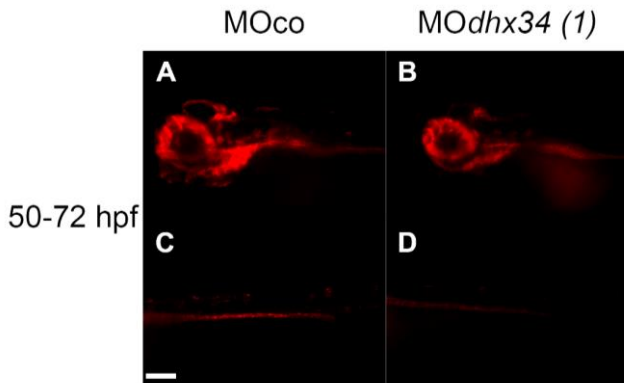
Au cours du développement, la signalisation Hedgehog joue couramment un rôle mitogène en plus de son rôle morphogène. La voie Notch est également connue pour activer la prolifération des progéniteurs de nombreuses lignées cellulaires. La signalisation Fgf3 est quant à elle reconnue pour son rôle dans la régulation de l'apoptose au cours de la formation de l'AH chez le poisson zèbre. Nous avons vu que l'inhibition de la voie NMD induit une dérégulation majeure des voies de signalisation contrôlant le développement de l'AH. L'une des conséquences est que l'AH présente un nombre accru de cellules, et ce dès 48 hpf. Pour essayer de déterminer si cette augmentation cellulaire est causée par un taux de prolifération supérieur ou à une mort cellulaire réduite, nous avons donc effectué des tests de prolifération et de mort cellulaire.

Une méthode de détection des cellules en prolifération est le marquage de la phosphorylation de l'histone 3 par des kinases de la famille Aurora/AIK, qui est un évènement crucial de la mitose cellulaire. L'immunohistochimie utilisant l'anticorps anti phospho-histone 3 (pH3) permet donc de marquer les cellules en mitose dans tout l'embryon (254). Une autre façon d'évaluer la prolifération cellulaire est de marquer l'ADN nouvellement synthétisé au cours d'une période de temps déterminée. En incubant les embryons avec l'analogue de thymidine EdU (5-éthynyl-2'-désoxyuridine), les cellules qui répliquent leur ADN au cours de la phase S, avant la mitose, vont incorporer cet analogue. Grâce à un réactif fluorescent nous pourrons ensuite marquer les cellules en prolifération au cours de l'incubation avec l'EdU.



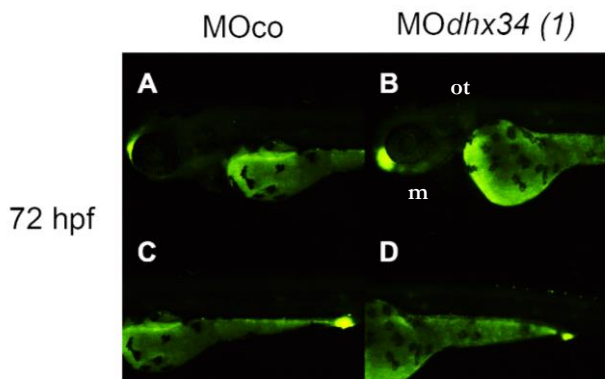
### Figure II.19: Prolifération cellulaire entre 28 et 48 hpf

Prolifération cellulaire à 28 hpf (A-D), 36 hpf (E-H) et 48 hpf (I-L) marquée par immunohistochimie de l'histone 3 phosphorylé. Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A, C, E, G, I et K) ou 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (B, D, F, H, J et L). Afin d'avoir une vue globale, chaque embryon est représenté par une photographie de sa tête et de son tronc. Les embryons sont présentés en position latérale, partie rostrale orientée à gauche. Barre d'échelle= 100  $\mu$ m



### Figure II.20: Prolifération cellulaire entre 50 et 72 hpf

Prolifération cellulaire entre 50 hpf et 72 hpf marquée par immunohistochimie après incorporation d'EDU. Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A et C) ou 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (B et D). Afin d'avoir une vue globale, chaque embryon est représenté par une photographie de sa tête et de son tronc. Les embryons sont présentés en position latérale, partie rostrale orientée à gauche. Barre d'échelle= 100  $\mu$ m



### Figure II.21: Mort Cellulaire à 72 hpf

Mort cellulaire marquée à 72 hpf par la coloration à l'acridine orange. Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A et C) ou 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (B et D). Afin d'avoir une vue globale, chaque embryon est représenté par une photographie de sa tête et de son tronc. Les embryons sont présentés en position latérale, partie rostrale orientée à gauche. m: mâchoire; région otique. Barre d'échelle= 100  $\mu$ m

## Résultats

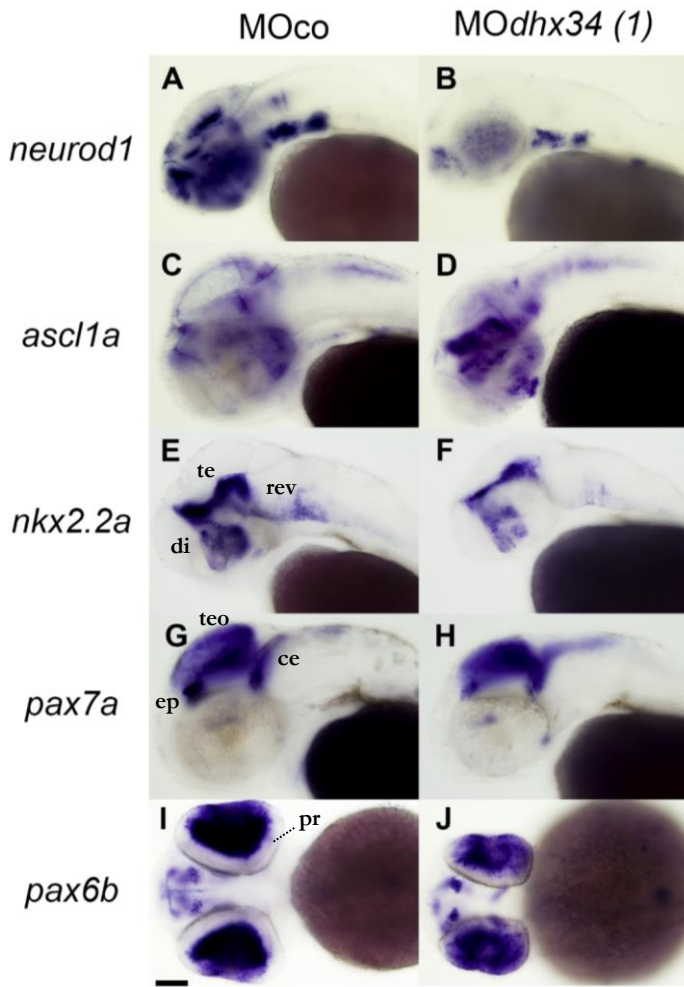
L'absence d'anticorps en immunohistochimie ou de lignée transgénique spécifique à l'AH, ne nous permet malheureusement pas d'analyser la prolifération ni la mort cellulaire spécifiquement dans l'AH. A défaut, nous nous contentons donc d'une analyse globale.

Sur la [Figure II.19] nous pouvons voir que chez les morphants, la prolifération cellulaire à 28 et 48 hpf est similaire aux contrôles, alors qu'à 36 hpf elle semble être augmentée, et ce de manière générale dans la tête de l'embryon. Ceci est particulièrement intéressant puisque cette accentuation du taux prolifératif suit de près l'augmentation de la signalisation Hh.

Nous avons également constaté qu'entre 48 et 72 hpf, le nombre de cellules endocrines adénohypophysaire augmente largement. Afin d'essayer d'évaluer si cela résulte d'une augmentation de la différenciation ou un taux de prolifération supérieur à des stades plus tardifs, nous avons réalisé une incorporation d'EdU entre 50 et 72 hpf, et observé le résultat à 72 hpf [Figure II.20]. En vue latérale on constate que la prolifération globale est amoindrie chez les morphants par rapport aux embryons contrôle. Ces données nous permettent donc de penser que l'augmentation du nombre de cellules endocrines constatée à 72 hpf, correspond à un taux prolifératif des progéniteurs de l'AH supérieur à 36hpf ainsi qu'à la différenciation de ces cellules lors des étapes ultérieures.

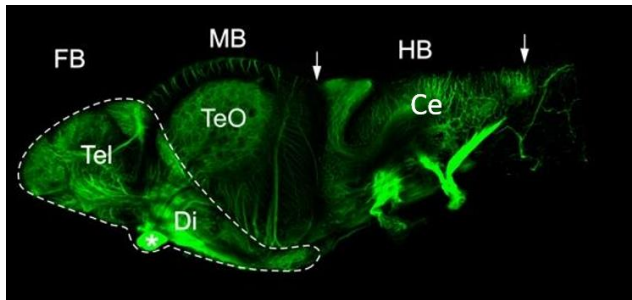
Nous avons également testé l'apoptose induite par la diminution d'expression de *dhx34* et *nbas* via coloration *in vivo* à l'acridine orange. Le principe de cette méthode repose sur le fait que l'acridine orange est capable de s'intercaler dans les cassures de l'ADN génomique des cellules en mort cellulaire (255, 256). En conséquence les cellules apoptotiques vont absorber le fluorophore au contraire des cellules vivantes. Nous pouvons voir sur la [Figure II.21] qu'à 3 dpf, les morphants présentent une augmentation de l'apoptose au niveau de la mâchoire ainsi que dans la région otique. En dehors de ces zones, l'injection des morpholinos *dhx34* ou *nbas* ne semble pas induire de mort cellulaire.





### Figure II.22: Cerveau

Formation du cerveau observée à 48 hpf et révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNms de *neurod1* (**A** et **B**), de *ascl1a* (**C** et **D**), de *nkx2.2a* (**E** et **F**), *pax7a* (**G** et **H**), *pax6b* (**I** et **J**). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (**A**, **C**, **E**, **G** et **I**), 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (**B**, **D**, **F**, **H** et **J**). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche. di: diencéphale; te: tegmentum; rev: rhombencéphale ventral; ep: épiphyse; teo: tectum optique; ce: cerebellum; pr: couche photoréceptrice. Barre d'échelle= 100 µm



### Figure II.23: Structure du cerveau

Le cerveau du poisson zèbre est divisé en 3 grandes parties: le proencéphale (FB) ou cerveau antérieur, le mésencéphale (MB) ou cerveau moyen et le rhombencéphale (HB) ou le cerveau postérieur. Le proencéphale (délimité par des pointillés) est constitué du diencéphale (Di) et du télencéphale (Tel). Le mésencéphale comprend le tectum optique (TeO) et le tegmentum. Le rhombocéphale (délimité par des flèches) comprend le cervelet et le bulbe rachidien. Vue latérale d'un embryon de 5 dpf marqué par un anticorps contre la tubuline acétylée. Les yeux et la peau de l'embryon ont été retirés. L'astérisque marque le tractus optique. Adapté de <http://zebrafishbrain.org/tutorial.php>



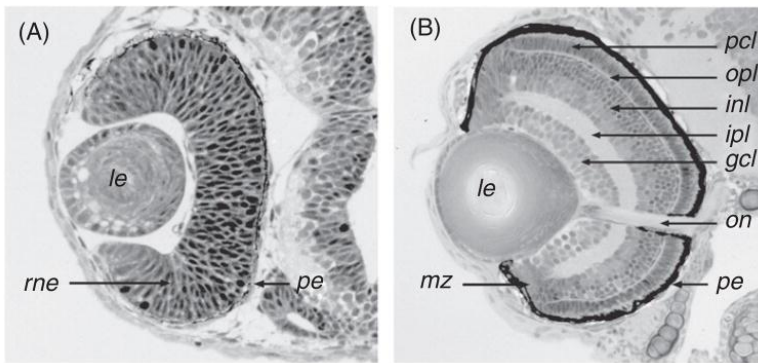
## II.5 Effets sur d'autres tissus

Au cours de notre étude, nous avons prouvé que l'inhibition du NMD mène à une formation adénohypophysaire aberrante ainsi qu'un dérèglement des voies de signalisation Hedgehog, Fibroblast Growth Factor et Notch. Nous avons pu constater que ce dérèglement signalétique n'est pas restreint à l'hypophyse, mais touche tout l'organisme. Par conséquent, il est plus que probable que d'autres tissus soient également affectés par le blocage de la voie NMD. Grâce à l'injection du morpholino ciblant *dhx34*, nous fournissons ici une vue d'ensemble des principaux défauts affectant les divers systèmes biologiques à 48 hpf.

### II.5.A Système nerveux

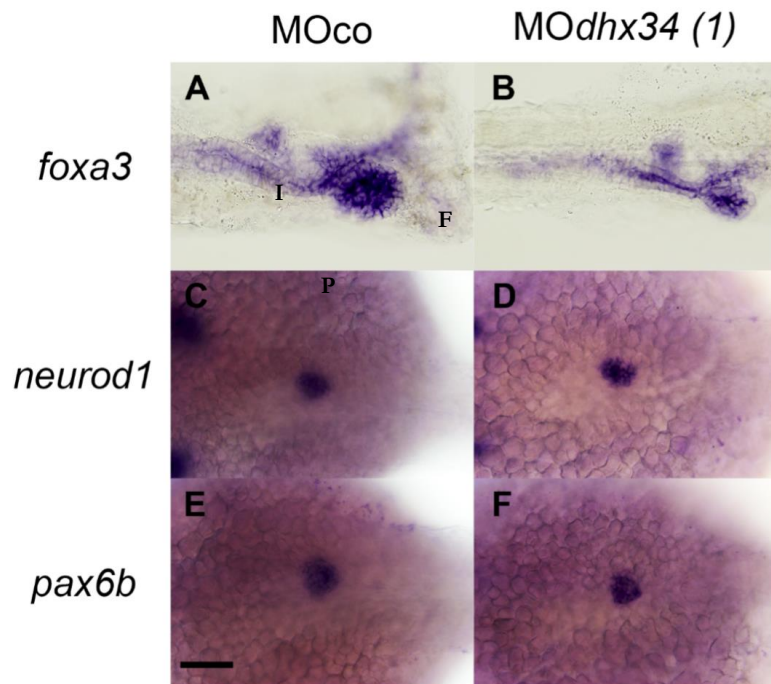
Tout au long de notre étude de l'AH, nous avons déjà pu noter quelques défauts au niveau du système nerveux central (SNC), par exemple nous avons vu une diminution de l'expression de *lhx3* dans le cerveau ainsi qu'au niveau de la notochorde [Figure II.12 A-C]. Afin de confirmer l'atteinte du SNC, nous avons marqué l'expression de *neurod1*, un facteur de transcription essentiel pour la différenciation neuronale (257-260) [Figure II.22 A et B]. A 48 hpf, *neurod1* est exprimé dans tout le cerveau à l'exception de 4 régions : le sous-pallium, la région pré-optique, le thalamus ventral et l'hypothalamus (260). L'injection du morpholino *dhx34* mène à une forte diminution de l'expression céphalique de *neurod1*, telle qu'au niveau du télencéphale, du diencephale, du mésencéphale et du rhombencéphale ; indiquant une forte altération de la formation du cerveau [Figure II.23]. L'expression de *neurod1* dans les yeux est également fortement réduite dans les morphants comparés aux contrôles. *neurod1* étant nécessaire dans la rétine pour la différenciation et la maintenance des photorécepteurs, cette diminution suggère donc un défaut dans cette lignée cellulaire de la rétine (261). Au sein des quatre domaines du cerveau dans lesquels *neurod1* est exclu, c'est un autre facteur bHLH (*basic helix-loop-helix*), *Ascl1a*, qui est responsable de la différenciation des neurones (262). Comme nous avons pu le constater précédemment, l'expression neurale de *ascl1a* est augmentée chez les morphants comparés aux embryons contrôles [Figure II.22 C et D]. Cette augmentation est principalement marquée au niveau du thalamus. Il est donc très intéressant de remarquer que les deux facteurs de transcription bHLH responsables de la différenciation des neurones réagissent différemment à la diminution d'expression de *dhx34*, *neurod1* étant réprimé tandis que *ascl1a* est induit.

Grâce au marquage de *shha*, nous avons précédemment constaté une augmentation de son expression dans le diencephale, mais sans que la structure de celui-ci ne soit



### Figure II.24: Structure de l'oeil

Coupe histologiques dans la rétine du poisson zèbre. (A) Section à travers un oeil durant les stades précoces de la neurogénèse rétinienne à environ 36hpf. A ce stade la rétine est constituée principalement par 2 couches épithéliales: l'épithélium pigmentaire (pe) et le neuroépithélium rétinien (rne). (B) Section à travers un oeil à 72 hpf, stade auquel la neurogénèse rétinienne est presque finie. gcl: couche cellulaire ganglionnaire; inl: couche nucléaire intérieure; ipl: couche plexiforme intérieure; le: cristallin; mz: zone marginale; on: nerf optique; opl: couche plexiforme extérieure; pcl: couche de cellules photoréceptrices; pe: épithélium pigmentaire. Tiré de Malicki, J., Pooranachandran, N., Nikolaev, A., Fang, X. and Aanesov, A. (2016) *Analysis of the retina in the zebrafish model*. In *Methods in Cell Biology*. Vol. 134, pp. 257–334.



### Figure II.25: Appareil digestif

Formation de l'intestin, du foie et du pancréas observée à 48 hpf et révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNm de *foxa3* (A et B), de *neurod1* (C et D) et de *ascl1a* (E et F). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (A, C et E), 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (B, D et F). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche. F: foie; I: intestin; P: pancréas. Barre d'échelle= 100 µm

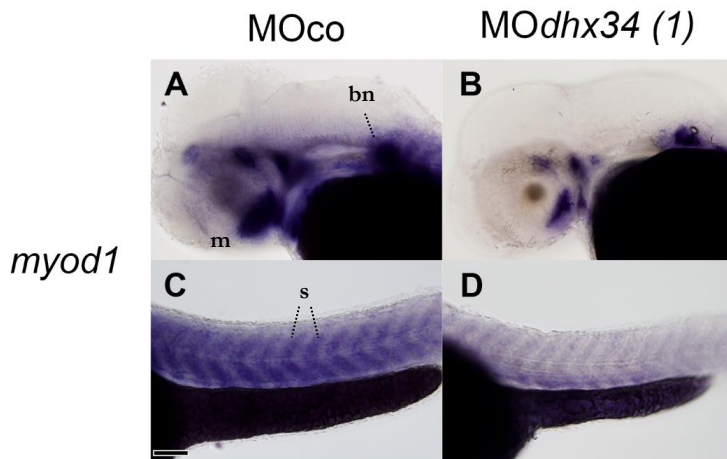
foncièrement altérée. Afin de vérifier cela, nous avons marqué l'expression du gène *nkx2.2a*, *Nkx2.2a* est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation neuronale et est exprimé dans le diencephale, dans le tegmentum et le rhombencéphale ventral (263, 264). On constate que bien que l'expression du gène soit réduite dans les morphants, indiquant des problèmes de différenciation, la structure du tissu ne semble pas compromise ; exception faite d'un amincissement du tegmentum [Figure II.22 E et F]. Il est important de remarquer que la voie de signalisation Shha régule l'expression de *nkx2.2a* (263). Le gène *pax7a* est exprimé principalement par l'épiphyse, le tectum optique et le cerebellum, on observe ici que la diminution d'expression de *dhx34* provoque une réduction de la taille de l'épiphyse et du tectum optique, mais sans que l'expression de *pax7a* ne soit autrement altérée [Figure II.22 G et H].

Au cours de l'analyse morphologique, nous avons également pu constater des défauts au niveau des yeux, grâce à l'expression de *pax6b* nous sommes en mesure de confirmer ces défauts puisque son expression est visiblement réduite [Figure II.22 I-J]. Chez les embryons contrôles *pax6b* est exprimé dans toutes les couches de l'œil à l'exception de la couche contenant les photorécepteurs [Figure II.24]. Chez les morphants, on peut voir que cette couche est sensiblement réduite, ce qui corrobore parfaitement avec la diminution de *neurod1* dans la rétine. De plus il apparaît que l'expression de *pax6b* est augmentée dans le cerveau, principalement dans le diencephale.

### II.5.B Appareil digestif

*foxa3* (*forkhead box A3*) est un facteur de transcription exprimé dans les précurseurs endodermiques dès la gastrulation et permet de marquer l'appareil digestif, puisqu'il est exprimé dans l'intestin, le foie ainsi que le pancréas (265). On constate sur la [Figure II.25 A et B] que l'intestin est fortement réduit en taille, la lumière de celui-ci étant réduite au minimum chez les morphants. Le foie est également fortement réduit lors du « knock-down » de *dhx34*.

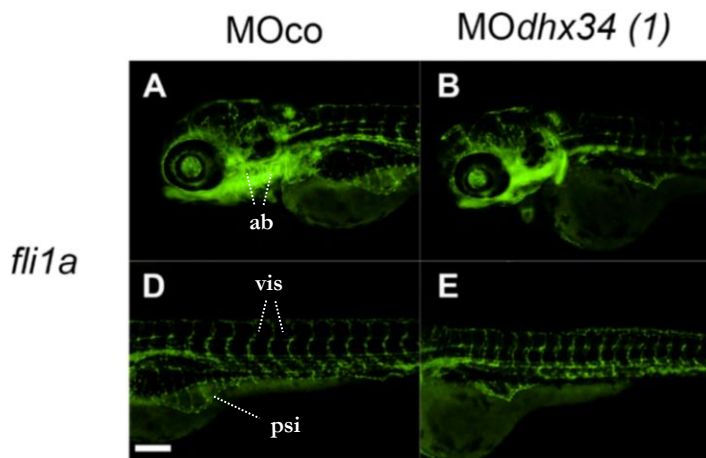
Le pancréas est une glande faisant partie à la fois du système digestif, puisqu'il produit le suc pancréatique et du système endocrinien puisqu'il produit de nombreuses hormones. Les facteurs de transcription *Neurod1* et *Pax6b* sont exprimés dans tout le pancréas endocrine et sont impliqués dans la différenciation des différentes lignées endocrines (266, 267). Chez les morphants *dhx34*, le tissu pancréatique ne semble pas être touché, comme le montre l'expression normale de *neurod1* et de *pax6b* dans les cellules endocrines pancréatiques [Figure II.25 C-F].



### Figure II.26: Muscles

Formation des muscles squelettiques observée à 48 hpf et révélée par hybridation *in situ* visible marquant les ARNm de *myod1* (**A**, **B**, **C** et **D**). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (**A** et **C**), 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (**B** et **D**). Afin d'avoir une vue globale, chaque embryon est représenté par une photographie de sa tête et de son tronc. Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche. bn: bourgeon de la nageoire pectorale; m: muscles de la mâchoire; s: muscles des somites.

Barre d'échelle= 100  $\mu$ m



### Figure II.27: Système vasculaire

Formation du système vasculaire observée à 48 hpf et révélée grâce au transgénique *fli1a:eGFP* (**A**, **B**, **C** et **D**). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (**A** et **C**), 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (**B** et **D**). Afin d'avoir une vue globale, chaque embryon est représenté par une photographie de sa tête et de son tronc. Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche. ab: arcs branchiaux; vis: vaisseaux intersegmentaires; psi: plexus sous-intestinal.

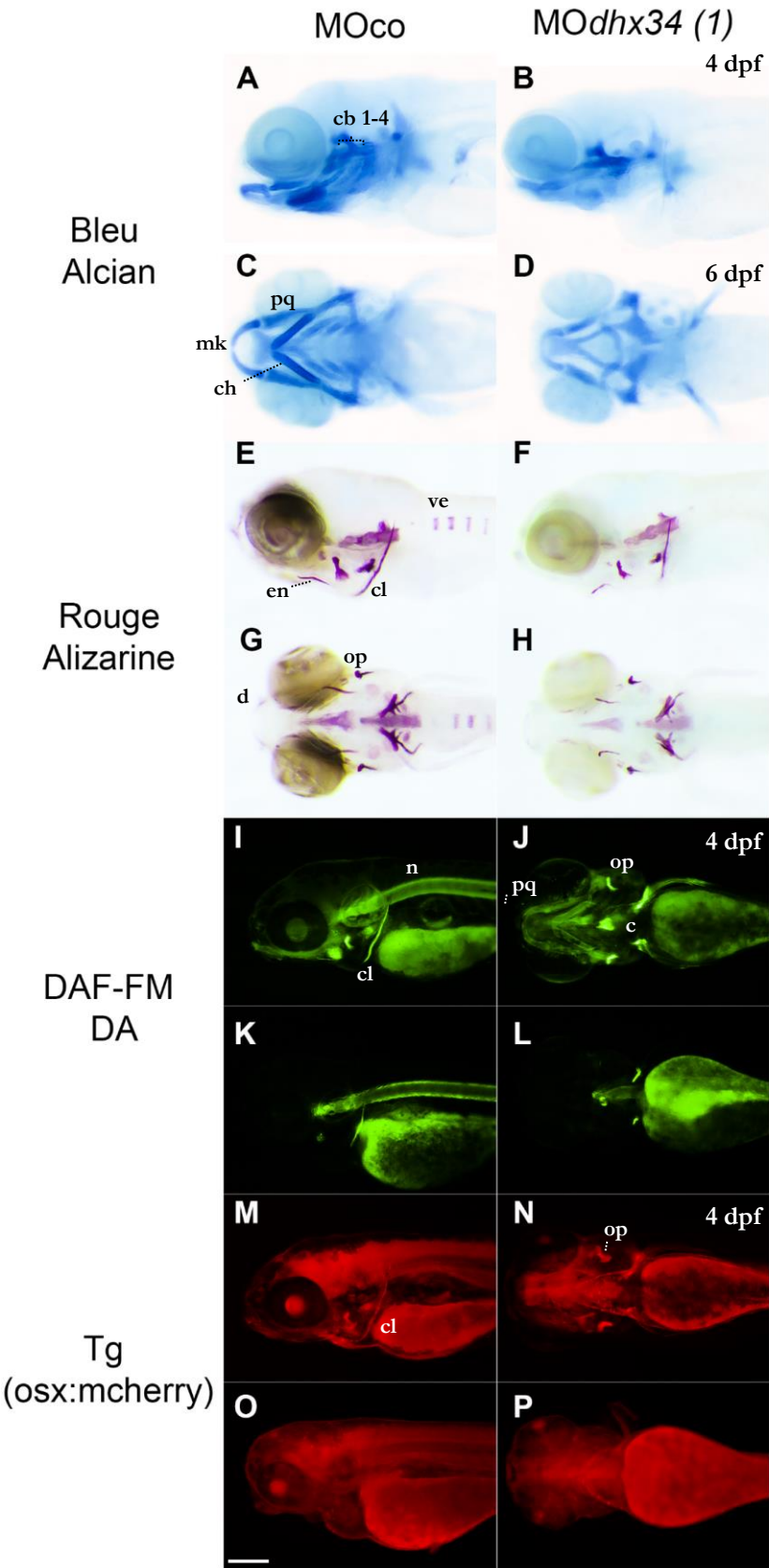
Barre d'échelle= 100  $\mu$ m

### II.5.C Système musculaire

Un autre défaut préalablement décrit est une atteinte des somites, ce qui induit une queue courbée. Afin de vérifier si la diminution d'expression de *dhx34* mène effectivement à des défauts au niveau des muscles, nous avons marqué l'expression de *myod1*. Myod1 est un facteur de transcription nécessaire afin d'induire la myogenèse des muscles squelettiques crâniens, somitiques et des nageoires pectorales (268). On peut clairement voir sur la [Figure II.26] que l'injection du morpholino ciblant *dhx34* induit une diminution sévère de l'expression de *myod1* au niveau des somites, mais aussi au niveau des muscles crâniens et des nageoires. Cette diminution d'expression va compromettre la formation des fibres musculaires de ces structures. Une insuffisance musculaire va être très handicapante pour les embryons à partir du moment où ils doivent se nourrir, c'est-à-dire à partir du cinquième jour de développement, ce qui compromet fortement la survie des animaux au-delà de 5 dpf. De plus, il a été montré que, dans les lignées mutantes et via « knock-down » de *myod1*, l'absence de muscles induit des défauts cartilagineux et osseux (268).

### II.5.D Système vasculaire

Le système vasculaire composé des cellules endothéliales et des cellules hématopoïétiques est un dérivé mésodermique vital. Bien que la petite taille des embryons de poisson zèbre permette une oxygénation par diffusion suffisante au cours des premiers jours de développement, l'apport et la distribution dans le corps de nutriments à partir du jaune est nécessaire à la survie des embryons. Le gène *fli1a* permet de marquer les cellules endothéliales ainsi que les arcs branchiaux [Figure II.27]. L'injection du morpholino *dhx34* ne semble pas altérer l'expression endothéliale de *fli1a* au niveau de la tête, alors que dans le tronc on constate que le réseau vasculaire présente de nombreux défauts structurels, tels qu'au niveau des vaisseaux du plexus sub-intestinal ou des vaisseaux intersegmentaires. Il est très intéressant de remarquer que l'angiogenèse de ces deux types de vaisseaux est, en plusieurs points, différente : par exemple, alors que les vaisseaux intersegmentaires requièrent les signalisations de Sonic hedgehog et de Notch pour leur formation, les vaisseaux sub-intestinaux semblent indépendants de ces voies de signalisation et semblent reposer davantage sur la signalisation Bmp pour leur croissance (269, 270). L'altération des vaisseaux intersegmentaires est à mettre en relation avec les défauts somitiques préalablement observés. De plus, on constate que l'expression de *fli1a* dans les arcs branchiaux est fortement diminuée dans les morphants, ce qui suggère des défauts squelettiques éventuels, puisque ces cellules correspondent aux précurseurs des chondrocytes qui vont former une partie du squelette crânien.



**Figure II.28: Système squelettique**

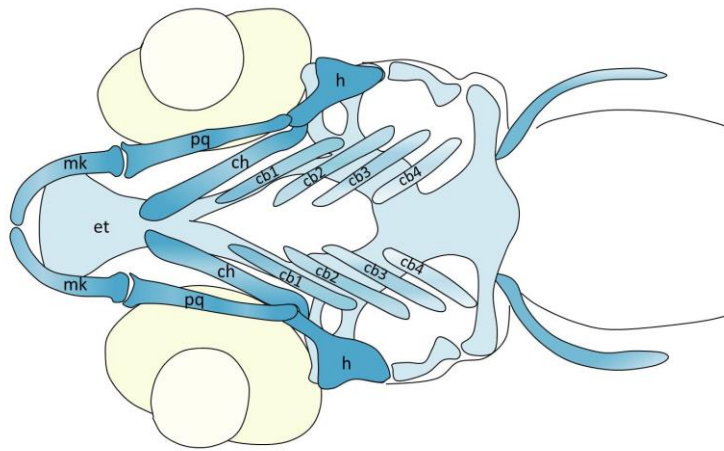
La formation du squelette cartilagineux est révélée par coloration au bleu alcian (**A-D**) et celle du squelette osseux est révélée par coloration au rouge d'alizarine (**E-H**). La production d'oxyde nitrique des cellules squelettiques, de la notochorde et d'une partie du coeur est marquée par coloration au DAF-FM DA (**I-L**). La présence des ostéoblastes matures est révélée grâce au transgène *osx:mCherry* (**M-P**). Embryons injectés avec 4 ng de morpholino contrôle (**A, C, E, G, I, K, M** et **O**) ou 4 ng de morpholino (1) ciblant *dhx34* (**B, D, F, H, J, L, N** et **P**). Les embryons sont présentés en position ventrale, partie rostrale orientée à gauche. c: coeur; cb 1-4: arcs cerato-branchiaux 1-4; ch: arc cératohyalin; cl: cleitrum; d: dentaire; en: entoptérygoïde; mk: cartilage de meckel; n: notochorde; pq: palattocarré; op: opercule; ve: vertèbres

Barre d'échelle= 200 µm

## II.5.E Système squelettique

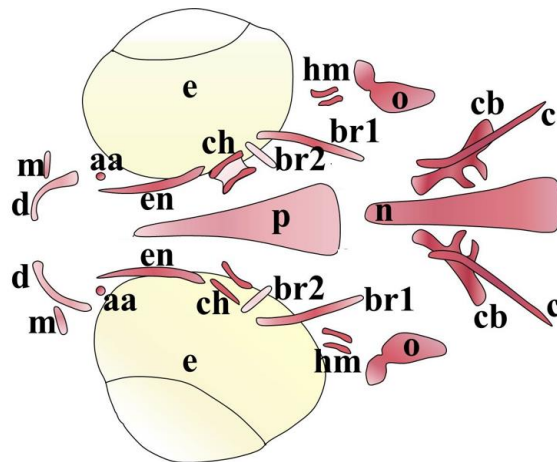
Dernier, mais pas des moindres, le système squelettique se développe dès 48 hpf avec la formation du squelette cartilagineux et l'apparition des premières ébauches osseuses [Figure II. 29 et Figure II.30]. La coloration au bleu alcian, qui marque la matrice cartilagineuse, nous permet de constater qu'à 4 dpf, la formation cartilagineuse est fortement altérée chez les morphants *dhx34* [Figure II.28 A-D]. Nous pouvons observer une disparition des arcs pharyngiens, ainsi qu'un sous-développement de l'arc cérato-hyalin et du palatocarré, ainsi que du cartilage de Meckel. Marqué par le rouge alizarine, le squelette osseux présente à 6 dpf des pièces ossifiées réduites en nombre et en taille lors du « knock-down » de *dhx34*. Par exemple les vertèbres ne sont pas ossifiées et l'opercule, le dentaire et l'arc cérato-branchial 5 sont fortement réduits [Figure II.28 E-H]. Afin de comprendre un peu mieux ce qui se passe au niveau squelettique, nous avons décidé d'utiliser la coloration au DAF-FM DA permettant de marquer *in vivo*, la production d'oxyde nitrique [Figure II.28 I-L]. Cette coloration, qui marque des cellules du cœur, de la notochorde et du squelette cartilagineux et osseux, nous permet de rendre compte de l'activité métabolique de ces cellules. Grâce au marquage DAF-FM DA à 4 dpf, nous pouvons constater que la diminution d'expression de *dhx34* induit une très forte diminution d'activité des cellules squelettiques et cardiaques, alors que la notochorde semble avoir une production d'oxyde nitrique comparable aux contrôles. La question de savoir si cela est dû à une diminution du nombre de cellules squelettique, ou si seule leur activité est réduite, peut être adressée grâce à l'utilisation de la lignée transgénique *osx :mCherry* [Figure II.28 M-P]. Ostérix est un facteur de transcription essentiel pour la maturation des ostéoblastes. Nous constatons que l'injection du morpholino *dhx34* induit, à 4 dpf, une forte réduction du nombre de cellules exprimant ostérix et donc une forte diminution du nombre d'ostéoblastes matures. Le bruit de fond rouge est dû à la rhodamine dextran présente dans le mix d'injection des morpholinos. Il est important de remarquer que l'efficacité des morpholinos diminue avec le temps et la croissance de l'embryon, ainsi on considère qu'au-delà du quatrième jour de développement les morpholinos ne mènent plus à une diminution d'expression du gène cible efficace. Le phénotype osseux que nous constatons ici est donc dû à des effets précoces sur la formation des os.





### Figure II.29: Squelette cartilagineux

Schéma représentant les différentes pièces du cartilage crânien d'un embryon de poisson zèbre à 10 dpf. Vue ventrale partie rostrale orientée à gauche. mk: cartilage de Meckel; et: plaque ethmoïde; pq: palatocarré; ch: cartilage cératohyalin; h: cartilage hyosimplétique; cb: arcs cératobranchiaux 1 à 4. Tiré de Aceto, J., Nourizadeh-Lillabadi, R., Marée, R., Dardenne, N., Jeanray, N., Wehenkel, L., Alestrom, P., Van Loon, J.J.W.A. and Muller, M. (2015) Zebrafish bone and general physiology are differently affected by hormones or changes in gravity. *PLoS One*, 10.



### Figure II.30: Squelette osseux

Schéma représentant les différentes pièces osseuses du crâne d'un embryon de poisson zèbre à 10 dpf. Vue ventrale partie rostrale orientée à gauche. d: dentaire; m: maxillaire; aa: os angulo-articulaire; en: entoptérygoïde; ch: os cératohyalin; e: oeil; p: parasphénoïde; br: rayon branchiostégal 1 et 2; hm: os hyomandibulaire; o: opercule; cb: cératobranchial 5; c: cleithrum; n: notochorde. Tiré de Aceto, J., Nourizadeh-Lillabadi, R., Marée, R., Dardenne, N., Jeanray, N., Wehenkel, L., Alestrom, P., Van Loon, J.J.W.A. and Muller, M. (2015) Zebrafish bone and general physiology are differently affected by hormones or changes in gravity. *PLoS One*, 10.



# III. Conclusions & Discussion

*« When you have eliminated the impossible,  
whatever remains, however improbable, must be  
the truth »*

SIR ARTHUR CONAN DOYLE

Gène	Localisation	Début d'expression	MO <i>dhx34</i> & MO <i>nbas</i>		
			1dpf	2dpf	3dpf
<i>pomca</i>	aPD & PI	24 hpf	↓	—	↑
<i>pomcb</i>	aPD	ND	ND	—	—
<i>prl</i>	aPD	23 hpf	↑	↑	↑
<i>cga</i>	pPD	32 hpf	NE	—	↑
<i>tsh6</i>	pPD	42 hpf	NE	↓	↑
<i>gh</i>	pPD	44 hpf	NE	↓	—
<i>sl6</i>	pPD	23 hpf	↓	↓	↓
<i>lh6</i>	pPD	72hpf	NE	NE	↑

**Tableau III.1: Résumé des effets des MOs sur l'expression hormonale de l'AH**

Les effets des morpholinos ciblant *dhx34* et *nbas* sur l'expression des gènes hormonaux de l'adénohypophyse à 1, 2 et 3 dpf par rapport aux embryons contrôles sont résumés dans ce tableau. Une flèche verte indique une diminution d'expression, une flèche rouge une augmentation d'expression et une barre bleue indique que l'expression du gène est inchangée. ND: pas de donnée pour ce stade; NE: pas d'expression à ce stade.

MO <i>dhx34</i> & MO <i>nbas</i>	
Gène	2dpf
<i>lhx3</i>	↑
<i>pitx3</i>	↑
<i>ascl1a</i>	↑
<i>pou1f1</i>	↑
<i>eya1</i>	↑
<i>pax7a</i>	↑

**Tableau III.2: Résumé des effets des MOs sur l'expression des facteurs de transcription majeurs de l'AH**

Les effets des morpholinos ciblant *dhx34* et *nbas* sur l'expression des principaux facteurs de transcription contrôlant la formation de l'adénohypophyse à 2 dpf par rapport aux embryons contrôles sont résumés dans ce tableau. Une flèche verte indique une diminution d'expression, une flèche rouge une augmentation d'expression et une barre bleue indique que l'expression du gène est inchangée. ND: pas de donnée pour ce stade; NE: pas d'expression à ce stade.

Gène	MO <i>dhx34</i> & MO <i>nbas</i>	
	1dpf	2dpf
<i>ptch1</i>	—	↑
<i>ptch2</i>	ND	↑
<i>shha</i>	—	↑
<i>shhb</i>	—	↑
<i>fgf3</i>	↑	—
<i>tp1glob</i>	↓	↓
<i>her6</i>	ND	↑
<i>dla</i>	↓	↑

**Tableau III.3: Résumé des effets des MOs sur les voies de signalisation**

Les effets des morpholinos ciblant *dhx34* et *nbas* sur l'expression de gènes impliqués dans les voies de signalisation contrôlant la formation de l'adénohypophyse à 1 et 2 dpf par rapport aux embryons contrôles sont résumés dans ce tableau. Une flèche verte indique une diminution d'expression, une flèche rouge une augmentation d'expression et une barre bleue indique que l'expression du gène est inchangée. ND: pas de donnée pour ce stade; NE: pas d'expression à ce stade.

Notre étude, à l'origine basée sur un criblage génétique visant à découvrir de nouveaux régulateurs de la formation de l'adénohypophyse (AH), nous a permis de mettre en évidence l'impact surprenant qu'a l'absence de l'hélicase à ARN Dhx34. Via une diminution d'expression induite par injection de morpholinos anti-sens ainsi que l'élaboration de lignées mutantes déficientes en *dhx34*, nous avons pu mettre en évidence que ce gène est requis afin de permettre une régulation adéquate de la différenciation des différentes populations de cellules endocrines composant l'adénohypophyse [Tableau III.1]. Cette altération des lignées endocrines s'accompagne d'une augmentation de l'expression des principaux facteurs de transcription à 48 hpf impliqués dans l'induction, la prolifération, la spécification, la différenciation et la survie des différentes cellules endocrines [Tableau III.2]. Nous avons été capables de déterminer que les défauts observés au niveau de l'AH relèvent probablement d'une dérégulation de la dynamique des voies de signalisation Sonic Hedgehog, Notch et Fgf3, régissant le développement de la glande endocrine [Tableau III.3]. Cette dérégulation signalétique n'étant pas confinée à l'AH, nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact qu'a cette modulation des voies de signalisation sur d'autres tissus [Tableau III.4]. Ainsi nous avons pu mettre en lumière des problèmes développementaux induits par la diminution d'expression de *dhx34* au niveau des tissus nerveux, musculaire, endothélial, intestinal, hépatique et squelettique. Enfin, étant donné que Dhx34 est un acteur central de la voie NMD, la similitude entre les défauts induits par l'absence de Dhx34 et ceux induits par un autre acteur de la voie, Nbas, suggère fortement que la voie de régulation des ARNm *Nonsense-mediated Decay* est impliquée dans la régulation des voies de signalisation contrôlant le développement embryonnaire. Au cours de la discussion ci-dessous nous analyserons en détail les différents résultats obtenus et nous nous évertuerons à en tirer les conclusions qui nous semblent les plus adéquates.

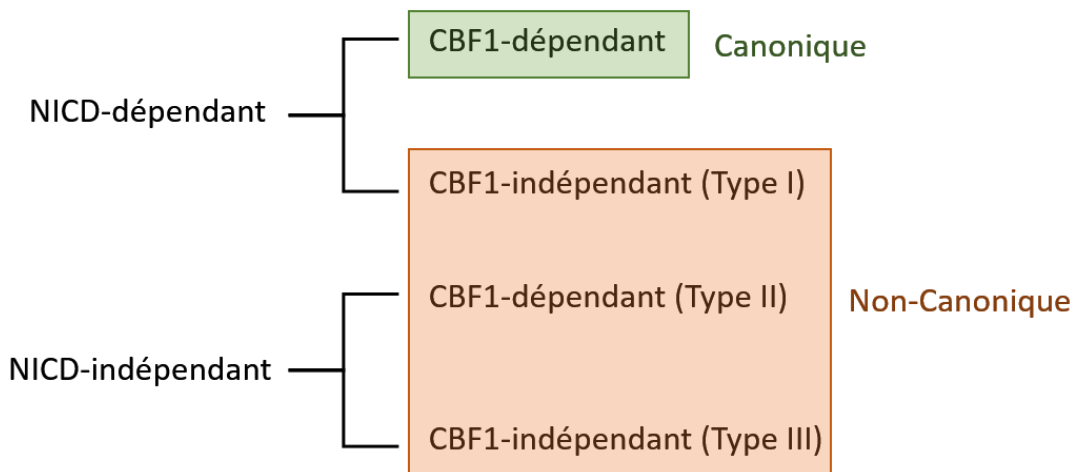
### III.1 Impacts développementaux

Notre étude fonctionnelle des gènes *dhx34* et *nbas* nous a permis de déterminer que ces deux acteurs de la voie *Nonsense-mediated Decay* (NMD) sont requis pour un contrôle des voies de signalisations [Tableau III.3]. La diminution d'expression de *dhx34* ou *nbas* induit en effet une dérégulation des voies de signalisation Sonic Hedgehog, Fibroblast growth factor 3 et Notch. Loin d'être restreinte à un tissu en particulier, cette dérégulation touche tout l'embryon et a un caractère dynamique puisque, suivant le stade de développement considéré, les différentes voies de signalisation subissent des modifications spécifiques. La signalisation Sonic Hedgehog semble normale à 28 hpf, alors qu'à 48 hpf, les embryons déficients en Dhx34 ou en Nbas montrent une

		MO <i>dhx34</i>
Tissu	Gène/ Marquage	Effet
Nerveux	<i>neurod1</i>	↓
	<i>ascl1a</i>	↑
	<i>nkx2.2a</i>	↓
	<i>pax7a</i>	↓
	<i>pax6b</i>	↑
Intestinal & hépatique	<i>foxa3</i>	↓
Pancréatique	<i>neurod1</i>	—
	<i>pax6b</i>	—
Musculaire	<i>myod1</i>	↓
Endothélial	<i>fli1a</i>	AS
cartilagineux	Bleu alcian	↓
	DAF-FM DA	↓
Osseux	Rouge alizarine	↓
	DAF-FM DA	↓
	<i>osx</i>	↓

**Tableau III.4: Résumé des effets des MOs sur l'expression de différents marqueurs tissulaires**

Les effets des morpholinos ciblant *dhx34* et *nbas* sur l'expression de gène permettant de marquer divers tissus par rapport aux embryons contrôles sont résumés dans ce tableau. Une flèche verte indique une diminution d'expression, une flèche rouge une augmentation d'expression et une barre bleue indique que l'expression du gène est inchangée. AS: Altération structurelle.



**Figure III.1: Différents types de voies Notch**

Classification des différents types de signalisation Notch. Adapté de Sanalkumar, R., Dhanesh, S.B. and James, J. (2010) Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67, 2957–2968.

## Conclusions & Discussion

suractivité de la voie Hedgehog, en accord avec une forte augmentation de l'expression des ligands Shha et Shhb. L'expression du ligand Fgf3 est quant à elle augmentée à 28 hpf chez les morphants, alors que son expression est normale à 48 hpf.

Le cas de la voie Notch est plus complexe, en effet nous avons constaté une diminution de l'expression du gène rapporteur *tp1glob-GFP* à 28 et 48 hpf, une augmentation de l'expression du gène cible *her6* à 48 hpf et une diminution de l'expression du ligand DeltaA à 28 hpf puis une augmentation de celle-ci à 48 hpf. La voie Notch canonique fait intervenir la liaison d'un ligand (Delta ou Jagged) à un récepteur Notch ainsi que l'activité transcriptionnelle de CBF1 (aussi connu sous le nom RBP-J $\kappa$ ); il existe cependant 3 types voies Notch non-canoniques [Figure III.1]. Le transgène *tp1glob-GFP* contient de nombreux sites de liaison à CBF1 et constitue donc un bon rapporteur de l'activité de la voie Notch canonique, mais pourrait également être activé par la voie non-canonique de type II indépendamment de la liaison d'un ligand au récepteur Notch. Le gène cible de Notch *her6* est un bon rapporteur de l'activité de la signalisation Notch, puisque son expression peut être induite par toutes les voies (canonique, type I, type II et type III). Le ligand DeltaA est quant à lui capable d'activer la voie canonique, mais également la voie non-canonique de type I. Il convient cependant de garder à l'esprit que la voie Notch peut être activée par de nombreux autres ligands; chez le poisson zèbre on dénombre 4 ligands Delta, 3 ligands Delta-like et 4 ligands Jagged. Il est donc possible que bien que *dla* soit augmenté à 48 hpf, d'autres ligands de la voie Notch soient diminués, résultant en une diminution globale de la voie canonique. Il nous semble donc que le plus probable est que la signalisation Notch canonique est diminuée à 28 et 48 hpf, comme démontré par le transgène *tp1glob-GFP*, nous ne pouvons cependant pas exclure l'activation d'une voie non canonique de Notch à 48 hpf, comme le suggère la sur-expression de *her6* à 48 hpf.

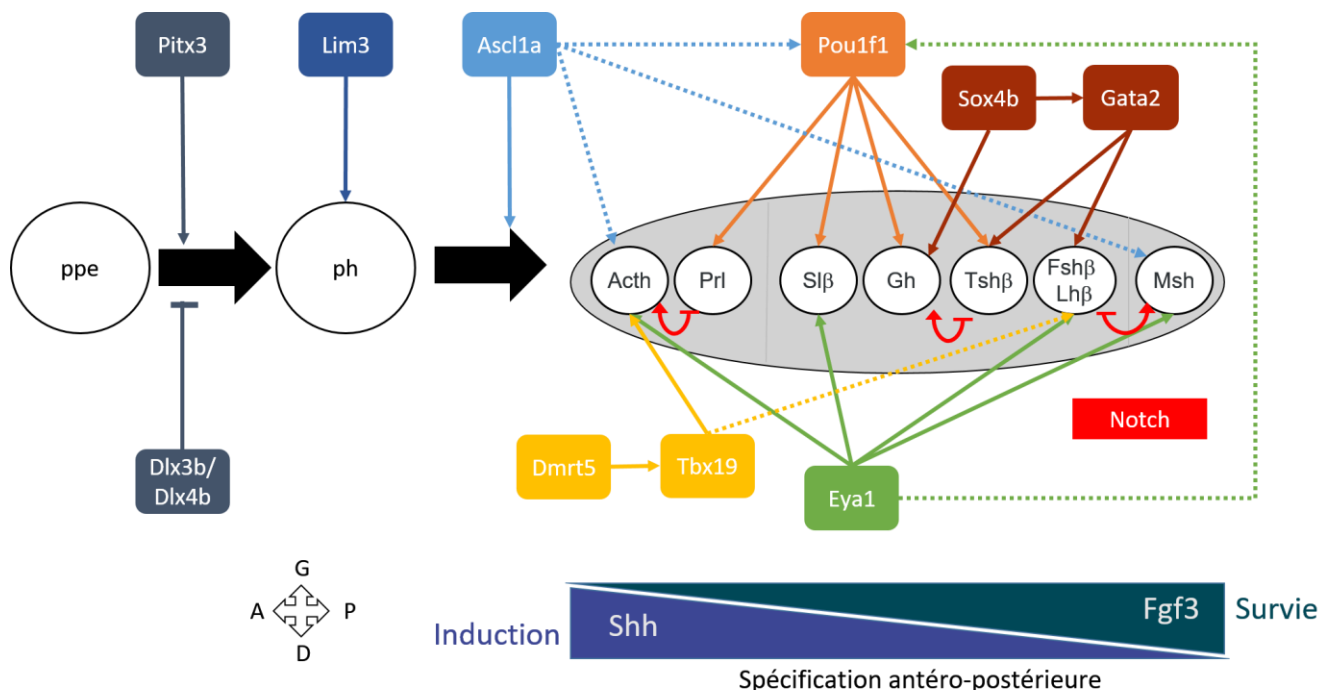
Comme l'on pourrait s'attendre d'une telle altération signalétique, la diminution d'expression de *dhx34* compromet sévèrement le développement de l'embryon du poisson zèbre. En plus de l'altération profonde que subit le développement de l'adénohypophyse, nous avons également pu prouver que les embryons présentent de graves problèmes de structuration du cerveau et des yeux, une myogenèse réduite, un intestin et un foie largement réduit en taille ainsi qu'un squelette et un système cardiovasculaire fortement altérés. Il est important de remarquer que, bien qu'altérés, tous les tissus atteints par la diminution d'expression de *dhx34* ont été d'abord correctement formés. Lors des étapes initiales de la formation de l'embryon, les différentes voies de signalisation jouent un rôle capital et même vital dans la structuration de l'embryon (271-274). Etant donné que ces étapes de structuration ne sont pas affectées dans les morphants, il semble que la dérégulation des voies de signalisation ne survienne que relativement tard dans le développement. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait



## Conclusions & Discussion

intéressant de tester l'activité des voies de signalisation à des stades plus précoces. Il est à noter que *dhx34* et *nbas* sont des facteurs maternels, les morpholinos d'épissage et les mutants n'agissant pas sur les ARNm maternels, les premiers processus du développement zygotique ne seraient donc pas affectés.

Axés sur le développement de l'adénohypophyse (AH), nous nous sommes limités à l'étude des voies Shh, Fgf3 et Notch. L'étude de Longman *et al.*, qui compare la modification d'expression génique par microarray lors du « knock-down » de *upf1*, *dhx34* et *nbas* chez le poisson zèbre, nous permet de suggérer que d'autres voies de signalisation seraient également touchées (100). Sous réserve de confirmation, il semble que la voie Wnt soit également influencée par le blocage de la voie NMD, puisque leurs données indiquent une surexpression des ligands Wnt3a et Wnt8a. Toujours sur base de leurs résultats, il semble que le signal Fgf3 ne soit pas le seul ligand de la voie Fgf à être affecté puisque l'expression de Fgf8a est augmentée chez les morphants *dhx34* et *nbas*. Ceci est particulièrement intéressant puisque les signaux Fgf3 et Fgf8 collaborent et sont partiellement redondants dans le cadre de nombreux processus développementaux (275–278). Nous n'avons malheureusement pas pu corroborer nos résultats avec ceux de cette analyse de microarray ; ces résultats divergents peuvent être expliqués par plusieurs facteurs. Premièrement, le stade étudié n'est pas le même, l'étude de Longman analyse les embryons à 24 hpf alors que nous les observons au plus tôt à 28 hpf. Cette différence de 4 heures peut paraître insignifiante, mais est en fait tout à fait conséquente étant donné la rapidité du développement du poisson zèbre (passage du stade pharyngula Prim-5 à Prim 15) (9). Deuxièmement, au cours de leur étude, la diminution d'expression de *dhx34* ou *nbas* fut réalisée avec 8 ng de morpholino, ce qui est largement plus élevé que les concentrations que nous utilisons (4 ng pour M*Odhx34* (1), 3,5 ng pour M*Odhx34* (2) et 2 ng pour M*Onbas*), ce qui peut mener à des différences notables notamment en matière de spécificité. De plus, les résultats d'analyses microarray doivent être validés par RT-qPCR ou par ISH, puisqu'ils peuvent comporter des faux positifs ou des faux négatifs. Il serait donc intéressant de tester l'activité de la voie Wnt ainsi que l'expression de Fgf8a dans nos morphants et mutants.



**Figure III.2: Résumé des facteurs de transcription et des voies de signalisation impliqués dans la formation de l'AH.**

Schéma représentant l'implication des facteurs de transcription majeurs et des principales voies de signalisation dans le développement de l'AH de *Danio rerio*. Au sein de la pré-placode ectodermique (ppe), la placode hypophysaire (ph) va être définie par le facteur de transcription Pitx3, restreinte par les facteurs Dlx3b et Dlx4b (gris foncé) et induite par la voie Shh (mauve) provenant du diencéphale voisin. Les cellules de la placode vont adopter la destinée adénohypophysaire marquée par l'expression de *lhx3* (bleu foncé). Grâce aux actions de la signalisation Fgf3 (vert foncé) provenant du télencéphale à l'action de Ascl1a (bleu clair), les cellules adénohypophysaires vont pouvoir s'engager dans une des destinées conduisant aux différentes lignées endocrines. La signalisation Fgf3 promeut également la survie de ces précurseurs. Pou1f1 (en orange) permet la différenciation des lactotopes (Prl), des somatolactotopes (Slβ), des somatotopes (Gh) et des thyrotopes (Tshβ). Eya1 (en vert) est nécessaire à la différenciation des corticotopes, des somatolactotopes (Slβ), des gonadotopes (Fshβ et Lhβ) et des mélanotropes. Eya1 semble être également requis pour la maintenance de l'expression de *pou1f1*. Remarquons que seuls les somatolactotopes nécessitent Pou1f1 et Eya1. Le facteur de transcription Sox4b (en bordeaux) est nécessaire à la différenciation des somatotopes, et via son contrôle de Gata2 (en bordeaux), des thyrotopes et des gonadotopes. Via l'induction de Tbx19 (en jaune), Dmrt5 (en jaune) permet de promouvoir les corticotopes et de restreindre les gonadotopes. Plus tard, Ascl1a a potentiellement un rôle dans l'expression du gène *pomc* par les corticotopes (Acth) et les mélanotropes (Msh). Les signalisations Shh et Fgf3 produites par le SNC respectivement antérieurement et postérieurement à l'AH, vont permettre de définir un double gradient inversé de signalisation, établissant un axe de spécification antéro-postérieur. Ainsi le domaine antérieur de l'AH reçoit un haut taux de signalisation Shh et un faible niveau de signalisation Fgf3, tandis que la partie la plus postérieure de l'AH reçoit un faible niveau de signalisation Shh et un haut taux de signalisation Fgf3. Dans chaque domaine, la voie de signalisation Notch (rouge) va permettre de définir le nombre relatif de chaque lignée endocrine. Par exemple, dans la partie antérieure de l'AH, la voie Notch restreint le nombre de lactotopes au profit des corticotopes via le processus d'inhibition latérale. Les différentes lignées endocrines sont représentées par la ou les hormone(s) qu'elles produisent. L'adénohypophyse est présentée en vue ventrale, partie antérieure vers la gauche. Adapté de Pogoda, H.M. and Hammerschmidt, M. (2009) *How to make a teleost adenohypophysis: molecular pathways of pituitary development in zebrafish*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 312, 2–13.



### III.1.A L'adénohypophyse

La dérégulation de ces trois voies de signalisation perturbe fortement la formation de l'adénohypophyse [Figure III.2]. Nous avons pu constater que la diminution d'expression de *dhx34* et de *nbas* mène à une augmentation du nombre de cellules adénohypophysaires, et ce dès 48 hpf. Le nombre de cellules peut être augmenté par 3 mécanismes : la prolifération et la différenciation de nouvelles cellules, la diminution de la mort cellulaire ou la différenciation (ou transformation) de cellules d'origine non pituitaire en cellules adénohypophysaires. Les tests de prolifération nous enseignent qu'aux alentours de 36 hpf, la prolifération cellulaire est accrue dans les morphants. Ceci est très intéressant puisque la signalisation Hh est augmentée durant cette période et qu'elle est connue pour jouer un rôle mitogène dans d'autres tissus tels que dans le tissu nerveux (voir plus loin). A ceci s'ajoute le rôle anti-apoptotique de *Fgf3*, dont l'expression est augmentée à 28 hpf. Enfin, la possibilité d'une transdifférenciation de cellules de tissus voisins, telles que des cellules de la placode des cristallins, ne peut pas être exclue. L'augmentation du nombre de cellules adénohypophysaire est donc probablement le résultat de plusieurs mécanismes superposés. En accord avec cette augmentation de la prolifération des progéniteurs, nous avons pu constater que tous les facteurs de transcription testés connus pour contrôler la différenciation des cellules endocrines de l'AH sont exprimés dans un nombre de cellules plus important que dans les embryons contrôles. En conséquence directe, le nombre total de cellules endocrines différenciées dans l'AH à 72 hpf chez les morphants est bien supérieur à celui observé chez les embryons contrôles. Ces données nous permettent donc de conclure que la diminution d'expression de *dhx34* et *nbas* induit une augmentation du nombre de progéniteurs adénohypophysaires et que ceux-ci subissent une différenciation accrue par rapport aux contrôles ; ce qui en résulte est un nombre de cellules endocrines accru.

Bien que le nombre total de cellules adénohypophysaire soit augmenté lors de l'injection du morpholino *dhx34* ou *nbas*, certaines lignées sont réprimées. Le meilleur exemple sont les somatolactotropes, dont l'expression hormonale est fortement réduite, et ce à tous les stades observés (28, 48 et 72 hpf). D'autres lignées subissent une diminution du nombre de cellules différenciées à un moment donné, mais retrouvent un nombre normal voir augmenté aux stades ultérieurs. Les corticotropes/mélanotropes sont diminués en nombre à 28 hpf, retrouvent un nombre équivalent aux contrôles à 48 hpf et ont tendance à être en surnombre à 72 hpf. Les somatotropes et les thyrotropes sont diminués en nombre à 48 hpf. A 72 hpf, les somatotropes retrouvent un nombre presque normal de cellules, tandis que les thyrotropes sont augmentées par rapport aux contrôles. Les corticotropes/mélanotropes commencent leur différenciation vers 24 hpf tandis que



## Conclusions & Discussion

les somatotropes et thyrotropes se différencient entre 36 et 42 hpf. Il existe donc deux interprétations possibles de ce phénomène : soit des effets compensatoires entrent en jeu avant 72 hpf permettant aux lignées diminuées de se « rattraper », soit il s'agit d'un retard de croissance induit par un effet aspécifique de l'injection de morpholino ; il serait donc intéressant de confirmer les effets sur l'expression de ces gènes chez le mutant *dhx34* au stade de leur diminution constatée avec les morpholinos.

Il est intéressant de remarquer qu'à 48 hpf, les lignées endocrines les plus affectées par la diminution d'expression des deux facteurs du NMD sont les lignées dépendantes de Pou1f1 à savoir les lactotropes, les somatolactotropes, les somatotropes et les thyrotropes. De plus, il apparaît que la lignée située dans la partie antérieure de la *Pars Distalis* (lactotropes) est promue tandis que les lignées situées dans la partie postérieure sont réprimées. Une telle différence antéro-postérieure pourrait être due à l'augmentation de la signalisation Shh qui a un effet antériorisant sur la différenciation endocrine de l'AH (153).

Il est envisageable que la diminution du nombre de somatolactotropes et l'augmentation de lactotropes observés chez les morphants *dhx34* ou *nbas*, correspondent à une modification de la balance de différenciation des précurseurs en somatolactotropes ou en lactotropes. Plusieurs arguments confirment la relation proche entre ces lignées endocrines. Les gènes de la prolactine (*prl*), de la somatolactine (*sl*) et de la somatotrophine (*gh*) partagent un ancêtre commun, démontré par la similarité de leur séquence protéique (279). Une population de cellules pituitaires capables de produire à la fois de la prolactine et de la somatotrophine fut observée de manière transitoire chez les vertébrés et nommée mammosomatotrope (280–282). De plus, dans des cas particuliers tels que la gestation ou l'hyperplasie de la pituitaire, les somatotropes sont capables de se transdifférencier en lactotropes (123, 283, 284).

Quoi qu'il en soit, le déséquilibre des forces inductrices (voies de signalisation) après inhibition de la voie NMD conduit à terme à une hyperplasie de l'hypophyse accompagnée d'une déficience en somatolactine et d'une surexpression de la prolactine, de la thyrotrophine, des gonadotrophines, de l'adrénocorticotrophine et probablement de la mélanotrophine. Etant donné ce déséquilibre hormonal conséquent, nous pouvons nous attendre à une incidence sur la physiologie des embryons.

L'augmentation du nombre de corticotropes à 72 hpf et donc l'augmentation probable de la production d'adrénocorticotrophine (Acth) laisse présager une altération du développement des glandes surrénales et une augmentation de la production d'hormones stéroïdiennes surrénales telles que le cortisol ou la Dhea (déshydroépiandrostérone) (112). L'augmentation de la production de cortisol devrait



## Conclusions & Discussion

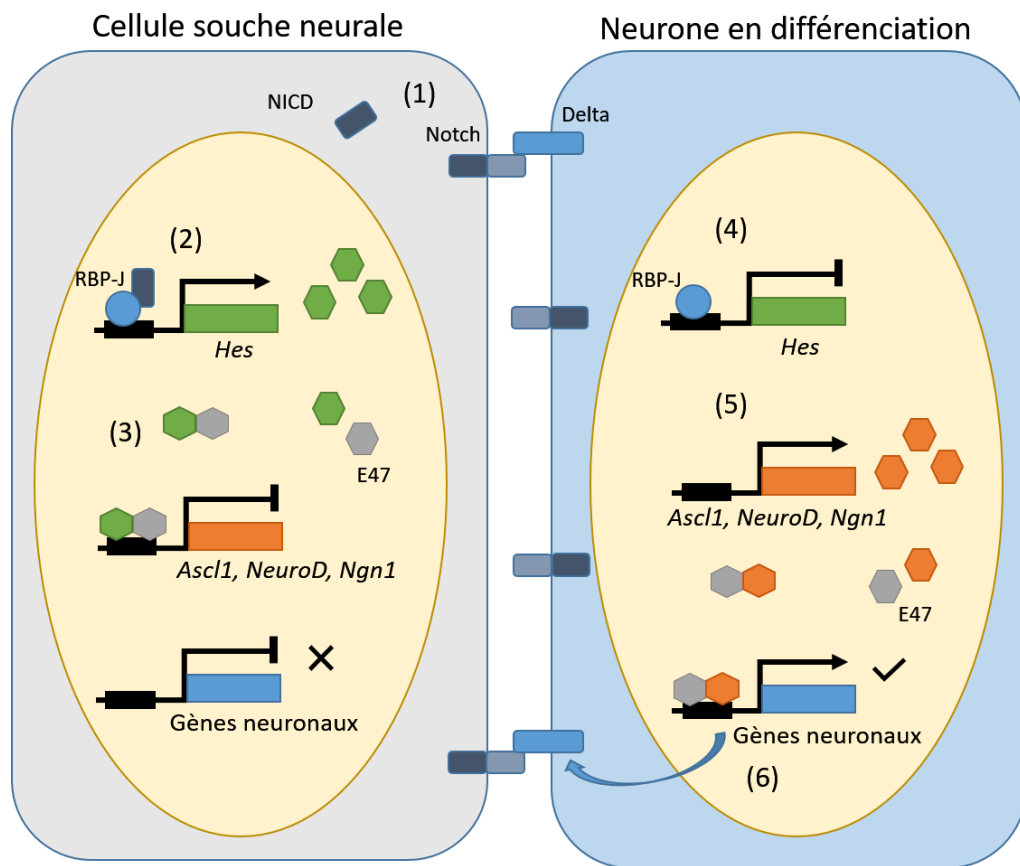
induire une augmentation de la gluconéogenèse, de la lipolyse et de la protéolyse ainsi qu'une réduction de la synthèse protéique et de la réponse immune. Une augmentation de la Dhea devrait mener à l'apparition de caractères masculins chez les femelles. Chez l'homme, la maladie de Cushing, due à un nombre excessif de corticotropes (adénome pituitaire), est caractérisée par une production anormalement haute d'ACTH et peut entraîner de nombreux symptômes dont l'obésité, une myopathie proximale, une croissance restreinte chez les enfants, un hypogonadisme, des troubles cardiovasculaires, une immunosuppression ainsi qu'une peau fine présentant des stries pigmentées et très susceptibles aux ecchymoses (251).

Chez les poissons, la prolactine (Prl) est principalement impliquée dans l'osmorégulation et permet d'augmenter les concentrations ioniques du plasma et de réduire la perméabilité des organes osmorégulateurs (peau, branchies, reins, intestin, vessie urinaire) à l'eau (279). De plus, la prolactine est une molécule qui a des propriétés immunostimulatrices (285-287). La surproduction de prolactine qui résulterait de l'augmentation du nombre de lactotropes, constatée dès 28 hpf, pourrait donc poser certains problèmes osmotiques pour le poisson, de plus les organes impliqués dans cette régulation pourraient être directement touchés par cette dérégulation osmotique. A ceci s'ajouterait une potentielle diminution de la capacité des animaux à induire une réponse immunitaire.

La thyroïdrotrophine (Tsh) est impliquée dans la croissance de la glande thyroïdienne chez l'adulte et induit la synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes. Une augmentation de la production de la thyroïdrotrophine telle que suggérée par l'augmentation de l'expression de la *tsh $\beta$*  et de *cga* à 72 hpf, aura probablement pour effet une augmentation de la taille de la glande thyroïde et une augmentation du métabolisme dû à l'augmentation des hormones thyroïdiennes circulantes (112, 125). Parmi les événements métaboliques susceptibles d'être augmentés, citons le rythme cardiaque, la gluconéogenèse, la glycolyse, la lipolyse, la ramification neuronale et la croissance osseuse.

Les hormones gonadotrophiques (Lh et Fsh) agissent sur les gonades afin d'induire la production d'hormones stéroïdiennes gonadiques (testostérone, estradiol, progestérones), de prostaglandines et la gamétogenèse (127). L'augmentation du nombre de gonadotropes et donc de la production de gonadotrophines, devrait donc surtout se marquer par un développement précoce des caractères sexuels primaires et secondaires.

La forte diminution de l'expression de la somatolactine  $\beta$  observée dès 28 hpf pourrait potentiellement avoir un impact sur la régulation osmotique, la maturation des



**Figure III.3: Régulation de la neurogénèse par les facteurs bHLH**

Représentation schématique de la régulation de la différenciation de cellules souches neurales en neurone par des facteurs de transcription bHLH. (1) Dans une cellule souche neurale, le récepteur Notch est activé par la liaison à un ligand Delta d'une cellule voisine. Suite à cette activation, le domaine intracellulaire de Notch est transféré dans le noyau. (2) Grâce à la formation d'un complexe avec RBP-J (= CBF1), il induit l'expression de facteurs bHLH répresseurs tels que Hes1 et Hes5. (3) Ces protéines Hes vont former des hétérodimères avec E47 et répriment la transcription de facteurs bHLH activateurs tels que Ascl1, NeuroD ou Ngn1. Notons qu'en plus de réprimer l'expression des bHLH activateurs, les bHLH répresseurs entrent en compétition avec le peu de bHLH activateurs produit; diminuant ainsi leur capacité transcriptionnelle. (4) Dans un neurone en différenciation, Notch n'est pas activé et RBP-J réprime l'expression des facteurs bHLH répresseurs. (5) En l'absence de facteurs réprimant leur expression, les facteurs bHLH activateurs sont exprimés. (6) En formant un complexe avec E47, les facteurs bHLH vont activer la transcription de gènes spécifiques aux neurones. De plus, les bHLH activateurs vont induire l'expression de ligands Delta, ce qui active la signalisation Notch dans la cellule voisine. Notons que les facteurs bHLH activateurs vont également induire l'expression de Hes6 qui va inhiber la fonction de Hes1 et donc renforcer la neurogénèse. *Adapté de Kageyama, R., Ohtsuka, T., Hatakeyama, J. and Ohsawa, R. (2005) Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. Exp. Cell Res., 306, 343–348.*

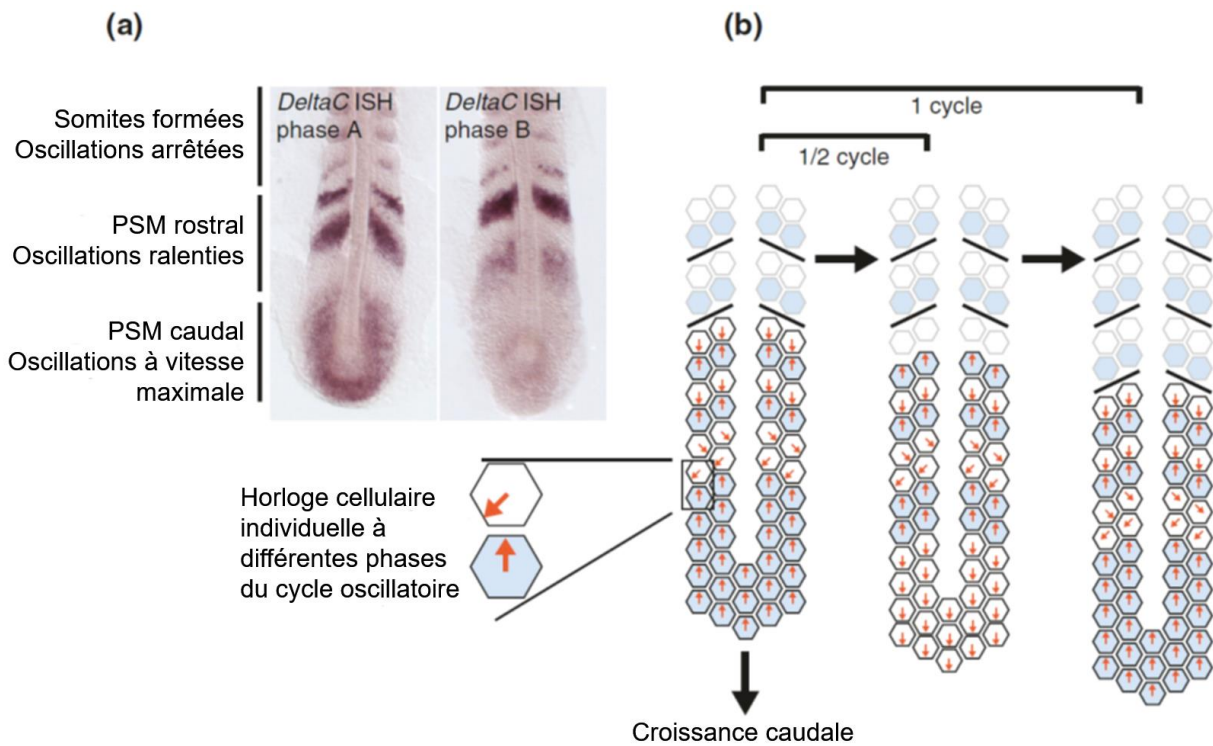
gonades, l'induction de la production de stéroïdes, la différenciation des chromatophores ainsi que sur la capacité de réponse aux stress (131-138).

Nous avons également observé une atteinte de l'hypothalamus. En plus d'être la source des signaux Shh et Fgf3, l'hypothalamus produit et sécrète de nombreux régulateurs des hormones adénohypophysaires, tels que les libérines. Il serait donc intéressant de tester l'expression de ces régulateurs afin d'avoir une idée plus générale de l'atteinte de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Toujours dans cet esprit, il serait également instructif de tester l'expression des hormones neurohypophysaires, la vasotocine et l'isotocine.

### III.1.B Système nerveux

Au cours de notre étude du système nerveux, nous avons constaté que la diminution d'expression de *dhx34* induit une forte diminution de l'expression de *neurod1* et une forte augmentation de *ascl1a* à 48 hpf. Ceci est très intéressant, puisque ces deux facteurs bHLH impliqués dans la différenciation neuronale ont des domaines d'expression complémentaires (260, 262). Cette complémentarité est retrouvée chez la souris, chez laquelle les facteurs NEUROGENIN1 et ASCL1 représentent deux voies alternatives de neurogenèse (288, 289).

Les facteurs de transcription bHLH tels que NEUROGENIN1, NEUROD ou ASCL1 sont dits de type activateur puisqu'ils induisent la différenciation neuronale (données revues dans (290)). Leur expression et leur activité sont réprimées par d'autres facteurs bHLH, tels que les facteurs HES1 et HES5 (homologues des facteurs Her6 et Her2 du poisson zèbre), qui sont de type répresseur [Figure III.3]. En plus de réprimer les facteurs bHLH de type activateur, ces facteurs HES permettent d'induire la prolifération des cellules souches neurales. L'expression de ces facteurs HES est directement contrôlée par la voie de signalisation Notch (289, 290). De ce fait, la voie Notch est impliquée dans la répression de la neurogenèse primaire et promeut la prolifération des progéniteurs neuraux (291-293). *deltaA* en particulier est exprimé au sein et au pourtour des centres prolifératifs du cerveau (260). De plus, la voie Notch est impliquée dans la segmentation du rhombencéphale via son action dans l'horloge de segmentation (voir plus loin) (253). La diminution de la signalisation Notch que nous constatons dans les morphants *dhx34* devrait donc induire une diminution du taux prolifératif des progéniteurs neuraux et une augmentation de leur différenciation en neurones. L'augmentation d'expression de *ascl1a* pourrait donc être expliquée par la diminution de la voie canonique de Notch que nous constatons à 28 et 48 hpf ; par contre la diminution de l'expression de *neurod1* doit trouver son origine dans un autre



### Figure III.4: L'horloge de segmentation des somites: l'oscillation transcriptionnelle de Notch

Les somites dérivent du mésoderme présomitique (PSM), un tissu non segmenté, situé dans le bout de la queue de l'embryon. Les cellules du PSM sont spécifiées grâce au gradient morphogène établi par l'action combinée des signalisations FGF et Wnt provenant du bout de la queue. A l'endroit où le niveau des signalisations Wnt et Fgf tombe en dessous d'une valeur seuil, les somites se forment. On considère qu'au cours du développement une nouvelle paire de somites est formée toutes les 30 minutes chez le poisson zèbre. Le segmentement des somites nécessite une coordination cellulaire dans l'espace et le temps et est assurée par une expression génétique oscillatoire appelée « horloge de segmentation » qui sonne dans les cellules du PSM et dicte le rythme de la formation des somites. Chaque cycle oscillatoire correspond à la formation d'une paire de somites supplémentaire. Parmi les gènes oscillateurs les plus importants on retrouve les effecteurs de la signalisation Notch *her1* et *her7* chez le poisson zèbre. Ces effecteurs contrôlent l'expression de nombreux gènes dont *delta C*. Ces gènes oscillateurs présentent un profil d'expression caractéristique en hybridation *in situ*. Dans la partie caudale du PSM, le niveau d'expression peut être haut ou bas en fonction de la phase du cycle oscillatoire au moment où l'embryon fut fixé. Dans la partie rostrale du PSM, on peut voir un profil d'expression zébré, dans lequel des bandes de cellules exprimant fortement le gène oscillateur alternent avec des bandes de cellules qui ne l'expriment pas. Le profil d'expression reflète aussi le ralentissement progressif des oscillations au fur et à mesure que l'on s'approche du point de spécification des cellules du PSM en cellules somitiques; point au delà duquel l'oscillation est arrêtée. Les cellules conservent donc l'état dans lequel elles ont été arrêtées (bleu transparent vs blanc transparent) permettant la démarcation des frontières des somites (lignes noires). Tiré de

Lewis, J., Hanisch, A. and Holder, M. (2009) Notch signaling, the segmentation clock, and the patterning of vertebrate somites. *J. Biol.*, 8, 44.



## Conclusions & Discussion

processus. L'augmentation de l'expression de facteurs bHLH répresseurs par une voie Notch non-canonique pourrait constituer un tel processus.

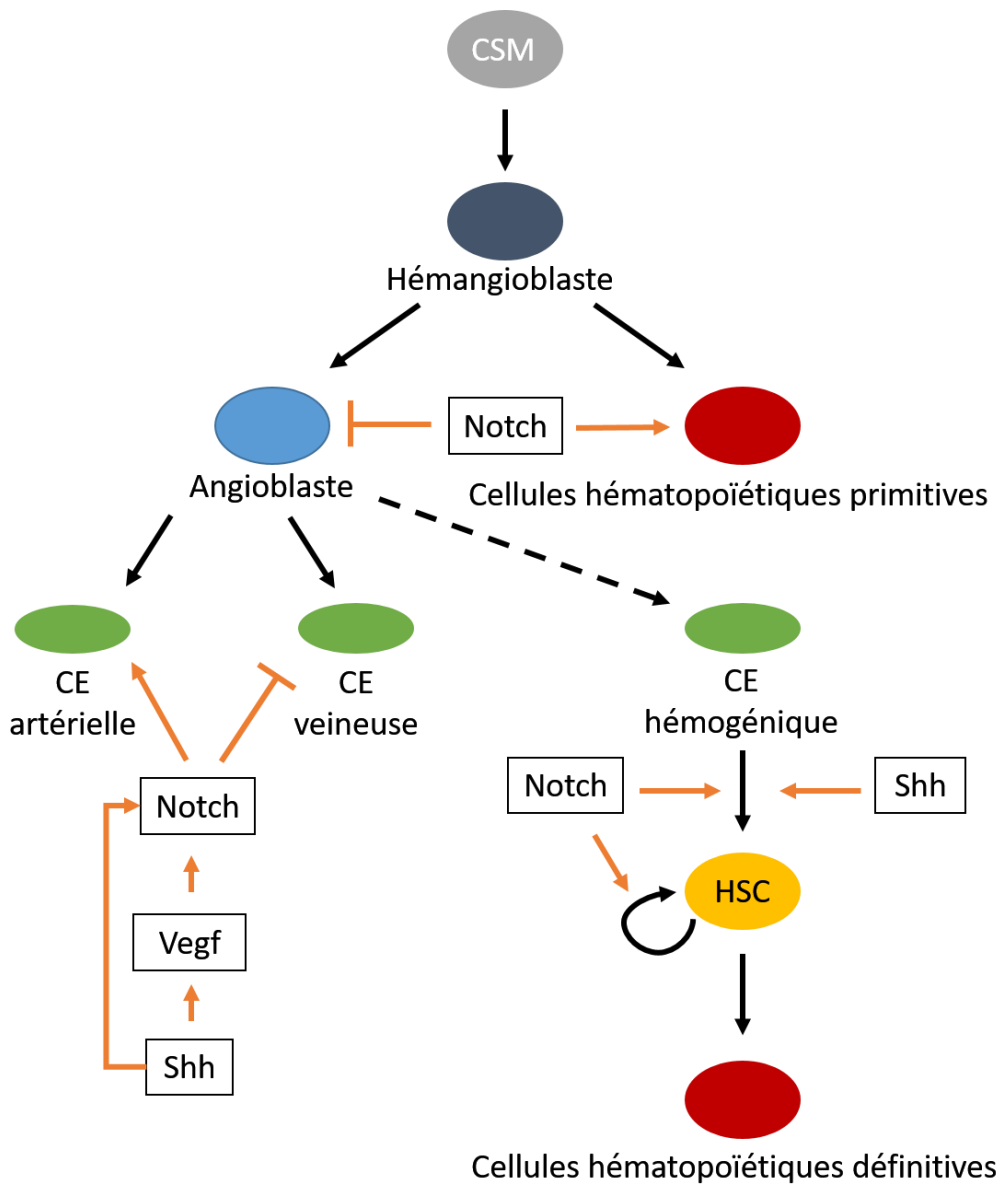
A l'opposé de la voie Notch, la voie Shh est capable d'induire l'expression des gènes codants pour les facteurs bHLH activateurs *Neurogenin1*, *NeuroD* et *Ascl1* dans les précurseurs neuronaux, et est donc un régulateur positif de la neurogenèse (294, 295). La voie Sonic Hedgehog est en effet connue pour son rôle essentiel et conservé dans la spécification neurale en agissant en tant que morphogène (296, 297). Un exemple de cette fonction morphogène est la croissance et la différenciation anisotropique (anisotrope : inégale/tropes : direction) des progéniteurs neuronaux de l'hypothalamus dirigée par la signalisation Shh provenant de la notochorde (298). La signalisation Shh a également une action mitogène, en activant la prolifération des progéniteurs neuronaux (299, 300). L'augmentation de la voie Shh que nous constatons à 48 hpf lors de l'injection du morpholino *dhx34* devrait altérer le gradient morphogène et donc déséquilibrer la différenciation neurale et augmenter le taux prolifératif des progéniteurs neuronaux.

Aux effets des signalisations Shh et Notch, il faut adjoindre l'effet de l'augmentation de la signalisation Fgf3 constatée à 24 hpf. En effet, les signalisations Fgf3 et Fgf8, en redondance partielle, coopèrent dans le développement du prosencéphale et du mésencéphale (223, 278).

Afin d'étudier plus en profondeur l'impact qu'a l'absence de Dhx34 sur la neurogenèse et la formation du système nerveux, il serait intéressant de tester l'expression d'autres acteurs de la neurogenèse tels que *neurogenin1* ainsi que la formation de la glie.

### III.1.C Système musculaire

La diminution d'expression de *dhx34* induit une forte diminution de l'expression de l'un des facteurs principaux de la différenciation des cellules musculaires, *myod1* ; ce qui suggère fortement une diminution de la myogenèse (268). Chez les embryons de poulet, une surexpression de *Delta1* dans les somites en développement induit une forte diminution de l'expression de *MyoD* (301). Cette situation de surexpression d'un ligand Delta accompagnée d'une diminution d'expression du gène *myod1*, correspond bien à ce que l'on a pu observer chez les embryons injectés avec le morpholino *dhx34* à 48 hpf. Il convient toutefois de remarquer que dans leur étude chez le poulet, Hirsinger et al. décrivent une suractivation de la voie Notch alors que dans notre cas nous avons une diminution de la voie Notch canonique. La voie Notch est également reconnue pour son implication dans le développement des somites, au cours duquel elle agit en tant qu'oscillateur transcriptionnel (240, 291, 292, 302). La structuration des



### Figure III.5: Différenciation des cellules endothéliales et hématopoïétiques

Chez le poisson zèbre les cellules endothéliales et hématopoïétiques dérivent d'un progéniteur commun appelé hémangioblaste. Les hémangioblastes dérivent de cellules souches du mésoderme ventral (CSM). Le choix de destinée des hémangioblastes est régulée par la voie de signalisation Notch, qui réprime la destinée angioblastique et favorise la destinée hématopoïétique. Chez les vertébrés, l'hématopoïèse survient en deux phase: la première dite primitive forme principalement des érythrocytes tandis que la deuxième dite définitive produit les cellules souches hématopoïétiques (HSC) capables de proliférer et responsables de la production des différentes cellules hématopoïétiques durant toute la vie de l'organisme. Les angioblastes peuvent se différencier en cellules endothéliales (CE) artérielles ou veineuses, choix dirigé par les voies de signalisation Shh et Notch. Cette cascade signalétique favorise la destinée veineuse et réprime la destinée artérielle. La voie Shh provenant de la notochorde est capable d'induire la signalisation de Vegf dans les somites, qui à son tour va induire la voie Notch dans les angioblastes. Une voie alternative permet à la voie Shh d'outre-passer Vegf, via l'activation de Crlr (« Calcitonin receptor-like receptor ») afin d'activer la voie Notch. Les angioblastes forment également les cellules endothéliales (CE) hémogéniques de l'aorte dorsale. Grâce à l'action des voie Notch et Shh ces cellules endothéliales particulières sont capables de se différencier en cellules souches hématopoïétiques (HSC) via un processus appelé transition endothéliale – hématopoïétique. Les HSC sont responsables de la production des cellules hématopoïétiques définitives. La prolifération des HSC est favorisée par la signalisation Notch. Les événements de spécification, différenciation ou prolifération cellulaire sont indiqués par une flèche noire. Les contrôles transcriptionnels opérés par des voies de signalisation sont indiqués par une flèche orange. *Adapté de Zhang,C., Patient,R. and Liu,F. (2013) Hematopoietic stem cell development and regulatory signaling in zebrafish. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj., 1830, 2370–2374.*

somites est en effet dépendante de cycles continus d'activation et d'inactivation de l'activité transcriptionnelle de la voie Notch [Figure III.4].

La diminution de *myod1* peut être le résultat de l'augmentation de la voie Hedgehog, puisqu'elle contrôle le domaine d'expression de *myod* dans les progéniteurs des myocytes (303). L'implication de la signalisation Hh dans la différenciation des muscles striés est bien établie, le nom du gène *smoothed*, *smo* pour *slow muscles omitted*, un composant essentiel de la transduction intracellulaire du signal Hh décrit même son action (304). La signalisation Shh provenant de la notochorde agit en tant que morphogène dans la détermination du type de fibre musculaire striée qui vont se différencier dans les myotomes. Un haut niveau de signalisation Hh va induire la différenciation des fibroblastes en fibres musculaires lentes tandis qu'un faible taux induit la différenciation de fibres musculaires rapides (303, 305–307).

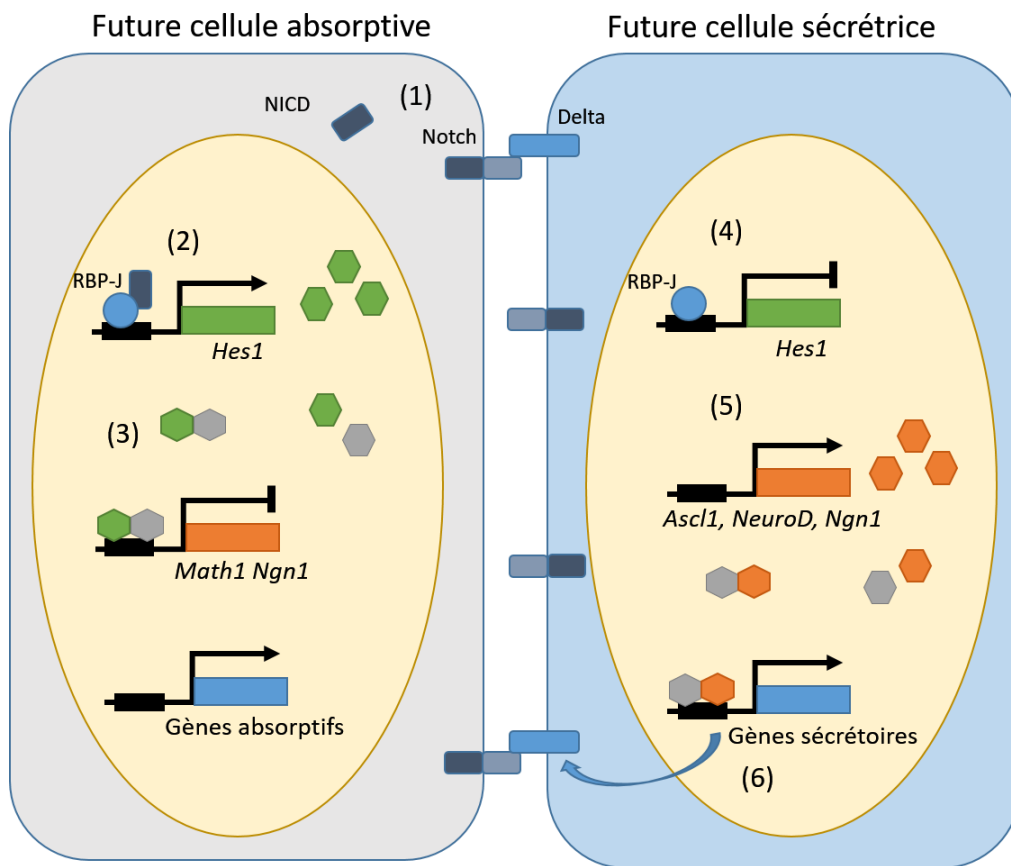
Afin d'étudier plus en profondeur l'impact qu'a la diminution de *dhx34* sur le développement musculaire, il serait intéressant de tester d'autres marqueurs de la myogenèse tels que *myf5* ou *myog*.

Il est à noter que la réduction de la musculature via une diminution de l'expression de *myod1* induit également une réduction de la formation cartilagineuse et osseuse, probablement en raison de l'interdépendance des tissus squelettiques et musculaires (268).

### III.1.D Système vasculaire

Bien que l'architecture globale du système vasculaire ne semble que peu compromise, l'absence de *Dhx34* induit une altération de la formation des vaisseaux sanguins comme démontré par le profil d'expression du gène *fli1a*.

Les voies de signalisation Shh et Notch sont des déterminants essentiels de la formation des vaisseaux sanguins ainsi que de la différenciation des cellules sanguines [Figure III.5]. En effet, la voie Notch réprime le nombre de cellules souches mésodermiques entrant dans la lignée endothéliale et favorise les lignées hématopoïétiques primitives (308). Les voies de signalisation Shh et Notch sont impliquées dans une cascade signalétique commune lors de la formation des artères et des veines en favorisant la différenciation des angioblastes en cellules endothéliales artérielles et en réprimant leur différenciation en cellules endothéliales veineuses (309–311). Les deux voies de signalisation favorisent également l'induction de la formation de cellules souches hématopoïétiques, responsables de la production des cellules hématopoïétiques définitives (308, 312–314). La voie Notch favorise également la prolifération des cellules souches hématopoïétiques. De plus, la voie Hedgehog est



**Figure III.6: Régulation de la différenciation intestinale par les facteurs bHLH**

Représentation schématique de la régulation du choix de destinée de cellules souches intestinales en cellule absorbative ou en cellule sécrétrice par des facteurs de transcription bHLH. (1) Dans une cellule souche intestinale, le récepteur Notch est activé par la liaison à un ligand Delta d'une cellule voisine. Suite à cette activation, le domaine intracellulaire de Notch est transféré dans le noyau. (2) Grâce à la formation d'un complexe avec RBP-J (= CBF1), il induit l'expression de facteurs bHLH répresseurs tels que *Hes1*. (3) Ces protéines *Hes* vont former des hétérodimères avec un facteur bHLH ubiquitaire et répriment ainsi la transcription de facteurs bHLH activateurs tels que *Math1* ou *Ngn1*. De ce fait, les gènes spécifiques à la lignée absorbative sont exprimés. (4) Dans une cellule sécrétrice en différenciation, Notch n'est pas activé et RBP-J réprime l'expression des facteurs bHLH répresseurs. (5) En l'absence de facteurs réprimant leur expression, les facteurs bHLH activateurs sont exprimés. (6) En formant un complexe avec un bHLH ubiquitaire, les facteurs bHLH activateurs vont activer la transcription de gènes spécifiques à la lignée sécrétrice. De plus, les bHLH activateurs vont induire l'expression de ligands Delta, ce qui active la signalisation Notch dans la cellule voisine.

*Adapté de Lee, C.S. and Kaestner, K.H. (2004) Development of gut endocrine cells. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 18, 453–462.*

impliquée dans la migration des progéniteurs endothéliaux à partir de l'aorte dorsale et favorise la croissance des vaisseaux inter-somitiques (313). Enfin les voies de signalisation Notch et Shh sont impliquées dans la formation et la croissance des vaisseaux intersomitiques (313, 315).

Les effets de l'augmentation de l'activité de la voie Shh et la diminution de la voie Notch que nous constatons lors de l'injection du *MOdhx34*, sont difficiles à prévoir puisque séparément, ces modifications de signalisation auraient des effets opposés. Par exemple, la diminution de la voie Notch devrait lever la répression de la formation veineuse et donc restreindre la formation artérielle, par contre l'augmentation de la voie Shh devrait favoriser la formation artérielle au détriment de la formation veineuse. Etant donné que les voies de signalisation Hedgehog et Notch sont aussi impliquées dans la différenciation des lignées hématopoïétiques, il serait intéressant de tester l'expression de marqueurs des cellules sanguines.

Il nous faut remarquer que tant les vaisseaux inter-somitiques, dépendants des voies de signalisation Hedgehog et Notch, que les vaisseaux du plexus sous-intestinal, indépendants de ces voies, sont touchés par la diminution d'expression de *dhx34* (269, 270). Les vaisseaux sous-intestinaux semblent être dépendants de la signalisation Bmp, il serait donc intéressant de tester l'activité de cette dernière lors de l'inactivation de l'expression de *dhx34*.

### III.1.E Système digestif

Au niveau du système digestif, nous avons pu constater que l'intestin et le foie présentent un nombre de cellules réduit et donc une taille restreinte, après injection du morpholino *dhx34*. Le pancréas semble par contre insensible à la diminution d'expression de *dhx34*.

La voie de signalisation Notch maintient le pool de progéniteurs intestinaux en inhibant leur différenciation et régule le choix de différenciation des cellules souches intestinales entre la lignée sécrétrice et la lignée absorptive [Figure III.6] (données revues dans (316)). Les cellules recevant un signal Notch fort deviennent des cellules absorbatives (entérocytes), tandis que celles exposées à un signal Notch faible deviennent des cellules sécrétrices (cellules caliciformes, cellules entéroendocrines et cellules de Paneth) (317, 318). La diminution de la voie Notch que nous avons constaté dans les morphants *dhx34*, devrait donc induire une augmentation de la différenciation des cellules intestinales, une diminution du nombre de progéniteurs et une favorisation des cellules sécrétrices au détriment des cellules absorbatives. Par conséquent, si l'on considère un épuisement du pool de cellules progénitrices, la



## Conclusions & Discussion

diminution du nombre de cellules intestinales que nous observons à 48 hpf chez les morphants semble coïncider avec une diminution de la signalisation Notch.

Chez le poisson zèbre, aucune fonction de la signalisation Hh sur la formation de l'intestin ne fut à ce jour décrite (319). Il est néanmoins établi que chez le poisson zèbre, la signalisation Shh provenant de l'endoderme est nécessaire à la migration des cellules de la crête neurale crânienne dans le cadre de la formation du système nerveux entérique. En plus de diriger leur migration, Hh semble également réguler leur prolifération cellulaire (320). Afin de décrypter tout l'impact de l'absence de *Dhx34* sur la formation de l'intestin, il serait donc intéressant d'analyser les différentes populations de cellules intestinales : progéniteurs intestinaux, entérocytes, cellules calciformes, cellules entéroendocrines, cellules de Paneth, neurones entériques et cellules musculaires lisses entourant le tube digestif.

Au niveau du foie, la voie Notch est reconnue pour son implication dans la différenciation des cellules biliaires et dans la morphogenèse des canaux biliaires (321, 322). De plus, il a été montré chez la souris que la voie Notch est un régulateur négatif de la différenciation des progéniteurs en hépatocytes (323). La signalisation Hh régule négativement le développement du foie, en agissant sur la prolifération des progéniteurs ainsi que sur leur différenciation (319). L'augmentation de la signalisation Hedgehog permet donc d'expliquer la diminution de la taille du foie observée chez les morphants *dhx34*.

Chez les poussins et les souris, lors de la formation du pancréas, la signalisation Hh permet de limiter la taille de l'organe, cette fonction inhibitrice semble agir tant sur les cellules exocrines que les cellules endocrines (données revues dans (324)). A l'inverse, chez le poisson zèbre la signalisation Hh semble être un activateur de la formation du pancréas, en particulier du bourgeon dorsal, lors des étapes précoces (319, 325-327). Il semble cependant que plus tard, après la fin de la gastrulation, la signalisation Hh ait une fonction inhibitrice des lignées endocrines du pancréas tandis qu'elle semble continuer à promouvoir la prolifération des cellules exocrines (265, 326, 327). Chez la souris, la voie Notch réprime la différenciation des cellules endocrines et permet ainsi le maintien du pool de progéniteurs, via une régulation de facteurs bHLH ; chez le poisson zèbre une régulation analogue semble également survenir (328-332). Il est donc surprenant que la perturbation des voies de signalisation Notch et Hh ne semble pas avoir de conséquence sur la formation du pancréas. Il faut cependant remarquer que, dans notre étude, nous avons utilisé des marqueurs précoces des cellules endocrines du pancréas, il serait donc intéressant d'analyser la proportion des différentes lignées endocrines matures ainsi que d'étudier le pancréas exocrine.





### III.1.F Système squelettique

Grâce à différents marquages, nous avons pu mettre en évidence que la diminution d'expression de *dhx34* induit une forte altération du squelette cartilagineux, notamment la disparition des arcs pharyngiens, et une réduction évidente du squelette osseux chondral et membranaire. Ces défauts sont probablement le résultat d'une diminution du nombre de cellules squelettiques, comme nous l'avons prouvé dans le cas des ostéoblastes. Afin de valider cette hypothèse dans le cadre de la formation des cartilages, il faudrait marquer les chondrocytes avec des marqueurs tels que *runx2b* ou *sox9a*.

La voie Sonic Hedgehog est essentielle pour la migration et la spécification des cellules de la crête neurale crânienne, notamment dans le cadre de la chondrogenèse craniofaciale et des arcs pharyngiens (333–335). Bien que l'augmentation de Shh survienne après la migration des cellules de la crête neurale crânienne, il est tout à fait possible qu'elle ait un effet sur la spécification des cellules squelettiques. Chez la souris, la signalisation Shh agit également en tant que morphogène dans la structuration antéro-postérieure des membres en formation ; l'expression ectopique de Shh induisant une duplication du bourgeon du membre (données revues dans (336)).

La signalisation Fgf3 est également requise pour le développement cartilagineux des arcs pharyngiens, de plus, le squelette cartilagineux craniofacial nécessite une coopération des signalisations Fgf3 et Fgf8 (337–340). Notons que cette fonction chondrogénique de Fgf3 semble être régulée par la signalisation Wnt5b (341). Fgf3 est également impliqué dans les processus de régénération de la nageoire, puisqu'il est induit dans le bourgeon régénératif afin de promouvoir la prolifération cellulaire (342). L'augmentation de la voie Fgf3 à 28 hpf, pourrait donc induire des altérations du squelette cartilagineux qui est à ce stade en cours de formation.

Chez la souris, via sa fonction dans l'horloge de segmentation des somites, la voie Notch permet la segmentation du squelette axial au cours de la somitogenèse (données revues dans (343)). De plus il a été déterminé chez la souris, puis confirmé chez le poisson zèbre, que la signalisation Notch est requise dans les progéniteurs chondraux afin de promouvoir leur prolifération et restreindre leur différenciation en chondroblastes (344, 345). Chez la souris, la voie Notch inhibe la différenciation précoce des progéniteurs des ostéoblastes et inhibe la formation des ostéoclastes (344, 346). De plus, il a été prouvé que chez la souris, le produit du gène cible de la voie Notch *Hes1* interagit avec RUNX2 afin de réguler négativement l'activité des promoteurs de l'ostéocalcine et de l'ostéopontine, deux protéines impliquées dans la minéralisation osseuse (346). La diminution de la signalisation Notch canonique

Voie de signalisation	Notch	Hedgehog	Fgf3
Système			
<b>Nerveux</b>	Prolifération (+) différenciation des progéniteurs (-)	Morphogène spécification neuronale Mitogène prolifération des progéniteurs (+)	Développement du prosencéphale (+) neurogenèse ganglions épibranchiiaux (+) Développement du mésencéphale (+)
<b>Oculaire</b>	Prolifération (+) et différenciation des progéniteur des photorécepteurs (-)	Différenciation progéniteurs (+)	ND
<b>Musculaire</b>	Oscillateur transcriptionnel somites. Différenciation des progéniteurs (-).	Morphogène différenciation des myocytes (+)	ND
<b>Vasculaire</b>	Prolifération et choix entre lignée endothéliale (-) et hématopoïétique (+). Choix entre cellule artérielle (+) et veineuse (-).	Prolifération des cellules souches hématopoïétique (+) migration des progéniteurs endothéliaux (+) formation artérielle (+)	ND
<b>Digestif</b>	Choix entre lignée sécrétrice (-) et absorptive(+)	Formation pancréas endocrine (+) Formation du foie (-)	ND
<b>Squelettique</b>	Différenciation des progéniteurs (-)	Migration et spécification des cellules CNC (+)	Développement cartilagineux (+)
<b>Autres</b>			Induction et formation de la placode otique (+)

**Tableau III.5: Résumé des principales fonctions connues des voies de signalisation.**

Principales fonctions connues des voies de signalisation Hedgehog, Notch et Fgf3 sur les systèmes nerveux, oculaire, musculaire, vasculaire, digestif et squelettique. (+) signifie une action promotrice tandis qu'un (-) signifie une action inhibitrice. ND: pas de donnée recensée.

devrait donc avoir un lourd impact sur la formation squelettique, en induisant la différenciation prématurée des chondroblastes, des ostéoblastes et des ostéoclastes et par conséquent réduisant le pool de leurs progéniteurs. De plus, si la régulation de l'expression des gènes ostéocalcine et ostéopontine par la voie Notch est conservée chez le poisson, la diminution de Notch devrait induire une dérégulation du processus de minéralisation de la matrice osseuse.

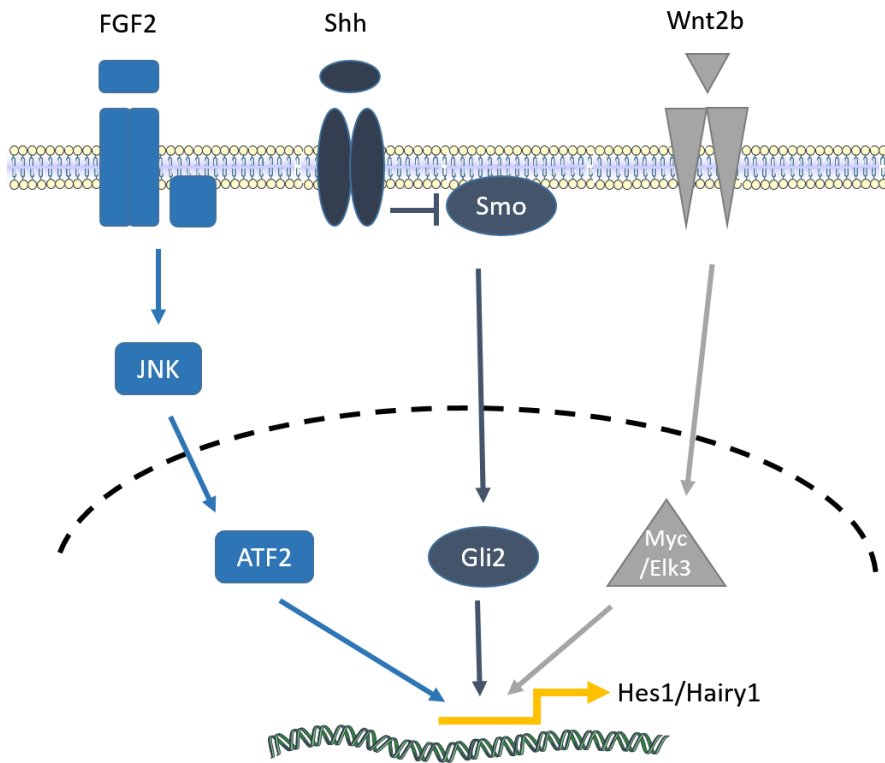
### III.2 Interdépendance des voies de signalisation

Il apparaît donc qu'il n'est pas toujours aisé de corréler les effets que nous observons lors de la diminution d'expression de *dhx34* avec les fonctions connues des voies de signalisation Shh, Fgf3 et Notch [Tableau III.5]. Cette constatation doit être mise en relation avec le fait que toutes les fonctions de ces voies ne sont probablement pas encore élucidées et, comme discuté plus haut, il est possible que d'autres voies de signalisation soient également affectées par l'absence de *dhx34*.

De plus, lorsque l'on étudie des altérations multi-systémiques telles que celles que nous décrivons dans cette étude, il convient de garder à l'esprit que le développement d'un tissu a une forte influence sur le développement des tissus environnants. La communication entre tissus est bien entendu cruciale, mais les événements de migration, de structuration spatiale et les dépendances fonctionnelles sont non moins primordiales. Un exemple flagrant est l'adénohypophyse, la migration des cellules adénohypophysaires est largement dépendante du remodelage du cerveau et de la cavité orale, l'hypothalamus produit de nombreuses hormones et messagers capables de contrôler le développement et la sécrétion hormonale de l'adénohypophyse, enfin une augmentation anormale de la glande hypophysaire peut provoquer une compression des nerfs optiques et provoquer des troubles visuels. Un autre exemple est donné par l'interdépendance entre la formation des muscles squelettiques et le développement des pièces squelettiques qui leurs sont associées.

Finalement, voir les différentes voies de signalisation comme indépendantes serait une erreur, il est en effet établi qu'il existe une communication et une régulation croisée entre les différentes voies de signalisation. La littérature regorge d'exemples, je vous ai listé ici quelques cas particuliers permettant de souligner mon propos :

- Il existe une relation entre la voie Wnt et la voie Notch, il a en effet été montré que Notch peut établir un seuil à la fonction de la  $\beta$ -caténine et donc moduler l'activité de la voie Wnt (347, 348). De plus, Notch semble inhiber la différenciation des ostéoblastes en réprimant l'activité de la signalisation Wnt (349).



### Figure III.7: Induction de la voie Notch par d'autres voies de signalisation

Représentation schématique de l'induction de gènes cibles de la voie Notch (type III) par les voies de signalisation FGF, Shh et Wnt. Ce type de voie non-canonique est dépourvu de libération du NICD ou de l'interaction de CBF1; les gènes cibles de Notch sont donc induits par des mécanismes alternatifs. Ainsi via l'activation de ATF2, Gli2 ou Myc/Elk3 par, respectivement les voies FGF2, Shh et Wnt2b peuvent induire des gènes tels que *Hes1* ou *Hairy1* indépendamment de la liaison de Notch avec son ligand. *Adapté de Sanalkumar, R., Dhanesh, S.B. and James, J. (2010) Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates. Cell. Mol. Life Sci., 67, 2957–2968.*

## Conclusions & Discussion

- Il a été déterminé chez la souris que les voies de signalisation Hedgehog et Notch coopèrent dans le cadre de la régulation de la maintenance et de la différenciation des progéniteurs neuraux ; la voie Notch permet de moduler la réponse des progéniteurs neuraux au morphogène Shh en régulant directement la voie de transduction Shh (350, 351). Ainsi, une diminution de la voie Notch ou une augmentation de la voie Shh dans la moelle épinière induit une diminution du nombre de cellules adoptant les destinées ventrales (motoneurones) au profit des destinées dorsales (interneurones spinaux et astrocytes)(351, 352). Les voies Shh et Notch coopèrent également dans le cadre de la formation artérielle, en effet la voie Shh permet d'induire le facteur de croissance vasculaire endothélial (Vegf) qui à son tour va activer la signalisation Notch afin d'induire les destinées artérielles dans les progéniteurs endothéliaux (310, 311).
- Les signalisations Fgf et Hh coopèrent dans de nombreux processus développementaux, tels que la formation des nageoires pectorales ou de la rétine et la différenciation des neurones GABAergiques du proencéphale (353–356). Il est intéressant de noter que chez le poisson zèbre, la diminution d'expression de *fgf3* induit une diminution de l'expression de *shha* dans le diencéphale, tandis que l'expression thalamique de *shhb* est inchangée (223).
- Chez la souris, FGF3 provenant du mésoderme est capable de réguler la signalisation BMP dans le neuroépithélium dans le cadre de la fermeture du tube neural, la spécification des cellules de la crête neurale et l'extension de l'axe antéro-postérieur (357). Chez le poisson zèbre, une régulation de la voie Bmp par la voie des Fgfs fut également décrite dans le cadre de la formation du cartilage crânien (340).

La voie Notch est un cas particulièrement intéressant, puisqu'une forme non canonique de la voie implique l'induction de l'expression de gènes cibles de Notch de manière indépendante de l'activation d'un récepteur Notch, ainsi que de la transduction du signal par CBF1 [Figure III.7] (données revues dans (358)). Il a en effet été montré que des gènes cibles caractéristiques, tel que *Hes1* (orthologue de *her6* du poisson zèbre), peuvent être induits par des voies de signalisation tel que Shh, Fgf ou Wnt (359–361). Une telle communication croisée entre les voies Shh/Fgf et Notch pourrait expliquer le fait que, bien que la signalisation canonique de Notch soit clairement réduite à 48 hpf suite à la diminution d'expression de *dhx34*, nous constatons que l'expression de *her6* est normale, voire légèrement augmentée par rapport aux embryons contrôles.



Cette interdépendance des voies de signalisation mène donc à la question de savoir si Dhx34 et Nbas sont impliqués dans la régulation de toutes ces voies de signalisation ou si la dérégulation de certaines voies suffirait à induire en réponse une modification des autres.

### III.3 Etre NMD ou ne pas être NMD ?

Nous avons prouvé que les effets que nous observons sont bien spécifiques à l'absence de Dhx34 ; en effet deux morpholinos différents mènent à des défauts identiques, de plus les lignées mutantes déficientes en Dhx34 montrent un phénotype comparable à celui des morpholinos, du moins dans l'hypophyse et sur les voies de signalisation Hedgehog et Notch. Ceci mène à la question de savoir si le phénotype observé est dû au blocage du NMD ou alors à l'inactivation d'une fonction auxiliaire de Dhx34. Il a été prouvé que la réduction d'expression de *dhx34* chez le poisson zèbre provoque une inactivation du NMD (111). Cependant il semble que certains acteurs du NMD peuvent également jouer un rôle dans d'autres processus. Afin de déterminer si le phénotype observé lors de la déplétion de Dhx34 est bien dû à l'inactivation du NMD, nous avons sélectionné un autre acteur également prouvé chez le poisson zèbre pour être nécessaire à l'activité du NMD. Nbas fut découvert acteur du NMD en même temps que Dhx34 et, bien que son rôle moléculaire ne soit pas encore élucidé, son importance pour la voie ne fait aucun doute. Au cours de notre étude, nous avons prouvé que la diminution d'expression de *nbas* par injection de morpholino induit des défauts similaires à ceux de *dhx34*, ce qui suggère fortement que l'inactivation de la voie NMD est bien la cause des défauts observés.

Il faut cependant remarquer que SMGL-1 (Nbas) et SMGL-2 (Dhx34) sont les deux seuls acteurs de la voie NMD chez *C. elegans* dont l'absence est létale (54). Il est donc possible que ces deux protéines soient impliquées, du moins chez les invertébrés, dans un processus autre que le NMD. Une analyse transcriptomique a permis de déterminer que chez le nématode, seuls 13% des transcrits régulés par SMG-2 (Upf1) le sont également par SMGL-2 (Dhx34) et SMGL-1 (Nbas) (100). Chez le poisson zèbre, par contre, environ 43% des transcrits régulés lors de la diminution d'expression de Upf1 sont également régulés par Dhx34 et Nbas. Ces données suggèrent que le poisson zèbre est un modèle de choix pour l'étude de la voie NMD, et que Dhx34 et Nbas sont largement impliqués dans le NMD chez ce modèle. Si un processus annexe tel que celui postulé par la létalité de SMGL-1 et SMGL-2 est présent chez *C. elegans* (ce qui reste à prouver), il y a peu de chances qu'il soit présent ou actif chez le poisson zèbre. De plus, plusieurs défauts physiologiques que nous avons décrits semblent être retrouvés lors du « *knock-down* » d'autres acteurs du NMD. Ainsi, les défauts au niveau





## Conclusions & Discussion

du cerveau, des yeux et des muscles sont également constatés lors de l'absence de *Upf1*, *Upf2*, *Smg5* et *Smg6* ; soutenant la conclusion que ces défauts sont bien dus à l'inactivation du NMD.

Chez la souris, l'inactivation du NMD mène également à de nombreux défauts développementaux, au niveau par exemple de la neurogenèse, de l'hématopoïèse et de la gamétogenèse, mais aussi au niveau de la différenciation des cellules du foie (données revues dans (36)). De plus, chez l'homme, l'absence de certains acteurs du NMD induit des troubles neurologiques parfois associés à des malformations faciales (données revues dans (43)). Il est très intéressant de remarquer que presque tous ces défauts ont pu être retrouvés dans notre modèle d'étude, renforçant ainsi notre étude sur le plan évolutionnaire, mais soutenant aussi notre hypothèse de l'inactivation du NMD.

En conclusion, même si nous ne pouvons pas complètement exclure que certains des défauts observés soient dus à des fonctions particulières de *Dhx34*, la dérégulation des voies de signalisation et les défauts morphologiques qui en découlent sont bien dus à l'inactivation du NMD. Afin de confirmer de manière formelle que les effets obtenus sont bien dus à l'inactivation du NMD, il faudrait étudier un ou deux gènes supplémentaires tels que *upf1* et *smg6*, et comparer les résultats obtenus avec un inhibiteur chimique de la voie NMD tel que NMDI-1 ou NMDI-14 (83, 362).

Notre étude montre dès lors clairement que la voie NMD a un impact considérable sur le développement et la physiologie du poisson zèbre. La définition primaire du NMD comme n'étant qu'une « simple » voie de dégradation des ARNm aberrants s'éloigne alors, au profit d'une vue du NMD plus globale de contrôle pré-translationnel de l'abondance des ARNm. Cette idée est soutenue par de nombreuses études récentes et semble s'imposer au fur et à mesure du décryptage de ce processus si particulier (données revues dans (81)).

Une question importante demeure cependant : les effets observés sont-ils dus à la régulation d'un transcrite physiologique par le NMD ou alors à la dégradation d'un ARNm aberrant (PTC+) ? Il paraît peu probable qu'une mutation ponctuelle introduisant un PTC dans un gène X et dont les ARNm sont normalement dégradés par le NMD soit responsable des défauts que nous observons lorsque nous inhibons le NMD, étant donné que nous avons utilisé pour notre étude différentes lignées de poissons n'étant pas liées génétiquement. Il est cependant possible qu'en conditions normales, le NMD cible un ou plusieurs ARNm contenant un PTC naturellement présent dans le génome. Toutefois, la présence et l'expression de tels ARNm toxiques pour l'organisme sont peu probables et auraient été la cible d'autres processus de contrôle d'expression génique. L'hypothèse la plus probable est donc que le phénotype



observé soit dû à une dérégulation d'un processus physiologique contrôlé par le NMD. Il est possible que les voies de signalisation soient directement régulées par le NMD ; une régulation fine et précise de la signalisation cellulaire est requise au cours du développement embryonnaire, il ne serait donc pas étonnant que plusieurs niveaux de contrôle se superposent et que le NMD soit l'un d'entre eux. Une autre possibilité est que cette dérégulation signalétique soit une conséquence indirecte du contrôle d'un processus tiers par le NMD. Bien que le NMD soit impliqué dans la régulation de processus physiologiques aussi divers que la réponse aux stress cellulaires, le cycle cellulaire, l'épissage des ARNm, la défense contre les infections virales ou la maturation de cellules immunitaires ; aucun ne permet d'expliquer la dérégulation des voies de signalisation (données revues dans (36)).

Au cours de ce travail, nous avons donc pu mesurer toute l'importance qu'a la voie *Nonsense-mediated Decay* pour le développement et la physiologie des vertébrés. Cette étude n'avait pas pour but d'étudier l'ensemble des défauts induits par l'absence de *Dhx34*, mais a permis d'entrouvrir la porte vers de nouvelles recherches qui permettront d'apporter un nouvel éclairage sur les processus de contrôle génétiques et développementaux des vertébrés.

### III.4 Perspectives

Afin d'étudier plus en détail l'influence qu'a la voie NMD sur le développement et la physiologie embryonnaires, nous avons relevé plusieurs points qui peuvent être approfondis.

Grâce à l'utilisation de morpholinos et à l'établissement de lignées mutantes, nous avons pu mettre en évidence que le NMD est requis pour le développement correct au cours des premiers jours de la vie embryonnaire. Ces résultats pourraient être complétés et certifiés par une étude de l'influence de l'inhibition du NMD grâce à des composés tels que NMDI-1 ou NMDI-14 sur le développement du poisson zèbre. De plus, de tels inhibiteurs permettraient une inhibition de la voie dans une fenêtre temporelle déterminée, ce qui permettrait d'affiner notre compréhension de l'importance de cette voie de dégradation des ARNm. Une analyse des effets de l'inactivation du NMD à des stades plus tardifs pourrait également être très instructive.

Afin de compléter notre étude de l'adénohypophyse, il serait tout d'abord intéressant de tester l'expression des quelques facteurs de transcription que nous n'avons pas eu l'occasion d'étudier tels que *dmrt5*, *tbx19*, *gata2* ou *sox4b*. Une observation plus détaillée et plus spécifique des événements de prolifération et de mort cellulaire des cellules de



## Conclusions & Discussion

l'AH pourrait confirmer certaines de nos hypothèses. Il serait également intéressant de pousser l'étude du mutant *dhx34* plus loin en testant l'expression de tous les gènes hormonaux, de tous les facteurs de transcription et des voies de signalisation. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes limités à l'AH mais une étude de l'impact de l'inactivation de la voie NMD sur la neurohypophyse pourrait être très instructive. Dans la même idée, l'étude de l'expression des régulateurs des hormones adénohypophysaires tels que les libérines par l'hypothalamus pourrait à mon avis fournir certaines réponses qui nous font défaut.

Une étude plus approfondie des altérations développementales des différents tissus suite à l'inhibition de la voie NMD pourrait être également très instructive, et permettre une meilleure compréhension de l'influence qu'a la voie sur ces tissus. De plus, il est très probable que la liste des tissus affectés que nous avons établie n'est pas exhaustive, ainsi une étude d'autres tissus tels que ceux des systèmes excréteur, auditif ou reproductif pourrait compléter notre compréhension. L'utilisation d'un mutant KO conditionnel dans un tissu particulier pourrait également aider à une meilleure compréhension de l'importance du NMD dans un type cellulaire particulier en excluant les influences des tissus environnants.

Une étude plus détaillée de l'influence qu'a l'inactivation de la voie NMD sur les voies de signalisation serait également très importante. Premièrement, l'analyse de plusieurs ligands, récepteurs et gènes cibles des voies Fgf et de la voie Notch pourrait éclaircir certaines zones d'ombre telles que celles que nous avons soulignées dans la partie discussion. Deuxièmement, il est raisonnable de penser que les voies de Fgf3, Notch et Shh ne sont pas les seules à être influencées par le NMD, une étude d'autres voies de signalisation contrôlant le développement telles que les voies Bmp ou Wnt pourrait fournir de nombreuses clés de compréhension. Troisièmement, une investigation du mode de fonctionnement du contrôle du NMD des voies de signalisation est à mon avis d'une importance capitale. De manière parallèle il serait également judicieux de comprendre si le NMD a une influence sur toutes les voies de signalisation ou si la perturbation de quelques une suffit à altérer l'activité des autres.

Finalement, trouver les cibles directes du NMD et les différencier des cibles indirectes est un travail complexe, mais très important. Une analyse des modifications du transcriptome lorsque le NMD est inactivé en comparaison avec des animaux sains peut fournir certaines données puisque les ARNm qui subissent une augmentation de de telles conditions sont des cibles probables du NMD. Cependant ce type d'analyse ne permet pas de certifier une cible et doit être complétée par d'autres analyses. Ainsi, l'analyse de la modification de la demi-vie de ces cibles supposées lors de l'inactivation du NMD, ainsi que le recoupement avec les données des transcrits



## Conclusions & Discussion

présentant des signes de clivage endonucléotidique par Smg6 permettrait d'augmenter la probabilité que ces ARNm soient des cibles directes du NMD (36). Une autre approche consiste à réaliser une co-immunoprécipitation d'un acteur clé de la voie NMD tel que la version phosphorylée de UPF1 et l'analyse des ARNm liés dans un organisme sain.





# IV. Matériels & Méthodes

*« Les théories ont causé plus d'expériences que  
les expériences n'ont causé de théories. »*

JOSEPH JOUBER

Paramètre	Valeur
Température	26-28°C
pH	~7.4
Nitrates ( $\text{NO}_3^{2-}$ )	<50mg/L
Nitrites ( $\text{NO}_2^-$ )	<0.8mg/L
Ammonium ( $\text{NH}_3$ )	<2mg/L
Dureté carbonatée (KH)	3-10°KH
Dureté totale (GH)	6-16°GH

**Tableau IV.1: Paramètres physico-chimiques de l'eau d'élevage des poissons zèbres**

## IV.1 Poisson zèbre

### V.1.A Elevage

Les poissons zèbres sont élevés dans des aquariums répartis dans différentes armoires (Zeb-Tec, Techniplast). Le système permet une circulation de l'eau, si bien que 10% de l'eau de chaque aquarium est renouvelée toutes les heures.

La température et la composition de l'eau sont contrôlées [Tableau IV.1]. La photopériodicité est de 14 heures de lumière et 10 heures d'obscurité. Les poissons sont nourris deux fois par jour avec des nauplius d'*Artemia salina* et des aliments en flocons.

Les embryons sont élevés dans du milieu E3 (5 mM NaCl / 0,17 mM KCl / 0,33 mM CaCl<sub>2</sub> / 0,33 mM MgSO<sub>4</sub> / 0,00001% bleu de méthylène) dans des boîtes de Pétri à 28°C et sont nourris à partir du cinquième jour de développement avec des paramécies.

### V.1.B Lignées

Les souches de poisson zèbre utilisées sont : la souche sauvage AB, les souches transgéniques *Tg(Hsp70 : dnBmpIIR : GFP)* (363), *Tg(osx :mCherry)* (élaborée par le Dr. J. Renn de notre laboratoire) (364), *Tg(fli1a :eGFP)* (365), *Tg(Tp1blob : eGFP)* (366).

### V.1.C Euthanasie & Anesthésie

L'euthanasie des larves et des poissons se réalise avec une solution de tricaine (Ethyl 3- aminobenzoate méthanesulfonate) pH 7.2 diluée à 0,1% dans de l'E3. L'anesthésie des embryons se réalise avec de la tricaine pH7.2 diluée à 0,015% dans de l'E3.

## IV.2 Traitement chimique des larves

Tout d'abord, les poissons mâles et femelles sont séparés la veille afin d'éviter les accouplements pendant la nuit. Le lendemain matin, les poissons sont placés dans un nouveau bac de croisement sans séparateur afin de permettre l'accouplement et la ponte. Les œufs sont récoltés toutes les 15 minutes et sont élevés dans de l'E3 à 28°C.

Lorsque le stade voulu est atteint, les embryons sont transférés dans une plaque 6 puits avec une densité de 25 embryons par puits. Dans chaque puits, on met 4mL de milieu E3 frais avec la concentration voulue en inhibiteur, soit 100 µM de dorsomorphine (Sigma-Aldrich), 10 µM de K02288 ou 20 µM de K02288 (Tocris Bioscience). Pour les

Morpholino	Séquence	Quantité injectée
contrôle	5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'	4 ng
<i>dhx34 (1)</i>	5'- ATCTTCATAGAGTTCAGTACCGACG- 3'	4 ng
<i>dhx34 (2)</i>	5'-ACGCAGAGCTGGGTGAAATAACAAA-3'	3,5 ng
<i>nbas</i>	5'-GCCAGCCATGCTCCACATACCTGAC-3'	2 ng

**Tableau IV.2: Morpholinos**

puits contrôles, la même quantité de DMSO que celle d'inhibiteur est ajoutée dans les 4mL de E3. Il est à noter que le pourcentage de DMSO ne dépasse jamais 0,4%. Les embryons sont ainsi incubés durant 24 hpf en incubateur à 28°C à l'abri de la lumière. Les embryons sont ensuite rincés avec de l'E3 frais, puis élevé jusqu'au stade de 5 dpf en incubateur à 28°C.

### IV.3 Morpholinos

#### V.3.A Séquences

Une fois les morpholinos (Gene Tools LLC, USA) réceptionnés, ceux-ci sont resolubilisés dans du Danieau (58mM NaCl/ 0,7 mM KCl/ 0,4 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/ 0,6 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>/ 5 mM HEPES pH 7,2) afin de les amener à une concentration de 1mM. Ensuite ils sont chauffés 10 minutes à 65°C afin d'achever la dissolution.

Les morpholinos utilisés sont indiqués dans le **tableau IV.2**

Le morpholino contrôle est conçu pour n'avoir aucune cible et n'avoir aucune activité biologique significative. Les morpholino *dhx34* (1) et *dhx34* (2) sont conçus pour cibler les sites d'épissage entre respectivement l'exon 1 et l'intron 2, et l'intron 2 et l'exon 2 du gène *dhx34*. Le morpholino *nbas* est conçu pour cibler le site d'épissage situé à la huitième frontière exon-intron.

#### V.3.B Injection

Au moment où l'on veut injecter, on provoque la ponte des poissons zèbres. Les poissons sont séparés entre mâles et femelles le jour avant et ce jusqu'au moment où l'on désire provoquer l'accouplement et le début des pontes. Une fois les œufs fraîchement fécondés à disposition, l'injection s'effectue manuellement sous binoculaire (Olympus SZX9). Les aiguilles sont fabriquées à partir d'un capillaire en verre, en utilisant le PB7 needle/electrode puller (Narishige, Japon). L'injection en elle-même s'effectue grâce au Picospritzer II (Parker Hannifin corporation, USA). L'injection s'effectue dans des zygotes au stade 1 cellule. Une fois ceci fait, les œufs sont placés dans une boîte de pétri contenant du milieu E3 frais et déposés dans un incubateur à 28°C afin de permettre le développement correct des poissons.

La solution d'injection comprend une quantité voulue de morpholino, 1 µL de Rhodamine dextran et du Danieau afin d'arriver à un volume final de 10 µL. L'ajout de rhodamine dextran, qui est un fluorophore rouge, permet de vérifier la qualité de l'injection et si la solution s'est effectivement repandue dans le pôle animal.



## IV.4 CRISPR

### V.4.A Elaboration

Toute la procédure d'élaboration du système CRISPR-Cas9 utilisé dans le cadre de notre étude se base sur la publication de James Gagnon *et al.* (14).

#### *ARN guide*

La séquence cible du CRISPR au sein de *dhx34* a été choisie grâce au logiciel en ligne CHOPCHOP accessible à l'adresse <http://chopchop.cbu.uib.no/search.php>. La séquence choisie contient une proportion élevée de guanine et de cytosine (57%), une guanine adjacente au motif d'espacement PAM (« protospacer adjacent motif »), et est située dans la région 5' d'un des premiers exons (le deuxième en l'occurrence). Les 20 premières bases sont incluses dans l'ARN guide, les trois dernières bases (soulignées dans la séquence ci-dessous) correspondent au PAM et ne sont pas incorporées dans la séquence de l'ARN guide.

Séquence cible *dhx34* : GGTGTGCTCCAGAGACATAGAGG

L'ADN servant à la synthèse de l'ARN guide est constitué d'un oligonucléotide constant et d'un oligonucléotide spécifique au gène ciblé (*dhx34* dans notre cas). L'oligonucléotide constant, d'une longueur de 80 nucléotides, représente le corps de l'ARN guide et représente notamment la partie se liant à la nucléase Cas9. L'oligonucléotide spécifique au gène ciblé, contient un promoteur d'une ARN polymérase en vue d'une transcription *in vitro* (T7 dans notre cas), les 20 bases de la séquence cible ainsi qu'une région de recouvrement avec l'oligonucléotide constant. La synthèse d'un ARN guide comporte 2 étapes : 1) l'appariement des oligonucléotides et 2) la synthèse des brins complémentaires afin de compléter l'ADN.

T7 : TAATACGACTCACTATA

Région de recouvrement : GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG

Oligonucléotide constant :

AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATT  
TAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC

L'appariement des oligonucléotides se fait comme suit dans un thermocycleur :

- Oligonucléotide spécifique (100µM) : 1 µL
- Oligonucléotide constant (100 µM) : 1 µL
- Eau : 8 µL





## Matériels & Méthodes

Les cycles de températures :

- 95°C                      5 minutes
- 95°C → 85°C            -2°C/seconde
- 85°C → 25°C            -0,1°C/seconde
- 4°C                        pause

La synthèse des brins complémentaires est réalisée grâce à l'ADN polymérase T4 (Promega) :

- dNTPs (10 mM)            2,5 µL
- 10 NEB buffer 2            2 µL
- 100x NEB BSA            0,2 µL
- T4 NEB ADN polymérase 0,5 µL
- Eau                        4,8 µL

Incubation pendant 20 minutes dans un thermocycleur à 12 °C.

L'ADN est purifié au moyen du kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel).

La synthèse de l'ARN guide est réalisée via le kit « MEGAscript T7 » (Ambion) en suivant les instructions du fabricant. Le produit de la transcription est purifié grâce à une précipitation à l'acétate d'ammonium 5M.

### ***ARNm Cas9***

L'ARNm codant pour la caspase 9 est synthétisé à partir d'un plasmide PCS2-Cas9 contenant un signal de polyadénylation SV40. Après avoir été linéarisé, le plasmide est transcrit au moyen de l'ARN polymérase Sp6 grâce au kit « mMessage mMachine SP6 » (Ambion) et en suivant les instructions du fabricant. Ce kit a la particularité d'ajouter directement une coiffe ainsi qu'une queue poly(A) lorsqu'un signal de polyadénylation est présent. Le produit de la transcription est purifié grâce à une précipitation à l'acétate d'ammonium 5M.

## **V.4.B Injection**

La co-injection de l'ARN guide et de l'ARNm codant pour la Cas9 est réalisée suivant le mix suivant dans des œufs de poisson zèbre au stade 1 cellule :

- ARN guide                      200- 400 ng
- ARNm *cas9*                    600 ng
- Rhodamine dextran            1 µL

(A)

WT 479 CCAGATACCGGATCAACATCTCAGTGTGCTCCAGAGACATAGA-----GGAGCGGTGGC---A-----GGACCAGACCATCGACGGAGAGAGAGCTCGGGTCCCGGCAGACAGGAGATCAC 587  
MA 479 CC-GATACCGGATC-ACATCTCAGTGTGCTCCAGAGTC-|TAGAGGAGCGGAGCGGTGGCCGGAGCGGCTGGCCGGACCAGACCATCGACGGAGAGAGAGCTCGGGTCCCGGCAGACAGGA-ATCAC 601

WT 479 CCAGATACCGGATCAACATCTCAGTGTGCTCCAGAGACATAGAGAGCGGCTGGCAGGACCAGACCATCGACGGAGAGAGAGCTCGGGTCCCGGCAGACAGGAGATCAC 587  
MB 479 CCAGATACCGGATCAACATCTCAGTGTGCTCCAGAG-|ATAGAGGAGCGGTGGC|GGACCAGACCATCGACGGAGAGAGAGCTCGGGTCCCGGCAGACAGGAGATCAC 585

(B)

WT	1150 aa	MA	145 aa	MB	142 aa
MSRKDEESRSWDWDSPRCRAQLDEVFFRQHDYIQAQSAEHKEFWSSFFERFQSFKAKKEMT ASKSSRQEKHVALREGKAKKKTGCVDLGLPKDYDARYRINISVCSRDIEERLAGSDHRRRESSG PGRQEITDGRLLALLHFLDFNQKQSFSLKSLRREQSLPIFYRDKIVELVRTHPVVVVAGDTG CGKSTQVPQYLLASGINNIACQPRRIACISLAKRVSFESLNQYGSKVGYQIRFETSRTLATKLLF LTEGLLLRQIQDASLQYQVLIQVDEVHERHLHCFLLGLVLRSLSLRDLRLVLMATINIKLF SSYFNDAPVLPVPGRLPIQVIYQIPPEEQVSRSEKLDPRPYLRVLQIGIDQRYPQEERGDLLE LSGVAEISTIQEACQTYATHTRQWVWVPLHSTLSLAQQDKVFDIAPPGVRKCIISTNIAETSVID GVRVVDVSGKVKEMSFDPKAKMQRLQEFWISRASSEQRKGRAGRTGPGVCYRLYSESDYDA FAPYPVEIHRVALDSLILQMKSMGLGDPRTFTFIDPPASSIQTAVTYLREQGALDEHGELTSL GRLLAQLPVDVVIGKMLVLGVSFNLVEPVLTVAAALSVQSPFLRSAQHNPDCSTARQPLNSN HGDPTLMNTFNWVQVKADRGSGSRKWCRRRGLEEQRLYEMVNLRRQFKELLRSHGLLE DDTGRATEPQDRARRRERFTRQKHLQKLRDHELQENTKRKVLRLLEEGLEGDASSGSDAEEES STSRRKKRDGAEQTMDIQEVKFKLRHNVNELQESAYASAALSSLQALLKLLRCGLYPQLAIP DEHNATRKDSQVHFHTRNKQGVVIHPTSVFASDPEVLHVPEHETSEFGQSNRHQLLAFVTL ETNKPYLSNCVRVPALQALLLVANSVNSNADCTRLVVDGWLESLTDGDAALKVLSSALSIRA EWERLLQAQLRQSGSCSSAGFGSSGPRVSRRELEKLEGLVRFLLYTEVNYSLKRLTALQSQNL YIGPQQDPDLSSAAAIGSLFPGMKAEPPDKGGLRCLSYFTYNCLCDSQDLYSECLRFKFWSCPR CDFYMLPTPLERMQHEASCRPAEEQQSESESVNPSSSSSSALTRVYHCDICNKDLTLTSTEI LKHKRQHL*		MSRKDEESRSWDWDSPRCRAQLDEVFFRQHD YIQAQSAEHKEFWSSFFERFQSFKAKKEMTAS SSRQEKHVALREGKAKKKTGCVDLGLPKDYDA DTGSHLSVLQSLSEERSGWPERLAGDPHRRRES SGPGRQESQTAAWLFYIS*		MSRKDEESRSWDWDSPRCRAQLDEVFFRQH DYIQAQSAEHKEFWSSFFERFQSFKAKKEMTAS KSSRQEKHVALREGKAKKKTGCVDLGLPKDYD ARYRINISVCSRDGAAGRTRPSTERELGSRQT GDHRRPPGSFTFPR*	

Figure IV.1: Lignées mutantes *dhx34*

(A) Mutations génétiques induites dans les lignées A (MA) et B (MB) mutantes pour le gène *dhx34*. Les séquences mutantes sont comparées à la séquence sauvage (WT). Les délétions, additions ou changements de bases par rapport à la séquence sauvage sont indiqués par une barre verticale et par en rouge dans les séquences mutantes. (B) Séquences protéiques produites par les lignées sauvages et mutante (A et B).

- Danieau

x  $\mu\text{L}$  afin d'arriver à 10 $\mu\text{L}$  de volume final

### V.4.C Génotypage

Les poissons porteurs d'une mutation sont identifiés par la technique du « *heteroduplex mobility assay* » (HMA). Afin de réaliser cette technique, l'ADN génomique de poissons hétérozygotes pour une mutation dans le gène *dhx34* est extrait via une lyse au NaOH 50mM. Ensuite une PCR est réalisée avec des amorces permettant d'amplifier 100 à 200 paires de bases autour du site cible de l'ARN guide.

Gène	Amorce	Séquence	Produit
<i>dhx34</i>	sens	AGGGGAAAGCCAAAAAGAAG	176 pb
	anti- sens	GCCGTCTGTGATCTCCTGTC	

La technique du HMA comprend une dénaturation de l'ADN (2 minutes à 95°C) afin de séparer les différents brins, suivie d'un appariement en conditions permettant la formation d'hétéroduplex formés d'un brin sauvage et d'un brin muté (refroidissement rapide dans du tampon 0,1M NaCl/ 10 mM Tris pH 7,8/ 2 mM EDTA). Etant donné que le brin muté contient un ou plusieurs nucléotides en plus ou en moins que le brin sauvage, une bulle de mésappariement est formée dans l'hétéroduplex. La présence d'une telle bulle va ralentir la migration sur gel des hétéroduplex par rapport aux homoduplex (formés de deux brins sauvages ou deux brins mutés). La migration se fait sur un gel de polyacrylamide 15% dans du tampon TBE (Tris 1,08%/acide borique 0,55%/EDTA 0,09%) pendant 2 heures à 270 volts. Les bandes d'intérêts sont découpées du gel, purifiées grâce au kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel), puis séquencées par la plateforme « *sequencing* » du GIGA.

Deux lignées mutantes pour *dhx34* ont été sélectionnées pour analyse, elles sont dénommées lignée A et lignée B [Figure IV.1]. La réparation de la coupure double brin induite par le CRISPR *dhx34* a provoqué dans la lignée A une délétion de 3 paires de base (pb), l'addition de 18 pb et la substitution d'1 pb. Dans la lignée B, le CRISPR a provoqué la délétion de 2 pb et 1 substitution de base. Ces mutations introduisent un codon stop dans la région codante et mènent à la production d'une protéine tronquée de 145 acides aminés (aa) pour la lignée A et de 142 aa pour la lignée B.

Gène	Amorce	Séquence	Promoteur	Produit (pb)
shhb	sens	CGTTATTGCACCTGCTTCGG	eT7	770
	anti-sens	<u>TAATACGACTCACAATCGCGGAGAT</u> CACCAAGTGTACCGTCC		
pax7a	sens	TCCTCTCAGGCTGCAAACAG	eT7	800
	anti-sens	<u>TAATACGACTCACAATCGCGGAGGAGG</u> CCTCACCTGAAGGAAC		
pitx3	sens	GACCGGGATTCATAGCCTGG	T3	644
	anti-sens	<u>AATTAACCCTCACTAAAGGG</u> CCATGTTTCATGGAAGGGA		
eya1	sens	GGTACAAAGACTGTCGGGCA	T3	588
	anti-sens	<u>AATTAACCCTCACTAAAGGT</u> GACACGTGACATCCATGCT		
pomcb	sens	CACATGTAGACGGTGGCAGA	T3	565
	anti-sens	<u>AATTAACCCTCACTAAAGGT</u> CAGGGTTTGTGGGATTTCG		

**Tableau IV.3: Tableau des amorces utilisées pour la production de sondes ISH**

Les séquences soulignées représentent la séquence promotrice d'une ARN polymérase. Les amorces utilisées ont été commandées chez Integrated DNA Technologies.

## IV.5 Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* est une technique qui permet de visualiser le profil d'expression d'un ou plusieurs gènes en détectant les ARN messagers au moyen de sondes ARN anti-sens marquées.

### V.5.A Fixation des embryons

Les embryons de poissons zèbre, préalablement déchorionnés (si besoin en est) dans de la pronase (5mg/mL) (Sigma) et ayant atteint le stade de développement désiré, sont fixés dans de la PFA 4% (4% paraformaldéhyde/ NaOH 80mM/ PBST) pendant 18 heures à 4°C ou 3 heures à température ambiante. Ensuite ils subissent plusieurs lavages au PBST (0,8% NaCl/ 0,02% KCl/ 0,115% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/ 0,02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ 0,1% tween 20) avant d'être graduellement déshydratés dans du méthanol 100%. Les embryons ainsi déshydratés peuvent être conservés à -20°C pendant plusieurs mois.

### V.5.B Synthèse de sonde

La majorité des sondes produites proviennent d'une synthèse à partir de plasmide contenant la séquence de la sonde précédée du promoteur d'une ARN polymérase (Sp6, T3 ou T7) : *lhx3* (151), *pou1f1* (160), *cga* (160), *prl*, *pomca* (152), *tshβ* (152), *gh* (152), *slβ* (130), *ascl1a* (172), *dla* (292), *fgf3* (158), *ptch1*(367), *ptch2* (367), *shha* (368), *her6* (369), *foxa3* (370), *neurod1* (371), *myod1*(372), *pax6b* (373), *nkx2.2a* (263). Les autres sondes ont été synthétisées à partir du produit de PCR réalisées avec les amorces du [Tableau IV.3] et en utilisant de l'ADNc produit à partir d'ARNm extrait d'embryon de 48 hpf. Les produits de PCR ont été purifiés grâce au kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel).

Afin de limiter autant que possible la dégradation de l'ARN, tout le matériel utilisé doit être RNase-free et, sauf indication contraire, toutes les étapes doivent se dérouler à 4°C. Le mélange ci-dessous est réalisé :

- 2 µg d'ADN d'intérêt (doit être préalablement linéarisé s'il s'agit d'un ADN plasmidique).
- 2 µL de « DIG-RNA labeling mix 10x » (Roche, Suisse) ou 1µL de NTP 20x + 1µL de DNP-11-UTP, selon que l'on veut synthétiser une sonde marquée au DIG ou au DNP.
- 2 µL de « transcription buffer » (Roche, Suisse).
- 1 µL d'inhibiteur de RNase (rRNasin® (40U/µL), Promega, Madison, USA),
- 2 µL de la polymérase appropriée (SP6, T3 ou T7, Roche, Suisse).

Stade	Concentration en PK	Température d'incubation	Temps d'incubation
24 hpf	20 µg/mL	37°C	15 minutes
48 hpf	20 µg/mL	37°C	30 minutes
72 hpf	20 µg/mL	37°C	45 minutes
4 dpf	40 µg/mL	25°C	25 minutes
5 dpf	40 µg/mL	25°C	30 minutes
6 dpf	40 µg/mL	25°C	35 minutes

**Tableau IV.4: Conditions de digestion des embryons pour ISH.**

- Ajout d'eau traitée au DEPC pour amener la solution à 20µL final.

Incubation du mélange 2h à 37°C. Une fois ce temps écoulé, 2µL de DNase1 RNase-free (10U/µL) (Roche) sont additionnés à la solution, qui est ensuite incubée 15 minutes à 37°C. Après cela, la réaction est stoppée par 2µL d'EDTA 0,2M pH8 et 50µL d'eau DEPC sont rajoutés.

L'ARN nouvellement synthétisé subit une précipitation à l'éthanol : ajout de 2µL de glycogène, de 7,5µL de NH<sub>4</sub>Ac 5M et de 185µL d'éthanol 100%, ensuite on laisse précipiter à -80°C toute la nuit. Cette étape est suivie par la centrifugation des tubes à 4°C pendant 20 minutes à 14000 rpm. Le surnageant est éliminé, ensuite on ajoute 1 volume d'éthanol 70%, l'opération de centrifugation est répétée. Le surnageant est une nouvelle fois enlevé et le culot est resuspendu dans 30µL d'eau DEPC. Les sondes vérifiées grâce à un gel de formaldéhyde, puis diluées dans de l'Hybmix+ à la concentration souhaitée, finalement elles sont conservées à -80°C.

### V.5.C Simple visible

#### *Réhydratation*

Conservés à -20°C dans du méthanol 100 % les embryons doivent tout d'abord être réhydratés graduellement dans du PBST (100% méthanol-75%-50%-25%-PBST). Si les embryons sont pigmentés, une étape de décoloration est possible. Cette décoloration se fait grâce à une solution de peroxyde d'hydrogène/ hydroxyde de potassium fraîche (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% / KOH 0.5%) pendant 10 à 20 minutes. Les embryons sont ensuite lavés avec du PBST (3x5 minutes).

Afin d'obtenir un marquage homogène, le mieux est de considérer 15 à 20 embryons/ tube Eppendorf.

#### *Digestion*

Afin de permettre aux diverses substances (en particulier les sondes et les anticorps) de pénétrer dans les embryons, une digestion à la protéinase K (PK) est nécessaire [Tableau IV.4]. La digestion est ensuite arrêtée et la protéinase K éliminée grâce à des rinçages au PBST (2x 5min).

#### *Fixation*

Dû au traitement à la PK, les embryons sont fragilisés, afin de consolider les tissus nous les fixons grâce à de la PFA 4% pendant 20 minutes à température ambiante. Afin d'éliminer toute trace de PFA, les embryons sont lavés plusieurs fois au PBST (5x 5minutes).





### ***Hybridation***

Afin de bloquer les sites aspécifiques sur lesquels la sonde pourrait s'hybrider, il est essentiel d'effectuer une étape de pré-hybridation avec de l'Hybmix+ (50% de formamide, 5X SSC, 0,1% Tween20, 50µg/ml d'héparine et dans 500 µg/ml de Torula RNA/ ajusté à pH=6 avec de l'acide citrique) pendant 2 à 6 heures à 65°C sous agitation douce. Ensuite l'Hyb mix + est remplacé par de l'Hybmix+ contenant 50 -120 ng de la sonde permettant de marquer les ARNm du gène d'intérêt. Les embryons sont incubés avec la sonde pendant 16 heures à 65°C sous agitation douce. Les sondes sont couplées à des molécules de digoxygénine (DIG) ou de dinitrophénol (DNP) qui seront reconnues ultérieurement par des anticorps.

### ***Lavages***

Après l'incubation avec la sonde, les embryons sont abondamment lavés afin d'éliminer toute trace de sonde qui ne s'est pas hybridée, de plus la concentration en sels est graduellement diminuée pour revenir dans une solution de PBST. Toutes ces étapes se font à 65°C sous agitation douce.

- 1 lavage rapide à 65°C dans du Hybmix- (50% de formamide, 5X SSC, 0,1% Tween/ ajustée à pH=6 avec de l'acide citrique);
- 1 lavage de 15 minutes à 65°C dans 75% Hybmix- / 25% 2X SSCT ;
- 1 lavage de 15 minutes à 65°C dans 50% Hybmix- / 50% 2X SSCT ;
- 1 lavage de 15 minutes à 65°C dans 25% Hybmix- / 75% 2X SSCT ;
- 1 lavage de 15 minutes à 65°C dans 2X SSCT ;
- 2 lavages de 30 minutes à 65°C dans 0,2X SSCT ;
- 1 lavage de 10 minutes à température ambiante dans 75% 0,2X SSC / 25% PBST ;
- 1 lavage de 10 minutes à température ambiante dans 50% 0,2X SSC / 50% PBST ;
- 1 lavage de 10 minutes à température ambiante dans 25% 0,2X SSC / 75% PBST ;
- 1 lavage de 10 minutes à température ambiante dans du PBST.

### ***Pré-absorption de l'anticorps***

Afin de débarrasser la solution d'anticorps de ceux qui sont capables de se fixer sur des antigènes présents naturellement chez les embryons de poissons, on procède à une étape de pré-absorption. Cette étape consiste à faire incuber, pendant 2 heures à température ambiante, les anticorps avec un broyat d'embryons de stade similaire aux



## Matériels & Méthodes

embryons sur lesquels on veut réaliser l'hybridation. Cette mixture est ensuite filtrée grâce à un filtre Millex-GV 0,22 µm (Merck Millipore) afin de récupérer les anticorps.

### *Ajout des anticorps*

Afin de bloquer les sites aspécifiques sur lesquels pourraient se fixer les anticorps, il est indispensable d'incuber les embryons 2 à 4 heures dans du tampon de blocage ISH1 (2% de sérum de mouton, 2 mg/ml de BSA (Sigma) dans du PBST). Ensuite les embryons sont incubés 16 heures dans une solution de tampon de blocage ISH1 contenant l'anticorps anti-DIG (Roche) ou anti-DNP (Vector Laboratories) dilués respectivement 3000x ou 500x. Les anticorps utilisés dans les hybridations *in situ* visibles sont couplés à une phosphatase.

### *Révélation*

Après le marquage des sondes par l'anticorps approprié, la solution d'anticorps est éliminée par des lavages dans du PBST à température ambiante (6x15 minutes). La révélation est préparée grâce aux lavages (3x 5 min) des embryons par une solution de marquage (100mM NaCl ; 50 mM MgCl<sub>2</sub> ; 100 mM Tris-HCl pH 9,5 ; 0,5% Tween 20). La dernière étape est la révélation de la sonde, qui s'effectue en ajoutant de la solution de marquage contenant cette fois 3,5µL/mL de Chlorure de bleu de nitro-tétrazolium (NBT : 100mg/mL dans 70% diméthylformamide) ainsi que 3,5µL/mL de phosphate de 5-bromo-4-chloro-3indolyde (BCIP : 650mg/mL dans 100% diméthylformamide). La réaction entre ces deux substrats et la phosphatase couplée à l'anticorps utilisé, donnera un précipité bleu-violacé insoluble à l'endroit où la sonde s'est hybridée et donc où le gène d'intérêt est exprimé. La coloration s'effectue à température et à l'abri de la lumière. Une fois le marquage apparu, la réaction est stoppée par 3 lavages successifs dans du PBST. Les embryons sont conservés dans de la PFA 1% à 4°C.

### *Observation*

Les embryons sont analysés et photographiés en lumière visible grâce à une caméra digitale reliée au microscope BX60 d'Olympus.



## IV.6 Colorations tissulaires

Les embryons marqués au bleu alcian, au rouge alizarine, au DAF-FM DA ou à l'acridine orange ont été analysés et photographiés grâce au stéréomicroscope SZX10 (Olympus).

### V.6.A Bleu Alcian

#### *Fixation*

Les embryons (10-50/ tube Eppendorf) au stade désiré doivent avoir été convenablement éuthanasié et fixés grâce à de la PFA 4%. Attention une sur-fixation risque d'augmenter le bruit de fond. Une fois le temps de fixation terminé, il faut rincer les embryons grâce à du PBST (3x 10 minutes).

#### *Coloration*

La coloration se réalise grâce à une solution de bleu alcian (0,04% Bleu Alcian/ 10mM MgCl<sub>2</sub>/ 80% éthanol) pendant 18 heures sous agitation douce. Afin de retirer le colorant non fixé, il faut laver les embryons avec une solution d'éthanol 80%/10 mM MgCl<sub>2</sub> pendant plusieurs jours (minimum 3 jours) sous agitation douce.

#### *Décoloration*

La première étape est de faire repasser les embryons dans une solution d'eau en les faisant passer successivement dans des bains de 5 minutes de concentration en éthanol de plus en plus faible (80%-50%-25%- eau). Ensuite on va procéder à une décoloration des embryons principalement dans le but de décolorer les cellules pigmentaires des embryons. Cette décoloration se fait grâce à une solution de peroxyde d'hydrogène/ hydroxyde de potassium (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%/ KOH 0.5%) fraîche pendant 20 à 60 minutes. On procède ensuite au rinçage des embryons avec une solution de glycérol 25% (glycérol 25%/ 0,1% KOH) (3x 10 minutes, puis 1x 30 minutes). Ensuite on réalise 1 lavage de 10 min avec une solution de glycérol 50 % (glycérol 50%/ KOH 0,1%), puis on stocke les embryons à 4°C.

### V.6.B Rouge Alizarine

#### *Fixation*

Les embryons (10-50/ tube Eppendorf) au stade désiré doivent avoir été convenablement éuthanasié et fixés grâce à de la PFA 4%. Attention une sur-fixation



risque d'augmenter le bruit de fond. Une fois le temps de fixation terminé, il faut rincer les embryons grâce à du PBST (3x 10 minutes).

### ***Décoloration***

On va procéder à une décoloration des embryons principalement dans le but de décolorer les cellules pigmentaires. Cette décoloration se fait grâce à une solution de peroxyde d'hydrogène/ hydroxyde de potassium ( $H_2O_2$  3%/ KOH 0.5%) fraîche pendant 10 à 20 minutes. On procède ensuite au rinçage des embryons avec une solution de glycérol 25% (glycérol 25%/ 0,1% KOH) (3x 10 minutes, puis 1x 30 minutes).

### ***Coloration***

Coloration des embryons grâce à une solution de rouge alizarine 0.05% pendant 30 minutes sur agitation douce et à l'abri de la lumière. On rince ensuite les embryons avec du glycérol 50% (50% glycérol/0,1% KOH) (2x 10 minutes), puis on conserve les embryons à 4°C à l'abri de la lumière.

## **V.6.C DAF-FM DA**

Le marquage de l'oxyde nitrique est réalisé *in vivo* grâce à du DAF-FM DA (4-amino-5-méthylamino-2',7'-difluorofluorescéine diacétate). Le DAF-FM DA est un composé non fluorescent qui est capable de traverser les membranes cellulaires, dans la cellule il est déacétylé par les estérases cytoplasmiques et converti en DAF-2 (4-amino-5-méthylamino-fluorescéine). Le DAF-2 n'est que faiblement fluorescent jusqu'à ce qu'il réagisse avec un ion nitrosonium (produit par l'oxydation spontanée de l'oxyde nitrique) afin de former un composé fluorescent, qui est retenu dans le cytoplasme. La solution stock de DAF-FM DA (5 mM dans du DMSO) est diluée 1 :1000 dans du milieu E3. Les embryons sont incubés dans cette solution durant 16 heures à 28°C à l'abri de la lumière. Ensuite les embryons sont soigneusement lavés avec de du milieu E3 frais (4x5 minutes). Les embryons sont ensuite anesthésiés afin de faciliter leur observation ainsi que la prise de photographie sous binoculaire fluorescent.

## **V.6.D Acridine orange**

La coloration Acridine orange se réalise sur des embryons vivants traités au PTU (afin de prévenir l'apparition des cellules pigmentaires). Les embryons sont incubés avec une solution d'E3-acridine orange (5µg/mL) pendant 20 minutes à 28°C à l'abri de la lumière. Les embryons sont ensuite rincés avec du milieu E3 frais (8 x 5 minutes), après





quoi il faut anesthésier les embryons afin de pouvoir les observer sous binoculaire fluorescent.

## IV.7 Immunohistochimie

### V.7.A pH3

#### *Perméabilisation*

Sur des embryons fixés à la PFA 4% puis déshydratés de manière similaire à ce qui se fait pour les hybridations *in situ* (voir plus haut). Les embryons sont ensuite progressivement réhydratés par des bains successifs avec des solutions contenant du méthanol et une concentration croissante de PBS/triton 0,3% (25%-50%-75%-100%). Si les embryons sont pigmentés, une étape de décoloration est possible. Cette décoloration se fait grâce à une solution de peroxyde d'hydrogène/ hydroxyde de potassium (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% / KOH 0.5%) fraîche pendant 10 à 20 minutes. Les embryons sont ensuite lavés grâce à du PBS/Triton X-100 0,3% (3x5 minutes). Afin de permettre l'accès des anticorps aux antigènes qu'ils doivent reconnaître, une étape de perméabilisation avec du PBS/triton 1% est nécessaire. Le temps d'incubation dans la solution de perméabilisation est indiqué dans le tableau ci-dessous :

Perméabilisation	24 hpf	36 hpf	48 hpf	72 hpf
Temps en minutes	10	13	15	30

Les embryons sont ensuite lavés dans du PBS/ Triton 0,3% (5x2 minutes)

#### *Ajout de l'anticorps primaire*

Avant de procéder à l'ajout de l'anticorps primaire, il nous faut bloquer les sites aspécifiques sur lesquels l'anticorps pourrait se fixer au moyen d'un tampon de blocage IHC (PBS/Triton X-100 0,3% / sérum de chèvre 4% / BSA 1% / DMSO 1%). Cette étape de blocage est réalisée durant 2 à 4 heures à température ambiante. Ensuite on élimine la solution de blocage et on la remplace par la solution contenant l'anticorps primaire reconnaissant la protéine désirée portant l'antigène spécifique ; dans notre cas l'histone 3 phosphorylé (tampon de blocage + anticorps polyclonal pH3 de lapin à une concentration de 1/2000). Laisser incuber les embryons dans la solution d'anticorps primaire durant 16 heures à 4 °C sous agitation douce.



### ***Ajout de l'anticorps secondaire***

On procède au lavage des embryons avec du PBS/triton 0,3% afin d'éliminer tout anticorps primaire qui ne s'est pas fixé (6x30 minutes). Ensuite avant d'ajouter l'anticorps secondaire, on incube les embryons dans de la solution de blocage IHC durant 2 à 4 heures à température ambiante. On remplace ensuite cette solution par une solution de blocage IHC contenant l'anticorps secondaire (tampon de blocage IHC + anticorps anti-lapin 488 de chèvre à une concentration de 1/750), on laisse incuber les embryons dans cette solution durant 16 heures à 4°C sous agitation douce. L'anticorps secondaire est choisi afin de reconnaître l'anticorps primaire, permettant une amplification du signal. De plus l'anticorps secondaire est lié à un fluorophore permettant sa détection en microscopie fluorescente. Après cette incubation finale, les embryons sont lavés avec du PBS/Triton X-100 0,3% afin d'éliminer les anticorps qui ne se seraient pas fixés.

### ***Observation***

Les embryons sont analysés et photographiés grâce au stéréomicroscope à fluorescence M165 FC (Leica).

## **IV.8 EdU**

La détection de la prolifération cellulaire peut être marquée via l'utilisation d'EdU (5'éthynyl- 2'- désoxyuridine). Ajouté dans le milieu, cet analogue de la thymine contenant un alcyne sera incorporé dans l'ADN au cours de sa réplication. Au sein de l'ADN des cellules nouvellement formées, l'EdU sera détecté via une réaction « click » (une cycloaddition alcyne-azoture catalysée au cuivre) en utilisant un fluorophore.

### ***Marquage***

La première étape est le marquage de l'ADN nouvellement synthétisé à l'EdU. Pour se faire, on incube les poissons vivants dans de l'E3 additionné de 4 mM d'EdU à 28°C. Le temps d'incubation dépend de la fenêtre temporelle qui nous intéresse, dans notre cas 22 heures puisque nous voulions analyser la prolifération cellulaire entre 50 et 72 hpf. Ensuite les embryons sont soigneusement rincés afin d'éliminer toute trace d'EdU non incorporé.

### ***Fixation & Perméabilisation***

Les embryons sont euthanasiés puis fixés grâce à de la PFA 4% durant 16 heures à 4°C. Les embryons sont ensuite lavés avec du PBS/Triton X-100 0,3% (3x5 minutes). Les embryons sont perméabilisés dans du PBS/ Triton X-100 2% durant 1 heure, puis lavés



## Matériels & Méthodes

avec du PBS/ Triton X-100 0,3% (2x5 minutes). Si les embryons sont pigmentés, une étape de décoloration est possible. Cette décoloration se fait grâce à une solution de peroxyde d'hydrogène/ hydroxyde de potassium ( $H_2O_2$  3%/ KOH 0.5%) fraîche pendant 10 à 20 minutes. Les embryons sont ensuite lavés grâce à du PBS/Triton X-100 0,3% (3x5 minutes).

### *Détection*

Les embryons sont lavés avec du tampon de blocage IHC (2x5 minutes). On ajoute ensuite 200  $\mu$ L par tube de solution « Click iT EdU Alexa Fluor 555 Imaging kit» (172  $\mu$ L de Click iT reaction buffer 1x + 8  $\mu$ L de  $CuSO_4$  + 0,48  $\mu$ L d'AlexaFluor azide 555 + 20  $\mu$ L de reaction buffer additive) provenant du kit « Click-iT EdU Imaging Kit » (Invitrogen). Les embryons sont incubés dans cette solution 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Les embryons sont ensuite lavés avec du PBS/triton 0,3% ou avec du tampon de blocage IHC si l'on désire procéder à une IHC sur ces embryons.

## IV.9 RT-qPCR

### V.9.A Extraction d'ARN

A 100 embryons on ajoute 700  $\mu$ L de « QIAzol Lysis Reagent » (Qiagen, Venlo, Netherlands) qui est un réactif monophasique contenant du phénol et de l'isothiocyanate de guanidium permettant la lyse des cellules. Pendant l'homogénéisation dans des seringues, le QIAzol maintient l'intégrité de l'ARN tout en lysant les cellules et en dissolvant leurs composants. L'ajout de 140  $\mu$ L de chloroforme, suivi d'une homogénéisation au vortex, de 3 minutes d'incubation à température ambiante, et d'une centrifugation de 15 minutes à 10000 rpm à 4°C, permet de séparer la solution en une phase aqueuse et une phase organique. L'ARN se trouvant dans la phase aqueuse, on récupère celle-ci et on lui ajoute 1,5 volume d'éthanol 100% « RNase-free ». La suite de la purification de l'ARN se fait grâce au kit « RNeasy Mini Kit (50) » et en suivant le protocole du fabricant. Finalement une partie de l'ARN récupéré est converti en ADNc, le reste est conservé à -80°C.

### V.9.B Reverse transcription

La quantification d'ARN par RT-PCR en temps réel est une combinaison de trois étapes : la conversion de l'ARN en ADNc grâce à une reverse transcriptase,

Gène	Amorce	Séquence
<i>rlp13α</i>	sens	TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC
	anti-sens	AGACGCACAATCTTGAGAGCAG
β-actine	sens	CAGACATCAGGGAGTGATGG
	anti-sens	ATGGGGTATTTGAGGGTCAG
<i>pomca</i>	sens	AGGTCAGTGTGGGAAAACG
	anti-sens	GGTAGACGGGGGTTTCATCT
<i>prl</i>	sens	ACCACACAGATTCACGCAAG
	anti-sens	TTGGTGAGTGAGGTGCTGAG
<i>sIβ</i>	sens	AGCTCATTTACCGCTTCTCG
	anti-sens	TTTTGGGAGCACACACAGC
<i>gh</i>	sens	CTGCAACTCTGACTCCATCG
	anti-sens	AAGGTCTGGCTGGGAAACTC
<i>cga</i>	sens	TCACATCAGAAGCCACTTGC
	anti-sens	GTGGCAGTCTGTGTGGTTGT
<i>tshβ</i>	sens	TGTGGAGAGGGAAGAATGTG
	anti-sens	GTGCATCCCCTCTGAACAAT
<i>lhβ</i>	sens	GCAGAGACACTTACAACAGCC
	anti-sens	AAAACCAAGCTCTGAGCAGCC

**Tableau IV.5: Tableau des amorces utilisées en RT-qPCR**

Les amorces utilisées ont été commandées chez Eurogentec ou chez Integrated DNA Technologies.

l'amplification des ADNc par PCR, et la détection et la quantification des produits amplifiés en temps réel.

L'étape de conversion se réalise grâce au kit « iScript cDNA synthesis » (BioRad, Californie, USA) qui utilise une reverse transcriptase dérivant du virus de la leucémie murine de Maloney (MMLV). Nous avons suivi le protocole du fabricant pour 1µg d'ARN total et un volume total de 20µL.

### V.9.C Quantification

L'étape d'amplification se réalise grâce au kit « SensiMix™ SYBR » (Bioline USA Inc.) qui utilise le fluorophore *Sybr Green* afin de mesurer la quantité d'ADN produite à chaque cycle. Cette étape d'amplification se réalise grâce à des amorces spécifiques permettant d'amplifier une courte séquence de l'ADNc du gène étudié [Tableau IV.5]. Les étapes d'amplification et de détection se réalisent dans un seul instrument, qui dans notre cas est le « 7900HT Fast Real-Time PCR system » (Applied Biosystems, Inc., Californie, USA). Les données sont analysées grâce au programme SDS2.2 fourni par le fabricant. Chaque échantillon est analysé en triplicata sur une plaque 384 puits (ABgene) scellée grâce à un film plastique transparent (Applied Biosystems). Le taux de transcrits relatifs de chaque gène est calculé selon la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (374) et normalisé grâce au gène *rlp13a*. Les résultats sont présentés en pourcentage d'expression des embryons traités en comparaison aux embryons contrôles  $\pm$  la déviation standard. Les données de réplicats biologiques ont été compilées et présentées sous forme d'expression génique normalisée  $\pm$  la déviation standard. Les paramètres des cycles sont 50°C x 2min, 95°C x 10 min, ensuite 40 cycles 95°C x 15 s, 60°C x 30 s. Une analyse de la dissociation thermique des amplicons est réalisée en fin d'amplification : 95°C x 15s, 60°C x 15 s et 95°C x 15 s. Les analyses statistiques ont été réalisées sur les données brutes en utilisant une Anova-1. Le niveau d'importance statistique est défini à  $p < 0,01$ .

## IV.10 Bactériologie

### V.10.A Souche

Les bactéries compétentes utilisées sont des *Escherichia coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Genotype : *F- mcrA Δ( mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ( araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*





### **V.10.B Transformation**

La transformation de bactéries compétentes consiste à incorporer un plasmide d'intérêt dans ces bactéries. Le plasmide contenant un gène de résistance à un antibiotique, les bactéries ayant intégré le plasmide seront sélectionnées par culture sur un milieu contenant l'antibiotique à une concentration toxique. Dans notre étude nous avons procédé à une transformation par choc thermique.

Les bactéries compétentes conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  sont délicatement décongelées sur glace. 50  $\mu\text{L}$  de bactéries sont placés dans un tube Eppendorf préalablement refroidi, 2- 5  $\mu\text{L}$  de plasmide sont ajoutés. On laisse reposer entre 5 à 30 minutes sur glace. Ensuite on procède au choc thermique en plaçant les tubes à  $42^{\circ}\text{C}$  pendant 30 secondes (ou 2 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$ ), après quoi les bactéries sont remises sur glace pendant 2 minutes. On laisse les bactéries récupérer en les mettant dans 250  $\mu\text{L}$  de milieu LB (1% NaCl/ 0,5% extraits de levures/ 1% bactotryptone) à  $37^{\circ}\text{C}$  sous agitation. Les bactéries sont ensuite étalées sur du milieu LB-agar (milieu LB + 1,5% agar) contenant l'antibiotique, préalablement coulé dans des boîtes de Petri. Les boîtes sont ensuite incubées dans une étuve à  $37^{\circ}\text{C}$ . Le lendemain les boîtes de Petri sont contrôlées visuellement afin de sélectionner des colonies de bactéries transformées.

### **V.10.C Production bactérienne**

Afin de produire une plus grande quantité de plasmide, les bactéries transformées avec celui-ci sont cultivées dans un milieu LB liquide adéquat. Les cellules seront ensuite lysées et l'ADN plasmidique purifié et concentré. En fonction de la quantité d'ADN plasmidique désiré, on peut démarrer à partir d'une culture bactérienne de 5 mL ou d'une culture de 250 mL. Si l'on part d'une culture bactérienne de 5mL, on réalise une mini-préparation en utilisant le kit « ZR PLasmid Miniprep - Classic » (ZymoResearch) et en suivant les instructions du fabricant. Si l'on démarre d'une culture de 250 mL, on réalise une midi-préparation en utilisant le kit « Nucleobond Xtra Midi » (Macherey-Nagel) et en suivant les instructions du fabricant.



## IV.11 Solutions communes

- Danieau : 58mM NaCl/ 0,7 mM KCl/ 0,4 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/ 0,6 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>/ 5 mM HEPES pH 7.2.
- PBST : 0,8% NaCl/ 0,02% KCl/ 0,115% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/ 0,02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ 0,1% tween 20
- E3 : 5 mM NaCl / 0,17 mM KCl/ 0,33 mM CaCl<sub>2</sub>/ 0,33 mM MgSO<sub>4</sub>/ 0.00001% bleu de méthylène
- PFA 4% : 4% paraformaldéhyde/ NaOH 80mM/ PBST
- SSC 20X : 3 M NaCl/ 0,3 M Na<sub>3</sub>Citrate/ ajusté à pH=7 avec du HCl.
- SSCT 2X : SSC 2X/ 0,1% Tween 20.
- SSCT 0,2X : SSC 0,2X/ 0,1% Tween 20.
- Hybmix+ : 50% de formamide, 5X SSC, 0,1% Tween20, 50µg/ml d'héparine et dans 500 µg/ml de Torula RNA/ ajusté à pH=6 avec de l'acide citrique
- Hybmix- : 50% de formamide, 5X SSC, 0,1% Tween/ ajustée à pH=6 avec de l'acide citrique.
- TNT : 0,1 M Tris-HCl pH=7,5/ 0,15 M NaCl/ 0,5% Tween 20.

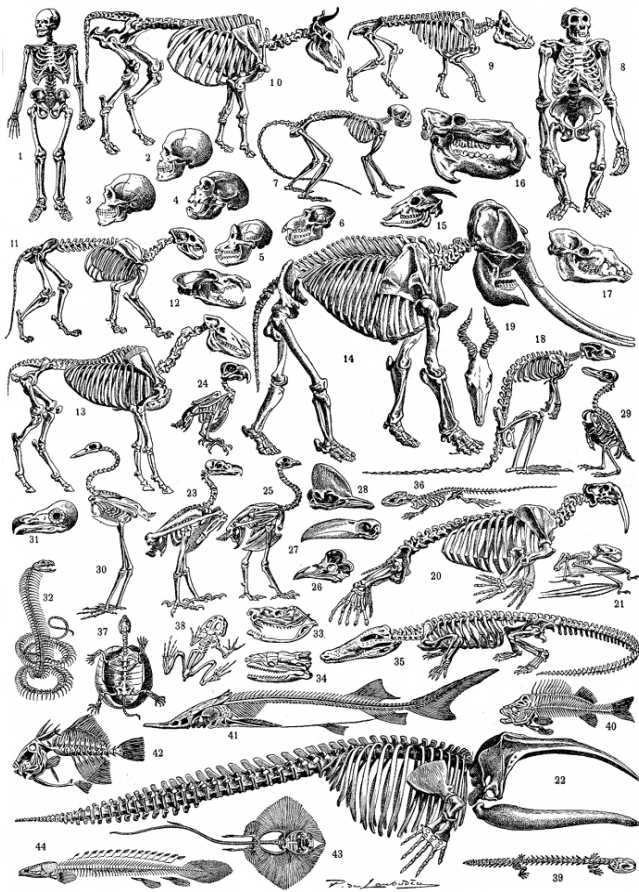


## V. Sujet annexe

**La voie de signalisation BMP régule le développement osseux en promouvant la fonction des ostéoblastes**

*« Cherchons comme cherchent ceux qui doivent trouver, et trouvons comme trouvent ceux qui doivent chercher encore. Car il est écrit : celui qui est arrivé au terme ne fait que commencer »*

SAINT AUGUSTIN

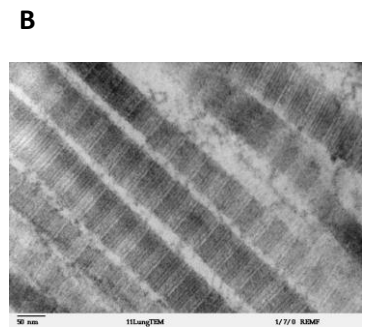
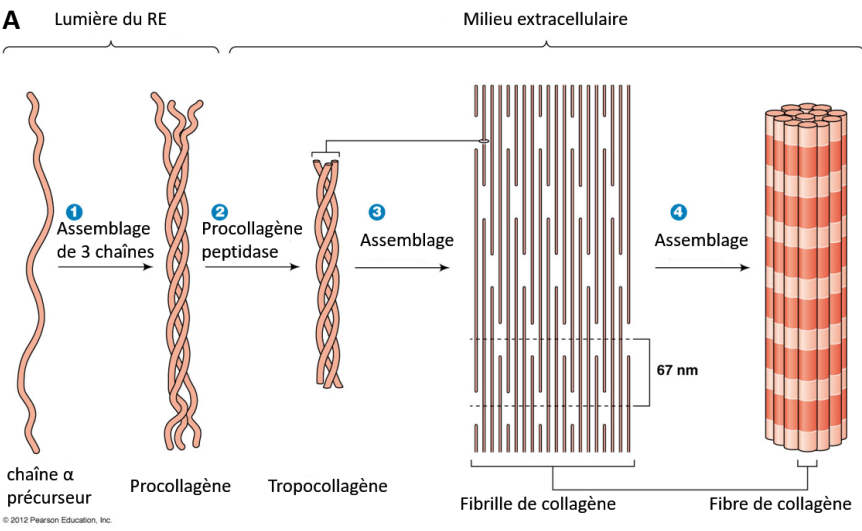


**Figure V.1: Diversité squelettique des Vertébrés**

1. Homme; 2. Crâne d'Européen; 3. Crâne d'Australopithèque; 4. Fossile, chapelle aux Saints ; 5. Chimpanzé; 6. Cynocéphale; 7. Semnopithèque; 8. Gorille; 9. Sanglier; 10. Bœuf; 11. Lion; 12. Loup; 13. Cheval; 14. Éléphant ; 15. Chèvre; 16. Hippopotame; 17. Chameau; 18. Kangourou; 19. Antilope; 20. Morse; 21. Chauve-souris; 22. Baleine; 23. Aigle; 24. Perroquet; 25. Poule; 26. Coq (coupe du crâne); 27. Toucan; 28. Casoar; 29. Pingouin; 30. Grue; 31. Crâne d'oiseau ; 32. Naja; 33. Crotale; 34. Boa; 35. Crocodile; 36. Lézard; 37. Tortue; 38. Grenouille; 39. Salamandre; 40. Perche; 41. Esturgeon; 42. Baliste; 43. Raie; 44. Polyptère.

*Tiré du Larousse 1922.*

SOURCES : Mammifères : 1. Homme. — 2. Crâne d'Européen. — 3. D'Australien. — 4. Fossile, de la Chapelle-aux-Saints. — 5. Chimpanzé. — 6. Cynocéphale. — 7. Semnopithèque. — 8. Gorille. — 9. Sanglier. — 10. Bœuf. — 11. Lion. — 12. Loup. — 13. Cheval. — 14. Éléphant. — 15. Chèvre. — 16. Hippopotame. — 17. Chameau. — 18. Kangourou. — 19. Antilope. — 20. Morse. — 21. Vampyre. — 22. Baleine. — 23. Aigle. — 24. Perroquet. — 25. Poule. — 26. Coq (coupe du crâne). — 27. Toucan. — 28. Casoar. — 29. Pingouin. — 30. Grue. — 31. Effraie. — 32. Naja. — 33. Crotale. — 34. Boa. — 35. Crocodile. — 36. Lézard. — 37. Tortue. — 38. Grenouille. — 39. Salamandre. — 40. Perche. — 41. Esturgeon. — 42. Baliste. — 43. Raie. — 44. Polyptère.



**Figure V.2: Fibres de collagène**

**(A)** Les polypeptides de collagène sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique (RE) et subissent d'importantes modifications dans le RE et l'appareil de Golgi. Chaque polypeptide collagénique a une conformation en hélice gauche (3,3 résidus par tours). L'association de ces polypeptides en triple hélice est stabilisée par des ponts disulfures et permet de former le procollagène; la triple hélice prend elle-même une forme de superhélice droite étirée. Le procollagène possède aux extrémités N- et C-terminales des propeptides qui n'adoptent pas la conformation en hélice. Ces propeptides seront dégradés par des métalloprotéinases dans la matrice extracellulaire pour former la molécule de collagène mature (tropicollagène). L'association de molécules de tropocollagène latéralement en séries parallèles décalées du quart de leur longueur (67nm) permet la formation de fibrilles de collagène de 30 à 150 nm de diamètre. L'association de nombreuses fibrilles permet la formation d'une fibre de collagène de 0,5 à 10 µm de diamètre. **(B)** La périodicité caractéristique des fibres de collagène apparaît sous microscopie électronique sous forme de fines striations transversales. **(A)** Tiré de Reece, J. and Urry, L. (2011) *Campbell biology Benjamin Cummings / Pearson*. **(B)** Fibres de collagène de type I provenant d'un tissu pulmonaire de mammifère, observée au microscope électronique à transmission (MET) Auteur: Louisa Howard.

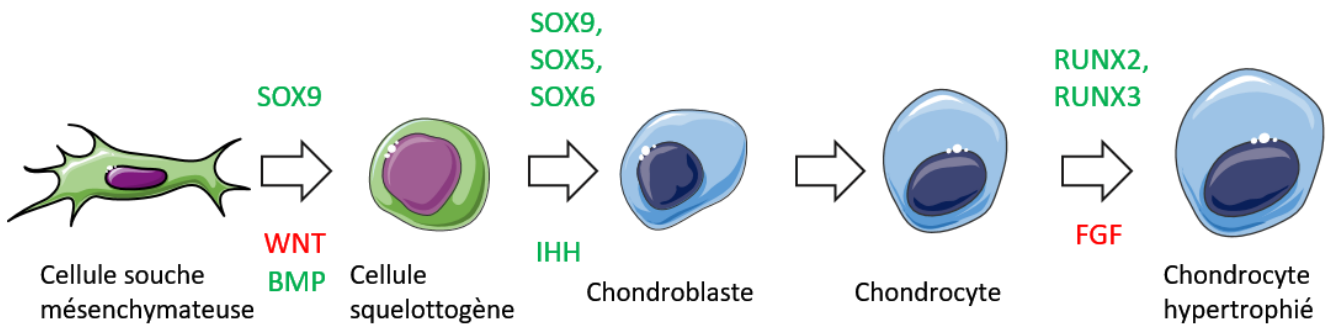
## V.1 Introduction

Le développement d'un squelette constitué de cartilages, d'os, de ligaments et de tendons est un processus qui a contribué de manière prépondérante à l'émergence des vertébrés [Figure V.1] (375). Le squelette des vertébrés consiste en un édifice élaboré de plus de 200 pièces osseuses et cartilagineuses, dans lequel chaque pièce squelettique est conçue à un endroit particulier dans le corps, est articulée avec d'autres et a une taille, une forme et une composition spécifiques caractéristiques de l'espèce, mais aussi de l'individu considéré. Cette charpente complexe remplit de nombreuses fonctions, elle confère des caractéristiques morphologiques, permet des postures et des mouvements contrôlés, protège les organes vitaux, héberge l'hématopoïèse, stocke des minéraux, absorbe les toxines et constitue même une source d'hormones (375, 376).

Le squelette osseux des vertébrés est soumis à des contraintes mécaniques nombreuses et son intégrité est maintenue par des mécanismes adaptatifs de destruction/reconstruction durant toute la vie. Certaines pathologies osseuses sont congénitales, comme des mutations dans les gènes *TWIST* ou *FGFR2* humains qui conduisent à des déformations du squelette céphalique, d'autres sont acquises au cours de la vie (377-380). Ainsi, l'ostéoporose se traduit par une perte osseuse graduelle et représente une des pathologies les plus répandues dans nos populations vieillissantes (381).

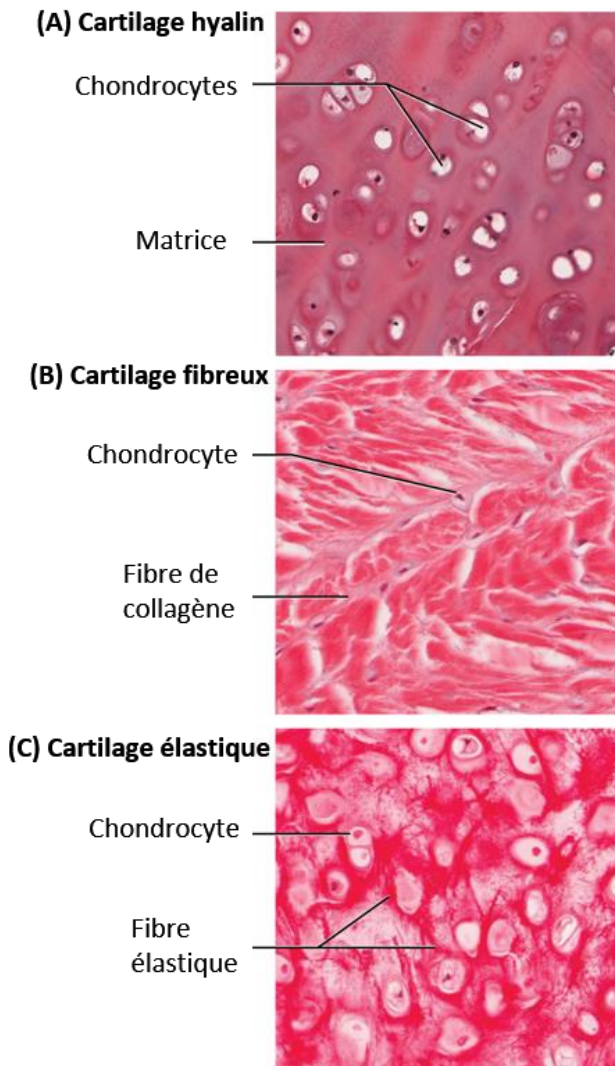
Comme tout tissu conjonctif, les tissus squelettiques sont produits par des cellules d'origine mésenchymateuse produisant une matrice extracellulaire (MEC) plus ou moins hydratée et constituée de fibres et de substance fondamentale (112, 382). Les tissus cartilagineux et osseux sont produits par des cellules appelées respectivement chondroblastes et ostéoblastes, les fibres sont principalement des fibres de collagène et la substance fondamentale qui peut être minéralisée est majoritairement formée par des glycosaminoglycanes liés ou non à des protéines.

Le collagène est une molécule extracellulaire majeure des tissus squelettiques. Il en existe 28 types, certains sont combinés afin de former la trame spécifique des tissus cartilagineux et osseux. Chaque molécule de collagène résulte de l'association de trois chaînes alpha polypeptidiques (homo- ou hétérotrimérique) [Figure V.2] (112). Les molécules de collagène sont produites sous forme de procollagène, dont la région centrale en triple hélice est entourée par des propeptides en N- et C-terminal. Après la sécrétion du procollagène dans le milieu extracellulaire, des métalloprotéinases vont retirer ces propeptides et le convertir en collagène mature ou tropocollagène. Les différents types de collagènes sont répartis en trois groupes : les collagènes fibrillaires (ex. : collagènes I et II), les collagènes associés aux fibrilles (ex. : collagènes IX et XII) et les collagènes associés à d'autres structures (ex. : collagène IV des lames basales). Les



### Figure V.3: Chondroblastogénèse

Schéma représentant les différents stades de la chondroblastogénèse ainsi que les facteurs de transcription et les voies de signalisation majeurs la contrôlant. En vert sont indiqués les facteurs nécessaires pour le passage au stade suivant, tandis qu'en rouge sont indiqués les facteurs inhibant le passage au stade suivant. Les facteurs intrinsèques (facteurs de transcription) sont placés au dessus des flèches indiquant le passage entre les différents stades, tandis que les facteurs extrinsèques sont placés en dessous des flèches. Dans certains cas, tels que lors de l'ossification chondrale, les chondrocytes peuvent s'hypertrophier. *D'après Karsenty, G. (2008) Transcriptional control of skeletogenesis. Annu Rev Genomics Hum Genet, 9, 183–196. & Servier Medical Art*



### Figure V.4: Principaux types de cartilages

Coupes histologiques dans les 3 principaux types de cartilages retrouvés chez les mammifères. **(A)** Le cartilage hyalin est le cartilage majoritaire chez l'adulte et constitue le squelette embryonnaire qui sera remplacé par de l'os chondral. C'est un cartilage dont les fibres sont constituées de collagène type II. Il est assez rigide, translucide, de couleur blanche ou bleutée, et peut être partiellement calcifié. **(B)** Le cartilage fibreux ou fibrocartilage est constitué de fibres de collagène de type I et de type II. Les chondrocytes sont alignés entre les fibres de collagènes. Il est très résistant, peu élastique, opaque et ne forme pas de péri-chondre. Il est généralement en continuité avec du tissu conjonctif dense. On le retrouve aux sites d'insertion des ligaments et des tendons, dans les disques intervertébraux, les ménisques des genoux et la symphyse pubienne. **(C)** Le cartilage élastique est constitué de fibres de collagène de type II et de fibres d'élastine. Il a la caractéristique d'être élastique, opaque et de couleur jaunâtre. On retrouve ce cartilage dans l'oreille externe, les ailes du nez, l'épiglotte et le larynx. A partir du haut, LM  $\times 300$ , LM  $\times 1200$ , LM  $\times 1016$ . *Microphotographie réalisées par le Regents of University of Michigan Medical School © 2012. Adapté de <http://cnx.org/contents/tu2W4Fr@1/Histology-Module-4A-and-4B-C> & Berthet, J. (2005) Dictionnaire de biologie De Boeck.*



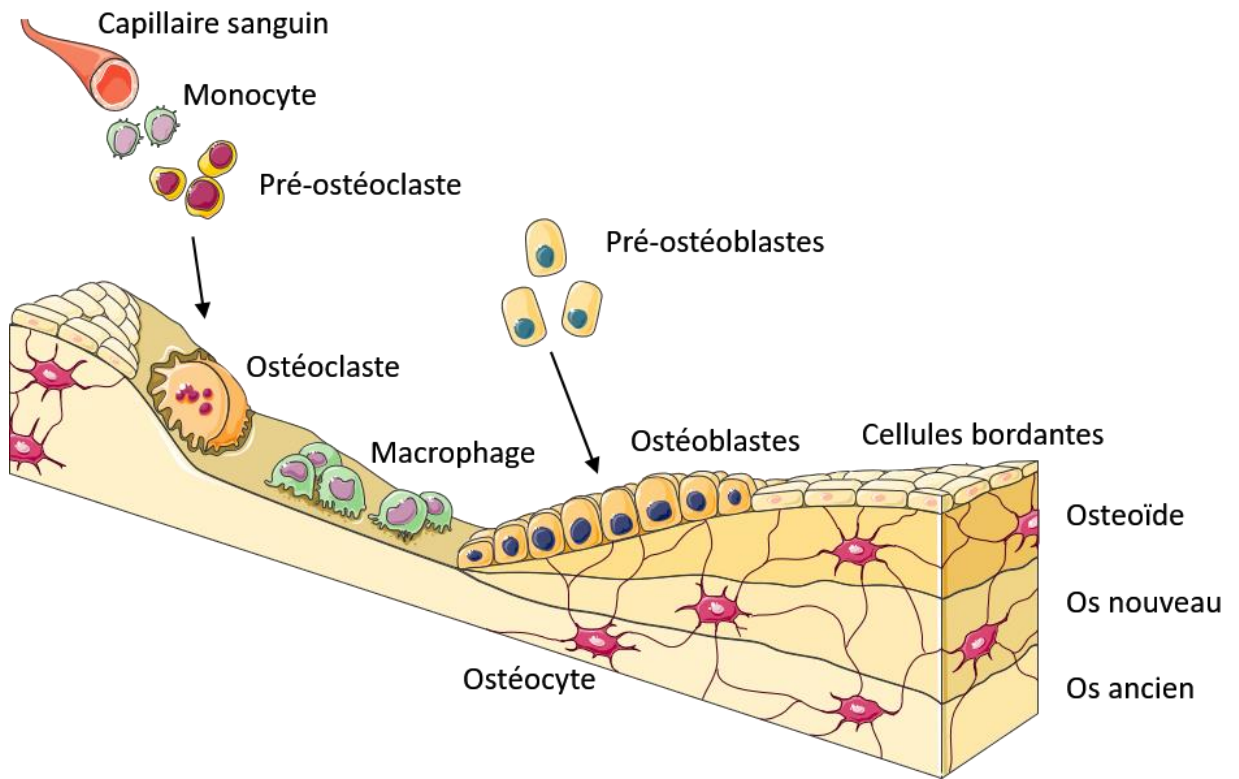
collagènes fibrillaires forment des fibrilles par association latérale en séries parallèles décalées. L'apposition latérale et longitudinale de fibrilles va permettre la formation de fibres de collagène de 0.5 à 150 µm de diamètre. Les fibres de collagène sont orientées préférentiellement en fonction des forces qui s'appliquent au tissu considéré. Par exemple, les os soumis à des forces d'extension auront des fibres orientées longitudinalement, tandis que les os soumis à des forces de tension auront des fibres orientées transversalement.

## VI.1.A Cartilage

Le cartilage est un tissu articulaire et de soutien produit par des cellules mésenchymateuses appelées chondroblastes. Le squelette cartilagineux (hyalin) forme le squelette embryonnaire, qui sera graduellement remplacé par des pièces osseuses. Au niveau des os longs, le cartilage perdure au niveau des articulations ainsi qu'au niveau des zones de croissance de la pièce osseuse (383). Les chondroblastes dérivent du mésoderme et de la crête neurale crânienne, ils conservent une capacité proliférative et sont caractérisés par l'expression de *SOX9*, le principal régulateur de la chondrogenèse [Figure V.3]. Deux autres facteurs de la famille des « *Sry-related HMG box* », *SOX5* et *SOX6*, peuvent se lier à *SOX9* et ainsi augmenter sa fonction transactivatrice (données revues dans (384)). La formation d'une pièce cartilagineuse consiste en la condensation de cellules mésenchymateuses et en leur différenciation en chondroblastes qui vont produire la matrice extracellulaire cartilagineuse. Au fur et à mesure de la formation de la pièce cartilagineuse, certains chondroblastes vont finir par être entourés par la matrice cartilagineuse et devenir ainsi des chondrocytes (112). Sous certaines conditions, les chondrocytes perdent leur capacité proliférative et s'hypertrophient en dégradant une partie de la matrice cartilagineuse avoisinante. Deux facteurs de la famille « *Runt-related* » sont indispensables à la régulation de ce processus d'hypertrophie des chondrocytes : *RUNX2* et *RUNX3* (données revues dans (384)).

Plus hydratée que celle des os, la matrice extracellulaire cartilagineuse est constituée de fibres collagènes principalement de type II, produit du gène *Col2a1*, et de glycosaminoglycanes. Les glycosaminoglycanes sont des molécules à caractère très hydrophile qui peuvent être sous forme libres tels que l'acide hyaluronique ou liés à des peptides pour former des protéoglycanes tels que la chondroïtine sulfate ou le kératane sulfate (112). Remarquons que certains cartilages peuvent se calcifier partiellement par dépôt de cristaux d'apatite (385).

La composition du squelette cartilagineux des vertébrés est loin d'être homogène: différents types peuvent être distingués sur base de la proportion en



**Figure V.5: Homéostasie osseuse**

Schéma représentant les cycles de formation/remodelage du tissu osseux ainsi que les différentes cellules impliquées. Les ostéoblastes matures produisent la MEC osseuse appelée ostéoïde qui sera ensuite minéralisée par des dépôts de cristaux d'hydroxyapatite. Une fois leur fonction de production osseuse accomplie, les ostéoblastes à la surface de l'os peuvent entrer en latence et devenir des cellules bordantes. Les ostéoblastes qui se sont fait emprisonner dans l'ostéoïde peuvent mourir par apoptose ou devenir des ostéocytes. Grâce à leurs prolongements cytoplasmiques, les ostéocytes forment un réseau de communication au sein de l'os et contrôlent l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes. Arrivant dans le tissu via la vascularisation, des monocytes se convertissent en ostéoclastes responsables de la résorption osseuse. Grâce à leur capacité phagocytaire, les macrophages permettent de débarrasser le tissu des débris cellulaires notamment induits par le remodelage du tissu. De plus, les macrophages sont impliqués dans la formation osseuse et l'homéostasie osseuse. *Adapté de Bellido, T., Plotkin, L.I. and Bruzani, A. (2014) Bone Cells. Basic Appl. Bone Biol., 14, 27–45. & Sinder, B.P., Pettit, A.R. and McCauley, L.K. (2015) Macrophages: Their Emerging Roles in Bone. J. Bone Miner. Res., 30, 2140–2149. & Servier Medical Art*

glycosaminoglycanes, la composition en fibres de collagène et de la présence ou non de fibres élastiques (385). Ainsi, chez les mammifères trois types de cartilages peuvent être distingués [Figure V.4] :

- Hyalin : matrice composée principalement de glycosaminoglycanes (ex. : squelette embryonnaire)
- Élastique : des fibres élastiques sont présentes dans la MEC (ex. : oreille externe)
- Fibreux : la matrice est enrichie en fibres de collagène, notamment de collagène de type I. (ex. : cartilage articulaire)

## VI.1.B Os

Embryologiquement parlant, les os dérivent du mésoderme et de la crête neurale crânienne (383). Le collagène de type I, constitué des produits des gènes *Col1a1* et *Col1a2*, est la protéine la plus abondante dans la matrice extracellulaire osseuse, tandis que l'ostéocalcine, l'ostéopontine et l'ostéonectine sont les protéines qui ne sont pas des collagènes, les plus abondantes (386). Produite par des cellules mésenchymateuses appelées ostéoblastes, la matrice extracellulaire osseuse connue sous le nom d'ostéoïde est minéralisée par des cristaux d'hydroxyapatite [Figure V.5]. La matrice osseuse est dégradée par des cellules d'origine hématopoïétique appelées ostéoclastes. Le squelette osseux sert de soutien au corps, permet la protection d'organes vitaux tels que le cerveau ou le cœur et constitue un point d'ancrage pour les muscles. Les os représentent un site important de régulation métabolique des minéraux et constituent une réserve de calcium et de phosphore. De plus, chez les mammifères, les os abritent la moelle osseuse, un site d'hématopoïèse (112).

En plus des collagènes, la MEC osseuse contient de nombreuses protéines impliquées dans la construction, la régulation et la minéralisation de la matrice extracellulaire [Tableau V.1] :

- des protéoglycanes (ex. : l'acide hyaluronique, le versican, l'héparan sulfate ou les petits protéoglycanes riches en leucine (SLRPs))
- des glycoprotéines (ex. : l'alkaline phosphatase, les thrombospondines 1 et 2, la fibronectine et la vitronectine)
- des protéines de la famille SIBLING (« *small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein* ») (ex. : l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse, DMP-1 (« *Dentin matrix acidic phosphoprotein 1* ») et MEPE (« *Matrix extracellular phosphoglycoprotein* »))
- l'ostéocalcine
- l'ostéonectine.

## Tableau V.1: Protéines non collagéniques de la MEC osseuse

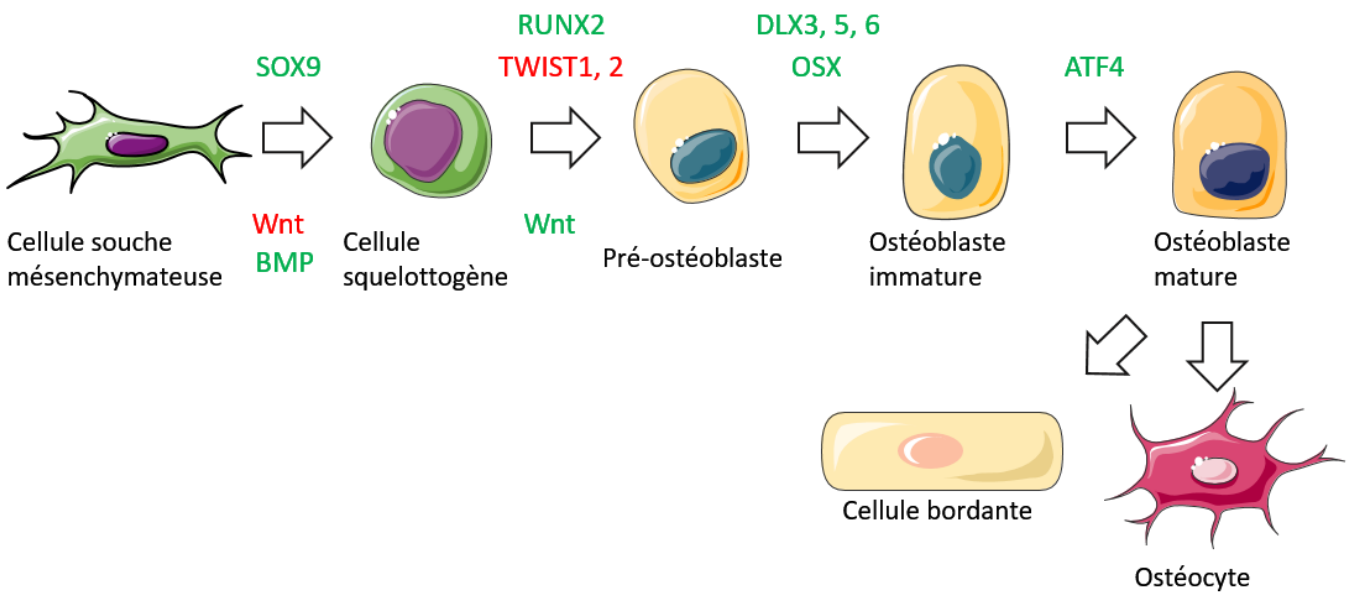
*Adapté de Burr, D.B. and Akkus, O. (2013) Bone Morphology and Organization Elsevier Inc*

Protéoglycans et Glycoaminoglycans									
Héparane sulfate	Produits par les ostéoclastes et les ostéoblastes. Joue un rôle important dans la communication intercellulaire (signalisation FGF et TGF $\beta$ ). Impliqué dans la régulation de l'ostéoprotégérine.								
Acide hyaluronique	Glycoaminoglycane qui ne forme pas de liaison covalente avec d'autres composants de la MEC. Permet d'augmenter la viscosité du tissu dans lequel il se trouve. Avec son récepteur cellulaire CD44 joue un rôle dans le développement squelettique.								
SLRPs	Fournissent l'organisation structurelle de la MEC osseuse.								
	<table border="1"> <tr> <td>Biglycane</td> <td>Principalement exprimé par les ostéoblastes matures. Capable d'induire l'apoptose des précurseurs ostéoblastiques. Peut se lier au collagène et aux TGF-<math>\beta</math>.</td> </tr> <tr> <td>Décorine</td> <td>Produit par les préostéoblastes puis réprimé dans les ostéoblastes matures. Se lie au collagène et peut réguler le diamètre des fibrilles. Lie les ligands TGF-<math>\beta</math> Inhibe la liaison cellulaire à la fibronectine.</td> </tr> <tr> <td>Fibromoduline</td> <td>Se lie aux fibres de collagène et aux ligands TGF-<math>\beta</math>.</td> </tr> <tr> <td>Ostéoadhérine</td> <td>Principalement exprimé par les ostéoblastes matures. Impliqué dans la différenciation des ostéoblastes et la minéralisation.</td> </tr> </table>	Biglycane	Principalement exprimé par les ostéoblastes matures. Capable d'induire l'apoptose des précurseurs ostéoblastiques. Peut se lier au collagène et aux TGF- $\beta$ .	Décorine	Produit par les préostéoblastes puis réprimé dans les ostéoblastes matures. Se lie au collagène et peut réguler le diamètre des fibrilles. Lie les ligands TGF- $\beta$ Inhibe la liaison cellulaire à la fibronectine.	Fibromoduline	Se lie aux fibres de collagène et aux ligands TGF- $\beta$ .	Ostéoadhérine	Principalement exprimé par les ostéoblastes matures. Impliqué dans la différenciation des ostéoblastes et la minéralisation.
Biglycane	Principalement exprimé par les ostéoblastes matures. Capable d'induire l'apoptose des précurseurs ostéoblastiques. Peut se lier au collagène et aux TGF- $\beta$ .								
Décorine	Produit par les préostéoblastes puis réprimé dans les ostéoblastes matures. Se lie au collagène et peut réguler le diamètre des fibrilles. Lie les ligands TGF- $\beta$ Inhibe la liaison cellulaire à la fibronectine.								
Fibromoduline	Se lie aux fibres de collagène et aux ligands TGF- $\beta$ .								
Ostéoadhérine	Principalement exprimé par les ostéoblastes matures. Impliqué dans la différenciation des ostéoblastes et la minéralisation.								
Versican	Contient du chondroïtine sulfate. Impliqué dans l'adhésion, la migration et la prolifération								
Glycoprotéines									
Phosphatase alcaline	Hydrolyse des inhibiteurs de la déposition minérale tels que les pyrophosphates. Utilisé comme marqueur de la formation osseuse. Nombreux isoformes dont une spécifique à l'os (BSAP).								
Fibronectine	Produite au cours des phases précoces de la formation osseuse. Impliqué dans l'adhésion, la croissance, la migration et la différenciation cellulaire.								
Thrombospondine	Produite au cours des phases précoces de la formation osseuse. Rôle dans le développement osseux. Activité anti-angiogène.								
Vitronectine	Impliqué dans l'adhérence cellulaire. Peut se lier à l'ostéopontine.								
Protéines SIBLING									
Sialoprotéine osseuse	Marqueur des derniers stades de la différenciation des ostéoblastes et des premiers événements de minéralisation. Aide à la formation des cristaux d'hydroxyapatite.								
DMP-1	Exprimé par les ostéoblastes et les ostéocytes. Régule la minéralisation. A une affinité pour l'hydroxyapatite et le collagène.								
MEPE	Exprimé par les ostéoblastes et les ostéocytes. Régule la minéralisation. Régulateur négatif de l'activité ostéoblastique.								
Ostéopontine	Produite au cours des phases précoces de la formation osseuse. Inhibe la formation minérale et la croissance cristalline. Se lie aux atomes calciques. Permet l'ancrage des ostéoclastes dans la MEC minéralisée.								
Autres									
Ostéocalcine	Exprimée par les ostéoblastes et les ostéocytes. Contrôle le dépôt minéral. Augmente la liaison du calcium. Marqueur du remodelage osseux.								
Ostéonectine	Lie le collagène, l'acide hyaluronique et la vitronectine. Localisée aux sites de dépôt minéral. Pourrait jouer un rôle dans la prolifération ostéoblastique.								

L'ostéocalcine est un bon marqueur du modelage/ remodelage osseux puisqu'elle active la liaison du calcium, contrôle le dépôt minéral et régule l'activité des ostéoclastes. L'ostéonectine localisée au site de minéralisation, lie l'hydroxyapatite, le collagène, la vibronectine et plusieurs facteurs de croissance, et aide à la formation du réseau minéral (387).

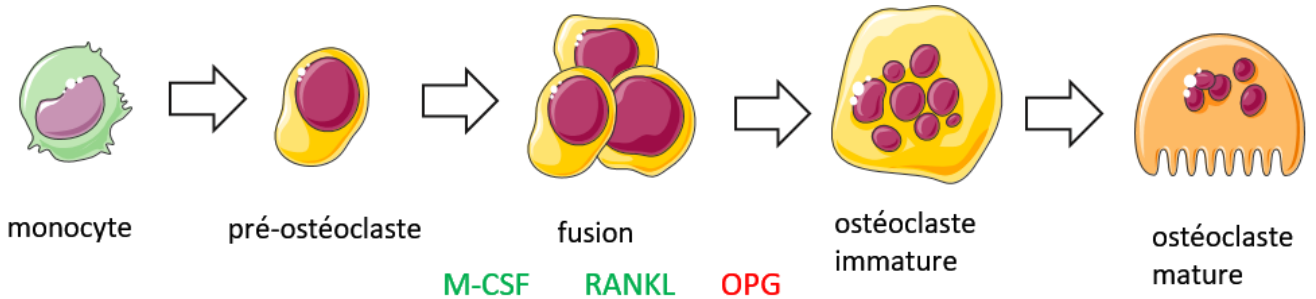
Les ostéoblastes dérivent de progéniteurs mésenchymateux, au même titre que les chondrocytes, les myocytes ou les adipocytes (387). Le rôle principal des ostéoblastes est la production de la matrice extracellulaire osseuse ainsi que sa minéralisation. La différenciation de cellules progénitrices en ostéoblastes matures, appelée ostéoblastogenèse, débute par l'induction de la cellule souche mésenchymateuse en progéniteur squelettogénique [Figure V.6]. Un progéniteur squelettogénique est une cellule pouvant se différencier soit en chondroblaste soit en ostéoblaste en fonction des signaux extracellulaires qu'il reçoit. Sous l'influence des voies de signalisation WNT et BMP et du facteur de transcription RUNX2, un progéniteur squelettogénique va se différencier en un précurseur ostéoblastique. Ce processus est inhibé par les facteurs de transcription bHLH TWIST1 et TWIST2. Ensuite, sous l'effet des facteurs de transcription ostérix (OSX), DLX 3, 5 et 6, le précurseur va se différencier en ostéoblaste immature. La maturation de l'ostéoblaste se réalise grâce à l'action du facteur de transcription ATF4 (données revues dans(384, 387)). D'autres facteurs de transcription importants au cours de l'ostéoblastogenèse sont les protéines de la famille AP-1 telles que FOS, JUN et JUND. L'interaction des ostéoblastes avec la matrice osseuse via des intégrines permet la régulation de la différenciation, la fonction et la survie des ostéoblastes selon les besoins du tissu. Après avoir complété leur tâche de formation osseuse, la majorité des ostéoblastes meurent par apoptose ; les autres deviennent des cellules quiescentes aplaties appelées cellules bordantes ou des ostéocytes (387).

La production d'ostéoïde par les ostéoblastes, mène parfois à leur emprisonnement au sein de celle-ci ; ils deviennent alors des ostéocytes(386). Les ostéocytes sont impliqués dans la minéralisation de la matrice osseuse, dans la modulation de l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes, ils servent de senseur mécanique et sont capables d'une résorption osseuse particulière appelée ostéolyse ostéocytaire. La logette dans laquelle siège un ostéocyte est appelée ostéoplaste, à partir de celle-ci plusieurs canalicules parcourent le tissu osseux et renferment des prolongements cytoplasmiques(387). Ces prolongements cytoplasmiques permettent la communication avec des ostéoblastes, avec d'autres ostéocytes, et servent probablement à la fonction de senseur mécanique des ostéocytes. Un produit particulier des ostéocytes est la sclérostine, produite par le gène *Sost*, qui inhibe les ostéoblastes et stimule la résorption osseuse par les ostéocytes (386). Les ostéocytes produisent également FGF-23, une hormone qui régule la résorption de phosphate par



### Figure V.6: Ostéoblastogenèse

Schéma représentant les différents stades de l'ostéoblastogenèse ainsi que les facteurs de transcription et les voies de signalisation majeure la contrôlant. En vert sont indiqués les facteurs nécessaires pour le passage au stade suivant, tandis qu'en rouge sont indiqués les facteurs inhibant le passage au stade suivant. Les facteurs intrinsèques (facteurs de transcription) sont placés au dessus des flèches indiquant le passage entre les différents stades, tandis que les facteurs extrinsèques sont placés en dessous des flèches. Les ostéoblastes matures peuvent mourir par apoptose, devenir des cellules bordantes quiescentes ou être emprisonnés dans leur matrice et devenir des ostéocytes. *Adapté de Bellido, T., Plotkin, L.I. and Bruzganiti, A. (2014) Bone Cells. Basic Appl. Bone Biol., 14, 27–45. & Servier Medical Art*



### Figure V.7: Ostéoclastogenèse

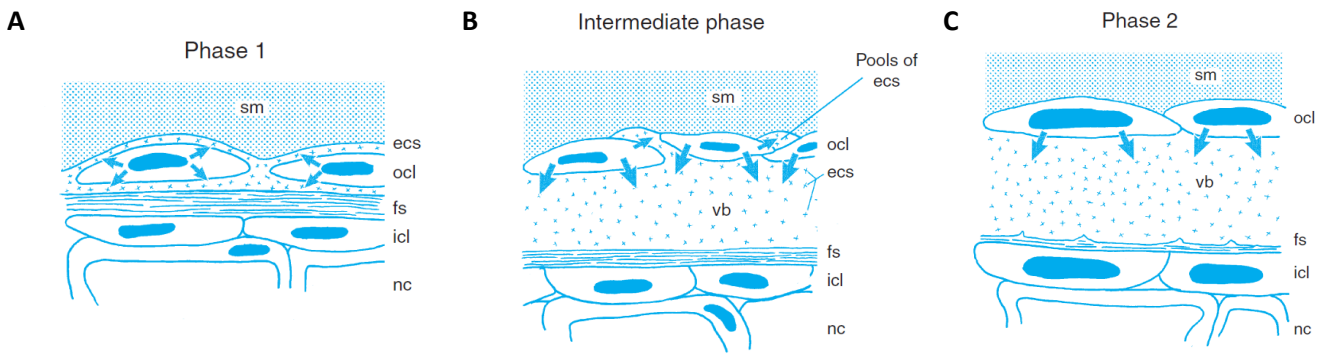
Schéma représentant les différents stades de l'ostéoclastogenèse ainsi que les principaux facteurs contrôlant le processus. En vert sont indiqués les facteurs favorisant la différenciation tandis qu'en rouge sont représentés les facteur l'inhibant. Les facteurs intrinsèques (facteurs de transcription) sont placés au dessus des flèches indiquant le passage entre les différents stades, tandis que les facteurs extrinsèques sont placés en dessous des flèches. Les différents facteurs impliqués dans l'ostéoclastogenèse sont principalement produits par les ostéoblastes et les ostéocytes. Des monocytes vont s'engager dans la lignée ostéoclastique pour former des pré-ostéoclastes qui vont fusionner entre eux pour former un ostéoclaste immature multinucléé. La maturation de ce dernier, comprenant une étape de polarisation de la cellule, mène à la formation d'un ostéoclaste mature capable de se lier à la MEC osseuse et de la dégrader. *Adapté de Bellido, T., Plotkin, L.I. and Bruzganiti, A. (2014) Bone Cells. Basic Appl. Bone Biol., 14, 27–45. & Servier Medical Art*

les reins, la production et le catabolisme de la 1,25-dihydroxyvitamine D, ainsi que la minéralisation osseuse (388).

Les ostéoclastes sont les cellules impliquées dans le processus de résorption osseuse, processus essentiel au remodelage de la matrice osseuse afin de garantir la croissance et l'intégrité du tissu osseux (112). Le remodelage osseux nécessite le recrutement de précurseurs ostéoclastiques à la surface osseuse, où ils vont proliférer, se différencier et fusionner afin de former des ostéoclastes matures multinucléés. Contrairement aux ostéoblastes, les ostéoclastes ne proviennent pas d'une lignée mésenchymateuse, mais font partie de la lignée hématopoïétique monocyttaire. Le recrutement de monocytes et leur différenciation en ostéoclastes, appelée ostéoclastogenèse, est contrôlée principalement par le facteur de stimulation de colonies macrophagiques (M-CSF) et le ligand du récepteur activateur de NFκB (RANKL) [Figure V.7] (386, 387). Les ostéoclastes matures sont des cellules polarisées, le pôle actif proche de la surface osseuse présente des podosomes et est riche en filaments d'actine permettant aux ostéoclastes de s'attacher à la surface osseuse. Les ostéoclastes induisent la résorption de la matrice osseuse en créant un milieu acide et en déversant des enzymes lysosomiales par leur pôle actif ; l'acidité dissout la partie minérale tandis que les enzymes dégradent la partie organique de la matrice. Les produits de cette digestion sont internalisés par les ostéoclastes dans des vésicules lysosomiales grâce auxquelles ils peuvent être dégradés ou exportés dans le milieu extracellulaire (386, 387). Une fois leur mission de résorption accomplie, les ostéoclastes meurent par apoptose ; les ostéoclastes ont une durée de vie très brève, environ 3 semaines. La différenciation et l'activité des ostéoclastes est notamment contrôlée par les ostéoblastes et les ostéocytes qui produisent RANKL ainsi que son antagoniste, l'ostéoprotégérine (OPG). Ainsi le rapport entre la production de RANKL et d'OPG influe grandement sur l'équilibre entre l'ostéolyse et l'ostéosynthèse. La parathormone stimule la formation d'ostéoclastes et leur activité tandis que la calcitonine inhibe leur fonction.

### *Les os acellulaires*

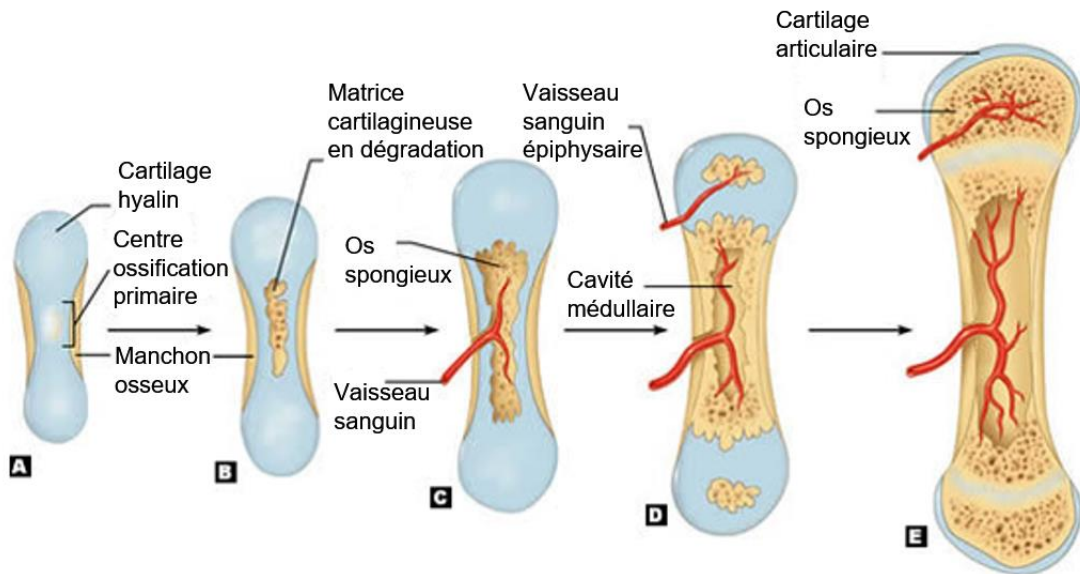
Chez l'homme, les os acellulaires, c'est-à-dire des os dépourvus d'ostéocytes en leur sein, résultent généralement de dégénérescence ou de pathologies osseuses (386). Cependant, chez un grand groupe de vertébrés, les téléostéens, les os acellulaires font partie du squelette normal (non-pathologique et non-régénératif). Les téléostéens sont subdivisés en deux groupes : les « basiques » (ex.: saumon et poisson zèbre) qui possèdent des os principalement cellulaires et des ostéoclastes multinucléés, tandis que les poissons « avancés » (ex. : medaka et dorade) possèdent un squelette osseux principalement acellulaire et des ostéoclastes mononucléés (389). La formation d'os acellulaire implique une sécrétion polarisée de l'ostéoïde par les ostéoblastes, ceux-ci



### Figure V.8: Formation osseuse chez les téléostéens

Modèle de développement d'un os acellulaire vertébral par Sunetra Ekanyake et Brian Hall d'après leur étude du médaka *Oryzias latipes*. La notochorde (nc) est entourée d'une couche cellulaire interne (icl) produisant une gaine fibreuse (fs) et une couche externe (ocl) responsable de la formation osseuse. **(A)** Durant les phases embryonnaire et larvaire, des ostéoblastes de la ocl vont produire de la matrice osseuse (ecs) tout autour d'elles (flèches). **(B)** La phase intermédiaire a lieu au cours de la phase juvénile et est caractérisée par une sécrétion plus polarisée de l'ostéoïde à mesure que l'os vertébral (vb) se forme. **(D)** Chez le medaka adulte, la sécrétion de la matrice osseuse est complètement polarisée (flèches), laissant les ostéoblastes à la surface osseuse et formant un os acellulaire. sm: somite

Adapté Ekanyake, S. and Hall, B.K. (1988) *Ultrastructure of the osteogenesis of acellular vertebral bone in the Japanese medaka, Oryzias latipes (teleostei, cyprinodontidae)*. *Am. J. Anat.*, 182, 241–249. D'après Bone. *Bone and cartilage 2<sup>e</sup> Ed.* Hall 2015



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

### Figure V.9: Ossification chondrale

L'ossification chondrale prend place sur un modèle cartilagineux préexistant. Le remplacement de la pièce cartilagineuse par une pièce osseuse débute par l'hypertrophie des chondrocytes situés au centre de la pièce squelettique (diaphyse); au cours de ce processus, les chondrocytes vont résorber une partie de la matrice les entourant. Parallèlement une gaine osseuse est formée sur le pourtour de la diaphyse. En résulte une calcification de la MEC cartilagineuse et la mort de nombreux chondrocytes, ce qui mène la formation d'un réseau de vacuoles vides. La transdifférenciation de chondrocytes en ostéoblastes et l'arrivée de cellules souches mésenchymateuses via la vascularisation naissante va permettre la formation d'un centre d'ossification primaire. Ce centre d'ossification primaire va produire de l'os réticulaire, qui sera ensuite remplacé par de l'os spongieux. Les ostéoblastes situés à la surface diaphysaire sont responsables de l'ossification péri-chondrale et produisent un os lamellaire. Des centres d'ossification peuvent apparaître aux extrémités de la pièce squelettique (épiphyse), ceux-ci suivent la même procédure d'ossification qu'au niveau de la diaphyse. La croissance de l'os en longueur est assurée par les cartilages de conjugaison situés à la limite entre la diaphyse et les épiphyses, tandis que la croissance en largeur est assurée par les ostéoblastes périphériques par ossification périostale. Adapté de Allen, M.R. and Burr, D.B. (2013) *Bone Modeling and Remodeling. Basic Appl. Bone Biol.*, 10.1016/B978-0-12-416015-6.00004-6.



conservant toujours leur position à la surface osseuse et ne se faisant jamais emprisonner par celle-ci [Figure V.8].

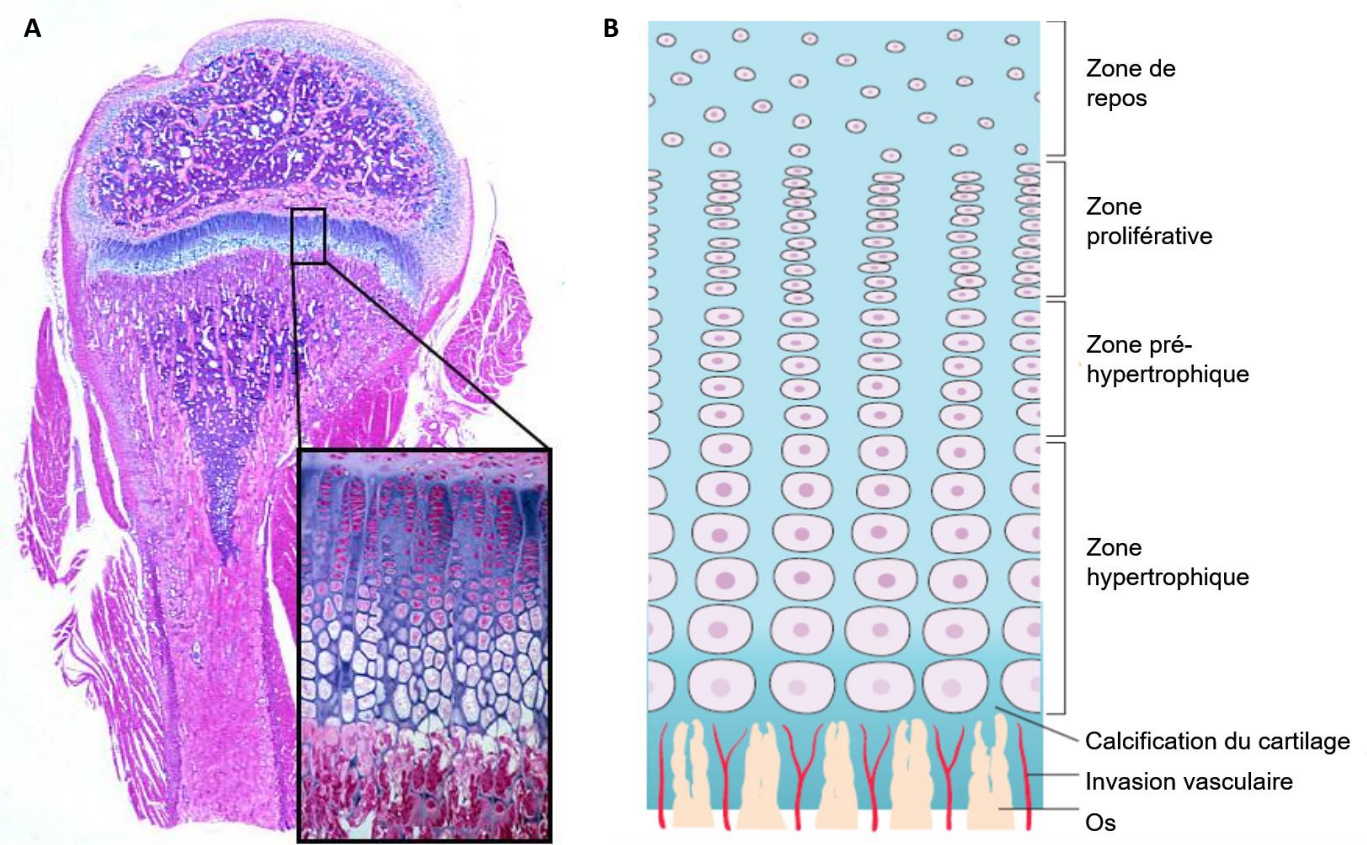
Vivant dans un milieu liquide riche en minéraux, il est évident que le rôle du squelette des poissons dans la régulation homéostatique des minéraux est moindre, les os des poissons jouent cependant un rôle important dans la régulation phosphore et dans une moindre mesure du calcium.

### VI.1.C Ossification

On distingue deux grands types d'ossification : chondrale lorsqu'elle a lieu sur une matrice cartilagineuse préexistante et membranaire quand elle a lieu directement par condensation de cellules mésenchymateuses.

La majorité des structures osseuses du squelette se forment à partir d'un modèle cartilagineux hyalin embryonnaire qui est remplacé progressivement par du tissu osseux minéralisé : c'est l'ossification dite chondrale [Figure V.9] (données revues dans (390)). La première étape du remplacement du cartilage par de l'os est l'hypertrophie des chondrocytes qui résorbent la matrice qui les entoure et forment un réseau de vacuoles communicantes. Ensuite des cellules situées à la périphérie de la pièce cartilagineuse se différencient en ostéoblastes et débutent la formation d'os minéralisé à la surface du cartilage, appelé manchon osseux. Ce processus de formation osseuse débute au niveau de la région médiane de la pièce cartilagineuse (appelée diaphyse dans le cas d'un os long) : c'est le centre d'ossification primaire. La formation du manchon osseux limite l'accès du tissu cartilagineux sous-jacent aux nutriments et induit sa calcification. Suite à cette privation en nutriments, de nombreux chondrocytes hypertrophiés vont mourir, il faut toutefois remarquer que certains ont la capacité de se transdifférencier en ostéoblastes (391-395). L'étape suivante est l'invasion vasculaire du réseau vacuolaire formé suite à l'hypertrophie des chondrocytes (données revues dans (390)). Outre l'approvisionnement en nutriments, l'arrivée de vaisseaux sanguins dans la structure en cours d'ossification permet l'apport de cellules souches mésenchymateuses et de monocytes ; ces dernières vont pouvoir se différencier respectivement en ostéoblastes et en ostéoclastes. Les ostéoclastes détruisent le cartilage calcifié qui est remplacé par de l'os formé par les ostéoblastes.

Des centres d'ossification secondaires peuvent éventuellement apparaître aux extrémités de la pièce osseuse (épiphyse) via un processus similaire. Au fur et à mesure de l'ossification, seule une bande de cartilage, appelé le cartilage de conjugaison, va subsister entre la diaphyse et chacune des épiphyses [Figure V.10]. Durant la



### Figure V.10: Cartilage de conjugaison

(A) Le cartilage de conjugaison situé à la limite entre la diaphyse et chaque épiphyse peut être divisé en cinq zones suivant l'apparence histologique des chondrocytes et de la matrice qui les entourent. (B) Ainsi on distingue la zone de repos, dans laquelle le tissu a une apparence de tissu cartilagineux hyalin standard. La zone proliférative contient comme son nom l'indique des chondrocytes en phase de prolifération intense. La zone pré-hypertrophique contient des chondrocytes qui commencent à augmenter en taille et est logiquement suivie par la zone hypertrophique marquée par des chondrocytes hypertrophiés et une matrice qui commence à se calcifier. La zone suivante est une zone intermédiaire entre le cartilage en dégradation et l'os en formation, elle est caractérisée par la présence de matrice cartilagineuse calcifiée, la réduction du nombre de chondrocytes, la présence de vaisseaux sanguins et l'apparition d'ostéoblastes et de l'ostéoïde qu'ils produisent. Tiré de [http://medsci.indiana.edu/histo/docs/lab2\\_8.htm](http://medsci.indiana.edu/histo/docs/lab2_8.htm) & Allen, M.R. and Burr, D.B. (2013) *Bone Modeling and Remodeling, Basic Appl. Bone Biol.*, 10.1016/B978-0-12-416015-6.00004-6.

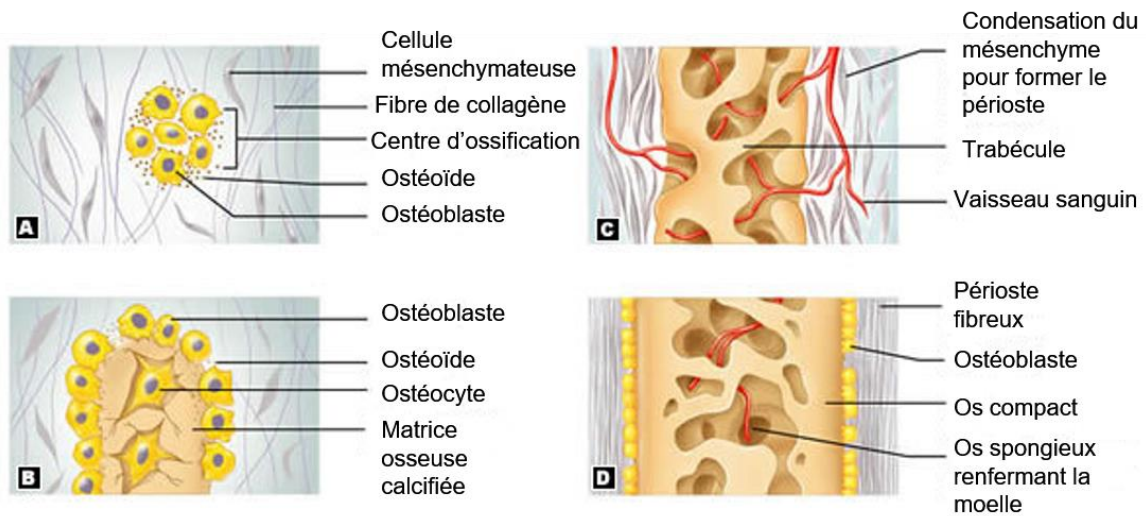
## Sujet annexe

croissance de l'individu, la multiplication des chondrocytes des cartilages de conjugaison suivie de leur remplacement par du tissu osseux permet la croissance en longueur de l'os. La croissance en largeur est assurée par les ostéoblastes situés en périphérie de la pièce osseuse (nommé périoste), processus appelé ossification périostale. En fin de croissance, les cartilages de conjugaison s'ossifient totalement. L'ossification chondrale n'est pas uniquement limitée au développement embryonnaire, puisqu'elle est très importante au cours de la réparation de fractures.

Alors que chez les mammifères et les lézards, les ossifications périchondrales et endochondrales ont une importance équivalente, chez les poissons, les amphibiens et les oiseaux, l'ossification périchondrale prédomine (385).

Les pièces osseuses qui ne se forment pas à partir d'un modèle cartilagineux se forment par ossification membranaire [**Figure V.11**] (données revues dans (390)). La phase initiale est la condensation de cellules souches mésenchymateuses au lieu d'ossification, pour former ce que l'on appelle un blastème osseux. Les cellules au sein du blastème vont se différencier en ostéoblastes et produire de la matrice osseuse. Cette production de tissu osseux va permettre d'établir un centre d'ossification primaire produisant de l'os réticulaire. La matrice osseuse ainsi rapidement produite est mécaniquement faible, les fibres de collagènes ont une disposition aléatoire et la matrice est peu minéralisée. L'os réticulaire sera à terme remplacé par de l'os spongieux. Suite à l'agrandissement de la pièce osseuse, des ostéoblastes vont être recrutés à la surface osseuse et vont produire un tissu osseux organisé et solide appelé os lamellaire permettant de renforcer la structure.

Dans les cas où la structure osseuse devient tellement large que les ostéocytes centraux sont trop distants des vaisseaux sanguins et donc ne reçoivent pas assez de nutriments, une cavité médullaire se forme. Cette cavité médullaire sera envahie par des vaisseaux sanguins pour former de la moelle osseuse. Chez l'homme, les os tels que la mâchoire forment une cavité médullaire alors que d'autres tels que la clavicule n'en forment pas. L'ossification membranaire est également impliquée dans les processus de réparation de fracture.



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

### Figure V.11: Ossification membranaire

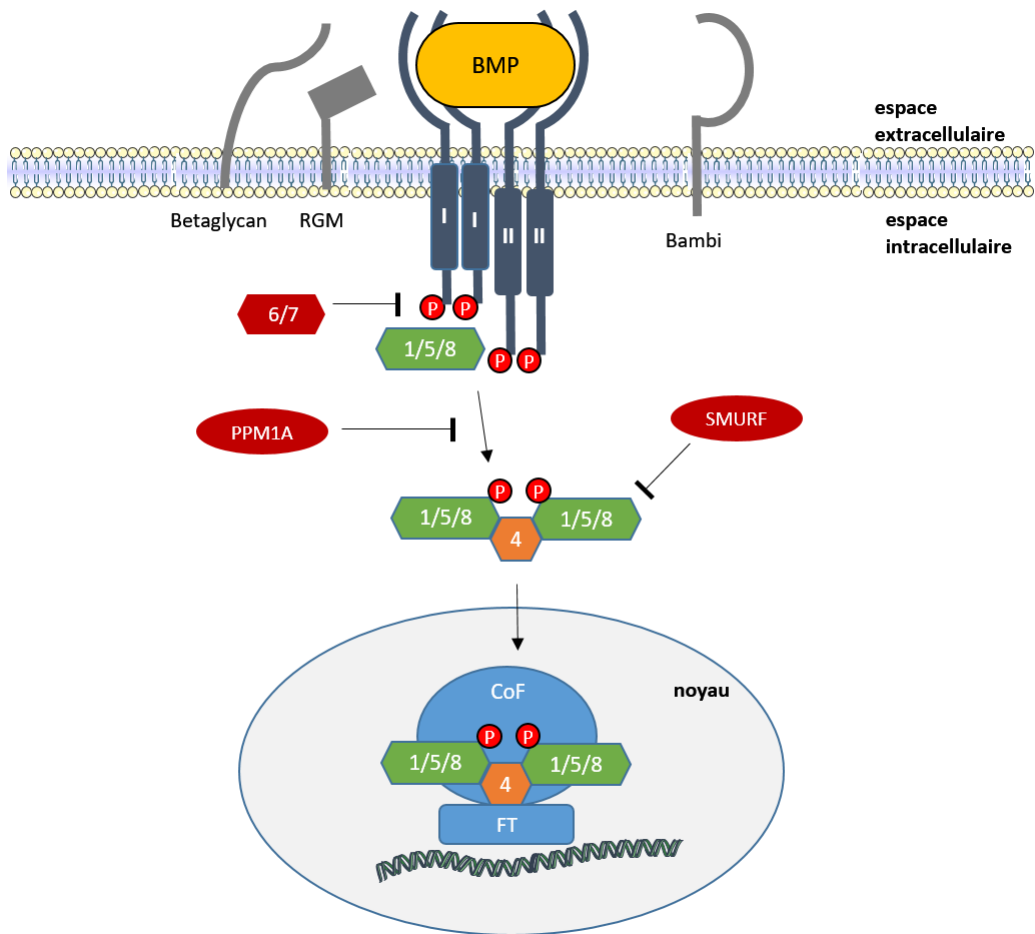
L'ossification membranaire consiste en la formation d'une pièce osseuse à partir d'un condensat de cellules mésenchymateuses, sans passage par un modèle cartilagineux. **(A et B)** Des cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes et constituent un centre d'ossification primaire produisant une MEC osseuse peu organisée (os réticulaire). **(C)** Cet os sera ensuite remplacé par du tissu spongieux et envahi par des vaisseaux sanguins amenant les nutriments, des monocytes, des macrophages et des cellules mésenchymateuses au tissu osseux en formation. **(D)** A la surface externe de l'os (le périoste), des ostéoblastes produisent un tissu osseux lamellaire, plus organisé et résistant. Tiré de Allen, M.R. and Burr, D.B. (2013) *Bone Modeling and Remodeling. Basic Appl. Bone Biol.*, 10.1016/B978-0-12-416015-6.00004-6.

## VI.1.D BMP

La masse osseuse est maintenue au cours de la vie via la régulation fine de la balance entre les activités des ostéoblastes et des ostéoclastes. Cette coordination est assurée grâce à une signalisation intercellulaire intense, modulée par l'interaction des cellules osseuses avec la matrice extracellulaire et contrôlée par l'action d'hormones. L'une des voies de signalisation majeures lorsque l'on évoque la formation est la voie des protéines morphogéniques osseuses ou BMPs.

Les BMPs (« *Bone Morphogenic Proteins* ») sont des facteurs de croissance appartenant à la superfamille des TGF- $\beta$  (« *Transforming Growth Factor- $\beta$*  »). Chez les vertébrés, la voie de signalisation des BMPs est connue pour jouer un rôle essentiel dans de nombreux processus développementaux précoces, tels que dans la gastrulation, la détermination des axes du corps ou la neurulation, mais aussi dans la squelettogenèse (396-401). Dans le tissu squelettique, les BMPs sont produits par divers types cellulaires, dont les cellules endothéliales, les chondrocytes et les ostéoblastes (données revues dans (402)). La majorité des ligands BMPs sont formés par homodimérisation via une liaison bisulfure. Une fois sécrétés dans le milieu extracellulaire, de nombreuses molécules, tels que Noggin, Chordin, Follistatin ou la Sclérostine, sont capables de séquestrer les ligands BMPs ; permettent ainsi un niveau de régulation de la voie BMP supplémentaire (données revues dans (402)).

Les ligands BMPs vont se lier à un complexe transmembranaire constitué de deux types de récepteurs sérine/thréonine kinase. Les récepteurs type I (ALK-1, -2, -3 et -6) possèdent un domaine riche en glycine et en sérine, appelé domaine GS, entre le domaine transmembranaire et le domaine kinase cytoplasmique. Les récepteurs de type II (BMPR-II, ACTR-IIA et ACTR-IIB) sont constitutivement actifs. La liaison d'un ligand BMP à un couple de récepteurs BMP I/II permet la phosphorylation du domaine GS du récepteur I par le récepteur II ; ce qui entraîne l'activation du domaine kinasique du récepteur I [Figure V.12]. La liaison du ligand est facilitée grâce à des co-récepteurs membranaires tels que le Betaglycane ou des membres de la famille des protéines de guidance répulsive (RGM) ; d'autres molécules membranaires telles que BAMBI agissent en tant que pseudorécepteur et empêchent la liaison ligand - récepteur. Dans la voie BMP canonique, le récepteur lié au ligand va activer par phosphorylation les facteurs de transcription SMAD1, 5 et 8 associés aux récepteurs, communément appelés les R-Smads. En association avec SMAD4, les R-SMADs phosphorylés vont passer dans le noyau, interagir avec d'autres protéines et moduler l'expression de gènes cibles (403). La phosphorylation des R-SMADs peut être modulée via l'action de phosphatases cytoplasmiques telles que PPM1A (« *Protein phosphatase magnesium dependent 1A* »), SCP-1 ou SCP-2 (« *Small C-terminal domain*



### Figure V.12: Signalisation BMP canonique

La liaison d'un ligand BMP au complexe de récepteurs BMP I et II permet l'activation par phosphorylation du domaine kinase du récepteur I par le récepteur II. La liaison du ligand aux BMPRs est facilitée par des co-récepteurs tels que le Betaglycan ou des protéines membranaires de guidance répulsive (RGM), et contrée par des pseudorécepteurs tels que BAMBI. Une fois activés les BMPRs vont pouvoir induire la voie de transduction du signal SMAD consistant en l'activation de R-SMADs, qui vont se lier à un Co-SMAD afin de passer dans le noyau pour moduler l'expression de gènes cibles. Les R-SMADs 1, 5 et 8 vont être phosphorylés et donc activés par le BMPR lié au ligand. Cette phosphorylation des R-SMADs peut être inhibée par l'action des I-SMADs 6 et 7. Les R-SMADs peuvent être déphosphorylés par l'action de phosphatases telles que PPM1A, SCP-1 ou SCP-2. Une fois activés, les R-SMADs vont s'associer au Co-SMAD 4, passer dans le noyau et s'associer à des co-facteurs (CoF) activateurs ou répresseurs ainsi qu'à des facteurs de transcription afin de réguler l'expression génétique de gènes cibles de la voie. Parmi les facteurs de transcription dont l'action peut être ainsi modulée, citons des facteurs des familles AP-1, bHLH ou RUNX. L'activité des R-SMADs peut être également régulée par ubiquitination par des protéines telles que SMURF1 ou SMURF2. D'après Sánchez-Duffhues, G., Hiepen, C., Knaus, P. and ten Dijke, P. (2015) Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone*, 80, 43–59.

*phosphatases 1 and 2* »). De manière complémentaire, l'activité des Smads peut être régulée par ubiquitination par des protéines telles que SMURF1 ou SMURF2. Les ligands BMPs semblent être capables de se lier à des composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la fibrilline ou la fibronectine ; cette interaction permet donc de moduler la biodisponibilité des ligands BMPs (données revues par (402).

L'importance de la voie de signalisation des BMPs pour le développement du squelette est soulignée par le nombre de maladies humaines qui y sont liées. Par exemple, la fibrodysplasie ossifiante progressive (FOD) aussi appelée la maladie de l'homme de pierre (OMIM 135100) est une maladie génétique autosomique dominante rare. La FOD est caractérisée par des malformations des gros orteils et une ossification hétérotopique progressive formant de l'os dans des tissus extrasquelettiques tels que les muscles (404). Cette maladie est due à une mutation activatrice (R206H) dans le gène codant pour le récepteur BMP type I ALK2 ; stimulant les cellules mésenchymateuses à se différencier en ostéoblastes et donc à la production de tissu osseux (405, 406). De nombreuses études *in vivo* chez la souris supportent l'importance de la signalisation BMP dans l'ostéogenèse. Des défauts craniofaciaux ont été rapportés chez les souris portant un « *knock-out* » conditionnel pour le récepteur BMP type I ALK2 ou SMAD4 dans les cellules de la crête neurale crânienne (CNC), ou dans des souris transgéniques exprimant l'antagoniste SMAD7 dans les cellules CNC (407-409). Chez les mammifères, BMP2 est un régulateur positif important de la différenciation ostéoblastique par stimulation de l'expression de OSTERIX et RUNX2 via DLX5 (410, 411).

Chez le poisson zèbre, il a été montré que plusieurs membres de la famille de ligands BMP, tel que Bmp2a, Bmp2b, Bmp4, Bmp5 et Bmp7 sont exprimés dans la région pharyngienne et sont importants pour le développement du cartilage craniofacial (412-415). Les BMP ont été décrits comme promoteur des destins ventraux du squelette craniofacial chez le poisson zèbre avant 24hpf (416). Aux stades plus tardifs (30-36hpf), le contrôle précis de l'expression du gène *fsta*, codant pour un antagoniste BMP, dans l'endoderme pharyngien a été montré pour être requis pour une quantité optimale de la signalisation BMP nécessaire pour une différenciation chondrocytaire et une formation des cartilages pharyngiens correcte (417). Ainsi, le rôle de la signalisation BMP dans la formation du squelette a été bien étudié au cours des deux premiers jours de développement, cependant on connaît peu sur son rôle à des stades plus tardifs, notamment au niveau de la formation du squelette osseux.

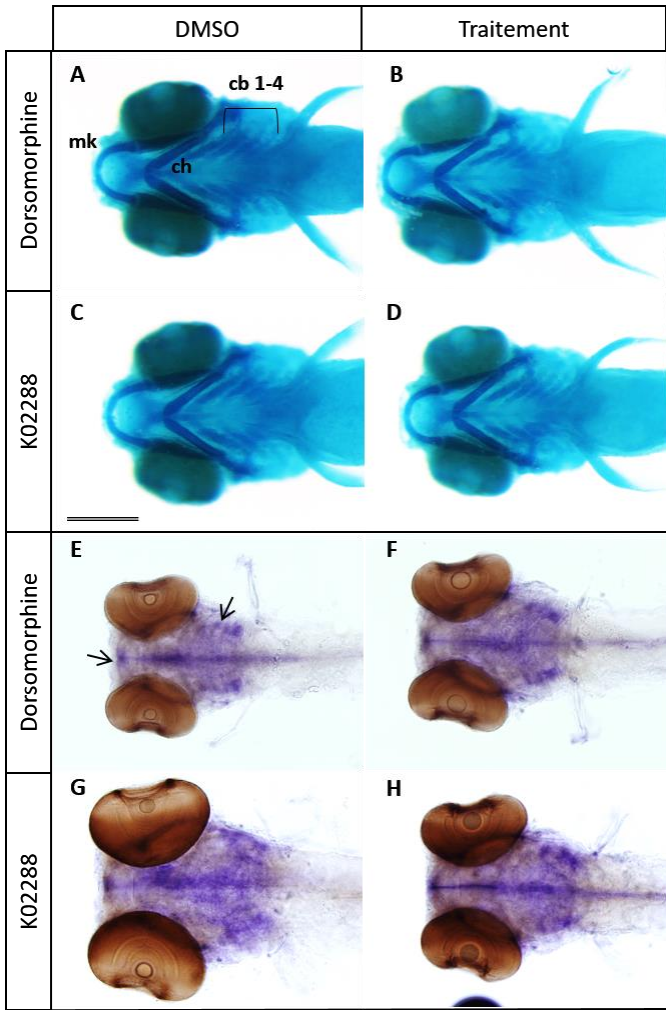




## V.2 Objectifs

Au cours du développement embryonnaire, les voies de signalisation permettent de réguler la différenciation de cellules mésenchymateuses en cellules squelettiques et contrôlent la formation et la maintenance des différentes pièces squelettiques. L'altération de ces voies de signalisation mène à un grand nombre de pathologies congénitales regroupées sous le terme de dysplasies squelettiques. Parmi ces voies de signalisation, la voie des protéines morphogéniques osseuses (BMP) est incontournable, bien qu'étant l'une des premières à avoir été découverte pour son action sur le développement squelettique, de nombreuses zones d'ombres restent encore à éclaircir. Le poisson zèbre, *Danio rerio*, a été reconnu comme un modèle puissant pour étudier les pathologies humaines, en comprendre les mécanismes et développer des thérapies (418–420). Etant donné le nombre de pathologies qui y sont associées et le fait qu'il soit le premier à subir l'ossification et la minéralisation, c'est le squelette craniofacial qui a reçu le plus d'attention (421–423). De plus, ce squelette a l'avantage d'être formé d'os chondraux et membranaires, ce qui permet d'étudier les deux types d'ossification simultanément.

Des études précédentes chez le poisson zèbre ont révélé l'importance cruciale de la signalisation BMP pour la formation correcte du squelette cartilagineux embryonnaire (416, 417). Il a en effet été démontré que la signalisation BMP est requise entre 15 et 45 hpf afin de permettre le développement correct des différentes pièces cartilagineuses, en particulier des arcs pharyngiens, au moins en partie via son action activatrice de l'expression de *runx2b*. Dans le cadre de notre étude, nous voulons élucider le rôle de la signalisation BMP sur le développement du squelette crâniofacial osseux. Pour ce faire nous avons inactivé la signalisation BMP au moyen des inhibiteurs chimiques dorsomorphine et K02288, ainsi que via l'expression conditionnelle d'un mutant dominant négatif pour un récepteur BMP dans la lignée transgénique *Tg(hsp70l:dnBmpr-GFP)*. Suite à cette inactivation, la formation osseuse a été analysée grâce à la coloration rouge alizarine, la présence des ostéoblastes fut inspectée grâce à une lignée transgénique exprimant la protéine fluorescente mCherry sous le contrôle d'un promoteur ostérix *Tg(osterix:mCherry)*, et l'activité des ostéoblastes évaluée via la détection de la production d'oxyde nitrique grâce au colorant DAF-FM DA à 5 dpf. De plus, afin de vérifier le fait que la signalisation BMP n'est plus nécessaire au squelette cartilagineux après 48 hpf, des colorations au bleu Alcian ont été effectuées sur des embryons dont la signalisation a été inactivée.



**Figure V.13: Effets des inhibiteurs BMP entre 2 et 3 dpf sur la formation cartilagineuse.**

Larves de 5 dpf préalablement traitées à 2 dpf durant 24 heures avec de la dorsomorphine (100  $\mu$ M) ou du K02288 (20  $\mu$ M). Les embryons contrôles sont traités avec du DMSO. **(A-D)** Squelette cartilagineux marqué grâce au bleu alcian. **(E-H)** Expression de *sox9a* marquée par hybridation *in situ* visible. Aucun effet sur les pièces cartilagineuses ni sur l'expression de *sox9a* n'est observé suite aux traitements. cb 1-4: rayons cératobranchiaux 1 à 4; ch: cératohyalin; mk: cartilage de Meckel. Barre d'échelle: 200  $\mu$ M

## V.3 Résultats

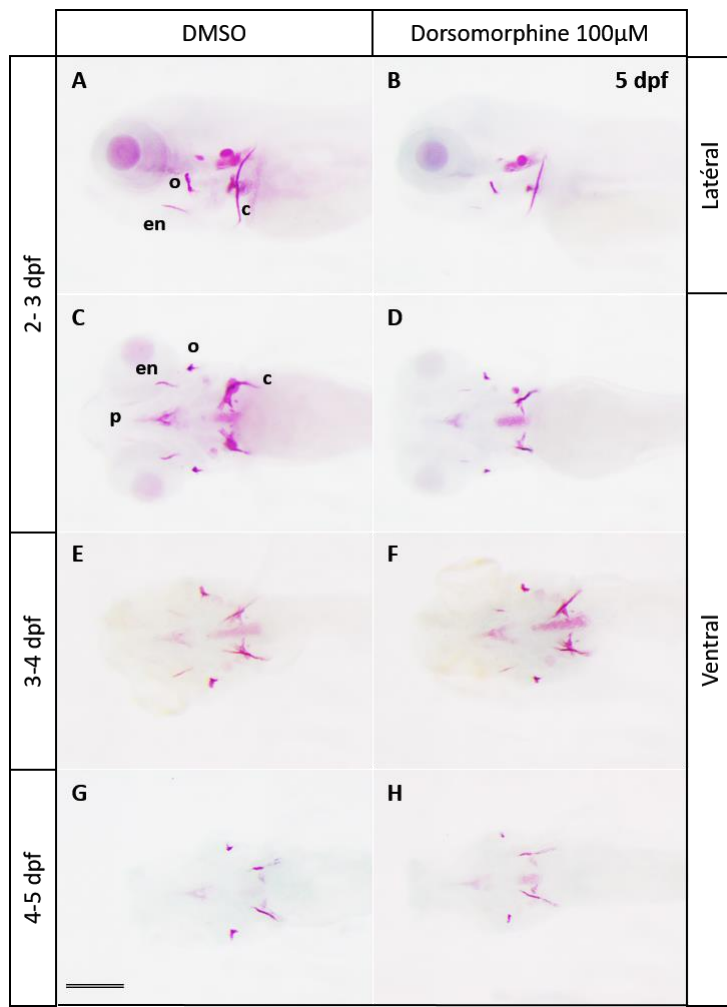
### VI.3.A Formation cartilagineuse

En tant que préambule à notre étude de la formation osseuse, il nous faut confirmer le fait que la signalisation n'a plus d'effet sur le squelette cartilagineux à 48 hpf. En effet, le squelette osseux comporte de nombreuses pièces formées par ossification chondrale, une perturbation du squelette cartilagineux aurait donc une incidence directe sur le squelette osseux.

Pour ce faire, nous avons inhibé la voie BMP grâce à un inhibiteur chimique bien connu dans le cadre d'études de la voie BMP : la dorsomorphine (424–426). La dorsomorphine est un inhibiteur des récepteurs de type I Alk2, Alk3 et Alk6, elle empêche par conséquent la phosphorylation des Smad1/5/8 et bloque donc la voie des BMPs (424). Des traitements avec 100  $\mu$ M de dorsomorphine ont été réalisés sur des embryons entre 2 et 3 dpf et entre 3 et 4 dpf ; après 24 heures de traitement les embryons sont lavés puis élevés jusqu'à ce qu'ils atteignent 5 dpf, stade auquel ils sont marqués au bleu Alcian [Figure V.13 A et B]. Aucun défaut n'a été observé au niveau de la formation du cartilage crânien, ce qui confirme les observations faites lors des études précédentes (416, 417).

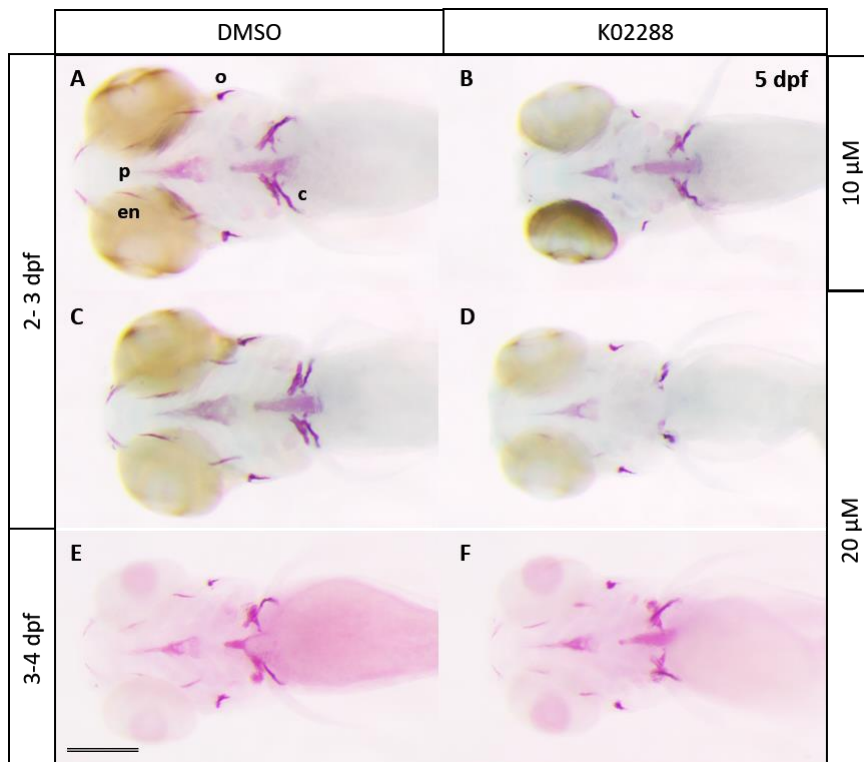
Bien que la dorsomorphine soit un inhibiteur empirique de la signalisation BMP, il a été montré qu'il est également capable d'inhiber les signalisations Vegfr2 et Ampk (425, 427, 428). Des inhibiteurs de nouvelle génération ont donc été développés, parmi ceux-ci, le composé K02288, présente une haute spécificité pour les récepteurs de type I Alk1 à Alk6 et est capable d'induire une dorsalisation chez de jeunes embryons de poisson zèbre (429). Nous avons donc ajouté le K02288 à notre étude, suite au traitement avec 20  $\mu$ M de cet inhibiteur nous constatons que similairement à ce que l'on a observé avec la dorsomorphine, l'inhibition de la voie BMP après 48 hpf avec le K02288 n'influe pas sur le squelette cartilagineux [Figure V.13 C et D].

Dans le but de visualiser les chondroblastes suite à l'inactivation de la voie BMP, nous avons effectué des hybridations *in situ* marquant le facteur chondrogénique majeur *sox9a*. Le marquage des ARNm *sox9a* sur des embryons de 5 dpf traités à la dorsomorphine ou au K02288 entre 2 et 3 dpf, nous permet de constater que les chondroblastes ne sont pas affectés par l'absence de la signalisation BMP après 2 jours de développement [Figure V.13 E-H].



**Figure V.14: Effets de la dorsomorphine sur la formation osseuse.**

Visualisation du squelette osseux minéralisé par marquage avec du rouge alizarine de larves de 5 dpf préalablement traitées à 2, 3 ou 4 dpf durant 24 heures avec de la dorsomorphine (100 µM). Les embryons contrôles sont traités avec du DMSO. Les embryons traités à 2 dpf (**B** vue latérale et **D** vue ventrale) présentent une réduction sévère de la formation d'os minéralisés comparés aux contrôles (**A** vue latérale et **C** vue ventrale). Les traitements à 3 dpf (**F** vue ventrale) et 4 dpf (**H** vue ventrale) induisent une réduction de la formation osseuse par rapport aux embryons contrôles (respectivement **E** et **G** en vue ventrale), mais comparativement moindre que celle observée à 2 dpf. c: cleithrum; en: entoptérygoïde; o: opercule; p: parasphénoïde. Barre d'échelle: 200 µM



**Figure V.15: Effets de K02288 sur la formation osseuse.**

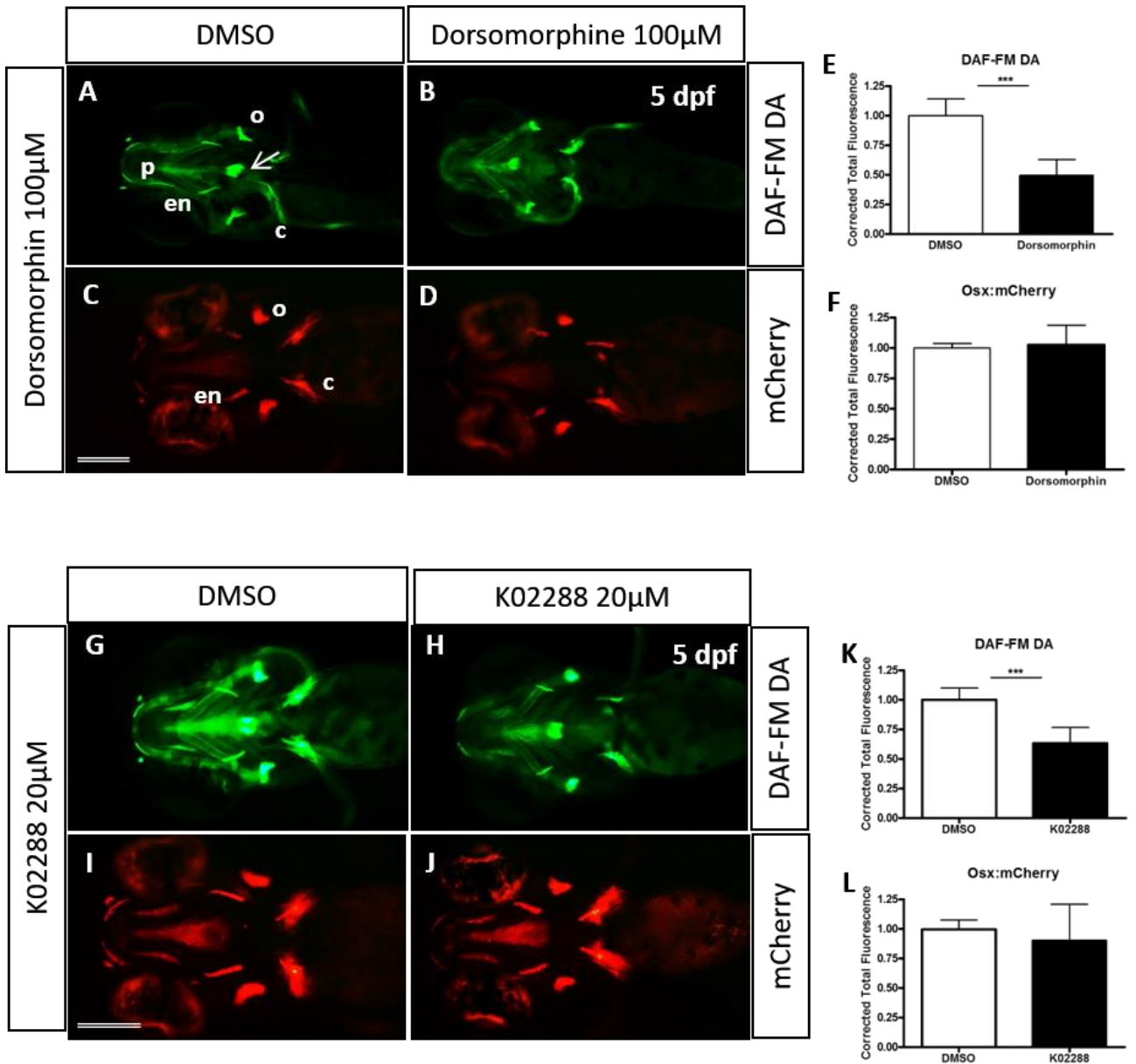
Visualisation du squelette osseux minéralisé par marquage avec du rouge alizarine de larves de 5 dpf préalablement traitées à 2 ou 3 dpf durant 24 heures avec du K02288 (10 µM et 20 µM). Les embryons contrôles sont traités avec du DMSO. Les embryons traités à 2 dpf avec 10 µM de K02288 (**B** vue ventrale) présentent une réduction de la formation d'os minéralisés comparés aux contrôles (**A** vue ventrale) mais moins sévère que les embryons traités avec 20 µM (**D** en vue ventrale; contrôles **C** en vue ventrale). Le traitement à 3 dpf (**F** vue ventrale) induit une réduction de la formation osseuse par rapport aux embryons contrôles (**E** en vue ventrale), mais comparativement moindre que celle observée à 2 dpf. c: cleithrum; en: entoptérygoïde; o: opercule; p: parasphénoïde. Barre d'échelle: 200 µM

### VI.3.B Formation osseuse

Afin d'entrer dans le vif du sujet, nous avons réalisé des traitements d'embryons avec de la dorsomorphine 100  $\mu\text{M}$  à 3 périodes différentes : entre 2 et 3 dpf, entre 3 et 4 dpf et entre 4 et 5 dpf. L'ossification crâniale fut analysée par coloration rouge Alizarine à 5dpf [Figure V.14]. Le traitement entre 2 et 3 dpf mène à une réduction évidente de la calcification de toutes les pièces osseuses, et ce dans plus de 95% des larves. Le traitement entre 3 et 4 dpf mène à des effets mineurs, comme au niveau de l'opercule, tandis que le traitement entre 4 et 5 dpf n'induit aucun défaut détectable. Afin de vérifier si les résultats obtenus avec la dorsomorphine ne sont pas dus à une inhibition des voies Vegfr2 ou Ampk, nous avons également traité des embryons avec l'inhibiteur K02288 à deux concentrations différentes, nous avons observé une claire diminution de la calcification à 10 et 20  $\mu\text{M}$  après exposition entre 2 et 3 dpf, tandis que peu d'effets ont été observés après traitement entre 3 et 4 dpf [Figure V.15].

### VI.3.C Les ostéoblastes

La coloration au rouge Alizarine permet de marquer la matrice osseuse ossifiée, mais ne rend pas compte de la présence des ostéoblastes ni de leur fonction. Afin de comprendre si la diminution de matrice osseuse observée suite à l'inhibition de la voie BMP résulte d'un défaut au niveau de la différenciation des ostéoblastes, nous avons traité des embryons transgéniques *Tg(osterix:mCherry)* (430). Cette lignée transgénique contient la séquence codant pour la protéine fluorescente rouge mCherry sous le contrôle du promoteur *ostérix* du medaka, permettant la détection des ostéoblastes chez des larves vivantes. Le gène *ostérix* code pour l'un des facteurs ostéogéniques majeurs chez la souris et les poissons (431, 432). Lorsque nous traitons ces larves transgéniques entre 2 et 3 dpf avec de la dorsomorphine ou du K02288, nous observons que le profil d'expression de *ostérix* à 5 dpf n'est que faiblement diminué par rapport aux contrôles [Figure V.16 C, D, I et J]. Ces données indiquent que la prolifération et la différenciation des ostéoblastes ne sont pas sensiblement affectées par ce traitement. Seules les structures les plus antérieures, le dentaire et le maxillaire, sont moins intensément fluorescentes dans les larves traitées. Puisque le nombre d'ostéoblastes différenciés dans le squelette craniofacial n'est pas foncièrement affecté par l'inhibition de la voie BMP, nous avons décidé de tester la fonction des ostéoblastes. Une caractéristique intéressante des ostéoblastes est qu'ils produisent de grandes quantités d'oxyde nitrique (NO), composé facilement détectable grâce au DAF-FM DA (433, 434). Le squelette cartilagineux et la notochorde sont également des sources de NO mais en produisent de plus faibles quantités, seul le *bulbus arteriosus* du cœur exprime un taux de NO comparable à celui des ostéoblastes. Nous avons donc évalué la



**Figure V.16: Effets des inhibiteurs BMP sur les ostéoblastes.**

Visualisation de la production d'oxyde nitrique (NO) par marquage grâce au DAF-FM DA (**A**, **B**, **G** et **H**). Visualisation de l'expression du gène *ostérix* grâce à l'utilisation de la lignée *Tg (osx:mCherry)* (**C**, **D**, **I** et **J**). Larves de 5 dpf préalablement traitées à 2 dpf durant 24 heures avec de la dorsomorphine (100 µM) (**B**, **D** et **F**) ou avec du K02288 (20 µM) (**H**, **J** et **L**). Les embryons contrôles sont traités avec du DMSO (**A**, **C**, **E**, **G**, **I**, **K**). Les embryons traités à 2 dpf avec 100 µM de dorsomorphine (**B**) ou avec 20 µM de K02288 (**H**) présentent une réduction de la production de NO comparés aux contrôles (respectivement **A** et **G**). Les embryons traités à 2 dpf avec 100 µM de dorsomorphine (**D**) ou avec 20 µM de K02288 (**J**) présentent une expression du transgène *osx* comparable à celle des embryons contrôles (respectivement **C** et **I**). Tous les embryons sont présentés en vue ventrale c: cleithrum; en: entoptérygoïde; o: opercule; p: parasphénoïde. Barre d'échelle: 200 µm. Les images sont accompagnées d'analyses statistiques de mesures de l'intensité de fluorescence du DAF-FM DA (**E** et **K**) et de la mCherry (**F** et **L**) effectuées sur des expériences répliquées. *p*-value <0,005

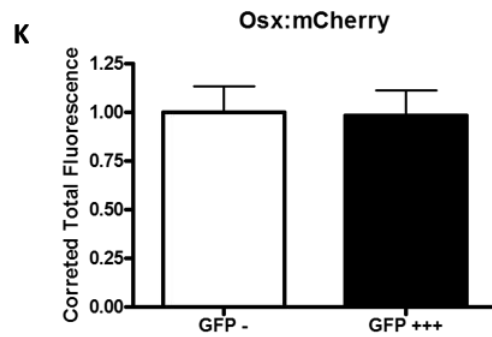
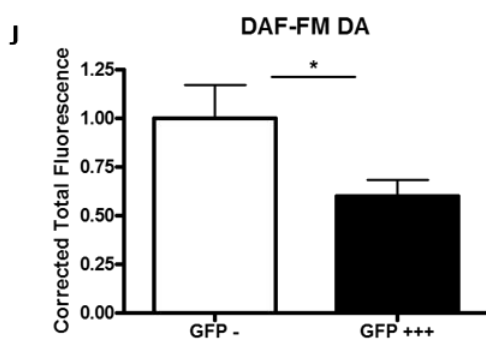
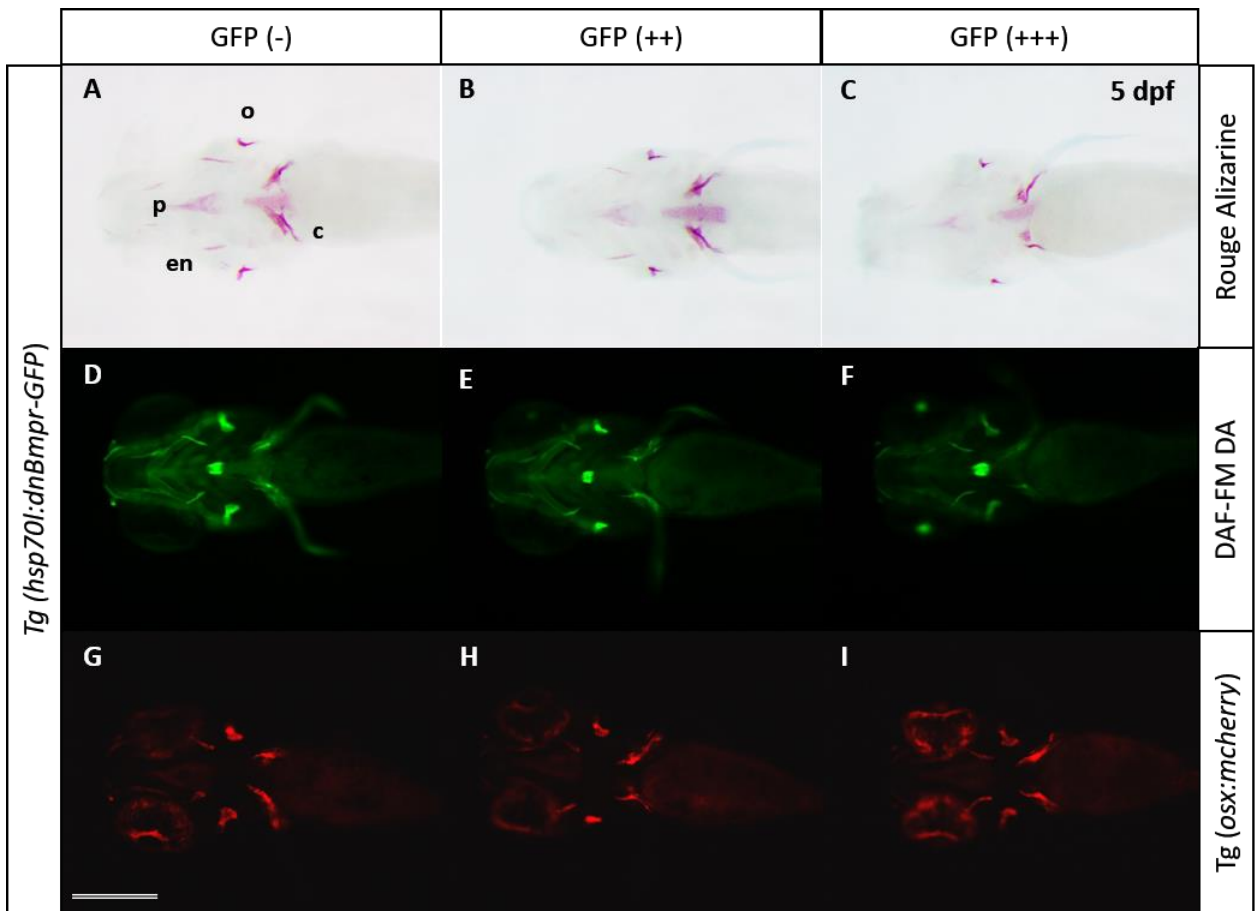
production de NO par les os et donc une partie de leur l'activité métabolique, dans des larves en utilisant le marquage vert fluorescent induit par la réaction entre le DAF-FM DA et le NO. La détection du NO dans des larves traitées à 2 dpf durant 24 heures avec de la dorsomorphine ou du K02288 révèle une forte diminution de la production de NO dans toutes les pièces osseuses, alors que le marquage dans le cœur et au niveau du cartilage est peu affecté [Figure V.16 A, B, G et H].

### VI.3.D Dominant négatif

Afin de confirmer l'importance de la signalisation BMP au cours de la formation osseuse, nous avons également utilisé une lignée transgénique *Tg(hsp70l:dnBmpr-GFP)w30* présentant un transgène inductible par la température et produisant une protéine fusion entre un variant dominant négatif des récepteurs BMP et la GFP (363). L'induction du transgène permet donc d'inhiber temporairement la signalisation BMP à un moment voulu sans avoir recours à des inhibiteurs chimiques et peut être vérifiée par la fluorescence verte de la GFP. Des larves transgéniques ont subi un choc thermique à 37°C durant 30 minutes à 2 dpf afin d'induire le transgène, le squelette crânien est ensuite étudié à 5 dpf [Figure V.17]. Alors que les larves contrôles (fratrie non transgénique) développent un squelette parfaitement normal, indiquant que le choc thermique n'a pas d'effet, les larves transgéniques (présentant une expression de la GFP) qui produisent le dominant négatif pour les récepteurs BMP présentent une forte diminution de la minéralisation osseuse marquée au rouge alizarine. Cet effet est plus prononcé chez les individus présentant une plus forte expression de la GFP. Notons que lorsque l'on réalise le choc thermique après 2 jours, 123 sur 129 larves présentent un cartilage normal (résultats non montrés). Ces résultats confirment clairement que la signalisation BMP est requise pour la formation osseuse entre 48 hpf et 72 hpf, sans affecter la formation du cartilage. Nous avons étudié plus en profondeur la différenciation des ostéoblastes en croisant les lignées *Tg(hsp70l:dnBmpr-GFP)w30* et *Tg(osterix:mCherry)* et en induisant l'expression du dnBMPr dans les larves par choc thermique à 2 dpf. Nous n'avons constaté que peu de différence dans l'expression de la mCherry chez les larves double transgéniques. Ceci confirme que l'inhibition de la signalisation BMP après 48 hpf affecte peu ou pas la différenciation ou le maintien des ostéoblastes. La détection du NO dans les mêmes animaux révèle une diminution significative de l'activité ostéoblastique à 5 dpf.

Nous avons donc observé que l'inhibition de la signalisation BMP entre 48 et 72 hpf mène à une réduction de la minéralisation osseuse et de la production de NO. A contrario, la maturation des ostéoblastes et la chondrogenèse semblent être inchangées. La fonction des ostéoblastes et la formation osseuse sont moins affectées





**Figure V.17: Effets causés par l'expression du dominant négatif BMPR sur la formation osseuse.**

Visualisation de la MEC osseuse minéralisée par marquage au rouge alizarine (**A-C**). Visualisation de la production d'oxyde nitrique (NO) par marquage grâce au DAF-FM DA (**D-F**). Visualisation de l'expression du gène *ostérix* grâce à l'utilisation de la lignée Tg (*osx:mCherry*) (**G-I**). Larves de la lignée Tg (*dnBMPR-GFP*) de 5 dpf qui ont préalablement subi un choc thermique à 2 dpf. L'expression de la GFP après 2 heures permet de classer les larves en GFP(-): larves non transgéniques, GFP(++) larves transgéniques exprimant un niveau de transgène modéré, GFP(+++) larves transgéniques exprimant le transgène à un taux élevé. La formation de pièces osseuses minéralisées est largement réduite dans les embryons exprimant le dominant négatif (**B** et **C**) par rapport aux contrôles (**A**). La production d'oxyde nitrique est également sensiblement réduite dans les embryons dont le dnBMPR bloque la signalisation BMP (**E** et **F**) par rapport aux contrôles (**D**). L'expression du transgène ostérix ne semble pas être affectée par l'induction du dominant négatif (**H** et **I**) par rapport aux embryons contrôles (**G**). Tous les embryons sont présentés en vue ventrale c: cleithrum; en: entoptérygoïde; o: opercule; p: parasphénoïde. Barre d'échelle: 200  $\mu$ M. Les images sont accompagnées d'analyses statistiques de mesures de l'intensité de fluorescence du DAF-FM DA (**J**) et de la mCherry (**K**) effectuées sur des expériences répliquées.  $p$ -value < 0,005



lorsque la signalisation BMP est inhibée au-delà de 72 hpf. Ces résultats suggèrent que la signalisation BMP est cruciale entre 48 et 72 hpf afin d'assurer la fonction des ostéoblastes ainsi que l'ossification.

## V.4 Conclusion & Discussion

La voie de signalisation BMP est l'une des voies de communication intercellulaire les plus importantes dans le développement embryonnaire des vertébrés (435–437). La majorité des études entreprises, notamment celles étudiant le développement squelettique, se sont focalisées sur les rôles précoces de la voie BMP au cours du développement (412, 438). Des études chez la souris et le poisson zèbre ont pu mettre en évidence l'implication de la signalisation BMP dans la migration des cellules de la crête neurale crânienne (CNC) ainsi que dans leur induction vers la destinée chondrocytaire (439, 440). Chez le poisson zèbre, il a été démontré qu'après les événements de migration des cellules de la CNC (20-24 hpf), la voie des BMPs permet de réguler la formation du squelette cartilagineux crânien selon l'axe dorso-ventral (416, 441). Enfin, il a été prouvé que la signalisation BMP est requise aux alentours de 30-36 hpf afin de permettre la différenciation des chondroblastes via un contrôle de l'expression de *runx2b* (417). Cette dernière étude réalisée dans notre laboratoire a également permis de déterminer que la formation du chondrocrâne n'est plus dépendante de la signalisation BMP après 48 hpf.

Basés sur ces données, nous avons donc entrepris d'étudier le rôle de la signalisation BMP sur la formation squelettique osseuse à des stades plus tardifs. A cette fin nous avons mis au point un système de marquages/transgénique permettant l'étude de la différenciation des ostéoblastes, de leur activité métabolique ainsi que de la minéralisation de la matrice qu'ils produisent. Pour étudier l'impact de la perte de la signalisation BMP sur la formation osseuse sans affecter les rôles précoces de la voie BMP, nous avons sélectionnés deux inhibiteurs de la voie BMP : la dorsomorphine et le K02288 et comparé les résultats obtenus avec l'induction conditionnelle d'un variant dominant négatif pour un récepteur BMP.

Grâce à ces outils nous avons pu mettre en évidence que la signalisation BMP est requise entre 2 et 3 dpf et dans une moindre mesure entre 3 et 4 hpf afin de permettre la formation de pièces osseuses calcifiées à 5 dpf. Ces observations nous ont donc permis de déterminer que la fenêtre temporelle dans laquelle la voie BMP est la plus importante pour la formation osseuse se situe entre 2 et 3 dpf. Afin d'étudier plus en profondeur les effets de la voie BMP sur la formation osseuse nous nous sommes ensuite intéressés aux cellules productrices de la matrice osseuse : les ostéoblastes.



## Sujet annexe

Nous avons pu mettre en lumière que les ostéoblastes exprimant le gène *ostérix* à 5 dpf sont peu affectées par l'inhibition de la voie BMP, ce qui indique que les événements de prolifération et de différenciation des ostéoblastes ne sont pas significativement dépendants des facteurs de croissance BMP au cours de cette période.

Il a été démontré que des membres de la superfamille des TGF- $\beta$  ne faisant pas partie des BMPs, tels que Tgf- $\beta$ 2 et Tgf- $\beta$ 3, sont impliqués dans le développement précoce des cartilages chez le poisson zèbre (442, 443). Bien que ces études aient été réalisées par injection de morpholinos anti-sens diminuant l'expression génétique des gènes cibles dès le début du développement embryonnaire et limitant leur utilisation aux stades précoces, ces facteurs pourraient également avoir un effet à des stades plus tardifs tels que ceux considérés dans notre étude. L'inhibiteur K02288 est 100 fois plus actif envers les récepteurs BMP ALK1 et ALK2 comparé aux récepteurs TGF $\beta$  ALK4 et ALK5 ; nous pensons donc que les résultats que nous avons obtenus ici sont dus à une inactivation de la voie BMP et non à une autre voie TGF $\beta$  (429). Renforçant cette hypothèse, aucune donnée ne permet de penser que le variant dominant négatif de récepteur BMP utilisé dans notre étude interagirait avec les récepteurs Alk4 ou Alk5. Il serait donc intéressant d'étudier l'importance de ces récepteurs Alk5 et Alk6 dans le développement osseux au moyen d'inhibiteurs chimiques spécifiques.

L'oxyde nitrique est de longue date associé avec le développement osseux ainsi qu'avec des pathologies squelettiques, telles que l'ostéoporose (444-446). L'inhibition pharmacologique des synthétases de l'oxyde nitrique (NOS) chez le rat mène à une diminution de la masse osseuse et à des défauts au niveau de la croissance d'os longs tels que le tibia (447, 448). Le souris ayant un déficit de l'activité de la NOS endothéliale (eNOS) présentent un volume osseux réduit ainsi que des défauts sévères au niveau de la maturation et de l'activité des ostéoblastes (449, 450). Il a été démontré que l'oxyde nitrique joue un rôle dans la production osseuse puisqu'elle est impliquée dans la régulation de la voie cGMP-PKG (protéine kinase G dépendante du GMP cyclique), de l'expression de Runx2 et de la métalloprotéase 13 (MMP-13) (données revues dans (451)). Le NO est également un régulateur négatif du processus de résorption osseuse en jouant le rôle d'antagoniste de la prostaglandine E2 (PGE2) (452). Ces résultats prennent toute leur ampleur lorsque l'on sait que dans des cas de perte de masse osseuse dues à des pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, la balance NO/PGE2 est déséquilibrée en faveur de PGE2.

Afin de pousser notre étude plus loin, il serait intéressant de tester la différenciation et l'activité des ostéoclastes lorsque la signalisation BMP est inhibée. Les cellules osseuses sont connues pour réagir aux stress mécaniques par la production de NO (453-455). Dans des cellules de mammifères soumises à des contraintes de cisaillement, le NO



## Sujet annexe

induit l'activation de la voie cGMP-PKG qui résulte en la translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau (456, 457). De manière similaire, la différenciation ostéoblastique de cellules souches embryonnaires murines peut être augmentée par l'action du NO via une activation de la  $\beta$ -caténine par la voie canonique Wnt (458).

Chez le poisson zèbre l'inhibition de la signalisation BMP entre 2 et 3 dpf n'affecte pas significativement la présence des ostéoblastes. Par contre, leur production d'oxyde nitrique est clairement diminuée, observation qui, combinée à la diminution observée de la minéralisation osseuse, mène à la conclusion qu'une production normale de NO est nécessaire à la formation d'une matrice osseuse minéralisée. La relation exacte entre ces deux phénomènes devra être déterminée par des travaux futurs.



# VI. Bibliographie

*“La seule vraie science est la connaissance des faits.”*

GEORGES-LOUIS LECLERC DE BUFFON





1. Windhausen,T., Squifflet,S., Renn,J. and Muller,M. (2015) BMP signaling regulates bone morphogenesis in zebrafish through promoting osteoblast function as assessed by their nitric oxide production. *Molecules*, **20**, 7586–7601.
2. Spence,R., Gerlach,G., Lawrence,C. and Smith,C. (2008) The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.*, **83**, 13–34.
3. Dahm,R., Geisler,R. and Nusslein-Volhard,C. (2005) Zebrafish ( *Danio rerio* ) Genome and Genetics.
4. Langheinrich,U. (2003) Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays*, **25**, 904–912.
5. Miklosi,A. and Andrews,R.J. (2006) The zebrafish as a model for behavioral studies. *Zebrafish*, **3**, 227–234.
6. Dai,Y.-J., Jia,Y.-F., Chen,N., Bian,W.-P., Li,Q.-K., Ma,Y.-B., Chen,Y.-L. and Pei,D.-S. (2014) Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.*, **33**, 11–7.
7. Zon,L.I. (1999) Zebrafish: A new model for human disease. *Genome Res.*, **9**, 99–100.
8. Lieschke,G.J. and Currie,P.D. (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 353–367.
9. Kimmel,C.B., Ballard,W.W., Kimmel,S.R., Ullmann,B. and Schilling,T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, **203**, 253–310.
10. Auer,T.O. and Del Bene,F. (2014) CRISPR/Cas9 and TALEN-mediated knock-in approaches in zebrafish. *Methods*, **69**, 142–150.
11. Ekker,S.C. and Larson,J.D. (2001) Morphant technology in model developmental systems. *Genesis*, **30**, 89–93.
12. Wright,D. a, Li,T., Yang,B. and Spalding,M.H. (2014) TALEN-mediated genome editing: prospects and perspectives. *Biochem. J.*, **462**, 15–24.
13. Hwang,W.Y., Fu,Y., Reyon,D., Maeder,M.L., Tsai,S.Q., Sander,J.D., Peterson,R.T., Yeh,J.R. and Joung,J.K. (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, **31**, 227–229.
14. Gagnon,J.A., Valen,E., Thyme,S.B., Huang,P., Ahkmetova,L., Pauli,A., Montague,T.G., Zimmerman,S., Richter,C. and Schier,A.F. (2014) Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS One*, **9**, e98186.
15. Ma,Y., Zhang,L. and Huang,X. (2014) Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J.*, **281**, 5186–5193.
16. Orphanides,G. and Reinberg,D. (2002) A unified theory of gene expression. *Cell*, **108**, 439–451.
17. Reed,R. (2003) Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 326–331.
18. Ibba,M. and Söll, and D. (1999) Quality Control Mechanisms During Translation. *Science (80-. )*, **286**, 1893–1897.
19. Harigaya,Y. and Parker,R. (2010) No-go decay: a quality control mechanism for RNA in

- translation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **1**, 132–141.
20. Shoemaker,C.J. and Green,R. (2012) Translation drives mRNA quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 594–601.
  21. Vasudevan,S., Peltz,S.W. and Wilusz,C.J. (2002) Non-stop decay--a new mRNA surveillance pathway. *Bioessays*, **24**, 785–8.
  22. Graille,M. and Séraphin,B. (2012) Surveillance pathways rescuing eukaryotic ribosomes lost in translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 727–35.
  23. Kervestin,S. and Jacobson,A. (2012) NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 700–712.
  24. Popp,M.W.-L. and Maquat,L.E. (2013) Organizing principles of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Annu. Rev. Genet.*, **47**, 139–65.
  25. Hwang,J. and Maquat,L.E. (2011) Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in animal embryogenesis: To die or not to die, that is the question. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **21**, 422–430.
  26. Chang,Y.-F.F., Imam,J.S. and Wilkinson,M.F. (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 51–74.
  27. Bhuvanagiri,M., Schlitter,A.M., Hentze,M.W. and Kulozik,A.E. (2010) NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem. J.*, **430**, 365–377.
  28. Nicholson,P., Yepiskoposyan,H., Metze,S., Zamudio Orozco,R., Kleinschmidt,N. and Mühlemann,O. (2010) Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell. Mol. Life Sci.*, **67**, 677–700.
  29. Kerr,T.P., Sewry,C. a, Robb,S. a and Roberts,R.G. (2001) Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum. Genet.*, **109**, 402–7.
  30. Hall,G.W. and Thein,S. (1994) Nonsense codon mutations in the terminal exon of the beta-globin gene are not associated with a reduction in beta-mRNA accumulation: a mechanism for the phenotype of dominant beta-thalassemia. *Blood*, **83**, 2031–7.
  31. Thein,S.L., Hesketh,C., Taylor,P., Temperley,I.J., Hutchinson,R.M., Old,J.M., Wood,W.G., Clegg,J.B. and Weatherall,D.J. (1990) Molecular basis for dominantly inherited inclusion body beta-thalassemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 3924–8.
  32. Welch,E.M., Barton,E.R., Zhuo,J., Tomizawa,Y., Friesen,W.J., Trifillis,P., Paushkin,S., Patel,M., Trotta,C.R., Hwang,S., *et al.* (2007) PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, **447**, 87–91.
  33. Kerem,E., Hirawat,S., Armoni,S., Yaakov,Y., Shoseyov,D., Cohen,M., Nissim-Rafinia,M., Blau,H., Rivlin,J., Aviram,M., *et al.* (2008) Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet*, **372**, 719–727.
  34. Wilschanski,M., Miller,L.L., Shoseyov,D., Blau,H., Rivlin,J., Aviram,M., Cohen,M., Armoni,S., Yaakov,Y., Pugatch,T., *et al.* (2011) Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.*, **38**, 59–69.
  35. Mühlemann,O., Eberle,A.B., Stalder,L. and Zamudio Orozco,R. (2008) Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, **1779**, 538–549.

36. Lykke-Andersen,S. and Jensen,T.H. (2015) Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 665–677.
37. Li,S. and Wilkinson,M.F. (2016) Nonsense Surveillance in Lymphocytes? *Immunity*, **8**, 135–141.
38. Connor,A., Wiersma,E. and Shulman,M.J. (1994) On the linkage between RNA processing and RNA translatability. *J. Biol. Chem.*, **269**, 25178–25184.
39. Jack,H.M., Berg,J. and Wabl,M. (1989) Translation affects immunoglobulin mRNA stability. *Eur J Immunol.*, **19**, 843–7.
40. Carter,M.S., Li,S. and Wilkinson,M.F. (1996) A splicing-dependent regulatory mechanism that detects translation signals. *EMBO J.*, **15**, 5965–75.
41. Buzina, a and Shulman,M.J. (1999) Infrequent translation of a nonsense codon is sufficient to decrease mRNA level. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 515–524.
42. Lewis,B.P., Green,R.E. and Brenner,S.E. (2003) Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 189–92.
43. Fatscher,T., Boehm,V. and Gehring,N.H. (2015) Mechanism, factors, and physiological role of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**, 4523–4544.
44. Hodgkin,J., Papp,A., Pulak,R., Ambros,V. and Anderson,P. (1989) A new kind of informational suppression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **123**, 301–13.
45. Leeds,P., Peltz,S.W., Jacobson,A. and Culbertson,M.R. (1991) The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.*, **5**, 2303–2314.
46. Cui,Y., Hagan,K.W., Zhang,S. and Peltz,S.W. (1995) Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.*, **9**, 423–436.
47. He,F., Brown,A.H. and Jacobson,A. (1997) Upf1p, Nmd2p, and Upf3p are interacting components of the yeast nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1580–94.
48. Page,M.F., Carr,B., Anders,K.R., Grimson, a and Anderson,P. (1999) SMG-2 is a phosphorylated protein required for mRNA surveillance in *Caenorhabditis elegans* and related to Upf1p of yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5943–5951.
49. Serin,G., Gersappe,A., Black,J.D., Aronoff,R. and Maquat,L.E. (2001) Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4). *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 209–23.
50. Gatfield,D., Unterholzner,L., Ciccarelli,F.D., Bork,P. and Izaurralde,E. (2003) Nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila*: at the intersection of the yeast and mammalian pathways. *EMBO J.*, **22**, 3960–70.
51. Lykke-Andersen,J., Shu,M.D. and Steitz,J. a. (2000) Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when downstream of a termination codon. *Cell*, **103**, 1121–1131.
52. Mendell,J.T., ap Rhys,C.M.J. and Dietz,H.C. (2002) Separable roles for rent1/hUpf1 in

- altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science*, **298**, 419–422.
53. Culbertson, M.R. and Leeds, P.F. (2003) Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **13**, 207–214.
  54. Longman, D., Plasterk, R.H.A., Johnstone, I.L. and Cáceres, J.F. (2007) Mechanistic insights and identification of two novel factors in the C-elegans NMD pathway. *Genes Dev.*, **21**, 1075–1085.
  55. Yamashita, A., Izumi, N., Kashima, I., Ohnishi, T., Saari, B., Katsuhata, Y., Muramatsu, R., Morita, T., Iwamatsu, A., Hachiya, T., *et al.* (2009) SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.*, **23**, 1091–1105.
  56. Bhattacharya, a, Czaplinski, K., Trifillis, P., He, F., Jacobson, a and Peltz, S.W. (2000) Characterization of the biochemical properties of the human Upf1 gene product that is involved in nonsense-mediated mRNA decay. *RNA*, **6**, 1226–1235.
  57. Czaplinski, K., Weng, Y., Hagan, K.W. and Peltz, S.W. (1995) Purification and characterization of the Upf1 protein: a factor involved in translation and mRNA degradation. *RNA*, **1**, 610–23.
  58. Cheng, Z., Muhrad, D., Lim, M.K., Parker, R. and Song, H. (2007) Structural and functional insights into the human Upf1 helicase core. *EMBO J.*, **26**, 253–64.
  59. Chamieh, H., Ballut, L., Bonneau, F. and Le Hir, H. (2008) NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 85–93.
  60. Melero, R., Buchwald, G., Castaño, R., Raabe, M., Gil, D., Lázaro, M., Urlaub, H., Conti, E. and Llorca, O. (2012) The cryo-EM structure of the UPF-EJC complex shows UPF1 poised toward the RNA 3' end. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 498–505.
  61. Czaplinski, K., Ruiz-Echevarria, M.J., Paushkin, S. V, Han, X., Weng, Y., Perlick, H. a, Dietz, H.C., Ter-Avanessian, M.D. and Peltz, S.W. (1998) The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev.*, **12**, 1665–77.
  62. Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G. and Ohno, S. (2006) Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.*, **20**, 355–67.
  63. Celik, A., Kervestin, S. and Jacobson, A. (2015) NMD: At the crossroads between translation termination and ribosome recycling. *Biochimie*, **114**, 2–9.
  64. Hug, N. and Cáceres, J.F. (2014) The RNA Helicase DHX34 Activates NMD by Promoting a Transition from the Surveillance to the Decay-Inducing Complex. *Cell Rep.*, **8**, 1845–1856.
  65. Melero, R., Hug, N., López-Perrote, A., Yamashita, A., Cáceres, J.F. and Llorca, O. (2016) The RNA helicase DHX34 functions as a scaffold for SMG1-mediated UPF1 phosphorylation. *Nat. Commun.*, **7**, 10585.
  66. Gehring, N.H., Kunz, J.B., Neu-Yilik, G., Breit, S., Viegas, M.H., Hentze, M.W. and Kulozik, A.E. (2005) Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements. *Mol. Cell*, **20**,

65–75.

67. Chan,W.-K., Huang,L., Gudikote,J.P., Chang,Y.-F., Imam,J.S., MacLean,J.A. and Wilkinson,M.F. (2007) An alternative branch of the nonsense-mediated decay pathway. *EMBO J.*, **26**, 1820–1830.
68. Metze,S., Herzog,V.A., Ruepp,M.-D. and Mühlemann,O. (2013) Comparison of EJC-enhanced and EJC-independent NMD in human cells reveals two partially redundant degradation pathways. *RNA*, **19**, 1432–48.
69. Ohnishi,T., Yamashita,A., Kashima,I., Schell,T., Anders,K.R., Grimson,A., Hachiya,T., Hentze,M.W., Anderson,P. and Ohno,S. (2003) Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol. Cell*, **12**, 1187–1200.
70. Okada-Katsuhata,Y., Yamashita,A., Kutsuzawa,K., Izumi,N., Hirahara,F. and Ohno,S. (2012) N-and C-terminal Upf1 phosphorylations create binding platforms for SMG-6 and SMG-5:SMG-7 during NMD. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 1251–1266.
71. Fukuhara,N., Ebert,J., Unterholzner,L., Lindner,D., Izaurralde,E. and Conti,E. (2005) SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol. Cell*, **17**, 537–547.
72. Loh,B., Jonas,S. and Izaurralde,E. (2013) The SMG5-SMG7 heterodimer directly recruits the CCR4-NOT deadenylase complex to mRNAs containing nonsense codons via interaction with POP2. *Genes Dev.*, **27**, 2125–2138.
73. Glavan,F., Behm-Ansmant,I., Izaurralde,E. and Conti,E. (2006) Structures of the PIN domains of SMG6 and SMG5 reveal a nuclease within the mRNA surveillance complex. *Embo J*, **25**, 5117–5125.
74. Huntzinger,E., Kashima,I., Fauser,M., Saulière,J. and Izaurralde,E. (2008) SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan. *RNA*, **14**, 2609–17.
75. Eberle,A.B., Lykke-Andersen,S., Mühlemann,O. and Jensen,T.H. (2009) SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *TL - 16. Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16 VN-r**, 49–55.
76. Rufener,S.C. and Mühlemann,O. (2013) eIF4E-bound mRNPs are substrates for nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 710–7.
77. Durand,S. and Lykke-Andersen,J. (2013) Nonsense-mediated mRNA decay occurs during eIF4F-dependent translation in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 702–9.
78. Shyu,A.-B., Wilkinson,M.F. and van Hoof,A. (2008) Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *EMBO J.*, **27**, 471–481.
79. He,F. and Jacobson,A. (2015) Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story. *Annu. Rev. Genet.*, **49**, annurev-genet-112414-054639.
80. Conti,E. and Izaurralde,E. (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 316–325.
81. Karousis,E.D., Nasif,S. and Muhlemann,O. (2016) Nonsense-mediated mRNA decay: novel mechanistic insights and biological impact. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **7**, 661–682.

82. Stalder,L. and Mühlemann,O. (2008) The meaning of nonsense. *Trends Cell Biol.*, **18**, 315–321.
83. Durand,S., Cougot,N., Mahuteau-Betzer,F., Nguyen,C.H., Grierson,D.S., Bertrand,E., Tazi,J. and Lejeune,F. (2007) Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *J. Cell Biol.*, **178**, 1145–1160.
84. Huang,L. and Wilkinson,M.F. (2012) Regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **3**, 807–828.
85. Karam,R., Wengrod,J., Gardner,L.B. and Wilkinson,M.F. (2013) Regulation of nonsense-mediated mRNA decay: Implications for physiology and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, **1829**, 624–633.
86. Bruno,I.G., Karam,R., Huang,L., Bhardwaj,A., Lou,C.H., Shum,E.Y., Song,H.W., Corbett,M.A., Gifford,W.D., Gecz,J., *et al.* (2011) Identification of a MicroRNA that Activates Gene Expression by Repressing Nonsense-Mediated RNA Decay. *Mol. Cell*, **42**, 500–510.
87. Lou,C.H., Shao,A., Shum,E.Y., Espinoza,J.L., Huang,L., Karam,R. and Wilkinson,M.F. (2014) Posttranscriptional Control of the Stem Cell and Neurogenic Programs by the Nonsense-Mediated RNA Decay Pathway. *Cell Rep.*, **6**, 748–764.
88. Soergel,D. and Lareau,L. (2000) Regulation of gene expression by coupling of alternative splicing and NMD. *Nonsense-mediated mRNA decay*.
89. McGlincy,N.J. and Smith,C.W.J. (2008) Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 385–393.
90. Park,E. and Maquat,L.E. (2013) Staufen-mediated mRNA decay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **4**, 423–435.
91. Cali,B.M., Kuchma,S.L., Latham,J. and Anderson,P. (1999) smg-7 is required for mRNA surveillance in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **151**, 605–616.
92. Longman,D., Arrisi,P., Johnstone,I.L. and Cáceres,J.F. (2008) Chapter 7 Nonsense-Mediated mRNA Decay in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Enzymol.*, **449**, 149–164.
93. Avery,P., Vicente-Crespo,M., Francis,D., Nashchekina,O., Alonso,C.R. and Palacios,I.M. (2011) *Drosophila* Upf1 and Upf2 loss of function inhibits cell growth and causes animal death in a Upf3-independent manner. *RNA*, **17**, 624–638.
94. Metzstein,M.M. and Krasnow,M.A. (2006) Functions of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in *Drosophila* development. *PLoS Genet.*, **2**, 2143–2154.
95. Rehwinkel,J., Letunic,I., Raes,J., Bork,P. and Izaurralde,E. (2005) Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. *RNA*, **11**, 1530–1544.
96. Wittkopp,N., Huntzinger,E., Weiler,C., Saulière,J., Schmidt,S., Sonawane,M. and Izaurralde,E. (2009) Nonsense-mediated mRNA decay effectors are essential for zebrafish embryonic development and survival. *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 3517–3528.
97. Medghalchi,S.M., Frischmeyer,P.A., Mendell,J.T., Kelly,A.G., Lawler,A.M. and Dietz,H.C. (2001) Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 99–105.

98. McIlwain,D.R., Pan,Q., Reilly,P.T., Elia,A.J., McCracken,S., Wakeham,A.C., Itie-Youten,A., Blencowe,B.J. and Mak,T.W. (2010) Smg1 is required for embryogenesis and regulates diverse genes via alternative splicing coupled to nonsense-mediated mRNA decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 12186–12191.
99. Weischenfeldt,J., Damgaard,I., Bryder,D., Theilgaard-Mönch,K., Thoren,L.A., Nielsen,F.C., Jacobsen,S.E.W., Nerlov,C. and Porse,B.T. (2008) NMD is essential for hematopoietic stem and progenitor cells and for eliminating by-products of programmed DNA rearrangements. *Genes Dev.*, **22**, 1381–1396.
100. Longman,D., Hug,N., Keith,M., Anastasaki,C., Patton,E.E., Grimes,G. and Cáceres,J.F. (2013) DHX34 and NBAS form part of an autoregulatory NMD circuit that regulates endogenous RNA targets in human cells, zebrafish and *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 8319–8331.
101. Wimmer,K., Zhu,X.X., Lamb,B.J., Kuick,R., Ambros,P.F., Kovar,H., Thoraval,D., Motyka,S., Alberts,J.R. and Hanash,S.M. (1999) Co-amplification of a novel gene, NAG, with the N-myc gene in neuroblastoma. *Oncogene*, **18**, 233–8.
102. Scott,D., Board,J., Lu,X., Pearson,A.D., Kenyon,R. and Lunec,J. (2003) The neuroblastoma amplified gene, NAG: genomic structure and characterisation of the 7.3 kb transcript predominantly expressed in neuroblastoma. *Gene*, **307**, 1–11.
103. Aoki,T., Ichimura,S., Itoh,A., Kuramoto,M., Shinkawa,T., Isobe,T. and Tagaya,M. (2009) Identification of the Neuroblastoma-amplified Gene Product as a Component of the Syntaxin 18 Complex Implicated in Golgi-to-Endoplasmic Reticulum Retrograde Transport. *Mol. Biol. Cell*, **20**, 2639–2649.
104. Maksimova,N., Hara,K., Nikolaeva,I., Chun-Feng,T., Usui,T., Takagi,M., Nishihira,Y., Miyashita,A., Fujiwara,H., Oyama,T., *et al.* (2010) Neuroblastoma amplified sequence gene is associated with a novel short stature syndrome characterised by optic nerve atrophy and Pelger-Huët anomaly. *J. Med. Genet.*, **47**, 538–48.
105. Segarra,N.G., Ballhausen,D., Crawford,H., Perreau,M., Campos-Xavier,B., van Spaendonck-Zwarts,K., Vermeer,C., Russo,M., Zambelli,P.-Y., Stevenson,B., *et al.* (2015) NBAS mutations cause a multisystem disorder involving bone, connective tissue, liver, immune system, and retina. *Am. J. Med. Genet. Part A*, **167**, 2902–2912.
106. Haack,T.B., Staufner,C., Köpke,M.G., Straub,B.K., Kölker,S., Thiel,C., Freisinger,P., Baric,I., McKiernan,P.J., Dikow,N., *et al.* (2015) Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy. *Am. J. Hum. Genet.*, **97**, 163–169.
107. Jankowsky,E., Gross,C.H., Shuman,S. and Pyle,A.M. (2001) Active disruption of an RNA-protein interaction by a DExH/D RNA helicase. *Science (80- )*, **291**, 121–125.
108. Linder,P., Tanner,N.K. and Banroques,J. (2001) From RNA helicases to RNPsases. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 339–341.
109. Schwer,B. (2001) A new twist on RNA helicases: DExH/D box proteins as RNPsases. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 113–116.
110. Tanner,N.K. and Linder,P. (2001) DExD/H box RNA helicases: From generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell*, **8**, 251–262.
111. Anastasaki,C., Longman,D., Capper,A., Patton,E.E., Cáceres,J.F. and Cáceres,J.F. (2011) Dhx34 and Nbas function in the NMD pathway and are required for embryonic

- development in zebrafish. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 3686–3694.
112. Berthet, J. (2005) Dictionnaire de biologie De Boeck.
113. Heath, J.W., Wheeler, P.R., Stevens, A. and Young, B. (2008) Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheeler.
114. Rizzoti, K. (2015) Genetic regulation of murine pituitary development. *J. Mol. Endocrinol.*, **54**, R55–R73.
115. Gorbman, A. (1995) Olfactory Origins and Evolution of the Brain-Pituitary Endocrine System: Facts and Speculation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **97**, 171–178.
116. Pitts, G. (1997) Vertebrate endocrinology. Third edition By David O. Norris. San Diego, Academic Press, 1997, \$69.95 (xii + 634 pages), ISBN 0-12-521670-X. *Trends Endocrinol. Metab.*, **8**, 252–253.
117. McCabe, M.J. and Dattani, M.T. (2014) Genetic aspects of hypothalamic and pituitary gland development. *Handb. Clin. Neurol.*, **124**, 3–15.
118. Suga, H., Kadoshima, T., Minaguchi, M., Ohgushi, M., Soen, M., Nakano, T., Takata, N., Wataya, T., Muguruma, K., Miyoshi, H., *et al.* (2011) Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. *Nature*, **480**, 57–62.
119. Pogoda, H.M. and Hammerschmidt, M. (2007) Molecular genetics of pituitary development in zebrafish. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **18**, 543–558.
120. Szarek, E., Cheah, P.S., Schwartz, J. and Thomas, P. (2010) Molecular genetics of the developing neuroendocrine hypothalamus. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **323**, 115–123.
121. Kelberman, D., Rizzoti, K., Lovell-Badge, R., Robinson, I.C.A.F. and Dattani, M.T. (2009) Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr. Rev.*, **30**, 790–829.
122. Wang, O., Majzoub, J.A., Gillam, M.P., Molitch, M.E., Herman-bonert, V.S., Melmed, S., Kaiser, U.B., Sarapura, V.D., Gordon, D.F., Samuels, M.H., *et al.* (2011) Adrenocorticotropin. In *The Pituitary*. Elsevier Inc., pp. 47–81.
123. Gillam, M.P. and Molitch, M.E. (2011) Prolactin. In *The Pituitary*. pp. 119–166.
124. Fujimoto, M., Sakamoto, T., Kanetoh, T., Osaka, M. and Moriyama, S. (2006) Prolactin-releasing peptide is essential to maintain the prolactin level and osmotic balance in freshwater teleost fish. *Peptides*, **27**, 1104–1109.
125. Sarapura, V.D., Gordon, D.F. and Samuels, M.H. (2011) Thyroid-stimulating Hormone.
126. Herman-Bonert, V.S. and Melmed, S. (2011) Growth Hormone.
127. Kaiser, U.B. (2011) Gonadotropin Hormones. In *The Pituitary*. Elsevier Inc., pp. 205–260.
128. Ono, M., Takayama, Y., Rand-Weaver, M., Sakata, S., Yasunaga, T., Noso, T. and Kawauchi, H. (1990) cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 4330–4.
129. Kaneko, T. (1996) Cell biology of somatolactin. *Int Rev Cytol*, **169**, 1–24.
130. Lopez, M., Nica, G., Motte, P., Martial, J.A., Hammerschmidt, M. and Muller, M. (2006) Expression of the somatolactin beta gene during zebrafish embryonic development. *Gene*



*Expr. Patterns*, **6**, 156–161.

131. Planas, J. V., Swanson, P., Rand-Weaver, M. and Dickhoff, W.W. (1992) Somatolactin stimulates in vitro gonadal steroidogenesis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **87**, 1–5.
132. Rand-Weaver, M., Pottinger, T.G. and Sumpter, J.P. (1993) Plasma somatolactin concentrations in salmonid fish are elevated by stress. *J. Endocrinol.*, **138**, 509–515.
133. Kakizawa, S., Kaneko, T., Hasegawa, S. and Hirano, T. (1995) Effects of feeding, fasting, background adaptation, acute stress, and exhaustive exercise on the plasma somatolactin concentrations in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **98**, 137–146.
134. Kakizawa, S., Kaneko, T. and Hirano, T. (1996) Elevation of plasma somatolactin concentrations during acidosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.*, **199**, 1043–51.
135. Kakizawa, S., Ishimatsu, A., Takeda, T., Kaneko, Y. and Hirano, T. (1997) Possible involvement of somatolactin in the regulation of plasma bicarbonate for the compensation of acidosis in rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, **200**, 2675–2683.
136. Lu, M., Swanson, P. and Renfro, J.L. (1995) Effect of somatolactin and related hormones on phosphate transport by flounder renal tubule primary cultures. *Am. J. Physiol.*, **268**, R577–82.
137. Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Astola, A., Pendón, C., Valdivia, M.M. and Pérez-Sánchez, J. (2002) Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatolactin paradigm. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **128**, 102–111.
138. Fukamachi, S., Sugimoto, M., Mitani, H. and Shima, A. (2004) Somatolactin selectively regulates proliferation and morphogenesis of neural-crest derived pigment cells in medaka. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 10661–6.
139. Kakizawa, S., Kaneko, T. and Hirano, T. (1997) Effects of hypothalamic factors on somatolactin secretion from the organ-cultured pituitary of rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **105**, 71–78.
140. Taniyama, S., Kitahashi, T., Ando, H., Kaeriyama, M., Zohar, Y., Ueda, H. and Urano, A. (2000) Effects of gonadotropin-releasing hormone analog on expression of genes encoding the growth hormone/prolactin/somatolactin family and a pituitary-specific transcription factor in the pituitaries of prespawning sockeye salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **118**, 418–24.
141. Jiang, Q., Lian, A. and He, Q. (2016) Dopamine inhibits somatolactin gene expression in tilapia pituitary cells through the dopamine D2 receptors. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.*, **197**, 35–42.
142. Le Tissier, P.R., Hodson, D.J., Lafont, C., Fontanaud, P., Schaeffer, M. and Mollard, P. (2012) Anterior pituitary cell networks. *Front. Neuroendocrinol.*, **33**, 252–266.
143. Treier, M., Gleiberman, A.S., O'Connell, S.M., Szeto, D.P., McMahon, J.A., McMahon, A.P. and Rosenfeld, M.G. (1998) Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.*, **12**, 1691–1704.
144. Pogoda, H.M. and Hammerschmidt, M. (2009) How to make a teleost adenohypophysis:

- molecular pathways of pituitary development in zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **312**, 2-13.
145. Baker,C. V and Bronner-Fraser,M. (2001) Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev. Biol.*, **232**, 1-61.
  146. Rubenstein,J.L.R., Shimamura,K., Martinez,S. and Puelles,L. (1998) Regionalization of the proencephalic neural plate. *Annu. Rev. Neurosci.*, **21**, 224-477.
  147. Whitlock,K.E. and Westerfield,M. (2000) The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. *Development*, **127**, 3645-3653.
  148. Akimenko,M. a, Ekker,M., Wegner,J., Lin,W. and Westerfield,M. (1994) Combinatorial expression of three zebrafish genes related to distal-less: part of a homeobox gene code for the head. *J. Neurosci.*, **14**, 3475-3486.
  149. Toro,S. and Varga,Z.M. (2007) Equivalent progenitor cells in the zebrafish anterior preplacodal field give rise to adenohypophysis, lens, and olfactory placodes. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **18**, 534-542.
  150. Dutta,S., Dietrich,J.-E.E., Aspöck,G., Burdine,R.D., Schier,A., Westerfield,M., Varga,Z.M., Aspöck,G., Burdine,R.D., Schier,A., *et al.* (2005) *pitx3* defines an equivalence domain for lens and anterior pituitary placode. *Development*, **132**, 1579-1590.
  151. Glasgow,E., Karavanov,A.A. and Dawid,I.B. (1997) Neuronal and neuroendocrine expression of *lim3*, a LIM class homeobox gene, is altered in mutant zebrafish with axial signaling defects. *Dev. Biol.*, **192**, 405-419.
  152. Herzog,W., Zeng,X., Lele,Z., Sonntag,C., Ting,J.W., Chang,C.Y. and Hammerschmidt,M. (2003) Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on sonic hedgehog. *Dev. Biol.*, **254**, 36-49.
  153. Sbrogna,J.L., Barresi,M.J.F. and Karlstrom,R.O. (2003) Multiple roles for Hedgehog signaling in zebrafish pituitary development. *Dev. Biol.*, **254**, 19-35.
  154. Chapman,S.C., Sawitzke,A.L., Campbell,D.S. and Schoenwolf,G.C. (2005) A three-dimensional atlas of pituitary gland development in the zebrafish. *J. Comp. Neurol.*, **487**, 428-440.
  155. Guner,B., Ozacar, a. T., Thomas,J.E. and Karlstrom,R.O. (2008) Graded hedgehog and fibroblast growth factor signaling independently regulate pituitary cell fates and help establish the pars distalis and pars intermedia of the zebrafish adenohypophysis. *Endocrinology*, **149**, 4435-4451.
  156. Nica,G., Herzog,W., Sonntag,C., Nowak,M., Schwarz,H., Zapata,A.G. and Hammerschmidt,M. (2006) *Eya1* is required for lineage-specific differentiation, but not for cell survival in the zebrafish adenohypophysis. *Dev. Biol.*, **292**, 189-204.
  157. Musumeci,G., Castorina,S., Castrogiovanni,P., Loreto,C., Leonardi,R., Aiello,F.C., Magro,G. and Imbesi,R. (2015) A journey through the pituitary gland: Development, structure and function, with emphasis on embryo-foetal and later development. *Acta Histochem.*, **117**, 355-66.
  158. Herzog,W., Sonntag,C., von der Hardt,S., Roehl,H.H., Varga,Z.M. and Hammerschmidt,M. (2004) *Fgf3* signaling from the ventral diencephalon is required for early specification and subsequent survival of the zebrafish adenohypophysis.

*Development*, **131**, 3681–3692.

159. Mollard,P., Hodson,D.J., Lafont,C., Rizzoti,K. and Drouin,J. (2012) A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends Endocrinol. Metab.*, **23**, 261–269.
160. Nica,G., Herzog,W., Sonntag,C. and Hammerschmidt,M. (2004) Zebrafish pit1 mutants lack three pituitary cell types and develop severe dwarfism. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 1196–1209.
161. Quiroz,Y., Lopez,M., Mavropoulos,A., Motte,P., Martial,J.A., Hammerschmidt,M. and Muller,M. (2012) The HMG-Box Transcription Factor Sox4b Is Required for Pituitary Expression of gata2a and Specification of Thyrotrope and Gonadotrope Cells in Zebrafish. *Mol Endocrinol*, **26**, 1014–1027.
162. Jacobson,A.G., Miyamoto,D.M. and Mai,S.-H. (1979) Rathke's pouch morphogenesis in the chick embryo. *J. Exp. Zool.*, **207**, 351–366.
163. Takuma,N., Sheng,H.Z., Furuta,Y., Ward,J.M., Sharma,K., Hogan,B.L., Pfaff,S.L., Westphal,H., Kimura,S. and Mahon,K.A. (1998) Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development*, **125**, 4835–4840.
164. Peter,R.E., Yu,K.L., Marchant,T.A. and Rosenblum,P.M. (1990) Direct neural regulation of the teleost adenohypophysis. *J. Exp. Zool.*, **4**, 84–89.
165. Soukup,V., Horacek,I. and Cerny,R. (2013) Development and evolution of the vertebrate primary mouth. *J. Anat.*, **222**, 79–99.
166. Nunes,I., Tovmasian,L.T., Silva,R.M., Burke,R.E. and Goff,S.P. (2003) Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 4245–50.
167. Semina,E. V, Murray,J.C., Reiter,R., Hrstka,R.F. and Graw,J. (2000) Deletion in the promoter region and altered expression of Pitx3 homeobox gene in aphakia mice. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 1575–85.
168. Herzog,W., Sonntag,C., Walderich,B., Odenthal,J., Maischein,H.-M.M. and Hammerschmidt,M. (2004) Genetic analysis of adenohypophysis formation in zebrafish. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 1185–1195.
169. Taira,M., Hayes,W.P., Otani,H. and Dawid,I.B. (1993) Expression of LIM class homeobox gene Xlim-3 in *Xenopus* development is limited to neural and neuroendocrine tissues. *Dev. Biol.*, **159**, 245–256.
170. Seidah,N.G., Barale,J.C., Marcinkiewicz,M., Mattei,M.G., Day,R. and Chrétien,M. (1994) The mouse homeoprotein mLIM-3 is expressed early in cells derived from the neuroepithelium and persists in adult pituitary. *DNA Cell Biol.*, **13**, 1163–80.
171. Zhadanov,A.B., Bertuzzi,S., Taira,M., Dawid,I.B. and Westphal,H. (1995) Expression pattern of the murine LIM class homeobox gene Lhx3 in subsets of neural and neuroendocrine tissues. *Dev. Dyn.*, **202**, 354–364.
172. Pogoda,H.-M.M., von der Hardt,S., Herzog,W., Kramer,C., Schwarz,H. and Hammerschmidt,M. (2006) The proneural gene ascl1a is required for endocrine differentiation and cell survival in the zebrafish adenohypophysis. *Development*, **133**, 1079–1089.
173. Kim,E.J., Battiste,J., Nakagawa,Y. and Johnson,J.E. (2008) Ascl1 (Mash1) lineage cells

- contribute to discrete cell populations in CNS architecture. *Mol. Cell. Neurosci.*, **38**, 595–606.
174. Liu,J., Lin,C., Gleiberman, a, Ohgi,K. a, Herman,T., Huang,H.P., Tsai,M.J. and Rosenfeld,M.G. (2001) Tbx19, a tissue-selective regulator of POMC gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 8674–8679.
  175. Zhang,F., Tanasa,B., Merkurjev,D., Lin,C., Song,X., Li,W., Tan,Y., Liu,Z., Zhang,J., Ohgi,K. a., *et al.* (2015) Enhancer-bound LDB1 regulates a corticotrope promoter-pausing repression program. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, 1380–1385.
  176. Ma,Q., Sommer,L., Cserjesi,P. and Anderson,D.J. (1997) Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J. Neurosci.*, **17**, 3644–52.
  177. Somasundaram,K., Reddy,S.P., Vinnakota,K., Britto,R., Subbarayan,M., Nambiar,S., Hebbar,A., Samuel,C., Shetty,M., Sreepathi,H.K., *et al.* (2005) Upregulation of ASCL1 and inhibition of Notch signaling pathway characterize progressive astrocytoma. *Oncogene*, **24**, 7073–83.
  178. Ware,M., Hamdi-Rozé,H. and Dupé,V. (2014) Notch signaling and proneural genes work together to control the neural building blocks for the initial scaffold in the hypothalamus. *Front. Neuroanat.*, **8**, 140.
  179. Nelson,B.R., Hartman,B.H., Ray,C.A., Hayashi,T., Bermingham-McDonogh,O. and Reh,T.A. (2009) Acheate-scute like 1 (Ascl1) is required for normal delta-like (Dll) gene expression and notch signaling during retinal development. *Dev. Dyn.*, **238**, 2163–78.
  180. Yun,K., Fischman,S., Johnson,J., Hrabe de Angelis,M., Weinmaster,G. and Rubenstein,J.L.R. (2002) Modulation of the notch signaling by Mash1 and Dlx1/2 regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon. *Development*, **129**, 5029–40.
  181. Li,S., Crenshaw,E.B., Rawson,E.J., Simmons,D.M., Swanson,L.W. and Rosenfeld,M.G. (1990) Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature*, **347**, 528–33.
  182. Camper,S.A., Saunders,T.L., Katz,R.W. and Reeves,R.H. (1990) The Pit-1 transcription factor gene is a candidate for the murine Snell dwarf mutation. *Genomics*, **8**, 586–590.
  183. Dasen,J.S., O’Connell,S.M., Flynn,S.E., Treier,M., Gleiberman,A.S., Szeto,D.P., Hooshmand,F., Aggarwal,A.K. and Rosenfeld,M.G. (1999) Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient- induced determination of pituitary cell types. *Cell*, **97**, 587–598.
  184. Tatsumi,K., Miyai,K., Notomi,T., Kaibe,K., Amino,N., Mizuno,Y. and Kohno,H. (1992) Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. *Nat. Genet.*, **1**, 56–58.
  185. Radovick,S., Nations,M., Du,Y., Berg,L. a, Weintraub,B.D. and Wondisford,F.E. (1992) A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science*, **257**, 1115–1118.
  186. Pfaffle,R.W., Blankenstein,O., Wuller,S. and Kentrup,H. (1999) Combined pituitary hormone deficiency: role of Pit-1 and Prop-1. *Acta Paediatr Suppl*, **88**, 33–41.

187. Lin,S.C., Li,S., Drolet,D.W. and Rosenfeld,M.G. (1994) Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals Pit-1-independent and Pit-1-dependent origins of the thyrotrope. *Development*, **120**, 515–22.
188. Bonini,N.M., Leiserson,W.M. and Benzer,S. (1993) The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing Drosophila eye. *Cell*, **72**, 379–95.
189. Kozlowski,D.J., Whitfield,T.T., Hukriede,N.A., Lam,W.K. and Weinberg,E.S. (2005) The zebrafish dog-eared mutation disrupts *eya1*, a gene required for cell survival and differentiation in the inner ear and lateral line. *Dev. Biol.*, **277**, 27–41.
190. Pignoni,F., Hu,B., Zavitz,K.H., Xiao,J., Garrity,P.A. and Zipursky,S.L. (1997) The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in Drosophila eye development. *Cell*, **91**, 881–891.
191. Li,X., Oghi,K. a, Zhang,J., Krones,A., Bush,K.T., Glass,C.K., Nigam,S.K., Aggarwal,A.K., Maas,R., Rose,D.W., *et al.* (2003) Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature*, **426**, 247–254.
192. Xu,P.X., Adams,J., Peters,H., Brown,M.C., Heaney,S. and Maas,R. (1999) Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat. Genet.*, **23**, 113–117.
193. Xu,P.-X., Zheng,W., Laclef,C., Maire,P., Maas,R.L., Peters,H. and Xu,X. (2002) Eya1 is required for the morphogenesis of mammalian thymus, parathyroid and thyroid. *Development*, **129**, 3033–44.
194. Zou,D., Silvius,D., Fritsch,B. and Xu,P.-X. (2004) Eya1 and Six1 are essential for early steps of sensory neurogenesis in mammalian cranial placodes. *Development*, **131**, 5561–5572.
195. Abdelhak,S., Kalatzis,V., Heilig,R., Compain,S., Samson,D., Vincent,C., Levi-Acobas,F., Cruaud,C., Le Merrer,M., Mathieu,M., *et al.* (1997) Clustering of mutations responsible for branchio-oto-renal (BOR) syndrome in the eyes absent homologous region (*eyaHR*) of *EYA1*. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 2247–55.
196. Vincent,C., Kalatzis,V., Abdelhak,S., Chaib,H., Compain,S., Helias,J., Vaneecloo,F.M. and Petit,C. (1997) BOR and BO syndromes are allelic defects of *EYA1*. *Eur. J. Hum. Genet.*, **5**, 242–246.
197. Buller,C., Xu,X., Marquis,V., Schwanke,R. and Xu,P.X. (2001) Molecular effects of Eya1 domain mutations causing organ defects in BOR syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 2775–2781.
198. Kiefer,J.C. (2007) Back to basics: Sox genes. *Dev. Dyn.*, **236**, 2356–66.
199. Abdelalim,E.M., Emara,M.M. and Kolatkar,P.R. (2014) The SOX Transcription Factors as Key Players in Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev.*, **23**, 2687–2699.
200. Kashiwabara,Y., Sasaki,S., Matsushita,A., Nagayama,K., Ohba,K., Iwaki,H., Matsunaga,H., Suzuki,S., Misawa,H., Ishizuka,K., *et al.* (2009) Functions of PIT1 in GATA2-dependent transactivation of the thyrotropin B promoter. *J. Mol. Endocrinol.*, **42**, 225–237.
201. Raymond,C.S., Murphy,M.W., O’Sullivan,M.G., Bardwell,V.J. and Zarkower,D. (2000) *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis

- differentiation. *Genes Dev.*, **14**, 2587–2595.
202. Ross, J.M., Kalis, A.K., Murphy, M.W. and Zarkower, D. (2005) The DM Domain Protein MAB-3 Promotes Sex-Specific Neurogenesis in *C. elegans* by Regulating bHLH Proteins. *Dev. Cell*, **8**, 881–892.
  203. Guo, Y., Cheng, H., Huang, X., Gao, S., Yu, H. and Zhou, R. (2005) Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **330**, 950–957.
  204. Kimura, K., Hachiya, T., Koganezawa, M., Tazawa, T. and Yamamoto, D. (2008) Fruitless and Doublesex Coordinate to Generate Male-Specific Neurons that Can Initiate Courtship. *Neuron*, **59**, 759–769.
  205. Matson, C.K., Murphy, M.W., Griswold, M.D., Yoshida, S., Bardwell, V.J. and Zarkower, D. (2010) The Mammalian Doublesex Homolog DMRT1 Is a Transcriptional Gatekeeper that Controls the Mitosis versus Meiosis Decision in Male Germ Cells. *Dev. Cell*, **19**, 612–624.
  206. Saulnier, A., Keruzore, M., De Clercq, S., Bar, I., Moers, V., Magnani, D., Walcher, T., Filippis, C., Kricha, S., Parlier, D., *et al.* (2013) The doublesex homolog *Dmrt5* is required for the development of the caudomedial cerebral cortex in mammals. *Cereb. Cortex*, **23**, 2552–2567.
  207. Guo, Y., Li, Q., Gao, S., Zhou, X., He, Y., Shang, X., Cheng, H. and Zhou, R. (2004) Molecular cloning, characterization, and expression in brain and gonad of *Dmrt5* of zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**, 569–575.
  208. Graf, M., Teo Qi-Wen, E.-R., Viktor Sarusie, M., Rajaei, F. and Winkler, C. (2014) *Dmrt5* controls corticotrope and gonadotrope differentiation in the zebrafish pituitary. *Mol. Endocrinol.*, 10.1210/me.2014-1176.
  209. Pulichino, A.M., Vallette-Kasic, S., Tsai, J.P.Y., Couture, C., Gauthier, Y. and Drouin, J. (2003) *Tpit* determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes Dev.*, **17**, 738–747.
  210. Lamolet, B., Poulin, G., Chu, K., Guillemot, F., Tsai, M.-J. and Drouin, J. (2004) *Tpit*-independent function of *NeuroD1*(*BETA2*) in pituitary corticotroph differentiation. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 995–1003.
  211. Lavoie, P.-L., Budry, L., Balsalobre, A. and Drouin, J. (2008) Developmental dependence on *NurRE* and *EboxNeuro* for expression of pituitary proopiomelanocortin. *Mol. Endocrinol.*, **22**, 1647–1657.
  212. Kioussi, C., O’Connell, S., St-Onge, L., Treier, M., Gleiberman, a S., Gruss, P. and Rosenfeld, M.G. (1999) *Pax6* is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 14378–14382.
  213. Bentley, C.A., Zidehsarai, M.P., Grindley, J.C., Parlow, A.F., Barth-Hall, S. and Roberts, V.J. (1999) *Pax6* is implicated in murine pituitary endocrine function. *Endocrine*, **10**, 171–177.
  214. Budry, L., Balsalobre, A., Gauthier, Y., Khetchoumian, K., L’Honoré, A., Vallette, S., Brue, T., Figarella-Branger, D., Meij, B. and Drouin, J. (2012) The selector gene *Pax7* dictates alternate pituitary cell fates through its pioneer action on chromatin remodeling. *Genes Dev.*, **26**, 2299–2310.
  215. Devine, C. a., Sbrogna, J.L., Guner, B., Osgood, M., Shen, M.C. and Karlstrom, R.O. (2009) A

- dynamic Gli code interprets Hh signals to regulate induction, patterning, and endocrine cell specification in the zebrafish pituitary. *Dev. Biol.*, **326**, 143–154.
216. Thisse,B. and Thisse,C. (2005) Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev. Biol.*, **287**, 390–402.
  217. Turner,N. and Grose,R. (2010) Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev.*, **10**, 116–129.
  218. Coumoul,X. and Deng,C.X. (2003) Roles of FGF Receptors in Mammalian Development and Congenital Diseases. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.*, **69**, 286–304.
  219. Norlin,S., Nordström,U. and Edlund,T. (2000) Fibroblast growth factor signaling is required for the proliferation and patterning of progenitor cells in the developing anterior pituitary. *Mech. Dev.*, **96**, 175–82.
  220. Ohuchi,H., Hori,Y., Yamasaki,M., Harada,H., Sekine,K., Kato,S. and Itoh,N. (2000) FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **277**, 643–649.
  221. De Moerlooze,L., Spencer-Dene,B., Revest,J.M., Hajihosseini,M., Rosewell,I. and Dickson,C. (2000) An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development*, **127**, 483–492.
  222. Ericson,J., Norlin,S., Jessell,T.M. and Edlund,T. (1998) Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development*, **125**, 1005–1015.
  223. Walshe,J. and Mason,I. (2003) Unique and combinatorial functions of Fgf3 and Fgf8 during zebrafish forebrain development. *Development*, **130**, 4337–4349.
  224. Liu,N.A., Ren,M., Song,J., Ríos,Y., Wawrowsky,K., Ben-Shlomo,A., Lin,S. and Melmed,S. (2008) In vivo time-lapse imaging delineates the zebrafish pituitary proopiomelanocortin lineage boundary regulated by FGF3 signal. *Dev. Biol.*, **319**, 192–200.
  225. Heretsch,P., Tzagkaroulaki,L. and Giannis,A. (2010) Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 6613–6624.
  226. Ryan,K.E. and Chiang,C. (2012) Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates. *J. Biol. Chem.*, **287**, 17905–17913.
  227. McMahon,A.P., Ingham,P.W. and Tabin,C.J. (2003) Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **53**, 1–114.
  228. Pasca di Magliano,M. and Hebrok,M. (2003) Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 903–911.
  229. Cameron,F.J., Khadilkar,V. V. and Stanhope,R. (1999) Pituitary dysfunction, morbidity and mortality with congenital midline malformation of the cerebrum. *Eur. J. Pediatr.*, **158**, 97–102.
  230. Rappaport,E.B., Ulstrom,R. a, Gorlin,R.J., Lucky, a W., Colle,E. and Miser,J. (1977) Solitary maxillary central incisor and short stature. *J. Pediatr.*, **91**, 924–8.
  231. Zhao,L., Zevallos,S.E., Rizzoti,K., Jeong,Y., Lovell-Badge,R. and Epstein,D.J. (2012) Disruption of SoxB1-Dependent Sonic hedgehog Expression in the Hypothalamus Causes

- Septo-optic Dysplasia. *Dev. Cell*, **22**, 585–596.
232. Trowe,M.-O., Zhao,L., Weiss,A.-C., Christoffels,V., Epstein,D.J., Kispert,A., Aanhaenen,W.T.J., Brons,J.F., Domínguez,J.N., Rana,M.S., *et al.* (2013) Inhibition of Sox2-dependent activation of Shh in the ventral diencephalon by Tbx3 is required for formation of the neurohypophysis. *Development*, **140**, 2299–309.
233. Treier,M., O'Connell,S., Gleiberman, a, Price,J., Szeto,D.P., Burgess,R., Chuang,P.T., McMahon, a P. and Rosenfeld,M.G. (2001) Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development*, **128**, 377–86.
234. Wang,Y., Martin,J.F. and Bai,C.B. (2010) Direct and indirect requirements of Shh/Gli signaling in early pituitary development. *Dev. Biol.*, **348**, 199–209.
235. Kondoh,H., Uchikawa,M., Yoda,H., Takeda,H., Furutani-Seiki,M. and Karlstrom,R.O. (2000) Zebrafish mutations in Gli-mediated hedgehog signaling lead to lens transdifferentiation from the adenohypophysis anlage. *Mech. Dev.*, **96**, 165–174.
236. Ruiz I Altaba,A. (1999) Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development*, **126**, 3205–3216.
237. Ruiz i Altaba,A., Mas,C. and Stecca,B. (2007) The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol.*, **17**, 438–447.
238. Cayuso,J., Ulloa,F., Cox,B., Briscoe,J. and Martí,E. (2006) The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development*, **133**, 517–28.
239. Rowitch,D.H., S-Jacques,B., Lee,S.M., Flax,J.D., Snyder,E.Y. and McMahon, a P. (1999) Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J. Neurosci.*, **19**, 8954–8965.
240. Fiúza,U.-M. and Arias,A.M. (2007) Cell and molecular biology of Notch. *J. Endocrinol.*, **194**, 459–474.
241. Bray,S. (1998) Notch signalling in Drosophila: three ways to use a pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **9**, 591–7.
242. Dutta,S., Dietrich,J.E., Westerfield,M. and Varga,Z.M. (2008) Notch signaling regulates endocrine cell specification in the zebrafish anterior pituitary. *Dev. Biol.*, **319**, 248–257.
243. Itoh,M., Kim,C.H., Palardy,G., Oda,T., Jiang,Y.J., Maust,D., Yeo,S.Y., Lorick,K., Wright,G.J., Ariza-McNaughton,L., *et al.* (2003) Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of notch signaling by delta. *Dev. Cell*, **4**, 67–82.
244. Geling,A., Steiner,H., Willem,M., Bally-Cuif,L. and Haass,C. (2002) A  $\gamma$ -secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep.*, **3**, 688–694.
245. Nakahara,Y., Muto,A., Hirabayashi,R., Sakuma,T., Yamamoto,T., Kume,S. and Kikuchi,Y. (2016) Temporal effects of Notch signaling and potential cooperation with multiple downstream effectors on adenohypophysis cell specification in zebrafish. *Genes to Cells*, **21**, 492–504.
246. Higham,C.E., Johannsson,G. and Shalet,S.M. (2016) Hypopituitarism. *Lancet*, **6736**, 1–13.
247. Sapochnik,M., Nieto,L.E., Fuertes,M. and Arzt,E. (2016) Molecular Mechanisms



Underlying Pituitary Pathogenesis. *Biochem. Genet.*, **54**, 107–119.

248. Zhan,X., Wang,X. and Cheng,T. (2016) Human Pituitary Adenoma Proteomics : New Progresses and Perspectives. *Front. Endocrinol. (Lausanne).*, **7**, 1–11.
249. Molitch,M.E. (2014) Nonfunctioning pituitary tumors 1st ed. Elsevier B.V.
250. Romijn,J.A. (2014) Hyperprolactinemia and prolactinoma 1st ed. Elsevier B.V.
251. Tritos,N.A. and Biller,B.M.K. (2014) Cushing's disease 1st ed. Elsevier B.V.
252. Chanson,P., Salenave,S. and Kamenicky,P. (2014) Acromegaly. *Handb. Clin. Neurol.*, **124**, 197–219.
253. Pasini,A., Henrique,D. and Wilkinson,D.G. (2001) The zebrafish Hairy/Enhancer-of-split-related gene her6 is segmentally expressed during the early development of hindbrain and somites. *Mech. Dev.*, **100**, 317–321.
254. Verduzco,D. and Amatruda,J. (2011) Analysis of Cell Proliferation, Senescence and Cell Death in Zebrafish Embryos. *Methods Cell Biol.*, **101**, 19–38.
255. Tucker,B. and Lardelli,M. (2007) A rapid apoptosis assay measuring relative acridine orange fluorescence in zebrafish embryos. *Zebrafish*, **4**, 113–116.
256. Delic,J., Coppey,J., Magdelenat,H. and Coppey-Moisan,M. (1991) Impossibility of acridine orange intercalation in nuclear DNA of the living cell. *Exp. Cell Res.*, **194**, 147–153.
257. Miyata,T., Maeda,T. and Lee,J.E. (1999) NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev.*, **13**, 1647–1652.
258. Liu,M., Pleasure,S.J., Collins,A.E., Noebels,J.L., Naya,F.J., Tsai,M.J. and Lowenstein,D.H. (2000) Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 865–70.
259. Schwab,M.H., Bartholomae, a, Heimrich,B., Feldmeyer,D., Druffel-Augustin,S., Goebbels,S., Naya,F.J., Zhao,S., Frotscher,M., Tsai,M.J., *et al.* (2000) Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J. Neurosci.*, **20**, 3714–3724.
260. Mueller,T. and Wullimann,M.F. (2003) Anatomy of neurogenesis in the early zebrafish brain. *Dev. Brain Res.*, **140**, 137–155.
261. Taylor,S.M., Alvarez-Delfin,K., Saade,C.J., Thomas,J.L., Thummel,R., Fadool,J.M. and Hitchcock,P.F. (2015) The bHLH transcription factor neuroD governs photoreceptor genesis and regeneration through delta-notch signaling. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **56**, 7496–7515.
262. Wullimann,M.F. and Mueller,T. (2002) Expression of Zash-1a in the postembryonic zebrafish brain allows comparison to mouse Mash1 domains. *Gene Expr. Patterns*, **1**, 187–192.
263. Barth,K.A. and Wilson,S.W. (1995) Expression of zebrafish nk2.2 is influenced by sonic hedgehog/vertebrate hedgehog-1 and demarcates a zone of neuronal differentiation in the embryonic forebrain. *Development*, **121**, 1755–68.
264. Thisse Thisse, Christine,B. (2004) Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis. *ZFIN Direct Data Submiss.*

265. Ober,E.A., Field,H.A. and Stainier,D.Y.R. (2003) From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. *Mech. Dev.*, **120**, 5–18.
266. Dalgin,G. and Prince,V.E. (2015) Differential levels of neurod establish zebrafish endocrine pancreas cell fates. *Dev. Biol.*, **402**, 81–97.
267. Verbruggen,V., Ek,O., Georgette,D., Delporte,F., Von Berg,V., Detry,N., Biemar,F., Coutinho,P., Martial,J.A., Voz,M.L., *et al.* (2010) The Pax6b homeodomain is dispensable for pancreatic endocrine cell differentiation in Zebrafish. *J. Biol. Chem.*, **285**, 13863–13873.
268. Hinits,Y., Williams,V.C., Sweetman,D., Donn,T.M., Ma,T.P., Moens,C.B. and Hughes,S.M. (2011) Defective cranial skeletal development, larval lethality and haploinsufficiency in Myod mutant zebrafish. *Dev. Biol.*, **358**, 102–112.
269. Cannon,J.E., Upton,P.D., Smith,J.C. and Morrell,N.W. (2010) Intersegmental vessel formation in zebrafish: Requirement for VEGF but not BMP signalling revealed by selective and non-selective BMP antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, **161**, 140–149.
270. Goi,M. and Childs,S.J. (2016) Patterning mechanisms of the sub-intestinal venous plexus in zebrafish. *Dev. Biol.*, **409**, 114–128.
271. Loucks,E.J., Schwend,T. and Ahlgren,S.C. (2007) Molecular changes associated with teratogen-induced cyclopia. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.*, **79**, 642–651.
272. Contakos,S.P., Gaydos,C.M., Pfeil,E.C. and McLaughlin,K.A. (2005) Subdividing the embryo: A role for Notch signaling during germ layer patterning in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, **288**, 294–307.
273. Fürthauer,M., Van Celst,J., Thisse,C. and Thisse,B. (2004) Fgf signalling controls the dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development*, **131**, 2853–2864.
274. Hong,S.-K. and Dawid,I.B. (2009) FGF-dependent left-right asymmetry patterning in zebrafish is mediated by *Ier2* and *Fibp1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 2230–2235.
275. Maves,L., Jackman,W. and Kimmel,C.B. (2002) FGF3 and FGF8 mediate a rhombomere 4 signaling activity in the zebrafish hindbrain. *Development*, **129**, 3825–37.
276. Phillips,B.T., Bolding,K. and Riley,B.B. (2001) Zebrafish *fgf3* and *fgf8* encode redundant functions required for otic placode induction. *Dev. Biol.*, **235**, 351–365.
277. Maroon,H., Walshe,J., Mahmood,R., Kiefer,P., Dickson,C. and Mason,I. (2002) *Fgf3* and *Fgf8* are required together for formation of the otic placode and vesicle. *Development*, **129**, 2099–2108.
278. Miyake,A. and Itoh,N. (2013) *Fgf22* regulated by *Fgf3/Fgf8* signaling is required for zebrafish midbrain development. *Biol. Open*, **2**, 515–24.
279. Manzon,L.A. (2002) The Role of Prolactin in Fish Osmoregulation: A Review. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **125**, 291–310.
280. Frawley,L.S. (1989) Mammosomatotropes: Current status and possible functions. *Trends Endocrinol. Metab.*, **1**, 31–34.
281. Beckers,A., Courtoy,R., Stevenaert,A., Boniver,J., Closset,J., Frankenne,F., Reznik,M. and Hennen,G. (1988) Mammosomatotropes in human pituitary adenomas as revealed by electron microscopic double gold immunostaining method. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, **118**, 503–512.

282. Villaplana, M., García Ayala, A., Chaves Pozo, E. and Agulleiro, B. (2000) Identification of mammosomatotropes, growth hormone cells and prolactin cells in the pituitary gland of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) using light immunocytochemical methods: an ontogenetic study. *Anat. Embryol. (Berl.)*, **202**, 421–9.
283. Vidal, S., Horvath, E., Kovacs, K., Lloyd, R. V and Smyth, H.S. (2001) Reversible transdifferentiation: interconversion of somatotrophs and lactotrophs in pituitary hyperplasia. *Mod. Pathol.*, **14**, 20–28.
284. Fu, Q. and Vankelecom, H. (2012) Regenerative capacity of the adult pituitary: multiple mechanisms of lactotrope restoration after transgenic ablation. *Stem Cells Dev.*, **21**, 3245–57.
285. Olavarría, V.H., Sepulcre, M.P., Figueroa, J.E. and Mulero, V. (2010) Prolactin-induced production of reactive oxygen species and IL-1 $\beta$  in leukocytes from the bony fish gilthead seabream involves Jak/Stat and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *J. Immunol.*, **185**, 3873–3883.
286. Soto, L., Lagos, A.F., Isla, A., Haussmann, D. and Figueroa, J. (2016) Immunostimulatory effects of prolactin on TLR1 and TLR5M in SHK-1 cells infected with *Piscirickettsia salmonis*. *Dis. Aquat. Organ.*, **118**, 237–245.
287. Paredes, M., Gonzalez, K., Figueroa, J. and Montiel-Eulefi, E. (2013) Immunomodulatory effect of prolactin on Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage function. *Fish Physiol. Biochem.*, **39**, 1215–1221.
288. Schuurmans, C. and Guillemot, F. (2002) Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **12**, 26–34.
289. Ma, Q., Sommer, L., Cserjesi, P. and Anderson, D.J. (1997) Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J. Neurosci.*, **17**, 3644–52.
290. Kageyama, R., Ohtsuka, T., Hatakeyama, J. and Ohsawa, R. (2005) Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp. Cell Res.*, **306**, 343–348.
291. Dornseifer, P., Takke, C. and Campos-Ortega, J.A. (1997) Overexpression of a zebrafish homologue of the Drosophila neurogenic gene Delta perturbs differentiation of primary neurons and somite development. *Mech. Dev.*, **63**, 159–171.
292. Haddon, C., Smithers, L., Schneider-Maunoury, S., Coche, T., Henrique, D. and Lewis, J. (1998) Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. *Development*, **125**, 359–370.
293. Bultje, R.S., Castaneda-Castellanos, D.R., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Kriegstein, A.R. and Shi, S.H. (2009) Mammalian Par3 Regulates Progenitor Cell Asymmetric Division via Notch Signaling in the Developing Neocortex. *Neuron*, **63**, 189–202.
294. Nguyen, V., Chokas, A.L., Stecca, B. and Ruiz i Altaba, A. (2005) Cooperative requirement of the Gli proteins in neurogenesis. *Development*, **132**, 3267–79.
295. Voronova, A., Fischer, A., Ryan, T., Al Madhoun, A. and Skerjanc, I.S. (2011) Ascl1/Mash1 is a novel target of Gli2 during Gli2-induced neurogenesis in P19 EC cells. *PLoS One*, **6**.
296. Briscoe, J. and Ericson, J. (1999) The specification of neuronal identity by graded Sonic Hedgehog signalling. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 353–362.

297. Xiong,F., Tentner,A.R., Huang,P., Gelas,A., Mosaliganti,K.R., Souhait,L., Rannou,N., Swinburne,I.A., Obholzer,N.D., Cowgill,P.D., *et al.* (2013) Specified neural progenitors sort to form sharp domains after noisy Shh signaling. *Cell*, **153**, 550–561.
298. Muthu,V., Eachus,H., Ellis,P., Brown,S. and Placzek,M. (2016) Rx3 and Shh direct anisotropic growth and specification in the zebrafish tuberal/anterior hypothalamus. *Development*, **143**, 2651–63.
299. Feijóo,C.G., Oñate,M.G., Milla,L.A. and Palma,V.A. (2011) Sonic hedgehog (Shh)-Gli signaling controls neural progenitor cell division in the developing tectum in zebrafish. *Eur. J. Neurosci.*, **33**, 589–598.
300. Ju,B., Chen,W., Spitsbergen,J.M., Lu,J., Vogel,P., Peters,J.L., Wang,Y.-D., Orr,B. a, Wu,J., Henson,H.E., *et al.* (2014) Activation of Sonic hedgehog signaling in neural progenitor cells promotes glioma development in the zebrafish optic pathway. *Oncogenesis*, **3**, e96.
301. Hirsinger,E., Malapert,P., Dubrulle,J., Delfini,M.C., Duprez,D., Henrique,D., Ish-Horowicz,D. and Pourquie,O. (2001) Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. *Development*, **128**, 107–116.
302. Lewis,J., Hanisch,A. and Holder,M. (2009) Notch signaling, the segmentation clock, and the patterning of vertebrate somites. *J. Biol.*, **8**, 44.
303. Ochi,H., Pearson,B.J., Chuang,P.T., Hammerschmidt,M. and Westerfield,M. (2006) Hhip regulates zebrafish muscle development by both sequestering Hedgehog and modulating localization of Smoothed. *Dev. Biol.*, **297**, 127–140.
304. Barresi,M.J., Stickney,H.L. and Devoto,S.H. (2000) The zebrafish slow-muscle-omitted gene product is required for Hedgehog signal transduction and the development of slow muscle identity. *Development*, **127**, 2189–2199.
305. Wolff,C., Roy,S. and Ingham,P.W. (2003) Multiple muscle cell identities induced by distinct levels and timing of Hedgehog activity in the zebrafish embryo. *Curr. Biol.*, **13**, 1169–1181.
306. Ingham,P.W. and Kim,H.R. (2005) Hedgehog signalling and the specification of muscle cell identity in the zebrafish embryo. *Exp. Cell Res.*, **306**.
307. Peterson,M.T. and Henry,C.A. (2010) Hedgehog signaling and laminin play unique and synergistic roles in muscle development. *Dev. Dyn.*, **239**, 905–913.
308. Lee,C.Y., Vogeli,K.M., Kim,S.H., Chong,S.W., Jiang,Y.J., Stainier,D.Y.R. and Jin,S.W. (2009) Notch Signaling Functions as a Cell-Fate Switch between the Endothelial and Hematopoietic Lineages. *Curr. Biol.*, **19**, 1616–1622.
309. Lawson,N.D., Scheer,N., Pham,V.N., Kim,C.-H.H., Chitnis,A.B., Campos-Ortega,J.A. and Weinstein,B.M. (2001) Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development*, **128**, 3675–3683.
310. Lawson,N.D., Vogel,A.M. and Weinstein,B.M. (2002) Sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev. Cell*, **3**, 127–136.
311. Wilkinson,R.N., Koudijs,M.J., Patient,R.K., Ingham,P.W., Schulte-Merker,S. and Van Eeden,F.J.M. (2012) Hedgehog signaling via a calcitonin receptor-like receptor can induce arterial differentiation independently of VEGF signaling in zebrafish. *Blood*, **120**, 477–488.

312. Burns,C.E., Traver,D., Mayhall,E., Shepard,J.L. and Zon,L.I. (2005) Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes Dev.*, **19**, 2331–2342.
313. Gering,M. and Patient,R. (2005) Hedgehog signaling is required for adult blood stem cell formation in zebrafish embryos. *Dev. Cell*, **8**, 389–400.
314. Wilkinson,R.N., Pouget,C., Gering,M., Russell,A.J., Davies,S.G., Kimelman,D. and Patient,R. (2009) Hedgehog and Bmp Polarize Hematopoietic Stem Cell Emergence in the Zebrafish Dorsal Aorta. *Dev. Cell*, **16**, 909–916.
315. Roca,C. and Adams,R.H. (2007) Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev.*, **21**, 2511–2524.
316. Jensen,J., Pedersen,E.E., Galante,P., Hald,J., Heller,R.S., Ishibashi,M., Kageyama,R., Guillemot,F., Serup,P. and Madsen,O.D. (2000) Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat. Genet.*, **24**, 36–44.
317. Lee,C.S. and Kaestner,K.H. (2004) Development of gut endocrine cells. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **18**, 453–462.
318. Crosnier,C., Vargesson,N., Gschmeissner,S., Ariza-McNaughton,L., Morrison,A. and Lewis,J. (2005) Delta-Notch signalling controls commitment to a secretory fate in the zebrafish intestine. *Development*, **132**, 1093–1104.
319. Wallace,K.N. and Pack,M. (2003) Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish. *Dev. Biol.*, **255**, 12–29.
320. Reichenbach,B., Delalande,J.M., Kolmogorova,E., Prier,A., Nguyen,T., Smith,C.M., Holzschuh,J. and Shepherd,I.T. (2008) Endoderm-derived Sonic hedgehog and mesoderm Hand2 expression are required for enteric nervous system development in zebrafish. *Dev. Biol.*, **318**, 52–64.
321. Zong,Y., Panikkar,A., Xu,J., Antoniou,A., Raynaud,P., Lemaigre,F. and Stanger,B.Z. (2009) Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development*, **136**, 1727–1739.
322. Lorent,K., Moore,J.C., Siekmann,A.F., Lawson,N. and Pack,M. (2010) Reiterative use of the Notch signal during zebrafish intrahepatic biliary development. *Dev. Dyn.*, **239**, 855–864.
323. Wang,T., You,N., Tao,K., Wang,X., Zhao,G., Xia,N., Li,N., Tang,L., Liu,W. and Dou,K. (2012) Notch is the key factor in the process of fetal liver stem/progenitor cells differentiation into hepatocytes. *Dev. Growth Differ.*, **54**, 605–617.
324. Lau,J., Kawahira,H. and Hebrok,M. (2006) Hedgehog signaling in pancreas development and disease. *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 642–652.
325. Roy,S., Qiao,T., Wolff,C. and Ingham,P.W. (2001) Hedgehog signaling pathway is essential for pancreas specification in the zebrafish embryo. *Curr. Biol.*, **11**, 1358–1363.
326. Dilorio,P.J., Moss,J.B., Sbrogna,J.L., Karlstrom,R.O. and Moss,L.G. (2002) Sonic hedgehog is required early in pancreatic islet development. *Dev. Biol.*, **244**, 75–84.
327. Tehrani,Z. and Lin,S. (2011) Antagonistic interactions of hedgehog, Bmp and retinoic acid signals control zebrafish endocrine pancreas development. *Development*, **138**, 631–640.
328. Murtaugh,L.C., Stanger,B.Z., Kwan,K.M. and Melton,D.A. (2003) Notch signaling controls

- multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 14920–5.
329. Rukstalis, J.M. and Habener, J.F. (2009) Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. *Islets*, **1**, 177–184.
330. Kimmel, R. a, Onder, L., Wilfinger, A., Ellertsdottir, E. and Meyer, D. (2011) Requirement for Pdx1 in specification of latent endocrine progenitors in zebrafish. *BMC Biol.*, **9**, 75.
331. Ninov, N., Borius, M. and Stainier, D.Y.R. (2012) Different levels of Notch signaling regulate quiescence, renewal and differentiation in pancreatic endocrine progenitors. *Development*, **139**, 1557–1567.
332. Flasse, L.C., Pirson, J.L., Stern, D.G., Von Berg, V., Manfroid, I., Peers, B. and Voz, M.L. (2013) *Ascl1b* and *Neurod1*, instead of *Neurog3*, control pancreatic endocrine cell fate in zebrafish. *BMC Biol.*, **11**, 78.
333. Jeong, J., Mao, J., Tenzen, T., Kottmann, A.H. and McMahon, A.P. (2004) Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev.*, **18**, 937–951.
334. Wada, N., Javidan, Y., Nelson, S., Carney, T.J., Kelsh, R.N. and Schilling, T.F. (2005) Hedgehog signaling is required for cranial neural crest morphogenesis and chondrogenesis at the midline in the zebrafish skull. *Development*, **132**, 3977–88.
335. Swartz, M.E., Nguyen, V., McCarthy, N.Q. and Eberhart, J.K. (2012) Hh signaling regulates patterning and morphogenesis of the pharyngeal arch-derived skeleton. *Dev. Biol.*, **369**, 65–75.
336. Yang, J., Andre, P., Ye, L. and Yang, Y.Z. (2015) The Hedgehog signalling pathway in bone formation. *Int J Oral Sci*, **7**, 73–79.
337. David, N.B., Saint-Etienne, L., Tsang, M., Schilling, T.F. and Rosa, F.M. (2002) Requirement for endoderm and FGF3 in ventral head skeleton formation. *Development*, **129**, 4457–4468.
338. Hanaoka, R., Ohmori, Y., Uyemura, K., Hosoya, T., Hotta, Y., Shirao, T. and Okamoto, H. (2004) Zebrafish *gcmb* is required for pharyngeal cartilage formation. *Mech. Dev.*, **121**, 1235–1247.
339. Walshe, J. and Mason, I. (2003) Fgf signalling is required for formation of cartilage in the head. *Dev. Biol.*, **264**, 522–536.
340. Larbuisson, A., Dalcq, J., Martial, J.A. and Muller, M. (2013) Fgf receptors *Fgfr1a* and *Fgfr2* control the function of pharyngeal endoderm in late cranial cartilage development. *Differentiation.*, **86**, 192–206.
341. Wu, B.-T., Wen, S.-H., Hwang, S.-P.L., Huang, C.-J. and Kuan, Y.-S. (2015) Control of *Wnt5b* secretion by *Wntless* modulates chondrogenic cell proliferation through fine-tuning *fgf3* expression. *J. Cell Sci.*, **128**, 2328–2339.
342. Shibata, E., Yokota, Y., Horita, N., Kudo, A., Abe, G., Kawakami, K., Kawakami, A., Akimenko, M.A., Johnson, S.L., Westerfield, M., *et al.* (2016) Fgf signalling controls diverse aspects of fin regeneration. *Development*, **143**, 2920–9.
343. Zanotti, S. and Canalis, E. (2013) Notch signaling in skeletal health and disease. *Eur. J. Endocrinol.*, **168**, R95–103.
344. Chen, S., Lee, B.H. and Bae, Y. (2014) Notch signaling in skeletal stem cells. *Calcif. Tissue*

*Int.*, **94**, 68–77.

345. Barske,L., Askary,A., Zuniga,E., Balczerski,B., Bump,P., Nichols,J.T. and Crump,J.G. (2016) Competition between Jagged-Notch and Endothelin1 Signaling Selectively Restricts Cartilage Formation in the Zebrafish Upper Face. *PLoS Genet.*, **12**, e1005967.
346. Zanotti,S. and Canalis,E. (2010) Notch and the skeleton. *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 886–96.
347. Hayward,P., Brennan,K., Sanders,P., Balayo,T., DasGupta,R., Perrimon,N. and Martinez Arias,A. (2005) Notch modulates Wnt signalling by associating with Armadillo/beta-catenin and regulating its transcriptional activity. *Development*, **132**, 1819–30.
348. Nicolas,M., Wolfer,A., Raj,K., Kummer,J.A., Mill,P., van Noort,M., Hui,C.C., Clevers,H., Dotto,G.P. and Radtke,F. (2003) Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet*, **33**, 416–421.
349. Deregowski,V., Gazzero,E., Priest,L., Rydziel,S. and Canalis,E. (2006) Notch 1 overexpression inhibits osteoblastogenesis by suppressing Wnt/Beta-catenin but not bone morphogenetic protein signaling. *J. Biol. Chem.*, **281**, 6203–6210.
350. Dave,R.K., Ellis,T., Toumpas,M.C., Robson,J.P., Julian,E., Adolphe,C., Bartlett,P.F., Cooper,H.M., Reynolds,B.A. and Wainwright,B.J. (2011) Sonic hedgehog and notch signaling can cooperate to regulate neurogenic divisions of neocortical progenitors. *PLoS One*, **6**.
351. Kong,J.H., Yang,L., Dessaud,E., Chuang,K., Moore,D.M., Rohatgi,R., Briscoe,J. and Novitch,B.G. (2015) Notch Activity Modulates the Responsiveness of Neural Progenitors to Sonic Hedgehog Signaling. *Dev. Cell*, **33**, 373–387.
352. Stasiulewicz,M., Gray,S., Mastromina,I., Silva,J.C., Bjorklund,M., Seymour,P. a, Booth,D., Thompson,C., Green,R., Hall,E. a, *et al.* (2015) A conserved role for Notch in priming the cellular response to Shh through ciliary localisation of the key Shh transducer, Smoothed. *Development*, **142**, 2291–2303.
353. Prykhozhiy,S. V and Neumann,C.J. (2008) Distinct roles of Shh and Fgf signaling in regulating cell proliferation during zebrafish pectoral fin development. *BMC Dev. Biol.*, **8**, 91.
354. Zhang,C., Ojiaku,P. and Cole,G.J. (2013) Forebrain and hindbrain development in zebrafish is sensitive to ethanol exposure involving agrin, Fgf, and sonic hedgehog function. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.*, **97**, 8–27.
355. Vinothkumar,S., Rastegar,S., Takamiya,M., Ertzer,R. and Strähle,U. (2008) Sequential and cooperative action of Fgfs and Shh in the zebrafish retina. *Dev. Biol.*, **314**, 200–214.
356. Hernández-Bejarano,M., Gestri,G., Spawls,L., Nieto-López,F., Picker,A., Tada,M., Brand,M., Bovolenta,P., Wilson,S.W. and Cavodeassi,F. (2015) Opposing Shh and Fgf signals initiate nasotemporal patterning of the zebrafish retina. *Development*, **142**, 3933–42.
357. Anderson,M.J., Schimmang,T. and Lewandoski,M. (2016) An FGF3-BMP Signaling Axis Regulates Caudal Neural Tube Closure, Neural Crest Specification and Anterior-Posterior Axis Extension. *PLoS Genet.*, **12**, e1006018.
358. Sanalkumar,R., Dhanesh,S.B. and James,J. (2010) Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.*, **67**, 2957–2968.

359. Sanalkumar,R., Indulekha,C.L., Divya,T.S., Divya,M.S., Anto,R.J., Vinod,B., Vidyanand,S., Jagatha,B., Venugopal,S. and James,J. (2010) ATF2 maintains a subset of neural progenitors through CBF1/Notch independent Hes-1 expression and synergistically activates the expression of Hes-1 in Notch-dependent neural progenitors. *J. Neurochem.*, **113**, 807–818.
360. Wall,D.S., Mears,A.J., McNeill,B., Mazerolle,C., Thurig,S., Wang,Y., Kageyama,R. and Wallace,V.A. (2009) Progenitor cell proliferation in the retina is dependent on Notch-independent Sonic hedgehog/Hes1 activity. *J. Cell Biol.*, **184**, 101–112.
361. Kubo,F. and Nakagawa,S. (2009) Hairy1 acts as a node downstream of Wnt signaling to maintain retinal stem cell-like progenitor cells in the chick ciliary marginal zone. *Development*, **136**, 1823–1833.
362. Martin,L., Grigoryan,A., Wang,D., Wang,J., Breda,L., Cardozo,T. and Gardner,L.B. (2015) Identification and characterization of small molecules that inhibit nonsense mediated RNA decay and suppress nonsense p53 mutations. *Cancer Res.*, **74**, 3104–3113.
363. Pyati,U.J., Webb,A.E. and Kimelman,D. (2005) Transgenic zebrafish reveal stage-specific roles for Bmp signaling in ventral and posterior mesoderm development. *Development*, **132**, 2333–2343.
364. Spoorendonk,K.M., Peterson-Maduro,J., Renn,J., Trowe,T., Kranenbarg,S., Winkler,C. and Schulte-Merker,S. (2008) Retinoic acid and Cyp26b1 are critical regulators of osteogenesis in the axial skeleton. *Development*, **135**, 3765–74.
365. Delov,V., Muth-Köhne,E., Schäfers,C. and Fenske,M. (2014) Transgenic fluorescent zebrafish Tg(fli1: EGFP)y1 for the identification of vasotoxicity within the zFET. *Aquat. Toxicol.*, **150**, 189–200.
366. Parsons,M.J., Pisharath,H., Yusuff,S., Moore,J.C., Siekmann,A.F., Lawson,N. and Leach,S.D. (2009) Notch-responsive cells initiate the secondary transition in larval zebrafish pancreas. *Mech. Dev.*, **126**, 898–912.
367. Concordet,J.P., Lewis,K.E., Moore,J.W., Goodrich,L. V, Johnson,R.L., Scott,M.P. and Ingham,P.W. (1996) Spatial regulation of a zebrafish patched homologue reflects the roles of sonic hedgehog and protein kinase A in neural tube and somite patterning. *Development*, **122**, 2835–2846.
368. Krauss,S., Concordet,J.P. and Ingham,P.W. (1993) A functionally conserved homolog of the Drosophila segment polarity gene hh is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*, **75**, 1431–1444.
369. Liu,T., Lu,J., Wang,Y., Campbell,W.A., Huang,L., Zhu,J., Xia,W. and Wong,S.T.C. (2006) Computerized image analysis for quantitative neuronal phenotyping in zebrafish. *J. Neurosci. Methods*, **153**, 190–202.
370. Mayer,A.N. and Fishman,M.C. (2003) Nil per os encodes a conserved RNA recognition motif protein required for morphogenesis and cytodifferentiation of digestive organs in zebrafish. *Development*, **130**, 3917–3928.
371. Korzh,V., Sleptsova,I., Liao,J., He,J. and Gong,Z. (1998) Expression of zebrafish bHLH genes ngn1 and nrd defines distinct stages of neural differentiation. *Dev. Dyn.*, **213**, 92–104.
372. Hammerschmidt,M., Pelegri,F., Mullins,M.C., Kane,D.A., van Eeden,F.J., Granato,M.,



- Brand,M., Furutani-Seiki,M., Haffter,P., Heisenberg,C.P., *et al.* (1996) dino and mercedes, two genes regulating dorsal development in the zebrafish embryo. *Development*, **123**, 95–102.
373. Krauss,S., Johansen,T., Korzh,V., Moens,U., Ericson,J.U. and Fjose, a (1991) Zebrafish pax[zf-a]: a paired box-containing gene expressed in the neural tube. *EMBO J.*, **10**, 3609–3619.
374. Pfaffl,M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 16–21.
375. Lefebvre,V. and Bhattaram,P. (2010) Vertebrate skeletogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **90**, 291–317.
376. Burr,D.B. and Akkus,O. (2013) Bone Morphology and Organization Elsevier Inc.
377. Ciurea,A.V. and Toader,C. (2008) Genetics of craniosynostosis: review of the literature. *J. Med. Life*, **2**, 5–17.
378. Kouskoura,T., Fragou,N., Alexiou,M., John,N., Sommer,L., Graf,D., Katsaros,C. and Mitsiadis,T. a (2011) The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities. *Schweiz. Monatsschr. Zahnmed.*, **121**, 636–646.
379. Sharma,S., Gao,X., Londono,D., Devroy,S.E., Mauldin,K.N., Frankel,J.T., Brandon,J.M., Zhang,D., Li,Q.Z., Dobbs,M.B., *et al.* (2011) Genome-wide association studies of adolescent idiopathic scoliosis suggest candidate susceptibility genes. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 1456–1466.
380. Marie,P.J., Kaabeche,K. and Guenou,H. (2008) Roles of FGFR2 and twist in human craniosynostosis: Insights from genetic mutations in cranial osteoblasts. *Front. Oral Biol.*, **12**, 144–159.
381. D.L.,D. and N.B.,W. (2013) Postmenopausal osteoporosis. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, **20**, 501–509.
382. Young,B., Woodford,P. and Gerladine,O. (2013) Functional histology.
383. Hall,B.K. (2015) Vertebrate Skeletal Tissues. *Bones Cartil.*, 10.1016/B978-0-12-416678-3.00001-X.
384. Karsenty,G. (2008) Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **9**, 183–196.
385. Hall,B.K. (2015) Chapter 3 - Vertebrate Cartilages. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416678-3.00003-3>.
386. Hall,B.K. (2015) Bone. *Bones Cartil.*, 10.1016/B978-0-12-416678-3.00002-1.
387. Bellido,T., Plotkin,L.I. and Bruzzaniti,A. (2014) Bone Cells. *Basic Appl. Bone Biol.*, **14**, 27–45.
388. Quarles,L.D. (2012) Skeletal secretion of FGF-23 regulates phosphate and vitamin D metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **8**, 276–86.
389. Witten,P.E. and Huysseune,A. (2009) A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function. *Biol. Rev.*, **84**, 315–346.

390. Allen,M.R. and Burr,D.B. (2013) Bone Modeling and Remodeling. *Basic Appl. Bone Biol.*, 10.1016/B978-0-12-416015-6.00004-6.
391. Galotto,M., Campanile,G., Robino,G., Cancedda,F.D., Bianco,P. and Cancedda,R. (1994) Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation to osteoblast-like cells and participate in the initial bone formation in developing chick embryo. *J. Bone Miner. Res.*, **9**, 1239–1249.
392. Yang,G., Zhu,L., Hou,N., Lan,Y., Wu,X.-M., Zhou,B., Teng,Y. and Yang,X. (2014) Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes. *Cell Res.*, **24**, 1266–9.
393. Yang,L., Tsang,K.Y., Tang,H.C., Chan,D. and Cheah,K.S.E. (2016) Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *World Rev. Nutr. Diet.*, **114**, 13.
394. Zhou,X., von der Mark,K., Henry,S., Norton,W., Adams,H. and de Crombrugge,B. (2014) Chondrocytes Transdifferentiate into Osteoblasts in Endochondral Bone during Development, Postnatal Growth and Fracture Healing in Mice. *PLoS Genet.*, **10**, e1004820.
395. Ono,N., Ono,W., Nagasawa,T. and Kronenberg,H.M. (2014) A subset of chondrogenic cells provides early mesenchymal progenitors in growing bones. *Nat. Cell Biol.*, **16**, 1157–1167.
396. Katsu,K., Tatsumi,N., Niki,D., Yamamura,K. ichi and Yokouchi,Y. (2013) Multi-modal effects of BMP signaling on Nodal expression in the lateral plate mesoderm during left-right axis formation in the chick embryo. *Dev. Biol.*, **374**, 71–84.
397. Smith,K.A., Noël,E., Thurlings,I., Rehmann,H., Chocron,S. and Bakkers,J. (2011) Bmp and Nodal independently regulate lefty1 expression to maintain unilateral Nodal activity during left-right axis specification in zebrafish. *PLoS Genet.*, **7**, e1002289.
398. Stottmann,R.W., Berrong,M., Matta,K., Choi,M. and Klingensmith,J. (2006) The BMP antagonist Noggin promotes cranial and spinal neurulation by distinct mechanisms. *Dev. Biol.*, **295**, 647–663.
399. Poulain,M., Fürthauer,M., Thisse,B., Thisse,C. and Lepage,T. (2006) Zebrafish endoderm formation is regulated by combinatorial Nodal, FGF and BMP signalling. *Development*, **133**, 2189–200.
400. Reichert,S., Randall,R. a and Hill,C.S. (2013) A BMP regulatory network controls ectodermal cell fate decisions at the neural plate border. *Development*, **140**, 4435–44.
401. Salazar,V.S., Gamer,L.W. and Rosen,V. (2016) BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **advance on**, 203–221.
402. Sánchez-Duffhues,G., Hiepen,C., Knaus,P. and ten Dijke,P. (2015) Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone*, **80**, 43–59.
403. Massague,J. and Gomis,R.R. (2006) The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.*, **580**, 2811–2820.
404. Kaplan,F.S., Shen,Q., Lounev,V., Seemann,P., Groppe,J., Katagiri,T., Pignolo,R.J. and Shore,E.M. (2008) Skeletal metamorphosis in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *J. Bone Miner. Metab.*, **26**, 521–530.
405. Kaplan,F.S., Pignolo,R.J. and Shore,E.M. (2009) The FOP metamorphogene encodes a novel type I receptor that dysregulates BMP signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **20**,

399–407.

406. Van Dinther,M., Visser,N., De Gorter,D.J.J., Doorn,J., Goumans,M.J., De Boer,J. and Ten Dijke,P. (2010) ALK2 R206H mutation linked to fibrodysplasia ossificans progressiva confers constitutive activity to the BMP type I receptor and sensitizes mesenchymal cells to BMP-induced osteoblast differentiation and bone formation. *J. Bone Miner. Res.*, **25**, 1208–1215.
407. Dudas,M., Sridurongrit,S., Nagy,A., Okazaki,K. and Kaartinen,V. (2004) Craniofacial defects in mice lacking BMP type I receptor Alk2 in neural crest cells. *Mech. Dev.*, **121**, 173–182.
408. Ko,S.O., Chung,I.H., Xu,X., Oka,S., Zhao,H., Cho,E.S., Deng,C. and Chai,Y. (2007) Smad4 is required to regulate the fate of cranial neural crest cells. *Dev. Biol.*, **312**, 435–447.
409. Tang,S., Snider,P., Firulli,A.B. and Conway,S.J. (2010) Trigenic neural crest-restricted Smad7 over-expression results in congenital craniofacial and cardiovascular defects. *Dev. Biol.*, **344**, 233–247.
410. Lee,M.H., Kim,Y.J., Kim,H.J., Park,H.D., Kang,A.R., Kyung,H.M., Sung,J.H., Wozney,J.M., Kim,H.J. and Ryoo,H.M. (2003) BMP-2-induced Runx2 Expression Is Mediated by Dlx5, and TGF- $\beta$ 1 Opposes the BMP-2-induced Osteoblast Differentiation by Suppression of Dlx5 Expression. *J. Biol. Chem.*, **278**, 34387–34394.
411. Lee,M.H., Kwon,T.G., Park,H.S., Wozney,J.M. and Ryoo,H.M. (2003) BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **309**, 689–694.
412. Nie,X., Luukko,K. and Kettunen,P. (2006) BMP signalling in craniofacial development. *Int. J. Dev. Biol.*, **50**, 511–521.
413. Asharani,P. V., Keupp,K., Semler,O., Wang,W., Li,Y., Thiele,H., Yigit,G., Pohl,E., Becker,J., Frommolt,P., *et al.* (2012) Attenuated BMP1 function compromises osteogenesis, leading to bone fragility in humans and Zebrafish. *Am. J. Hum. Genet.*, **90**, 661–674.
414. Holzschuh,J., Wada,N., Wada,C., Schaffer,A., Javidan,Y., Tallafuss,A., Bally-Cuif,L. and Schilling,T.F. (2005) Requirements for endoderm and BMP signaling in sensory neurogenesis in zebrafish. *Development*, **132**, 3731–42.
415. Martinez-Barbera,J.P., Toresson,H., Da Rocha,S. and Krauss,S. (1997) Cloning and expression of three members of the zebrafish Bmp family: Bmp2a, Bmp2b and Bmp4. *Gene*, **198**, 53–59.
416. Alexander,C., Zuniga,E., Blitz,I.L., Wada,N., Le Pabic,P., Javidan,Y., Zhang,T., Cho,K.W., Crump,J.G. and 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.
417. Dalcq,J., Pasque,V., Ghaye,A., Larbuisson,A., Motte,P., Martial,J.A. and Muller,M. (2012) RUNX3, EGR1 and SOX9B form a regulatory cascade required to modulate BMP-signaling during cranial cartilage development in zebrafish. *PLoS One*, **7**, e50140.
418. Gorman,K.F. and Breden,F. (2007) Teleosts as models for human vertebral stability and deformity. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, **145**, 28–38.
419. Harris,M.P., Henke,K., Hawkins,M.B. and Witten,P.E. (2014) Fish is Fish: The use of

- experimental model species to reveal causes of skeletal diversity in evolution and disease. *J. Appl. Ichthyol.*, **30**, 616–629.
420. Mork,L. and Crump,G. (2015) Zebrafish Craniofacial Development. A Window into Early Patterning. In *Current Topics in Developmental Biology*. Vol. 115, pp. 235–269.
421. Neuhauss,S.C.F., Solnica-Krezel,L., Schier,A.F., Zwartkruis,F., Stemple,D.L., Malicki,J., Abdelilah,S., Stainier,D.Y.R. and Driever,W. (1996) Mutations affecting craniofacial development in zebrafish. *Development*, **123**, 357–367.
422. Kimmel,C.B., DeLaurier,A., Ullmann,B., Dowd,J. and McFadden,M. (2010) Modes of developmental outgrowth and shaping of a craniofacial bone in zebrafish. *PLoS One*, **5**, e9475.
423. Chang,C. and Franz-Odenaal,T.A. (2013) The Zebrafish Infraorbital Bones: A Descriptive Study. *Zebrafish*, **11**, 50–56.
424. Yu,P.B., Hong,C.C., Sachidanandan,C., Babitt,J.L., Deng,D.Y., Hoyng,S.A., Lin,H.Y., Bloch,K.D. and Peterson,R.T. (2008) Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat. Chem. Biol.*, **4**, 33–41.
425. Boergemann,J.H., Kopf,J., Yu,P.B. and Knaus,P. (2010) Dorsomorphin and LDN-193189 inhibit BMP-mediated Smad, p38 and Akt signalling in C2C12 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **42**, 1802–1807.
426. Hao,J., Daleo,M.A., Murphy,C.K., Yu,P.B., Ho,J.N., Hu,J., Peterson,R.T., Hatzopoulos,A.K. and Hong,C.C. (2008) Dorsomorphin, a selective small molecule inhibitor of BMP signaling, promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *PLoS One*, **3**, e2904.
427. Yu,P.B., Deng,D.Y., Lai,C.S., Hong,C.C., Cuny,G.D., Bouxsein,M.L., Hong,D.W., McManus,P.M., Katagiri,T., Sachidanandan,C., *et al.* (2008) BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic ossification. *Nat. Med.*, **14**, 1363–1369.
428. Hao,J., Ho,J.N., Lewis,J.A., Karim,K.A., Daniels,R.N., Gentry,P.R., Hopkins,C.R., Lindsley,C.W. and Hong,C.C. (2010) In vivo structure - Activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors. *ACS Chem. Biol.*, **5**, 245–253.
429. Sanvitale,C.E., Kerr,G., Chaikuad,A., Ramel,M.-C., Mohedas,A.H., Reichert,S., Wang,Y., Triffitt,J.T., Cuny,G.D., Yu,P.B., *et al.* (2013) A new class of small molecule inhibitor of BMP signaling. *PLoS One*, **8**, e62721.
430. Renn,J. and Winkler,C. (2009) Osterix-mCherry transgenic medaka for in vivo imaging of bone formation. *Dev. Dyn.*, **238**, 241–248.
431. Nakashima,K., Zhou,X., Kunkel,G., Zhang,Z., Deng,J.M., Behringer,R.R. and De Crombrughe,B. (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, **108**, 17–29.
432. Felber,K., Elks,P.M., Lecca,M. and Roehl,H.H. (2015) Expression of osterix is regulated by FGF and Wnt/ $\beta$ -catenin signalling during osteoblast differentiation. *PLoS One*, **10**, e0144982.
433. Lepiller,S., Laurens,V., Bouchot,A., Herbomel,P., Solary,E. and Chluba,J. (2007) Imaging of nitric oxide in a living vertebrate using a diaminofluorescein probe. *Free Radic. Biol.*

*Med.*, **43**, 619–627.

434. Renn,J., Pruvot,B. and Muller,M. (2014) Detection of nitric oxide by diaminofluorescein visualizes the skeleton in living zebrafish. *J. Appl. Ichthyol.*, **30**, 701–706.
435. Wang,R.N., Green,J., Wang,Z., Deng,Y., Qiao,M., Peabody,M., Zhang,Q., Ye,J., Yan,Z., Denduluri,S., *et al.* (2014) Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.*, **1**, 87–105.
436. Chen,D., Zhao,M. and Mundy,G.R. (2004) Bone morphogenetic Proteins. *Taylor Fr. Ltd*, **22**, 233–241.
437. Schilling,T.F., Concordet,J.P. and Ingham,P.W. (1999) Regulation of left-right asymmetries in the zebrafish by Shh and BMP4. *Dev Biol*, **210**, 277–287.
438. Wan,M. and Cao,X. (2005) BMP signaling in skeletal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **328**, 651–657.
439. Bonilla-Claudio,M., Wang,J., Bai,Y., Klysik,E., Selever,J. and Martin,J.F. (2012) Bmp signaling regulates a dose-dependent transcriptional program to control facial skeletal development. *Development*, **139**, 709–719.
440. Das,A. and Crump,J.G. (2012) Bmps and Id2a Act Upstream of Twist1 To Restrict Ectomesenchyme Potential of the Cranial Neural Crest. *PLoS Genet.*, **8**, e1002710.
441. Zuniga,E., Rippen,M., Alexander,C., Schilling,T.F. and Crump,J.G. (2011) Gremlin 2 regulates distinct roles of BMP and Endothelin 1 signaling in dorsoventral patterning of the facial skeleton. *Development*, **138**, 5147–5156.
442. Swartz,M.E., Sheehan-Rooney,K., Dixon,M.J. and Eberhart,J.K. (2011) Examination of a palatogenic gene program in zebrafish. *Dev. Dyn.*, **240**, 2204–2220.
443. Cheah,F.S.H., Winkler,C., Jabs,E.W. and Chong,S.S. (2010) Tgfb3 regulation of chondrogenesis and osteogenesis in zebrafish is mediated through formation and survival of a subpopulation of the cranial neural crest. *Mech. Dev.*, **127**, 329–344.
444. Wimalawansa,S.J. (2010) Nitric oxide and bone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1192**, 391–403.
445. van'T Hof,R.J. and Ralston,S.H. (2001) Nitric oxide and bone. *Immunology*, **103**, 255–261.
446. Wimalawansa,S.J. (2008) Nitric oxide: novel therapy for osteoporosis. *Expert Opin. Pharmacother.*, **9**, 3025–3044.
447. Tsukahara,H., Miura,M., Tsuchida,S., Hata,I., Hata,K., Yamamoto,K., Ishii,Y., Muramatsu,I. and Sudo,M. (1996) Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am. J. Physiol.*, **270**, E840-5.
448. Turner,C.H., Owan,I., Jacob,D.S., McClintock,R. and Peacock,M. (1997) Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone formation in rats. *Bone*, **21**, 487–490.
449. Aguirre,J., Buttery,L., O'Shaughnessy,M., Afzal,F., Fernandez de Marticorena,I., Hukkanen,M., Huang,P., MacIntyre,I. and Polak,J. (2001) Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *Am J Pathol*, **158**, 247–257.
450. Armour,K.E., Armour,K.J., Gallagher,M.E., Gödecke,A., Helfrich,M.H., Reid,D.M. and

- Ralston,S.H. (2001) Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology*, **142**, 760–766.
451. Saura,M., Tarin,C. and Zaragoza,C. (2010) Recent insights into the implication of nitric oxide in osteoblast differentiation and proliferation during bone development. *ScientificWorldJournal*, **10**, 624–632.
452. Ralston,S.H. and Grabowski,P.S. (1996) Mechanisms of cytokine induced bone resorption: Role of nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, and prostaglandins. *Bone*, **19**, 29–33.
453. Bacabac,R.G., Smit,T.H., Mullender,M.G., Dijcks,S.J., Van Loon,J.J.W.A. and Klein-Nulend,J. (2004) Nitric oxide production by bone cells is fluid shear stress rate dependent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 823–829.
454. Bakker,A.D., Soejima,K., Klein-Nulend,J. and Burger,E.H. (2001) The production of nitric oxide and prostaglandin E2 by primary bone cells is shear stress dependent. *J. Biomech.*, **34**, 671–677.
455. Pitsillides,A.A., Rawlinson,S.C., Suswillo,R.F., Bourrin,S., Zaman,G. and Lanyon,L.E. (1995) Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling? *Faseb J*, **9**, 1614–1622.
456. Rangaswami,H., Schwappacher,R., Marathe,N., Zhuang,S., Casteel,D.E., Haas,B., Chen,Y., Pfeifer,A., Kato,H., Shattil,S., *et al.* (2010) Cyclic GMP and protein kinase G control a Src-containing mechanosome in osteoblasts. *Sci Signal*, **3**, ra91.
457. Rangaswami,H., Schwappacher,R., Tran,T., Chan,G.C., Zhuang,S., Boss,G.R. and Pilz,R.B. (2012) Protein kinase G and focal adhesion kinase converge on Src/Akt/ $\beta$ -catenin signaling module in osteoblast mechanotransduction. *J. Biol. Chem.*, **287**, 21509–21519.
458. Ding,H., Keller,K.C., Martinez,I.K.C., Geransar,R.M., zur Nieden,K.O., Nishikawa,S.G., Rancourt,D.E. and zur Nieden,N.I. (2012) NO- $\beta$ -catenin crosstalk modulates primitive streak formation prior to embryonic stem cell osteogenic differentiation. *J. Cell Sci.*, **125**, 5564–5577.

Article

## BMP Signaling Regulates Bone Morphogenesis in Zebrafish through Promoting Osteoblast Function as Assessed by Their Nitric Oxide Production

Thomas Windhausen, Steeve Squifflet, Jörg Renn and Marc Muller \*

Laboratory for Organogenesis and Regeneration, Université de Liège, GIGA-R B34, Sart Tilman, 4000 Liège, Belgium; E-Mails: t.windhausen@doct.ulg.ac.be (T.W.); steeve.squifflet@gmail.com (S.S.); jrenn@ulg.ac.be (J.R.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: m.muller@ulg.ac.be; Tel.: +32-4-366-4437; Fax: +32-4-366-4198.

Academic Editor: Claudio Battilocchio

Received: 28 February 2015 / Accepted: 21 April 2015 / Published: 24 April 2015

---

**Abstract:** Bone morphogenetic proteins (BMPs) control many developmental and physiological processes, including skeleton formation and homeostasis. Previous studies in zebrafish revealed the crucial importance of proper BMP signaling before 48 h post-fertilization (hpf) for cartilage formation in the skull. Here, we focus on the involvement of the BMP pathway between 48 and 96 hpf in bone formation after 96 hpf. Using BMP inhibitors and the expression of a dominant-negative BMP receptor, we analyze whether the loss of BMP signaling affects osteoblastogenesis, osteoblast function and bone mineralization. To this end, we used the transgenic zebrafish line *Tg(osterix:mCherry)*, detection of nitric oxide (NO) production, and alizarin red staining, respectively. We observed that inhibition of BMP signaling between 48 and 72 hpf led to a reduction of NO production and bone mineralization. Osteoblast maturation and chondrogenesis, on the other hand, seemed unchanged. Osteoblast function and bone formation were less affected when BMP signaling was inhibited between 72 and 96 hpf. These results suggest that for the onset of bone formation, proper BMP signaling between 48 and 72 hpf is crucial to ensure osteoblast function and ossification. Furthermore, detection of NO in developing zebrafish larvae appears as an early indicator of bone calcification activity.

**Keywords:** zebrafish; BMP; cartilage; bone; nitric oxide

---

## 1. Introduction

In zebrafish, major parts of the craniofacial skeleton derive from cranial neural crest cells (cNCCs) that previously migrated from the dorsal edge of the neural tube to differentiate into chondrocytes within the ventrally located pharyngeal arches [1]. Each pharyngeal arch is formed by a mesoderm-derived core embedded in the neural crest-derived cartilage precursor cells and is surrounded medially by endoderm and laterally by ectoderm. For formation of perichondral bone elements, the cartilage structures are populated with osteoblastic cells that will finally secrete the bone matrix. Depending on hedgehog signaling, the chondrocytes themselves or peripheral cells are recruited to that end [2]. Other (dermal) bone elements are directly formed by osteoblasts derived from mesenchymal cells, without a previous cartilage matrix. In mammals, one of the major genes involved in osteoblast differentiation is *Runx2*, similar to its zebrafish ortholog *runx2b* [3]. Further marker genes expressed in these bone-forming cells code for the transcription factor Osterix (*Osx*) [4] and bone extracellular matrix (ECM) proteins osteocalcin (*Osc2*) [5], collagen10a1 (*Col10a1a*) and collagen1a1a (*Col1a1a*) [6,7]. Finally, correct calcification of the bone ECM depends on transcellular epithelial calcium uptake through the calcium channel *Trpv5/6* [8] and the precise control of phosphate/pyrophosphate homeostasis by the osteoblast-specific *Entpd5* diphosphohydrolase [9] or the widely expressed phosphodiesterase *Enpp1* [10].

In vertebrates, the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway is known to play an essential role in many early developmental processes such as gastrulation or neurulation [11], but also in skeletogenesis [12]. BMP ligands bind to their transmembrane receptor complex, consisting of a type I and a type II receptor, to induce phosphorylation of the type I receptor. The activated receptor (*Alk1*, 2, 3, or 6) then phosphorylates *Smad1*, 5, and/or 8 which in turn associate with their common partner, *Smad4* to migrate into the nucleus and regulate target genes [13]. Craniofacial defects were reported in conditional knock-out mice lacking BMP type I receptor *Alk2* [14] or *Smad4* [15] in cNCC, or in transgenic mice expressing the antagonistic *Smad7* in cNCC cells [16]. In mammals, BMP2 is an important positive regulator for osteoblast differentiation by stimulating Osterix and *Runx2* expression via *Dlx5* [17,18]. Similar to the human bone disorder *osteogenesis imperfecta*, zebrafish harboring a mutation in the *bmp1a* gene display a higher mineral content of mature bone probably due to a negative effect on the ability to generate mature collagen fibrils [19]. In zebrafish, several members of the BMP ligand family, such as *Bmp2a*, *Bmp2b*, *Bmp4*, *Bmp5*, *Bmp7* were shown to be secreted in the pharyngeal region [12,20,21] and their importance for head cartilage development was shown [22]. Recently, BMPs were shown to promote ventral fates of the craniofacial skeleton in zebrafish before 24 hpf [23]. At later stages (30–36 hpf), the precise control of the expression of the *fst* gene, encoding a BMP antagonist, in pharyngeal endoderm was shown to be required for the optimal amount of BMP signaling, required for proper chondrocyte differentiation and pharyngeal cartilage formation. Thus, the role of BMP signaling in skeleton formation has been extensively studied during the first two days of development, however little is known about its role at later stages, beyond 48 hpf.

Here, we show that BMP signaling is required between 48 and 72 hpf, and to a lesser extent between 72 and 96 hpf, for bone mineralization in the head skeleton. Inhibition of BMP signaling

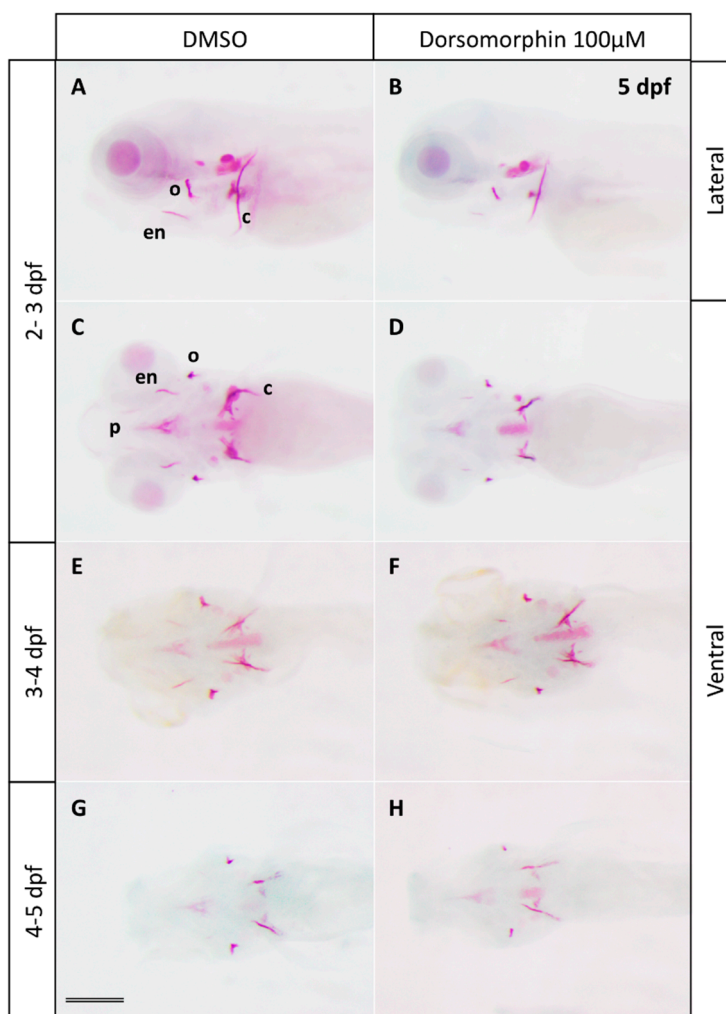


mainly affects osteoblast function, as assessed by monitoring their nitric oxide (NO) production, without affecting their proliferation or terminal differentiation.

## 2. Results

### 2.1. Inhibition of BMP Signaling Starting at 2 or 3 dpf Stages Affects Bone Mineralization

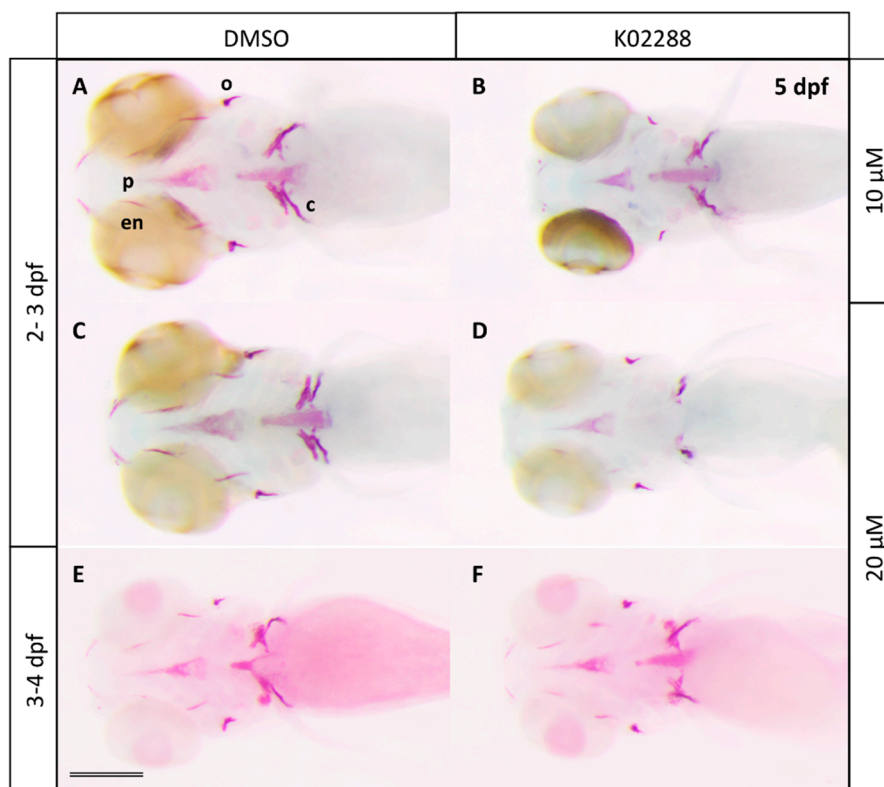
To assess the role of BMP signaling in head skeleton formation at later stages of development without affecting earlier processes, we investigated the effects of dorsomorphin, an inhibitor of ALK2, BMPR-IA and BMPR-IB signaling and of BMP-induced Smad1/5/8 phosphorylation [24] at different stages beyond 48 hpf.



**Figure 1.** Effects of the BMP inhibitor dorsomorphin on bone mineralization. Alizarin red staining of 5 dpf larvae treated at 2, 3 or 4 dpf during 24 h with 100 µM dorsomorphin. Control embryos were treated with DMSO. Embryos treated at 2 dpf (**B** lateral view and **D** ventral view) show severe reduction of all mineralized bone pieces compared to the controls (**A** lateral view and **C** ventral view). The treatments starting at 3 dpf (**F** in ventral view) and 4 dpf (**H** in ventral view) lead to a reduction of bone mineralization, but to a lesser extent than at 2 dpf compared to the controls embryos (respectively **E** and **G** in ventral view). c: cleithrum; en: entopterygoid; o: operculum; p: parasphenoid. Scale bar: 200 µM.

Treatment of embryos with 100  $\mu\text{M}$  dorsomorphin was performed for 3 different periods: between 48 and 72 hpf (2–3 dpf), between 72 and 96 hpf (3–4 dpf) and between 96 and 144 hpf (4–5 dpf), and cranial ossification was analyzed by Alizarin Red staining at 5 dpf (Figures 1 and S1). Treatment during 2–3 dpf lead to a clear reduction in calcification of all the bone elements in more than 95% of the larvae, treatment during 3–4 dpf caused minor defects mainly in the branchiostegal rays 1, while treatment during 4–5 dpf caused no detectable defects relative to the corresponding controls (Figures 1 and S1).

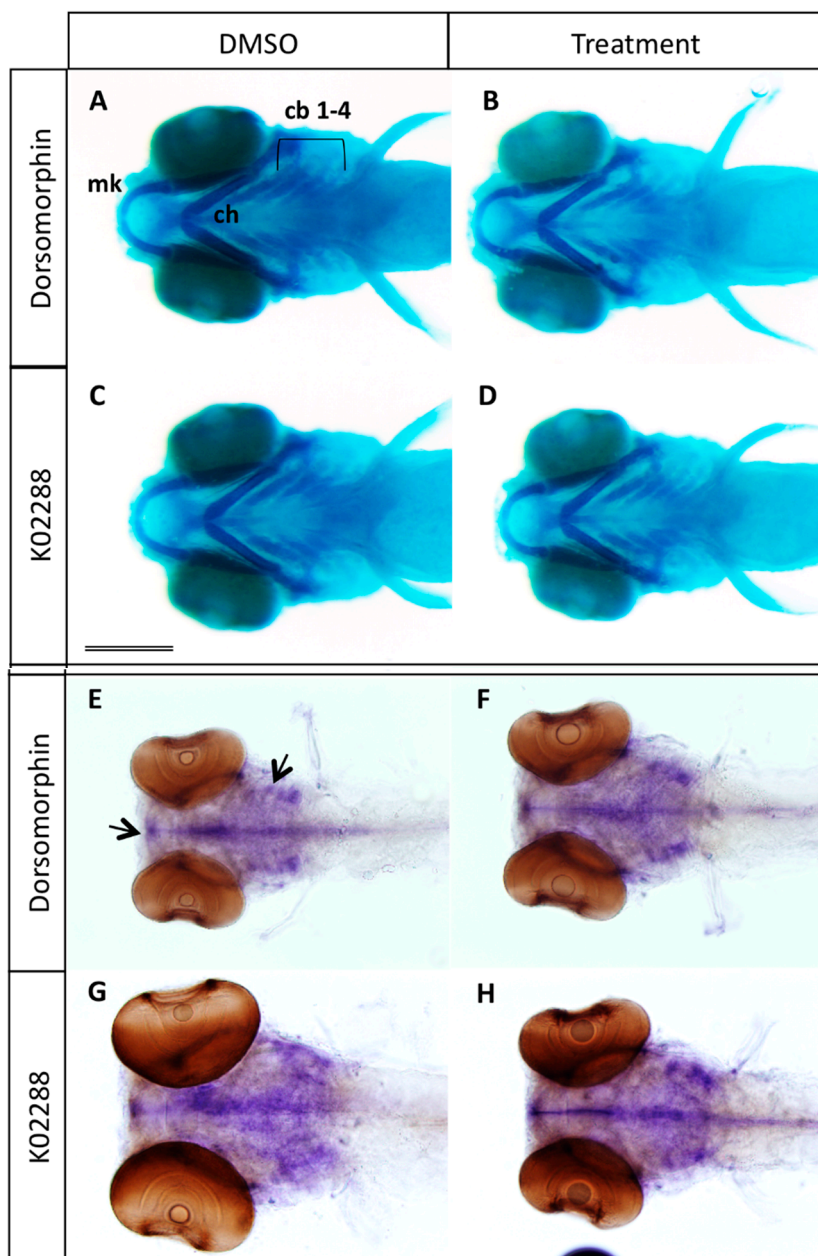
Although dorsomorphin was the first inhibitor of BMP signaling to be discovered [24], it was later shown to also inhibit vEGFR2 and AMPK signaling [25–27]. New generation BMP inhibitors were thus developed, among which the compound K02288 that presents a high specificity for BMP type I receptors, ALK1, 2, 3, and 6 [28] and was shown to induce dorsalization in early embryos at 8–10  $\mu\text{M}$  concentrations. When we tested K02288 treatment on developing zebrafish larvae at two different concentrations, we observed a clear decrease in bone calcification at both 10 or 20  $\mu\text{M}$  upon exposure from 2–3 dpf, while only a weak effect was observed following a 3–4 dpf treatment at 10 (not shown) or 20  $\mu\text{M}$  K02288 (Figures 2 and S2). Higher concentrations (40  $\mu\text{M}$ ) resulted in generation of morphological defects, such as cardiac edema, and were thus not considered.



**Figure 2.** Effects of the specific BMP inhibitor K02288 on bone mineralization. Alizarine red staining of 5 dpf larvae previously treated at 2 (B,D) or 3 dpf (F) during 24 h with K02288 10 (B) and 20  $\mu\text{M}$  (D,F). Control embryos (A,C,E) were treated with DMSO. c: cleithrum; en: entopterygoid; o: operculum; p: parasphenoid. Scale bar: 200  $\mu\text{M}$ .

To evaluate the specificity of the observed effects for bone formation, we also checked formation of the cartilage skeleton that serves as matrix for most of the cranial bone formation. Treatment with

dorsomorphin or K02288 was performed from 2–3 dpf and cartilage extracellular matrix was stained with Alcian Blue at 5 dpf (Figures 3 and S3). No defect was observed in the cranial cartilage formation, suggesting that BMP signaling at later stages mainly acts on bone formation (Figures 3 and S3). Whole mount *in situ* hybridization on 5 dpf revealed a similar expression pattern for the cartilage-specific *sox9a* gene in control and inhibitor treated larvae (Figure 3E–H, arrows). In living embryos, cartilage formation can additionally be assessed by nitric oxide labeling [29] (see below).



**Figure 3.** (A–D) Effects of BMP inhibitor treatment at 2–3 dpf on cartilage formation. Alcian blue staining of 5 dpf larvae previously treated at 2 dpf during 24 h with 100  $\mu$ M dorsomorphin (B) or 20  $\mu$ M K02288 (D). Control embryos (A,C) were treated with DMSO; (E–H) *In situ* hybridization using the *sox9a* probe. No difference in cartilage formation was observed between control (E,G) and treated (F,H). cb 1–4: ceratobranchial ray 1 to 4; ch: ceratohyal; mk: Meckel’s cartilage. Scale bar: 200  $\mu$ M.

2.2. Type I BMP Receptors Are Required for Osteoblast Formation and Function

Secretion of the bone extracellular matrix and subsequent mineralization requires the presence and activity of mature osteoblasts. We therefore decided to investigate whether osteoblast differentiation and/or function would be affected by inhibition of BMP signaling. One of the most prominent marker genes for osteoblast differentiation, both in mammals and in teleosts, is the Osterix gene *osx* [4,30,31]. The transgenic zebrafish line *Tg(osterix:mCherry)* contains the coding sequence for the red fluorescent protein mCherry under the control of the medaka *osterix* promoter, thus allowing detection of osteoblasts in living larvae. When we treated these transgenic larvae at 2 dpf with dorsomorphin or K202288, we observed a similar pattern of expression both in treated and control larvae at 5 dpf (Figure 4C,D,F,I,J,L), suggesting that osteoblast proliferation and terminal differentiation were not affected by this treatment. Only the most anterior structures, the dentary and maxillary were less intensely fluorescent in the treated larvae. Since the number of differentiated osteoblasts in the cranial skeleton did not seem to be generally affected by BMP inhibition, we decided to probe the function of these osteoblasts. In addition to producing and secreting ECM proteins such as collagens, osteocalcin or osteopontin, one striking feature of these cells in the developing embryo is their production of nitric oxide (NO).

Indeed, detection of NO in 5 dpf larvae using the green fluorescent label DAF-FM DA reveals strong staining of all the cranial bone elements and weak staining of cartilage structures; only the developing heart is stained to a similar extent (Figure 4A, arrow) [29]. NO detection in larvae treated at 2 dpf for 24 h with dorsomorphine or K02288 revealed a decrease of NO production in all bone elements (Figure 4A,B,E,G,H,K). The weak staining of cartilage structures was not affected.

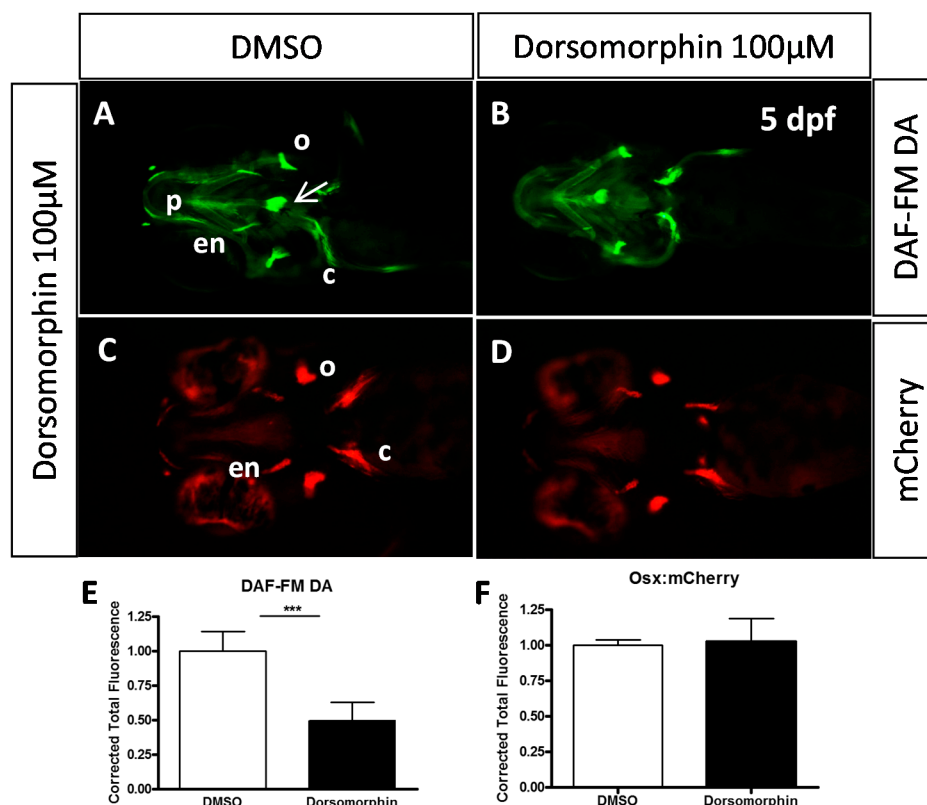
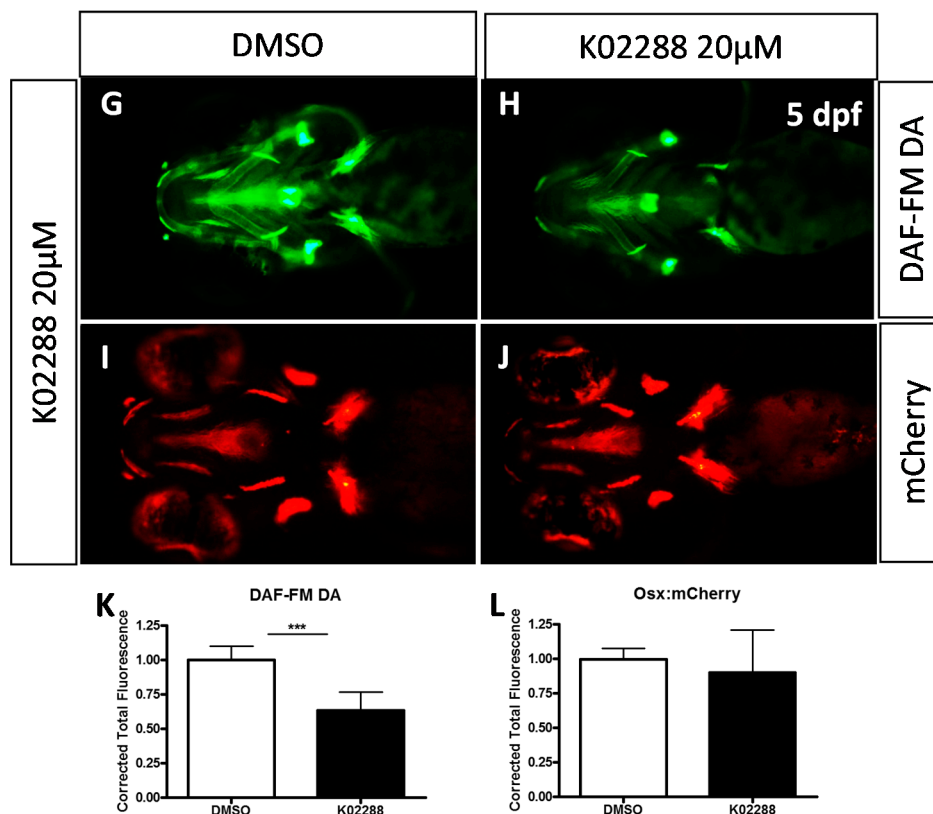


Figure 4. Cont.



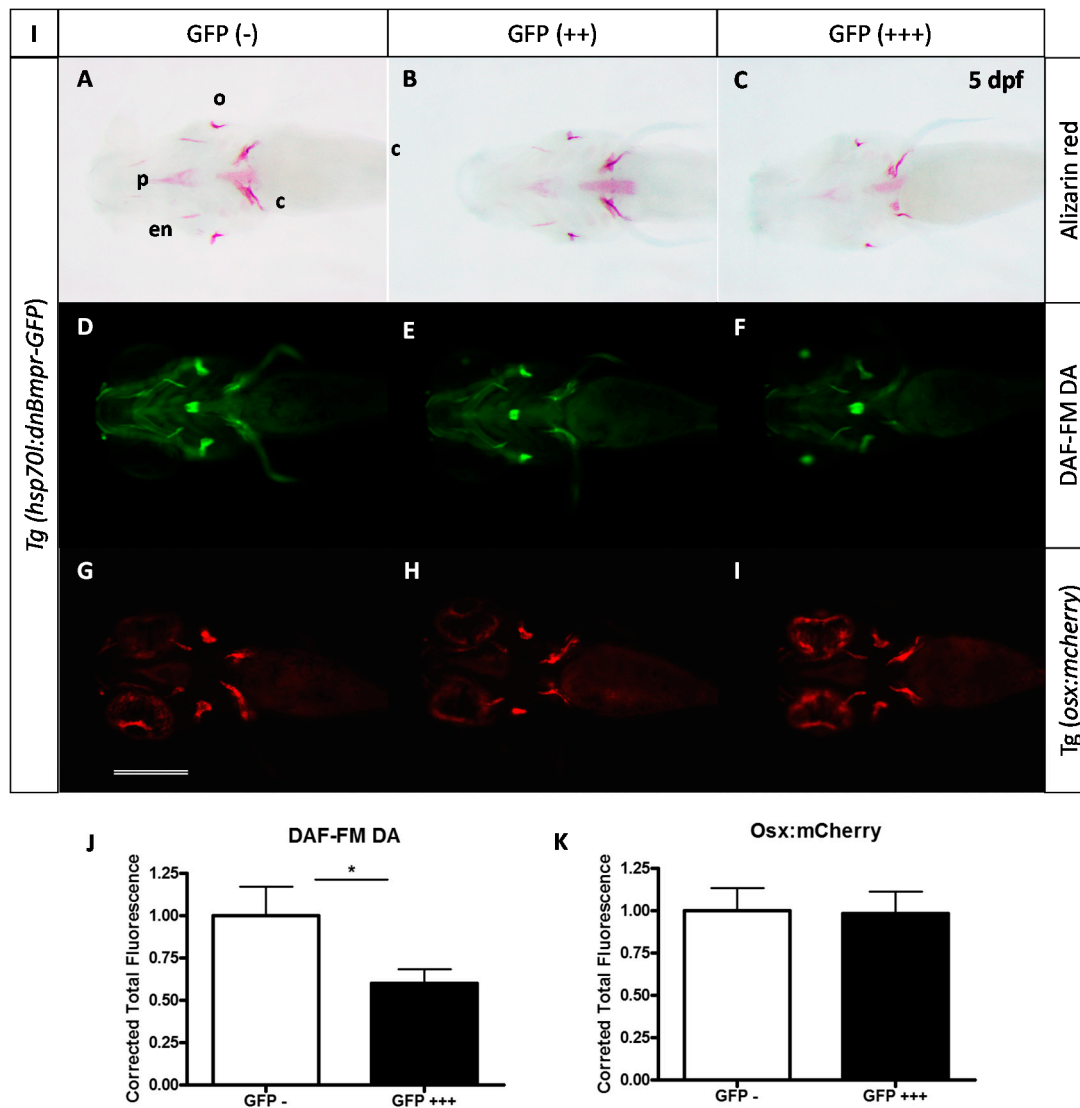


**Figure 4.** Effects of dorsomorphin (A–F) and K02288 (G–L) on NO production and osterix expression. (A,B,G,H) Nitric oxide labelling by DAF-FM DA of 5 dpf *Tg (osx:mcherry)* larvae previously treated during 24 h with 100 μM dorsomorphin (B) or 20 μM K02288 (H) at 2 dpf. (C,D,I,J) mCherry red fluorescence of 5 dpf *Tg (osx:mcherry)* larvae previously treated during 24 h with 100 μM dorsomorphin (D) or 20 μM K02288 (H) at 2 dpf. Control embryos (A,C,G,I) were treated with DMSO. c: cleithrum; en: entopterygoid; o: operculum; p: parasphenoid. Scale bar: 200 μM. (E,F,K,L) Statistical analysis of replicate experiments investigating the effect of dorsomorphin (E, F) or K02288 (K,L) on nitric oxide (E,K) or mCherry (F, L) detection. \*\*\* indicates  $p$ -value < 0.005.

### 2.3. Expression of a Dominant-Negative BMP Receptor Affects Bone Formation

To confirm this requirement for BMP signaling at late stages, we also used the transgenic line *Tg(hsp70l:dnBmpr-GFP)<sub>w30</sub>* harbouring a heat-shock inducible gene for a fusion protein between a dominant negative BMP receptor and the GFP. We performed a heat shock at 37 °C during 30 min at 2 dpf and compared the head skeleton at 5 dpf of the transgenic larvae to that of their non-transgenic siblings (Figure 5A–C), as determined by their expression of the GFP fusion protein. While all control larvae formed a perfectly normal skeleton, indicating that the heat shock itself had no effect, the transgenic larvae (positive for GFP expression) producing the active dominant negative BMP receptor presented a clear decrease of bone calcification. This effect was strongest in those individuals presenting the highest GFP expression. When heat shock on *Tg(hsp70l:dnBmpr-GFP)<sub>w30</sub>* was performed after 48 hpf, 123 of 129 larvae presented normal cartilage (data not shown). These results clearly confirm

that BMP signaling is required for bone formation between 48 hpf and 72 hpf, without affecting cartilage formation.



**Figure 5.** Effects caused by expression of the dominant negative Bmpr on bone formation. (A–C) Alizarin red staining of 5 dpf larvae after heat-shock treatment at 2 or 3 dpf. The extent of GFP expression 2 h after treatment indicates the transgenic status of the larva; GFP(–) being non-transgenic, GFP(++) transgenic, GFP(+++) being homozygous transgenic or larvae highly expressing the transgene (*dnBmpr-GFP*); (D–F) DAF-FM DA staining for nitric oxide detection in 5 dpf larvae (note that GFP fluorescence has disappeared at this time); (G–I) Red fluorescence allowing detection of mCherry-expressing osteoblasts c: cleithrum; en: entopterygoid; o: operculum; p: parasphenoid. Scale bar: 200  $\mu$ M. (J,K) Statistical analysis of replicate experiments investigating the effect of dnBmpr expression on nitric oxide (J) or mCherry (K) detection. \* indicates  $p$ -value < 0.05.

We further investigated the extent of osteoblast differentiation by crossing parents of the *Tg(hsp70l:dnBmpr-GFP)w30* with those of the *Tg(osterix:mCherry)* line and by inducing dnBmpr expression in the larvae by heat shock at 48 hpf. We observed no significant difference in mCherry

expression in the double transgenic larvae (Figure 5G–I,K), thus confirming that inhibition of BMP signaling after 48 hpf does not affect osteoblast formation. In contrast, NO detection in the same animals revealed a significant decrease of osteoblast activity at 5 dpf in the transgenic animals after heat shock at 2 dpf (note that the fluorescence of the dnBmpr-GFP fusion protein observed at 2–3 dpf is nearly absent at 5 dpf, except in the lens) (Figure 5D–F,J).

### 3. Discussion

The role of BMP/TGF $\beta$  ligands and/or antagonists in early embryonic development has been extensively documented in fundamental processes such as dorso-ventral patterning or establishment of left-right asymmetry [32–34]. Accordingly, many studies on the function and modulation of BMP signaling have concentrated on early stages of development, also concerning skeletal development [12,35]. Recent studies showed the involvement of BMP signals in cNCC migration and induction of pre-chondrocyte determination both in mouse [36] and in zebrafish around 12 hpf [37]. Later, at post-migratory cNCC stages in zebrafish (20–24 hpf), local BMP sources control the dorso-ventral patterning of the cranial skeleton [23,38]. Finally, BMP signaling was shown to be required around 30–36 hpf for induction of the *runx2b* gene in the differentiating chondrocytes, while inhibition of the BMP pathway at 48 hpf did not affect chondrocranium formation [39].

Based on these results, we investigated the role of BMP signaling at these later stages on cranial bone formation, osteoblast differentiation, and bone mineralization. Using two different BMP inhibitors, dorsomorphin [24] and K02288 [28], we show that BMP signaling is required between 48 and 72 hpf, and to a lesser extent between 72 and 96 hpf, for cranial bone ossification as revealed by alizarin red staining of the bone matrix. This result was confirmed by inducing the expression of a dominant-negative Bmp receptor [40] at 48 or 72 hpf. Note that we observed expression of the dnBmpr-GFP fusion protein through its green fluorescence already 2 h after the heat shock, indicating that the delay caused by transcription-translation is minimal. Taken together, these observations define the period between 48–72 hpf as the most crucial for BMP induction of ossification in the head skeleton. To further characterize the function of BMP signaling during these later stages, we investigated the differentiation and function of the osteoblasts upon pathway inhibition. Both the treatment with chemical inhibitors and expression of a dominant negative receptor only marginally affected the number of Osterix-expressing osteoblasts in the head of 5 dpf larvae, indicating that both proliferation and differentiation of these cells does not significantly depend on BMP signaling during this period.

Members of the TGF $\beta$  family have also been shown to be involved in zebrafish early cartilage development, such as Tgf $\beta$ 2 [41] and Tgf $\beta$ 3 [42]. Although these studies were performed using antisense morpholino injection and thus blocked gene expression from very early on, these factors may also affect skeletal development at later stages as studied here. The K02288 inhibitor is more than 100-fold more potent against BMP receptors ALK1 and ALK2 as compared to TGF $\beta$  receptors ALK4 and ALK5 [28], while we found no evidence that the dnBmpr could interact with ALK4 or ALK5, therefore we think that the results presented here are due to inhibition of BMP signaling. Future studies may use specific TGF $\beta$  inhibitors to investigate the function of these factors in late skeletogenesis.

Nitric oxide (NO) has long been associated to bone development and pathologies [43,44]. Pharmacological inhibition of nitrogen oxide synthases (NOS) enzymes in rats leads to a decreased

bone mass [45] and impairment of tibial growth [46], while mice deficient in endothelial NOS (eNOS) present reduced bone volume and severe defects in osteoblast maturation and activity [47,48]. NO production by osteoblasts has been associated with pathological conditions, such as inflammatory bone loss through activation of the cGMP/protein kinase G (PKG) pathway inducing Runx2 expression and production of matrix metalloproteinase MMP13 [44,49,50]. Bone cells are also known to react to mechanical or shear stress by producing nitric oxide [51–53], while NO action in shear stressed human and mouse osteoblasts was shown to result in activation of PKG, the intracellular protein kinases Src and Akt [54] finally inducing nuclear translocation of  $\beta$ -catenin [55]. Similarly, early osteogenic differentiation of murine embryonic stem cells as well as their mineralization was shown to be enhanced by NO, acting on  $\beta$ -catenin and involving the canonical Wnt pathway [56].

In zebrafish, inhibition of BMP signaling between 48–72 hpf did not significantly affect osteoblast differentiation. In contrast, production of nitric oxide was clearly decreased in the treated animals. This observation, together with the observed decrease in cranial bone mineralization, leads to the conclusion that NO production in developing cranial osteoblasts in zebrafish is closely associated to bone calcification.

## 4. Experimental Section

### 4.1. Fish and Embryo Maintenance

Zebrafish (*Danio rerio*) were reared in a recirculating system from Techniplast (Buguggiate, Italy) at a maximal density of 7 fish/L. The water characteristics were as follows: pH = 7.4, conductivity = 50 mS/m temperature = 28 °C. The light cycle was controlled (14 h light, 10 h dark). Fish were fed twice daily with dry powder (ZM fish food<sup>®</sup>, Zebrafish Management Ltd, Winchester, UK) with size adapted to their age, and once daily with fresh nauplii from *Artemia salina* (ZM fish food<sup>®</sup>). Larvae aged less than 14 days were also fed twice daily with a live paramecia culture. Wild type embryos from the AB strain were used and staged according to Kimmel [57]. The transgenic line *Tg(hsp70l:dnBmpr-GFP)* [40] was obtained from the Zebrafish International Research Center (ZIRC, Eugene, OR, USA). *Tg(osterix:mCherry)* transgenic zebrafish have been generated as described earlier [4,29,30].

The day before breeding, two males and two females were placed in breeding tanks out of the recirculating system, with an internal divider to prevent unwanted mating. On the day of breeding, fish were placed in fresh aquarium water and the divider was removed to allow mating. Eggs were raised in E3 (5 mM Na Cl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.00001% methylene blue).

### 4.2. Alcian Blue and Alizarin Red Staining

Cartilage and bone staining using alcian blue (CAS No: 33864-99-2) and alizarin red S (CAS No: 130-22-3, Sigma-Aldrich, Diegem, Belgium), respectively, on fixed specimen were performed as previously described [58].

### 4.3. Inhibition of Bmp Signaling

Transgenic embryos *hsp70l:dnBmpr-GFP* [40] were heat shocked at desired stages by placing them into a water bath for 30 min at 37 °C and afterward placed back at 28 °C. Two hours after the heat



shock, the embryos were screened for GFP fluorescence. Embryos not expressing GFP were used as non-transgenic controls.

Inhibition of Bmp signaling 10 mM stock solution of dorsomorphin (CAS No: 1219168-18-9) (Sigma-Aldrich), K02288 (CAS No: 1431985-92-0) (Tocris Bioscience<sup>®</sup>, Lille, France) was diluted in DMSO (Merck Chemicals, Overijse, Belgium). Embryos at desired stage were placed into 6-well plates with the inhibitor diluted in E3 rearing medium at the desired concentration during a specific time period. DMSO alone was used as control (1% for dorsomorphin 100  $\mu$ M and 0.1% and 0.2% for K02288 10  $\mu$ M and 20  $\mu$ M respectively). Embryos were then rinsed several times with E3, raised in E3 and finally fixed at the desired stage.

All experiments were performed on at least 20 individuals and repeated at least three times. Images shown in the figures are representative for more than 95% of the larvae observed under the respective conditions. Staining intensity was evaluated based on overall intensity, and focusing on the less intensely stained elements.

#### 4.4. Living Nitric Oxide Labeling

For labeling of nitric oxide (NO), DAF-FM DA stock (CAS No: 254109-22-3) (Alexis corporation, Lausen, Switzerland; 5 mM in DMSO) has been diluted 1:1000 in E3 zebrafish medium and larvae were incubated over night at 28 °C in the dark and rinsed several times before imaging as previously described [29,59].

#### 4.5. Whole-Mount *in Situ* Hybridization (WISH)

Whole mount *in situ* hybridization was performed as previously described [60]. The antisense RNA probe for *sox9a* [61] was synthesized by transcription of cDNA clones with T7, T3 or SP6 RNA polymerase using digoxigenin labeling mix (Roche Diagnostics, Meylan, France). Treated and non-treated larvae were fixed at 5 dpf in PFA 4%. *In situ* labeling was observed using an Olympus SZX10 stereomicroscope (Olympus, Berchem, Belgium) coupled with an Olympus XC50 camera.

#### 4.6. Image Acquisition

All images were taken on a SZX10 stereomicroscope driven by the CELL B software (Olympus). Fluorescent images for nitric oxide labeling and transgenic mCherry expression were obtained using GFP (Exc.: 460–490, Em.: 510–550) and RFP (Exc.: 540–580, Em.: 610) filters, respectively. For live imaging, embryos were anaesthetized with tricaine (Sigma-Aldrich) until they showed sufficiently low movement.

Quantification of fluorescence was performed using the ImageJ software [62] by first isolating the red or green channel, followed by integration of the pixel intensity on the resulting grey scale image. For nitric oxide labeling, the integrated density of the heart was subtracted, as this staining does not correspond to osteoblasts. The obtained numbers were normalized by dividing all values by the mean value obtained for the control larvae, and statistical significance of the observed differences was evaluated using a two-tailed t-test.

## 5. Conclusions

In conclusion, we show here that BMP signaling is of major importance for cranial bone formation in zebrafish between 48–72 hpf, with only minor effects on osteoblast proliferation and differentiation, but mainly by affecting bone mineralization through induction of osteoblast activity as visualized by their production of nitric oxide. Further, it appears that detection of nitric oxide in developing zebrafish larvae may be an early indicator of bone calcification activity.

## Supplementary Materials

Supplementary materials can be accessed at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/05/7586/s1>.

## Acknowledgments

This work was supported by the “Fonds de la Recherche Fondamentale Collective”; 2.4555.99/2.4542.00/2.4561.10, the SSTC; the European Space Agency, the Belgian Space Agency Prodex. T.W. was supported by F.N.R.S, J.R. by ESA and M.M. is a “Chercheur Qualifié du F.N.R.S.” We wish to thank the GIGA-R zebrafish facility for providing zebrafish adults and fertilized eggs and the GIGA-R GenoTranscriptomics platform for DNA sequencing.

## Author Contributions

T.W.; S.S.: all experiments, writing; J.R.; M.M.: planning, supervision and writing.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Schilling, T.F.; Kimmel, C.B. Segment and cell type lineage restrictions during pharyngeal arch development in the zebrafish embryo. *Development* **1994**, *120*, 483–494.
2. Hammond, C.L.; Schulte-Merker, S. Two populations of endochondral osteoblasts with differential sensitivity to hedgehog signalling. *Development* **2009**, *136*, 3991–4000.
3. Flores, M.V.; Lam, E.Y.; Crosier, P.; Crosier, K. A hierarchy of runx transcription factors modulate the onset of chondrogenesis in craniofacial endochondral bones in zebrafish. *Dev. Dyn.* **2006**, *235*, 3166–3176.
4. Spoorendonk, K.M.; Peterson-Maduro, J.; Renn, J.; Trowe, T.; Kranenbarg, S.; Winkler, C.; Schulte-Merker, S. Retinoic acid and *cyp26b1* are critical regulators of osteogenesis in the axial skeleton. *Development* **2008**, *135*, 3765–3774.
5. Gavaia, P.J.; Simes, D.C.; Ortiz-Delgado, J.B.; Viegas, C.S.; Pinto, J.P.; Kelsh, R.N.; Sarasquete, M.C.; Cancela, M.L. Osteocalcin and matrix gla protein in zebrafish (*Danio rerio*) and senegal sole (*Solea senegalensis*): Comparative gene and protein expression during larval development through adulthood. *Gene Expr. Patterns* **2006**, *6*, 637–652.

6. Li, N.; Felber, K.; Elks, P.; Croucher, P.; Roehl, H.H. Tracking gene expression during zebrafish osteoblast differentiation. *Dev. Dyn.* **2009**, *238*, 459–466.
7. Apschner, A.; Schulte-Merker, S.; Witten, P.E. Not all bones are created equal—Using zebrafish and other teleost species in osteogenesis research. *Methods Cell Biol.* **2011**, *105*, 239–255.
8. Vanoevelen, J.; Janssens, A.; Huitema, L.F.; Hammond, C.L.; Metz, J.R.; Flik, G.; Voets, T.; Schulte-Merker, S. Trpv5/6 is vital for epithelial calcium uptake and bone formation. *FASEB J.* **2011**, *25*, 3197–3207.
9. Huitema, L.F.; Apschner, A.; Logister, I.; Spoorendonk, K.M.; Bussmann, J.; Hammond, C.L.; Schulte-Merker, S. Entpd5 is essential for skeletal mineralization and regulates phosphate homeostasis in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 21372–21377.
10. Apschner, A.; Huitema, L.F.; Ponsioen, B.; Peterson-Maduro, J.; Schulte-Merker, S. Zebrafish *enpp1* mutants exhibit pathological mineralization, mimicking features of generalized arterial calcification of infancy (GACI) and pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Dis. Models Mech.* **2014**, *7*, 811–822.
11. Poulain, M.; Furthauer, M.; Thisse, B.; Thisse, C.; Lepage, T. Zebrafish endoderm formation is regulated by combinatorial nodal, fgf and bmp signalling. *Development* **2006**, *133*, 2189–2200.
12. Nie, X.; Luukko, K.; Kettunen, P. Bmp signalling in craniofacial development. *Int. J. Dev. Biol.* **2006**, *50*, 511–521.
13. Massague, J.; Gomis, R.R. The logic of TGF $\beta$  signaling. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 2811–2820.
14. Dudas, M.; Sridurongrit, S.; Nagy, A.; Okazaki, K.; Kaartinen, V. Craniofacial defects in mice lacking BMP type i receptor Alk2 in neural crest cells. *Mech. Dev.* **2004**, *121*, 173–182.
15. Ko, S.O.; Chung, I.H.; Xu, X.; Oka, S.; Zhao, H.; Cho, E.S.; Deng, C.; Chai, Y. Smad4 is required to regulate the fate of cranial neural crest cells. *Dev. Biol.* **2007**, *312*, 435–447.
16. Tang, S.; Snider, P.; Firulli, A.B.; Conway, S.J. Trigenic neural crest-restricted smad7 over-expression results in congenital craniofacial and cardiovascular defects. *Dev. Biol.* **2010**, *344*, 233–247.
17. Lee, M.H.; Kim, Y.J.; Kim, H.J.; Park, H.D.; Kang, A.R.; Kyung, H.M.; Sung, J.H.; Wozney, J.M.; Kim, H.J.; Ryoo, H.M. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF- $\beta$ <sub>1</sub> opposes the Bmp-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34387–34394.
18. Lee, M.H.; Kwon, T.G.; Park, H.S.; Wozney, J.M.; Ryoo, H.M. Bmp-2-induced osterix expression is mediated by dlx5 but is independent of runx2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *309*, 689–694.
19. Asharani, P.V.; Keupp, K.; Semler, O.; Wang, W.; Li, Y.; Thiele, H.; Yigit, G.; Pohl, E.; Becker, J.; Frommolt, P.; *et al.* Attenuated bmp1 function compromises osteogenesis, leading to bone fragility in humans and zebrafish. *Am. J. Hum. Genet.* **2012**, *90*, 661–674.
20. Holzschuh, J.; Wada, N.; Wada, C.; Schaffer, A.; Javidan, Y.; Tallafuss, A.; Bally-Cuif, L.; Schilling, T.F. Requirements for endoderm and bmp signaling in sensory neurogenesis in zebrafish. *Development* **2005**, *132*, 3731–3742.
21. Martinez-Barbera, J.P.; Toresson, H.; Da Rocha, S.; Krauss, S. Cloning and expression of three members of the zebrafish bmp family: Bmp2a, bmp2b and bmp4. *Gene* **1997**, *198*, 53–59.
22. Wilson, J.; Tucker, A.S. Fgf and bmp signals repress the expression of bapx1 in the mandibular mesenchyme and control the position of the developing jaw joint. *Dev. Biol.* **2004**, *266*, 138–150.

23. 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. Combinatorial roles for bmps and endothelin 1 in patterning the dorsal-ventral axis of the craniofacial skeleton. *Development* **2011**, *138*, 5135–5146.
24. Hao, J.; Daleo, M.A.; Murphy, C.K.; Yu, P.B.; Ho, J.N.; Hu, J.; Peterson, R.T.; Hatzopoulos, A.K.; Hong, C.C. Dorsomorphin, a selective small molecule inhibitor of bmp signaling, promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2904.
25. Boergermann, J.H.; Kopf, J.; Yu, P.B.; Knaus, P. Dorsomorphin and ldn-193189 inhibit bmp-mediated smad, p38 and akt signalling in c2c12 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 1802–1807.
26. Yu, P.B.; Deng, D.Y.; Lai, C.S.; Hong, C.C.; Cuny, G.D.; Bouxsein, M.L.; Hong, D.W.; McManus, P.M.; Katagiri, T.; Sachidanandan, C.; *et al.* Bmp type i receptor inhibition reduces heterotopic [corrected] ossification. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 1363–1369.
27. Hao, J.; Ho, J.N.; Lewis, J.A.; Karim, K.A.; Daniels, R.N.; Gentry, P.R.; Hopkins, C.R.; Lindsley, C.W.; Hong, C.C. *In vivo* structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective vegf and bmp inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 245–253.
28. Sanvitale, C.E.; Kerr, G.; Chaikuad, A.; Ramel, M.C.; Mohedas, A.H.; Reichert, S.; Wang, Y.; Triffitt, J.T.; Cuny, G.D.; Yu, P.B.; *et al.* A new class of small molecule inhibitor of bmp signaling. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62721.
29. Renn, J.; Pruvot, B.; Muller, M. Detection of nitric oxide by diamino fluorescein visualizes the skeleton in living zebrafish. *J. Appl. Ichthyol.* **2014**, *30*, 701–706.
30. Renn, J.; Winkler, C. Osterix-mcherry transgenic medaka for *in vivo* imaging of bone formation. *Dev. Dyn.* **2009**, *238*, 241–248.
31. Nakashima, K.; Zhou, X.; Kunkel, G.; Zhang, Z.; Deng, J.M.; Behringer, R.R.; de Crombrughe, B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **2002**, *108*, 17–29.
32. Wang, R.N.; Green, J.; Wang, Z.; Deng, Y.; Qiao, M.; Peabody, M.; Zhang, Q.; Ye, J.; Yan, Z.; Denduluri, S.; *et al.* Bone morphogenetic protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* **2014**, *1*, 87–105.
33. Chen, D.; Zhao, M.; Mundy, G.R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **2004**, *22*, 233–241.
34. Schilling, T.F.; Concordet, J.P.; Ingham, P.W. Regulation of left-right asymmetries in the zebrafish by shh and bmp4. *Dev. Biol.* **1999**, *210*, 277–287.
35. Wan, M.; Cao, X. Bmp signaling in skeletal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *328*, 651–657.
36. Bonilla-Claudio, M.; Wang, J.; Bai, Y.; Klysik, E.; Selever, J.; Martin, J.F. Bmp signaling regulates a dose-dependent transcriptional program to control facial skeletal development. *Development* **2012**, *139*, 709–719.
37. Das, A.; Crump, J.G. Bmps and id2a act upstream of twist1 to restrict ectomesenchyme potential of the cranial neural crest. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1002710.
38. Zuniga, E.; Rippen, M.; Alexander, C.; Schilling, T.F.; Crump, J.G. Gremlin 2 regulates distinct roles of bmp and endothelin 1 signaling in dorsoventral patterning of the facial skeleton. *Development* **2011**, *138*, 5147–5156.

39. Dalcq, J.; Pasque, V.; Ghaye, A.; Larbuisson, A.; Motte, P.; Martial, J.A.; Muller, M. Runx3, egr1 and sox9b form a regulatory cascade required to modulate bmp-signaling during cranial cartilage development in zebrafish. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e50140.
40. Pyati, U.J.; Webb, A.E.; Kimelman, D. Transgenic zebrafish reveal stage-specific roles for bmp signaling in ventral and posterior mesoderm development. *Development* **2005**, *132*, 2333–2343.
41. Swartz, M.E.; Sheehan-Rooney, K.; Dixon, M.J.; Eberhart, J.K. Examination of a palatogenic gene program in zebrafish. *Dev. Dyn.* **2011**, *240*, 2204–2220.
42. Cheah, F.S.; Winkler, C.; Jabs, E.W.; Chong, S.S. TGF $\beta$ 3 regulation of chondrogenesis and osteogenesis in zebrafish is mediated through formation and survival of a subpopulation of the cranial neural crest. *Mech. Dev.* **2010**, *127*, 329–344.
43. Evans, D.M.; Ralston, S.H. Nitric oxide and bone. *J. Bone Miner. Res.* **1996**, *11*, 300–305.
44. Van't Hof, R.J.; Ralston, S.H. Nitric oxide and bone. *Immunology* **2001**, *103*, 255–261.
45. Tsukahara, H.; Miura, M.; Tsuchida, S.; Hata, I.; Hata, K.; Yamamoto, K.; Ishii, Y.; Muramatsu, I.; Sudo, M. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am. J. Physiol.* **1996**, *270*, E840–E845.
46. Turner, C.H.; Owan, I.; Jacob, D.S.; McClintock, R.; Peacock, M. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone formation in rats. *Bone* **1997**, *21*, 487–490.
47. Aguirre, J.; Buttery, L.; O'Shaughnessy, M.; Afzal, F.; Fernandez de Marticorena, I.; Hukkanen, M.; Huang, P.; MacIntyre, I.; Polak, J. Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *Am. J. Pathol.* **2001**, *158*, 247–257.
48. Armour, K.E.; Armour, K.J.; Gallagher, M.E.; Godecke, A.; Helfrich, M.H.; Reid, D.M.; Ralston, S.H. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology* **2001**, *142*, 760–766.
49. Ralston, S.H.; Grabowski, P.S. Mechanisms of cytokine induced bone resorption: Role of nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, and prostaglandins. *Bone* **1996**, *19*, 29–33.
50. Saura, M.; Tarin, C.; Zaragoza, C. Recent insights into the implication of nitric oxide in osteoblast differentiation and proliferation during bone development. *Sci. World J.* **2010**, *10*, 624–632.
51. Bacabac, R.G.; Smit, T.H.; Mullender, M.G.; Dijcks, S.J.; Van Loon, J.J.; Klein-Nulend, J. Nitric oxide production by bone cells is fluid shear stress rate dependent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *315*, 823–829.
52. Bakker, A.D.; Soejima, K.; Klein-Nulend, J.; Burger, E.H. The production of nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> by primary bone cells is shear stress dependent. *J. Biomech.* **2001**, *34*, 671–677.
53. Pitsillides, A.A.; Rawlinson, S.C.; Suswillo, R.F.; Bourrin, S.; Zaman, G.; Lanyon, L.E. Mechanical strain-induced no production by bone cells: A possible role in adaptive bone (re)modeling? *FASEB J.* **1995**, *9*, 1614–1622.
54. Rangaswami, H.; Schwappacher, R.; Marathe, N.; Zhuang, S.; Casteel, D.E.; Haas, B.; Chen, Y.; Pfeifer, A.; Kato, H.; Shattil, S.; *et al.* Cyclic gmp and protein kinase g control a src-containing mechanosome in osteoblasts. *Sci. Signal.* **2010**, *3*, ra91.
55. Rangaswami, H.; Schwappacher, R.; Tran, T.; Chan, G.C.; Zhuang, S.; Boss, G.R.; Pilz, R.B. Protein kinase g and focal adhesion kinase converge on Src/Akt/ $\beta$ -catenin signaling module in osteoblast mechanotransduction. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 21509–21519.

56. Ding, H.; Keller, K.C.; Martinez, I.K.; Geransar, R.M.; zur Nieden, K.O.; Nishikawa, S.G.; Rancourt, D.E.; zur Nieden, N.I. No- $\beta$ -catenin crosstalk modulates primitive streak formation prior to embryonic stem cell osteogenic differentiation. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 5564–5577.
57. Kimmel, C.B.; Ballard, W.W.; Kimmel, S.R.; Ullmann, B.; Schilling, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **1995**, *203*, 253–310.
58. Walker, M.B.; Kimmel, C.B. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotech. Histochem.* **2007**, *82*, 23–28.
59. Lepiller, S.; Laurens, V.; Bouchot, A.; Herbomel, P.; Solary, E.; Chluba, J. Imaging of nitric oxide in a living vertebrate using a diamino-fluorescein probe. *Free Radic Biol. Med.* **2007**, *43*, 619–627.
60. Hauptmann, G.; Gerster, T. Multicolor whole-mount *in situ* hybridization. *Methods Mol. Biol.* **2000**, *137*, 139–148.
61. Yan, Y.L.; Miller, C.T.; Nissen, R.M.; Singer, A.; Liu, D.; Kim, A.; Draper, B.; Willoughby, J.; Morcos, P.A.; Amsterdam, A.; *et al.* A zebrafish sox9 gene required for cartilage morphogenesis. *Development* **2002**, *129*, 5065–5079.
62. ImageJ: Image Processing and Analysis in Java. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. Available online: <http://imagej.nih.gov/> (accessed on 20 April 2015).

*Sample Availability:* All compounds are commercially available.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).