



**HAL**  
open science

# Investigation des mécanismes moléculaires impliqués dans les anomalies du développement ostéoarticulaire chez la souris invalidée pour le gène de la Xylosyltransférase I

Taieb Mahdia

► **To cite this version:**

Taieb Mahdia. Investigation des mécanismes moléculaires impliqués dans les anomalies du développement ostéoarticulaire chez la souris invalidée pour le gène de la Xylosyltransférase I. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0032 . tel-02157545

**HAL Id: tel-02157545**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02157545v1>**

Submitted on 2 Oct 2019

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

## Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

### Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par

**Mahdia TAÏEB**

## **Investigation des mécanismes moléculaires impliqués dans les anomalies du développement ostéoarticulaire chez la souris invalidée pour le gène de la Xylosyltransférase I**

Soutenance prévue le 29 Avril 2019

### Membres du jury :

<b>Dr. Jérôme Guicheux</b>	Dr. INSERM	Université de Nantes	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr. Zhenlin Li</b>	Dr. INSERM	Université Pierre et Marie Curie	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Abderrahman Maftah</b>	Professeur	Université de Limoges	<b>Examineur</b>
<b>Dr. Catherine Baugé</b>	MCU	Université Caen Normandie	<b>Examineur</b>
<b>Dr. Mohamed Ouzzine</b>	Dr. INSERM	Université de Lorraine	<b>Directeur de thèse</b>

# Remerciements

*Tout d'abord je tiens à remercier le docteur Mohamed Ouzzine pour son encadrement durant ces trois années de thèse, pour sa présence, sa disponibilité et ses conseils.*

*Je remercie Monsieur Jérôme Guicheux et Monsieur Zhenlin Li de l'honneur qu'ils me témoignent en acceptant d'être les rapporteurs de ma thèse et d'avoir accepté de juger mon travail.*

*Je remercie également madame Catherine Baugé et Monsieur Abderrahmane Meftah d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et d'évaluer mes travaux de thèse.*

*Je remercie également le professeur Jean-Yves Jouzeau de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir permis d'effectuer mes deux stages de M1 et de M2 ainsi que mes travaux de thèse. Ce fut un plaisir d'avoir travaillé avec vous autant au labo et autant au conseil scientifique de l'université de lorraine.*

*Je remercie Monsieur Patrick Menu de m'avoir ouvert les portes de l'école doctorale BioSE et de m'avoir permis d'en faire partie, je le remercie pour sa gentillesse et sa bienveillance.*

*Je remercie tout spécialement le professeur Athanase Visvikis de m'avoir initié à la recherche et de m'avoir encadré durant mes stages de M1 et de M2. Merci d'avoir cru en moi, merci pour ton soutien et de m'avoir transmis le gout et la patient de la recherche et de l'enseignement. Un grand merci également à Stéphane Labialle, pour son aide durant mon stage M2, pour ses conseils et ses encouragements.*

*Un grand merci à Lydia pour son aide, ses conseils et sa disponibilité durant ces trois années de thèse.*

*Je tiens à remercier également Sylvie pour sa bienveillance, pour ses encouragements et pour ses sourires chaleureux. Merci à Nick pour nos échanges et nos longues discussions. Merci également à Sandrine pour sa sympathie et gentillesse.*

*A mes chères amis du bureau, « mes compagnons de guerre », merci pour tous les agréables moments que nous avons passés ensemble, merci pour votre soutien et pour vos encouragements. Merci à ma petite Dafné pour son soutien, pour son enthousiasme, pour son dynamisme et son énergie qui donne envie toujours de continuer mais surtout pour son*

*amitié, sa tolérance et sa gentillesse. Merci à petit Paul pour sa bonne humeur, pour sa folie, pour tous les fous rires et pour toutes les discussions. Merci à Benjamin et Anne pour nos échanges et nos discussions et pour leur gentillesse. Merci à Sajida, my best pakistani friend, merci pour sa gentillesse et pour tous les bons thés pakistanais qu'on a partagé ensemble. Merci à Irfan et à Xavier pour leur aide et leurs conseils et pour leur gentillesse. Merci à Nicolas et à Elise pour tous nos échanges enrichissants et surtout pour leur sympathie et gentillesse.*

*A mes très chères amies, Fatouma, Mayssa et Saliha, merci pour votre soutien au quotidien, merci pour tous les bons moments passés ensemble, merci pour tous nos fous rires et toutes nos folies. Vous faites partie de mes plus belles rencontres au cours de cette thèse et j'espère que notre amitié perdurera.*

*A mes libanaises préférées, Dima et Reine, un grand merci à vous mes très chères amies, merci pour nos échanges, merci pour votre soutien au quotidien, merci pour tous les agréables moments passés ensemble.*

*Un grand merci à Meriem et David, merci pour vos encouragements, pour votre soutien et merci surtout pour votre amitié, votre gentillesse et sympathie.*

*Merci à Hervé pour ses encouragements, pour son soutien et sympathie*

*Merci à tous mes amis doctorants du labo : Marrion, Anne-béatrice, charlotte, Xing, Anne-Sophie, Stéphanie, Gabriel, Olivier, Mathilde, Mathieu, Léonard, Laurie, Julie, Gautier, JC, Fanny, Flo, Jean-Malo, Géraud, Yohann, Arnaud, Benoit, Murielle, Adrien, Valentine et Jordan.*

*Un grand merci à mon cher Johnny, pour sa gentillesse et sa sympathie, pour tous ses sourires chaleureux et surtout pour son soutien qui m'apporte même étant à l'autre bout du monde, merci mon petit Jo pour tous tes messages qui m'ont toujours remonté le moral.*

*Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse et toutes les personnes qui ont contribué à rendre cette expérience aussi enrichissante sur le plan humain que sur le plan scientifique.*

*A mes frères et sœurs : Salima, Mohamed, Lynda et Nadir pour leur amour, pour leur soutien et pour tous leurs encouragements.*

*Merci Mima pour ta tendresse et ta compréhension.*

*Merci à toi mon frère Moh, merci pour ton soutien et pour ton accompagnement surtout durant mes premiers pas ici en France, qui n'ont pas été toujours faciles, merci pour tout ce que tu as fait pour moi.*

*A mon frère Nadir, pour ton soutien, pour ta gentillesse et ta sagesse.*

*A ma Lyli chérie, quoi que je te dise ça ne sera jamais suffisant, tu es ma meilleure, et tu le resteras à jamais. Merci d'avoir été toujours là pour moi, d'avoir cru en moi, merci pour ta présence autant dans mes moments de joies et autant dans mes moments de tristesse, tu as toujours su me rassurer dans mes moments de détresse et tu as toujours su me donner de la force pour continuer, à toi et à tes enfants Mohamed et Adam que j'aime tant je dédie ce travail.*

*A mon beau-frère Hakim pour ses conseils, ses encouragements et sa gentillesse.*

*A mes tentes Fatima et Baya, pour leur tendresse et pour leurs Duaas*

*A mon cher père, pour son soutien, pour ses encouragements, pour ses conseils et son accompagnement. Merci de m'avoir permis de prendre mes ailes afin de me construire et de m'instruire. J'espère que ce travail te rendra un petit peu fier de moi et j'espère qu'un jour je serai à la hauteur de tes attentes.*

*A la lumière de ma vie et à la prunelle de mes yeux, à ma maman chérie, sans toi je n'aurai jamais réussi. Merci pour ton amour sans limite que je reçois sans cesse, merci pour ton soutien quotidien et ta patience inépuisable, c'est de toi que j'épuise ma force et mon courage et c'est à toi que je dois ce parcours accompli, c'est toi qui m'as appris à persévérer jusqu'au bout. Tu as été toujours mon exemple et mon modèle, si aujourd'hui je suis arrivé là c'est grâce à toi à tout ce que tu as fait et tu fais pour moi, que le bon dieu te grade pour nous habibati oumi.*

# Sommaire

Sommaire .....	5
Liste d'abréviations .....	9
Liste des figures et des tableaux .....	16
Introduction .....	20
Chapitre 1 : Le Squelette et le développement des os .....	21
1. Le squelette et le développement des os .....	22
1.1. L'ossification intramembranaire .....	23
1.2. L'ossification endochondrale .....	24
Chapitre 2 : Le Cartilage .....	27
2. Le cartilage .....	28
2.1. Le cartilage articulaire .....	29
2.1.1. Organisation du cartilage articulaire .....	29
2.1.2. Fonction du cartilage articulaire .....	30
2.2. Le cartilage de croissance ou la plaque de croissance .....	30
2.2.1. Développement de la plaque de croissance .....	30
2.2.2. Organisation et fonction de la plaque de croissance .....	31
Chapitre 3 : Régulation de l'ossification endochondrale .....	34
3. Régulation de l'ossification endochondrale .....	35
3.1. Régulation par des facteurs de transcription .....	35
3.1.1. SOX9 .....	35
3.1.2. RUNX2 .....	36
3.2. Régulation par des facteurs extracellulaires .....	36
3.2.1. PTHrP .....	36
3.2.2. Ihh .....	37
3.3. Régulation par les facteurs de croissance .....	39
3.3.1. FGF .....	39
3.3.1.1. L'expression des FGFs et de leurs récepteurs durant le développement du squelette ....	41
3.3.1.2. Le rôle des FGFs durant le développement du squelette .....	43
3.3.2. TGF $\beta$ .....	44
3.3.2.1. Expression des TGF $\beta$ et de leurs récepteurs durant le développement du squelette .....	47
3.3.2.2. La signalisation du TGF $\beta$ durant le développement de la plaque de croissance .....	48
Chapitre 4 : La Matrice Extracellulaire du cartilage .....	50
4. La matrice extracellulaire du cartilage .....	51
4.1. Composition de la matrice extracellulaire .....	52
4.1.1. L'eau .....	52

4.1.2.	Les collagènes.....	52
4.1.2.1.	Le collagène de type II .....	52
4.1.2.2.	Le collagène de type X .....	53
4.1.3.	Les protéoglycanes (PGs).....	54
4.1.3.1.	Les chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs) .....	54
4.1.3.2.	Les protéoglycanes essentiels de la MEC.....	56
-	L'aggrécane.....	56
-	Le versican .....	57
-	Les syndécans .....	58
-	Les glypicans .....	59
-	Le bétaglycane.....	59
-	Les petits protéoglycans riches en leucine (SLRP) .....	60
4.1.3.3.	Synthèse des chaînes de GAGs.....	60
Chapitre 5 : Xylosyltransférases.....		62
5.	Les xylosyltransférases.....	63
5.1.	Spécificité de la xylosyltransférase.....	63
5.2.	Structure des XTs.....	63
5.3.	Relation structure / fonction.....	65
5.4.	Localisation intracellulaire .....	66
5.5.	La XT et les pathologies ostéoarticulaires .....	67
Matériel et méthodes .....		71
1.	Soin et élevage des souris : .....	72
2.	Préparation des embryons et génotypage .....	72
2.1.	Frottis cellulaire.....	72
2.2.	Récupération des embryons .....	72
2.3.	Extraction de l'ADN .....	73
2.4.	Génotypage .....	73
3.	Coloration du squelette au Bleu Alcian et au Rouge Alizarine .....	74
4.	Coupes histologiques .....	74
5.	Colorations histologiques.....	75
5.1.	Bleu Alcian.....	75
5.2.	Safranine-O.....	75
5.3.	Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran .....	75
5.4.	Rouge Alizarine.....	76
5.5.	Rouge Sirius.....	76
6.	Hybridation in situ par la technique du RNAscope (ISH).....	76
7.	Immunohistochimie .....	78
8.	Microscopie de génération de seconde harmonique (GSH) .....	79



9.	Coloration Tartrate Resistant Acid Phosphate (TRAP) .....	79
10.	Préparation des chondrocytes primaires .....	79
11.	Préparation des fibroblastes primaires .....	80
12.	Anabolisme des protéoglycanes .....	80
13.	Extraction des protéines .....	80
14.	Western Blot .....	81
15.	Extraction des ARN et RT-qPCR .....	82
15.1.	Extraction d'ARN.....	82
15.2.	Transcription inverse .....	82
15.3.	qPCR .....	82
16.	Transfection des chondrocytes et essai Luciférase .....	83
17.	Test de prolifération.....	83
18.	Traitement des chondrocytes .....	84
19.	Tests statistiques .....	84
	Objectifs de l'étude .....	85
	Résultats.....	88
1.	Génération des souris XT-I KO.....	89
2.	XT-I est moins exprimé dans les chondrocytes hypertrophiques .....	91
3.	L'inactivation de la XT-I chez la souris conduit à une létalité périnatale .....	93
4.	Les souris XT-I KO présentent un nanisme et des anomalies squelettiques .....	93
5.	Les souris XT-I KO présentent une plaque de croissance de taille réduite .....	95
6.	Prolifération plus importante des chondrocytes chez les embryons XT-I KO .....	97
7.	Synthèse des protéoglycanes est perturbée chez les souris XT-I KO .....	99
8.	Déficience d'anabolisme des protéoglycanes chez les souris XT-I KO .....	99
9.	Désorganisation des fibres de Collagène au niveau de la plaque de croissance des embryons XT-I KO .....	10
10.	L'expression de Sox9 est augmentée chez les souris XT-I KO .....	102
11.	L'inactivation de XT-I affecte la signalisation Ihh .....	103
12.	L'inactivation de XT-I affecte la formation du centre d'ossification primaire.....	105
13.	Formation précoce du centre d'ossification secondaire chez les souris XT-I KO .....	107
14.	L'inactivation de XT-I affecte l'expression et la signalisation de FGFR3.....	109
15.	La signalisation du TGFβR2 est altérée chez les souris XT-I KO.....	111
16.	L'inhibition du FGFR3 restaure l'activation optimale d'ERK1/2 dans les chondrocytes XT-I KO.....	112
	Discussion.....	114
1.	La XT-I est impliquée dans plusieurs pathologies du développement squelettique .....	113
2.	L'inactivation de la XT-I est létale et induit des anomalies squelettiques .....	114
3.	Défauts de chondrogenèse et d'ossification endochondrale chez les embryons XT-I KO .....	114

4.	L'ossification primaire et secondaire sont précoces chez les embryons XT-I KO .....	116
5.	Défauts de synthèse des PGs chez les embryons XT-I KO entraînant des défauts de signalisation .....	117
6.	Surexpression du FGFR3 et perturbation de la signalisation sous-jacente en absence de la XT-I ..	118
7.	Perturbation de la signalisation de TGFβ chez les embryons XT-I KO .....	119
8.	La perte de la XT-I affecte l'organisation et la fibrillation du collagène .....	119
Conclusions et perspectives .....		<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Références .....		120
Articles .....		120

## *Liste d'abréviations*

## Liste d'abréviations

### A

ACAN : Aggrécane

ACH : Achondroplasia

AER : Apical Ectodermal Ridge

ALK1 : Activin receptor-Like Kinase 1

ALK5 : Activin receptor-Like Kinase 5

AMPc : Adenosine Mono-Phosphate cyclic

ARNm : ARN messenger

### B

BMP : Bone morphogenic protein

BSA: Bovine Serum Albumin

B3GalT6 : Beta 3 GalactosylTransfêrase 6

B4GalT7 : Beta 4 GalactosylTransfêrase 7

### C

CA : Cartilage Articulair

Cbfa1 : Core-binding factor subunit alpha-1

CBP : CREB Binding Protein

CDK: Cyclin-Dependent Kinase

COL10A1 : Collagène de type X

COL2A1 : Collagène de type II

CPC : Cetylpyridinium Chloride

CSMs : Cellules souches mésenchymateuses

CSPG : Chondroïtine Sulfate Proteoglycan

### D

DAB: 3,3'-Diaminobenzidine

DBQD-II : Desbuquois Dysplasia type II

DHH: Desert Hedghog

DN-TGF $\beta$ RII : Dominant Negatif TGF $\beta$ RII

DS : Dermatan Sulfate

DSPG : Dermatan Sulfate Proteoglycan

DT : Dysplasia Thanatophore

## **E**

EGF: Epidermic Growth Factor

ERK: Extracellular signal Regulated Kinase

EXT1 : Exotensin 1

EXT2 : Exotensin 2

## **F**

FGF: Fibroblast Growth Factor

FGFR3: Fibroblast Growth Factor Receptor 3

## **G**

G1, G3 : Globular Regions

GAGs : Glucosaminoglycanes

GalNAC : N-Acetyl galactosamine

GALTI :  $\beta$ 1,4 galactosyltransférase I

GALTII :  $\beta$ 1,3 galactosyltransférase II

GFP : Green Fluorescent Protein

GlcA : Acide glucoronique

GlcNAC : N-acétyl glucosamine

GliA : Gli activateur

GliR : Gli Represseur

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

GTs : Glycosyltransferases

## H

HA : Hyaluronic acid

HCH : Hypochondroplasia

HES : Hematoxyline, Eosine, Safranine

HH : Hedgehog

HRP : Horseradish Peroxidase

HS : Heparan Sulfate

HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycan

## I

ICS : Institut de la Clinique de la Souris

IdoA : Iduronic Acid

IHC : Immunohistochimie

IHH : Indian hedgehog

## J

J0 : Jour 0

J10.5 : Jour 10.5

JAK : Janus Kinase

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

## K

KO : Knock-Out

KS : Keratan Sulfate

KSPG: Keratan Sulfate Proteoglycan

## L

LRR : Leucin Rich Repeat

LTBP : Latent TGF-beta Binding Protein

## **M**

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MCDS: Metaphyseal chondrodysplasia, Schmid type

MEK :

MKK : Mitogen-activated protein kinase kinase

MMP : Matrix Metalloprotease

## **O**

OC-Cre : Osteoblast- Cre-recombinase

OPN: Ostéopontine

## **P**

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PGs : Protéoglycanes

PI3K : Phosphoinositide 3 Kinase

PKC : Protein Kinase C

PLC $\gamma$  : Phospholipase C  $\gamma$

POC: Primary ossification center

PSGL-1 : P-Selectine Glycoprotein 1

Ptc : Patched

Ptch1: Patched 1

PTH : Parathyroid Hormone

PTHrR : Parathyroid Hormone Receptor

PTHrP : Parathyroid Hormone related Protein

PVDF : PolyVinylidene Fluoride

PXE : Pseudoxanthoma Elasticum

## **R**

RE : Réticulum Endoplasmique

RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux

RSLP : Rouge Sirius à lumière polarisée

R-Smad : Receptor-Smad

RTK : Receptor Tyrosine Kinase

RUNX2: Runt-related transcription factor 2

## S

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SHG : Secondary Harmonic Generation

SHH : Sonic Hedghog

SLRP : Small Leucin Rich Proteoglycan

SMAD: SMA And Mothers Against Decapentaplegic

Smo : Smoothened

SOC: Secondary Ossification Center

SOX9: SRY bOX 9 (DNA binding SRY box found in Sox family)

SP : Signal Peptide

SPP1 : Secreted Phospho Protein 1

SRY: Sex determining Region of chromosome Y

STAT : Signal Transducer and Activator of transcription

SVF : Sérum de Veau Fœtal

SYND : Syndécan

## T

TAK1 : Transforming growth factor beta Activated Kinase 1

TBST : Tris Buffer Saline Tween 20

TGFβ : Transforming Growth factor

TGFβR2 : Transforming Growth factor Receptor 2



TIMP : Tissular Inhibitor Métalloproteinases

TK1 : Tyrosine Kinase domaine 1

TK2 : Tyrosine Kinase domaine 1

TLR2 : Toll-like 2

TM : Trans-membranaire

TRAP : Tartrate Resistant Acid Phosphatase

## U

UDP : Uridine diphosphate glucose

## V

V0, V1, V2 : Les isoformes du Versican

## W

WT: Wild-type

Wnt : Wingless Integrated

## X

XT-I  $-/-$  : Xylosyltransférase I KO

XT-I  $+/-$  : Xylosyltransférase I Heterozygote

XT-I  $+/+$  : Xylosyltransférase I WT

XT-I : Xylosyltransférase I

XT-II : Xylosyltransférase II

Xyl : Xylose

*Xytl1* : Xylosyltransférase I (gène)

# *Liste des figures et des tableaux*

## Liste des figures

**Figure 1** : Schéma illustrant la contribution des différentes lignées cellulaires embryonnaires à la formation du squelette

**Figure 2** : Schéma illustrant la formation des os intramembranaires

**Figure 3** : Ossification endochondrale

**Figure 4** : Les différents types de cartilage chez l'homme

**Figure 5** : Structure histologique du cartilage articulaire et du cartilage de croissance

**Figure 6** : Mécanisme de transduction de la signalisation IHH

**Figure 7** : Représentation schématique de la structure du FGFR

**Figure 8** : Expression des différents FGFs et de leurs récepteurs durant l'ossification endochondrale développement de la plaque de croissance

**Figure 9** : Mécanisme général de l'activation du récepteur TGF- $\beta$  et Smad

**Figure 10** : Les différents récepteurs de la signalisation TGF $\beta$

**Figure 11** : Organisation et composition et de la MEC

**Figure 12** : Les différentes unités disaccharidiques formant les différents types de PGs

**Figure 13** : Topologie transmembranaire de la XT-I et de la XT-II

**Figure 14** : Schéma représentatif de la procédure de la technique RNAscope

**Figure 15** : Génération des souris XT-I KO

**Figure 16** : Analyse de l'expression de la XT-I et de la XT-II chez les embryons XT-I KO.

**Figure 17** : Les embryons XT-I KO présentent un nanisme et une hypoplasie frontonasale

**Figure 18** : Analyse morphologique et histologique de l'humerus chez les embryons XT-I KO

**Figure 19** : Etude de la plaque de croissance réduite et perturbée chez les embryons XT-I KO et sauvages.

**Figure 20** : Etude de la plaque de croissance chez les embryons XT-I KO et sauvages

**Figure 21** : Défaut de synthèse des protéoglycanes chez les embryons XT-I KO

**Figure 22** : Défauts d'anabolisme des protéoglycanes dans les chondrocytes XT-I KO

**Figure 23** : Désorganisation des fibres de collagène chez les embryons XT-I KO.

**Figure 24** : Analyse de l'expression de SOX9, de COL2A1 et d'ACAN chez les embryons XT-I KO et sauvages.

**Figure 25** : Analyse de l'expression d'IHH et de Runx2 au niveau de la plaque de croissance des embryons XT-I KO et sauvages.

**Figure 26** : L'invalidation de XT-I conduit à une formation accélérée du POC chez les souris

**Figure 27** : Formation précoce du SOC chez les embryons XT-I KO.

**Figure 28** : Analyse de l'expression de FGFR3 et des voies sous-jacentes du FGFR3 chez les souris XT-I KO et sauvages.

**Figure 29** : Analyse de l'expression du TGF $\beta$ 2 et de la voie de signalisation Smad

**Figure 30** : Inhibition *in vitro* de la voie de signalisation FGFR3 dans les chondrocytes XT-I KO et sauvages

## Liste des tableaux

**Tableau I** : Les différentes sous familles de FGFs

**Tableau II** : Les différents variants génétiques de Xylt1 et les différentes dysplasies osseuses associées.

**Tableau III** : Les séquences des amorces utilisées pour le géotypage des embryons

**Tableau IV** : Les conditions utilisées pour la PCR du géotypage

**Tableau V** : Liste des anticorps utilisées en western blot et en immunohistochimie

**Tableau VI** : Les séquences des amorces utilisées pour la QPCR

# *Introduction*

# Chapitre 1 : Le Squelette et le développement des os

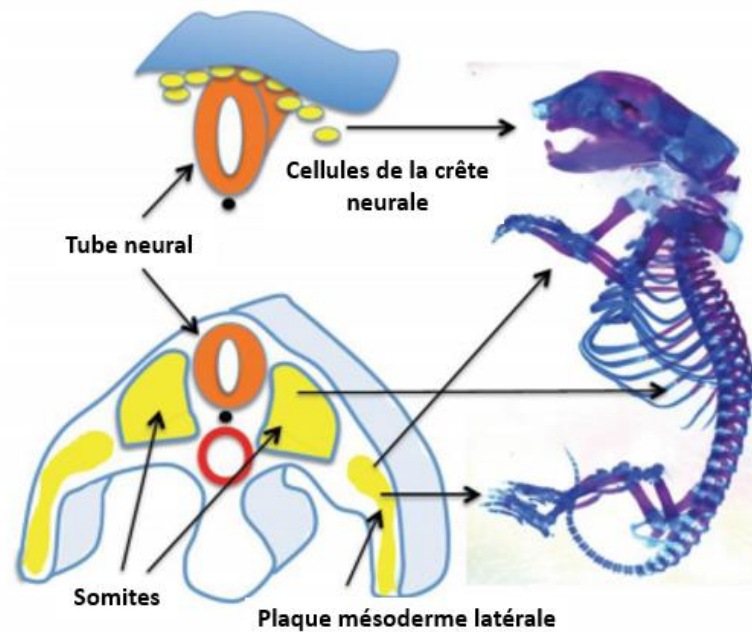
## 1. Le squelette et le développement des os

Le squelette est l'un des systèmes les plus importants chez les vertébrés. Il forme une charpente intérieure très rigide qui protège les organes internes et offre un support solide sur lequel s'attachent les tendons et les muscles qui sont le centre du mouvement et de la locomotion. Le système squelettique est composé d'os et de cartilage et est divisé en deux grandes parties, le squelette axial qui est la partie centrale du corps et comprend la tête, la cage thoracique et la colonne vertébrale, et le squelette appendiculaire qui forme les extrémités du squelette, les membres supérieurs et les membres inférieurs du corps.

Durant les premiers stades du développement embryonnaire, différentes lignées cellulaires contribuent à la formation des différentes parties du squelette. Les cellules de la crête neurale formant les marges dorsales du tube neural migrent dans la région antérieure du crane, donnant naissance à la dentine des dents, aux cartilages et à quelques os du visage du squelette antérieur. Les cellules du mésoderme péri-chondral produisent le cartilage et les os de la partie postérieure du squelette. Cependant les cellules du mésoderme paraxiale (les somites) forment le squelette axial et la plaque du mésoderme latérale forme le squelette appendiculaire (1) (**Figure 1**).

L'initiation de la formation du squelette commence par la migration des cellules mésenchymateuses dérivées de ces lignées embryonnaires aux sites du développement des futurs os. Au niveau de ces sites, les cellules forment un condensat de forte densité cellulaire qui donne la forme et la taille du futur os. Durant la condensation, les cellules mésenchymateuses se différencient soit en ostéoblastes pour former directement l'os (ossification intramembranaire), soit en chondrocytes et forment un modèle de cartilage appelé cartilage anlage qui sera à la base de la formation du futur os (ossification endochondrale).



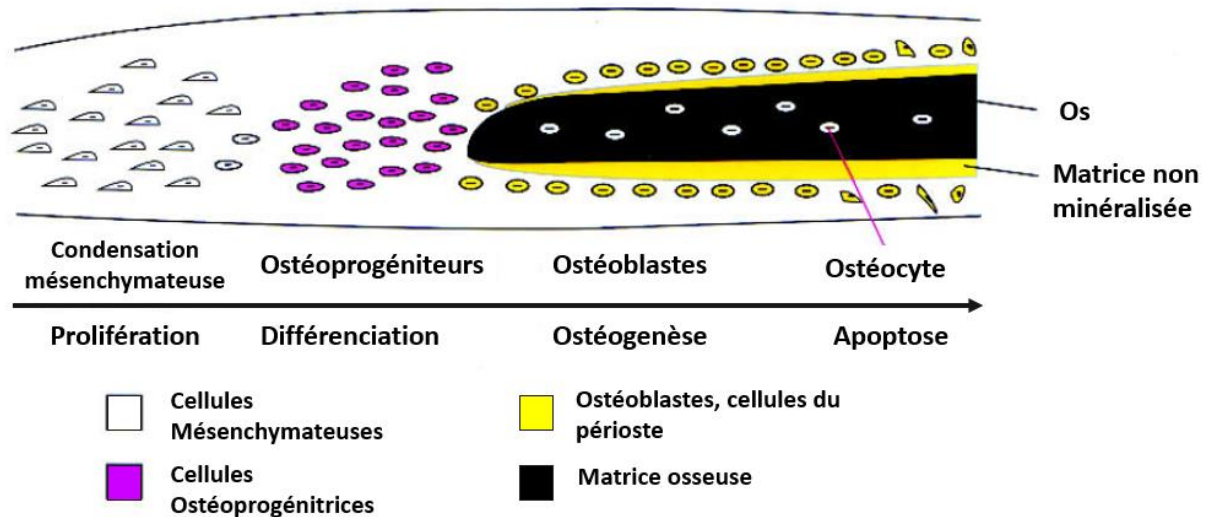


**Figure 1 : Schéma illustrant la contribution des différentes lignées cellulaires embryonnaires à la formation du squelette.** Les cellules de la crête neurale, des somites et de la plaque du mésoderme latéral contribuent à la formation des os crâniotaxiaux, des os du squelette axial et du squelette appendiculaire chez la souris. Le point noir représente le notochorde et l'anneau rouge en trait fin indique l'aorte (D'après Berendsen and Olsen, 2015).

### 1.1. L'ossification intramembranaire

L'ossification intramembranaire donne naissance aux os plats qui comprennent le crâne, les côtes, l'omoplate et les clavicules médiales. La formation des os intramembranaires commence par la condensation des cellules mésenchymateuses qui se différencient directement en ostéoblastes. Les centres d'ossification sont formés par un dépôt de la matrice extracellulaire (MEC) formant des plaques d'os qui s'étendent avec le développement mais qui ne sont pas fusionnées aux jonctions entre les os. La jonction entre les os du crâne est une structure fonctionnelle appelée suture. Celle-ci est responsable du maintien et de la séparation entre les os membranaires et de la régulation de la croissance du crâne. Dans les environs de la suture une minorité de cellules mésenchymateuses ostéogéniques se différencient en cellules ostéoprogénitrices et par la suite en ostéoblastes qui expriment le collagène de type 1, la bone sialoprotéine et l'ostéocalcine. Ils synthétisent ainsi la matrice osseuse tout le long des marges de l'os. La croissance et la différenciation au niveau de la suture est régulée par l'interaction entre le mésenchyme, le front ostéogénique, et la dure mère (une membrane fibreuse formant l'enveloppe externe du cerveau ou doublure interne des os crâniens et des

sutures). Vu que les sutures sont les principaux sites de la croissance des os intramembranaires durant le développement des os de la voûte crânienne, les événements se produisant au niveau de la suture sont essentiels pour la régulation de l'ossification intramembranaire (**Figure 2**) (2).



**Figure 2 : Schéma illustrant la formation des os intramembranaires.** Les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoprogéniteurs (en violet) puis elles deviennent des ostéoblastes matures (en jaune), qui déposent la matrice osseuse. Les ostéoblastes meurent par apoptose ou sont inclus dans la matrice en devenant des ostéocytes (d'après Marie et Ornitz, 2002)

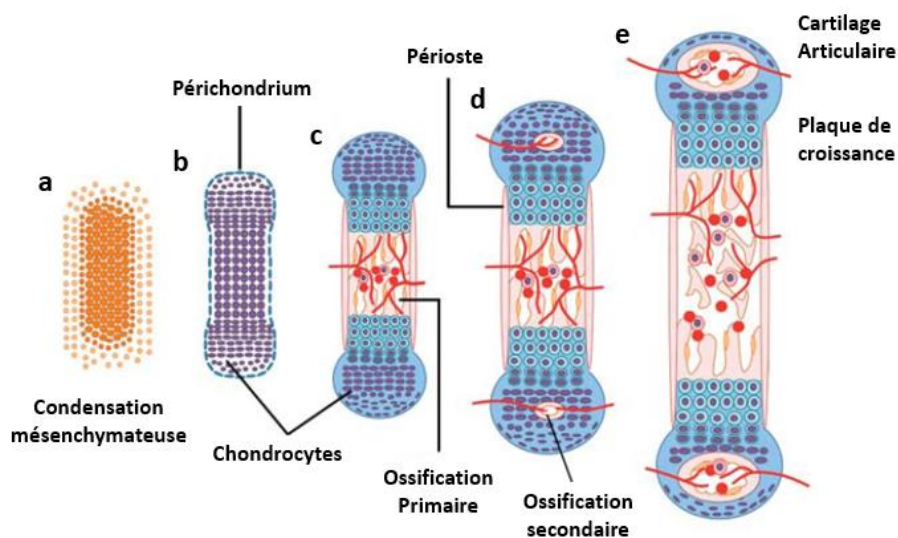
## 1.2. L'ossification endochondrale

L'ossification endochondrale donne naissance aux os longs qui comprennent les os du squelette appendiculaire, les os du visage, les vertèbres et les clavicules latérales médiales. Ce processus est initié par l'agrégation et la condensation des cellules souches mésenchymateuses qui se différencient en chondrocytes et forment un modèle de cartilage appelé le cartilage anlage. Ce dernier s'allonge, s'accroît et les chondrocytes deviennent organisés en quatre zones différentes, zone de réserve, zone proliférative, zone pré-hypertrophique et zone hypertrophique formant ainsi la plaque de croissance. Cette dernière est responsable de la croissance longitudinale jusqu'à ce que l'os se forme complètement (2). La zone de réserve est constituée de petits chondrocytes ronds adjacents à la surface articulaire. Ils se différencient en chondrocytes prolifératifs et deviennent aplatis et s'organisent sous forme de colonnes. Les chondrocytes de réserve et les chondrocytes

prolifératifs sécrètent le collagène de type II et l'aggrécane et d'autres protéines qui forment ainsi la MEC du cartilage. Les chondrocytes prolifératifs se différencient en chondrocytes préhypertrophiques puis en chondrocytes hypertrophiques et sécrètent le collagène de type X et la matrice métalloprotéinase 13 (MMP13) au niveau de la diaphyse, le centre du cartilage anlage (3).

Les chondrocytes hypertrophiques contrôlent la minéralisation de la matrice extracellulaire, ils attirent les vaisseaux sanguins par la production du VEGF et permettent ainsi le recrutement des ostéoblastes et des ostéoclastes. Ils contrôlent aussi la différenciation des cellules du péricondrium adjacent en ostéoblastes et ainsi la formation de l'os cortical. Une fois la diaphyse envahie par les ostéoblastes, ces derniers déposent la matrice minéralisée et le centre d'ossification primaire est formé. Des travaux antérieurs ont suggéré que les chondrocytes hypertrophiques peuvent se différencier en ostéoblastes, suggérant ainsi un rôle direct des chondrocytes hypertrophiques dans le dépôt de la matrice minéralisée et la formation de l'os (3).

La croissance longitudinale des os est particulièrement rapide durant le développement embryonnaire. Durant les premiers stades postnatux, les os s'allongent et le centre d'ossification secondaire est formé au niveau de l'épiphyse avec le même processus que le centre d'ossification primaire. Une fois les centres d'ossification formés, le cartilage reste présent au niveau de deux zones, les extrémités des épiphyses (cartilage articulaire) et entre le centre d'ossification primaire et le centre d'ossification secondaire (cartilage de croissance) (Figure 3) (3).

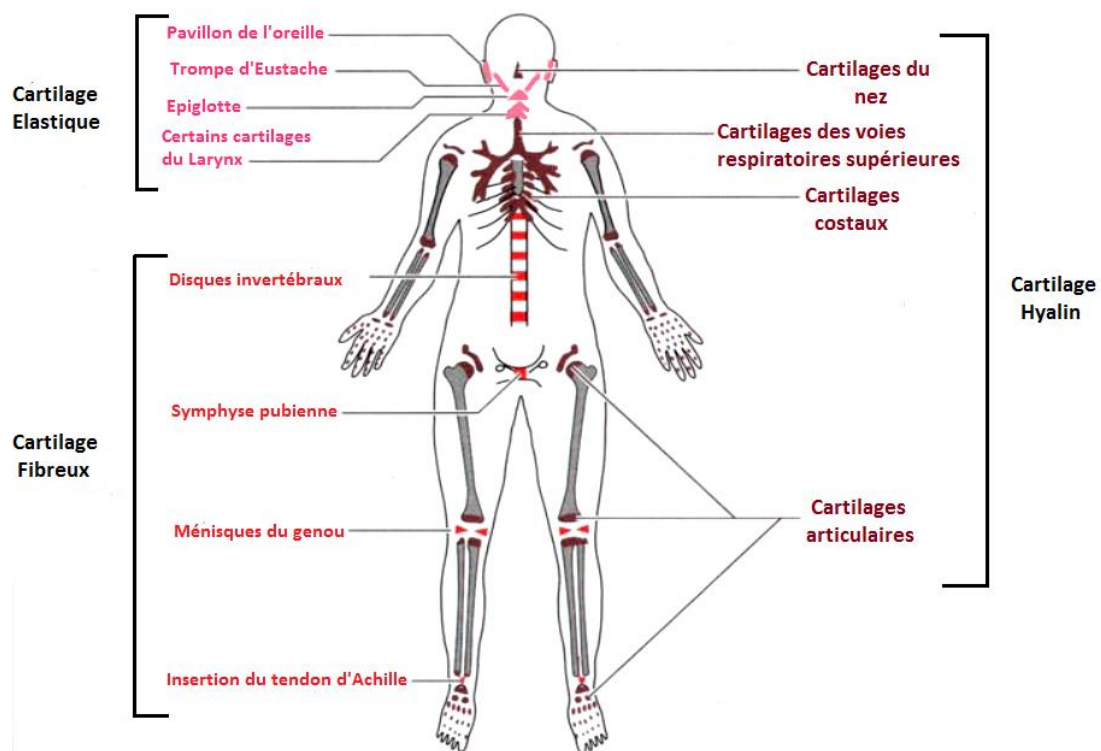


**Figure 3 : Ossification endochondrale.** **a)** Le processus d'ossification endochondrale commence par la condensation des cellules souches mésenchymateuses au niveau des sites de développement du futur os. Ces progéniteurs mésenchymateux se différencient en chondrocytes et forment un modèle de cartilage. **b)** Le modèle de cartilage s'allonge et est entouré par le péricondrium. Les chondrocytes au centre du modèle initient la formation de la plaque de croissance et s'hypertrophient. **c)** Les chondrocytes hypertrophiques sont calcifiés et sont envahis par les micro-vaisseaux pour former le centre d'ossification primaire. **d)** Les vaisseaux sanguins envahissent les épiphyses et forment le centre d'ossification secondaire avec les ostéoblastes et la moelle osseuse. **e)** La plaque de croissance contribue à la croissance des os longs. Le cartilage articulaire procure la résilience et un mouvement en douceur pour les articulations (4) (D'après Usami et al 2016).

## Chapitre 2 : Le Cartilage

## 2. Le cartilage

Le cartilage est le premier tissu squelettique qui se forme durant le développement embryonnaire, c'est un tissu conjonctif non minéralisé et non innervé, dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Il se procure les nutriments et élimine les déchets par diffusion via la membrane synoviale. Chez l'adulte, il est présent au niveau du nez, des oreilles, du tube bronchiale, des côtes, des disques intervertébraux et au niveau des articulations entre les os. Selon la morphologie et la composition de la MEC, ce tissu est divisé en trois types, le cartilage hyalin, le cartilage élastique et le cartilage fibreux. Le cartilage hyalin est le type le plus abondant formant la majorité du squelette embryonnaire. La MEC est composée principalement de collagène de type II, d'élastine et de protéoglycanes (PGs). Chez l'adulte, il est présent au niveau du nez, de la trachée et des côtes. Le cartilage élastique présente une MEC riche en fibres élastiques et en collagène de type II. Ce type de cartilage est présent au niveau des oreilles et de l'épiglotte. Le cartilage fibreux est localisé au niveau des disques intervertébraux, des ménisques des genoux et de la symphyse pubienne. Il contient le collagène de type I (**Figure 4**).



**Figure 4 : Les différents types de cartilage chez l'homme.** Il existe trois types de cartilage au niveau du squelette chez l'homme. Le cartilage hyalin (rouge brique) se trouve sur la majorité des os du squelette, il est riche en collagène de type II. Le cartilage fibreux (rouge)

est riche en fibres de collagène organisées de façon parallèles à la surface, il se trouve au niveau des disques intervertébraux, de la symphyse pubienne et des ménisques des genoux. Le cartilage élastique (rose) riche en élastine se trouve au niveau de l'épiglotte du larynx et au niveau du pavillon de l'oreille (5).

## 2.1. Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est typiquement un cartilage hyalin, il couvre les extrémités des os formant les articulations du corps. Il est composé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes, situés au sein d'une MEC dense composée essentiellement d'eau (60 à 80%) et de macromolécules (20 à 40%). Son épaisseur varie selon l'articulation, elle est plus importante dans les articulations les plus chargées (articulations des membres inférieurs) et maximale sur la rotule.

### 2.1.1. Organisation du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire a une structure hautement organisée composée de 4 zones : la zone superficielle (tangentielle), zone intermédiaire (transitionnelle), zone profonde (radiale) et zone calcifiée. Le phénotype des chondrocytes, la forme des cellules et la structure de la MEC varient d'une zone à l'autre (6,7). Les principaux composants de la MEC sont le collagène (75% du poids sec) et les PGs (20% à 30% du poids sec) (8,9). La teneur en collagène est plus élevée dans la zone superficielle, diminuant à 20% au niveau des zones intermédiaire et profonde. La teneur en PGs est faible au niveau de la zone superficielle, augmentant jusqu'à 50% dans les zones intermédiaire et profonde (8,9). La zone superficielle contient de fines fibres de collagène orientées de façon parallèle à la surface articulaire, dans laquelle les cellules sont allongées et disposées tangentiellement. Au niveau de la zone médiane, les fibres de collagène sont plus épaisses et les cellules sont de forme arrondie ou ovoïde et ont une distribution aléatoire. La zone profonde comporte des cellules qui sont disposées en colonnes courtes bien organisées et est riche en fibres de collagène de type II orientées perpendiculairement à la surface (10). La zone calcifiée contient du collagène de type X et les chondrocytes de cette zone présentent un phénotype hypertrophique (**Figure 5A**). Cette zone sert également d'ancrage aux fibres de collagène sur l'os et procure une résistance considérable pour la jonction entre le cartilage calcifié et l'os sous-chondral.

### 2.1.2. Fonction du cartilage articulaire

La fonction principale du cartilage articulaire est de fournir une surface lisse et lubrifiée pour une articulation à faible friction afin de faciliter la transmission de charge à l'os sous-chondral sous-jacent. Ces caractéristiques spécifiques permettent au cartilage de supporter les forces élevées de contact et de disperser les contraintes de compression résultantes sur l'os sous-chondral sous-jacent. Pour réduire les contraintes de cisaillement, des mécanismes de lubrification complexes sont assurés au niveau de l'articulation. Ces derniers gardent le frottement et l'usure faibles lorsque les surfaces articulaires glissent les unes sur les autres. Le cartilage articulaire est constitué de deux phases : une phase fluide et une phase solide. L'eau est la principale composante de la phase fluide et contribue à 80% du poids humide du cartilage articulaire. Les ions inorganiques tels que le sodium, le calcium, le chlorure et le potassium sont également présents dans cette phase. La phase solide est caractérisée par la MEC, qui est poreuse et perméable (10,11). Les interactions entre les agrégats de PGs et le liquide interstitiel offrent une résilience à la compression par le biais de forces de répulsion électrostatiques négatives. L'application rapide des forces de contact articulaire pendant la charge articulaire provoque une augmentation immédiate dans la pression du liquide interstitiel. Le liquide synovial joue également un rôle essentiel dans le comportement biomécanique, la lubrification, et la nutrition du cartilage articulaire. Il est la principale source de nutriment. Le liquide synovial est un réservoir dynamique de protéines dérivées du cartilage et du tissu synovial ; ainsi, sa composition peut servir de biomarqueur qui reflète la santé et la condition physiopathologique de l'articulation.

## 2.2. Le cartilage de croissance ou la plaque de croissance

Le cartilage de croissance est la structure anatomique spécialisée sur laquelle repose l'édification du squelette, il permet aux os de s'allonger durant la croissance et de se remodeler. Il est délimité par le centre d'ossification épiphysaire d'une part et par le centre d'ossification métaphysaire des os longs d'autre part. Malgré quelques différences, l'organisation générale présente une architecture similaire quelle que soit l'espèce (12,13).

### 2.2.1. Développement de la plaque de croissance

La formation du cartilage de croissance s'effectue au cours de la vie embryonnaire (13,14). Il existe des différences dans la chronologie du développement embryonnaire du cartilage de croissance en fonction de l'os concerné. Chez l'homme c'est au cours de la 6ème semaine du développement embryonnaire que les cellules mésenchymateuses se différencient



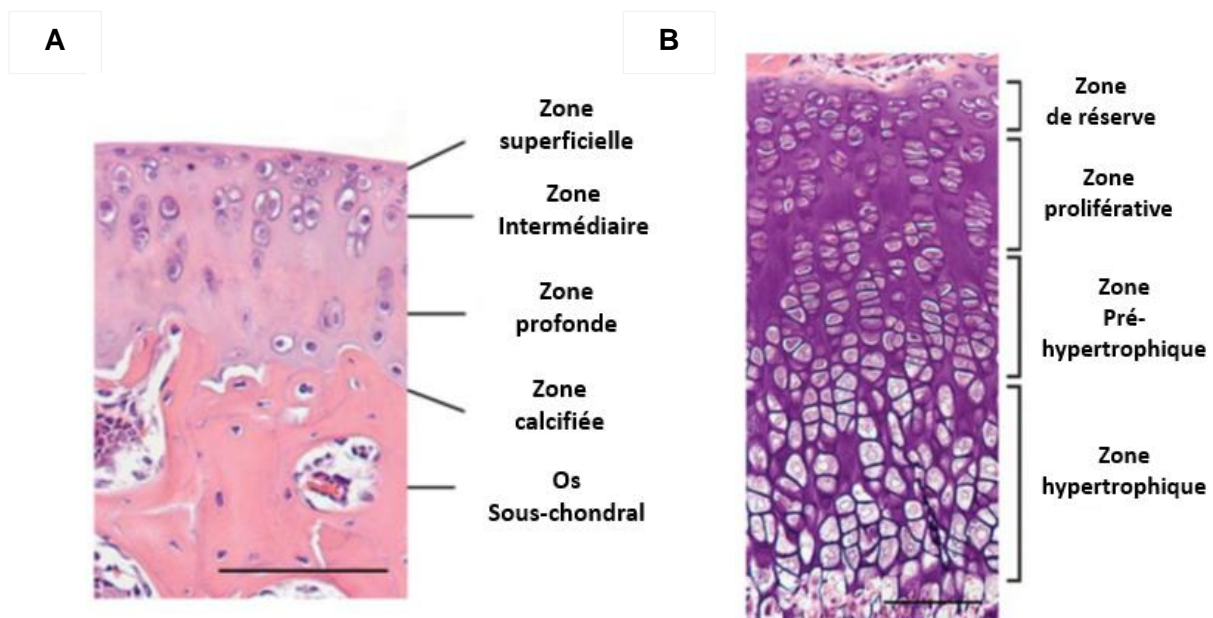
en chondrocytes et se condensent pour former le modèle cartilagineux du futur squelette (14,15). Chez la souris les cellules mésenchymateuses se condensent au stade embryonnaire E11.5 et forment le cartilage anlage au stade E13.5 en se différenciant en chondrocytes (15,16). Le modèle cartilagineux voit sa portion centrale se combler par les chondrocytes hypertrophiques sécrétant une MEC qui commence à se calcifier lors de la 7<sup>ème</sup> semaine chez l'homme et vers le stade E14.5 chez la souris. Une couche de cellules mésenchymateuses, de chondroblastes et de cellules ostéoprogénitrices, entoure le modèle cartilagineux hyalin et forme le périchondre qui deviendra le périoste avec la prédominance des cellules ostéoprogénitrices.

Au terme de la 8<sup>ème</sup> semaine chez l'homme et au stade E15.5 chez la souris, le centre du cartilage anlage est envahi par des bourgeons vasculaires qui assurent l'arrivée de cellules mésenchymateuses qui se différencieront en ostéoblastes et en ostéoclastes au sein de cette partie centrale. Les chondrocytes hypertrophiques meurent et sont remplacés par des ostéoblastes qui commencent à sécréter la matrice osseuse. Ce processus sera à l'origine de l'ossification endochondrale (17,18). Le centre du modèle cartilagineux, appelé diaphyse se remplit progressivement de moelle osseuse ainsi que d'os alors que les extrémités, ou épiphyses restent cartilagineuses. Le centre d'ossification apparaît par la suite avec la persistance d'une zone cartilagineuse entre l'épiphyse et la métaphyse. Les cartilages de croissance sont formés et se développent à chaque extrémité des os longs dès la 9<sup>ème</sup> semaine chez l'homme et à 5-7 jours après la naissance chez la souris (17,18). A la naissance, le cartilage de croissance est clairement identifié. Il assure la croissance longitudinale grâce à la prolifération et l'hypertrophie des chondrocytes.

### 2.2.2. Organisation et fonction de la plaque de croissance

La croissance osseuse longitudinale se produit au niveau de la plaque de croissance par l'ossification endochondrale, dans laquelle le cartilage se forme et se transforme ensuite en tissu osseux (19,20). La plaque de croissance des mammifères est composée de trois zones principales : une zone de repos, une zone proliférative et une zone hypertrophique. Les chondrocytes dans la zone de repos sont sphériques et sont dispersés de manière irrégulière dans un lit de matrice cartilagineuse, alors que les chondrocytes dans les zones proliférative et hypertrophique sont organisés en colonnes parallèles au grand axe de l'os (19,20). La zone proliférative joue un rôle crucial dans la formation des os endochondraux (21). Lorsqu'un chondrocyte en zone proliférative se divise, les deux cellules filles s'alignent le long du grand axe de l'os. Par conséquent, les clones de chondrocytes sont disposés en colonnes parallèles à

cet axe. Cette orientation spatiale dirige la croissance dans une direction spécifique et est donc responsable de la forme allongée prise par de nombreux os endochondraux. Le mécanisme par lequel les chondrocytes prolifératifs se reconnaissent et s'alignent le long de cet axe est encore mal connu. La zone hypertrophique joue également un rôle clé dans la formation des os endochondraux. Les chondrocytes hypertrophiques sont générés par la différenciation terminale des chondrocytes de la zone de prolifération les plus éloignés de l'épiphyse. Ces cellules cessent de se diviser puis s'hypertrophient, contribuant de manière substantielle au processus de croissance (22). La zone hypertrophique initie l'ossification en permettant l'invasion vasculaire à partir de l'os adjacent (23). La zone de repos apporte une contribution importante à la formation de l'os endochondral. Elle contient des cellules en forme de tige qui donnent naissance à des clones de chondrocytes prolifératifs. Elle stimule la production de IHH qui est un facteur d'orientation de la plaque de croissance, un morphogène, qui dirige l'alignement des clones prolifératifs en colonnes parallèles au grand axe de l'os. Elle produit également le PTHrP qui est un morphogène qui inhibe la différenciation terminale des chondrocytes de la zone de prolifération à proximité et peut donc être partiellement responsable de l'organisation de la plaque de croissance en zones distinctes de prolifération et d'hypertrophie (24) (**Figure 5B**).



**Figure 5 : Structure histologique du cartilage articulaire et du cartilage de croissance.**

**A)** Le cartilage articulaire de souris âgées de 8 semaines. Il est constitué de quatre zones différentes : zone superficielle, zone intermédiaire, couche profonde ou radiale et couche calcifiée bordée de l'os sous-chondral. **B)** Le cartilage de croissance d'un tibia (partie

proximale) de souris âgées de 4 semaines. Il est caractérisé par plusieurs zones morphologiquement bien distinctes : zone de repos, zone proliférative, zone pré-hypertrophique et zone hypertrophique (D'après Usami et al., 2016).

## Chapitre 3 : Régulation de l'ossification endochondrale

### 3. Régulation de l'ossification endochondrale

La majorité des os du squelette est formée par l'ossification endochondrale. Ce processus qui repose sur le développement de la plaque de croissance est un processus étroitement régulé par des facteurs de transcription, des facteurs de croissance et plusieurs constituants de la MEC. Dans la partie suivante nous décrivons un ensemble de molécules régulatrices et qui sont exprimées au niveau de la plaque de croissance et qui jouent un rôle essentiel dans l'ossification endochondrale aussi bien au niveau de la plaque de croissance qu'au niveau de l'os.

#### 3.1. Régulation par des facteurs de transcription

##### 3.1.1. SOX9

SOX9 est un facteur de transcription de la famille des facteurs SOX (Sry-related HMG **box**), caractérisés par un motif de liaison à l'ADN à la boîte HMG (High-Mobility-Group), apparenté au facteur déterminant du sexe Y (SRY). Il joue un rôle central dans la chondrogenèse et la régulation de la différenciation chondrocytaire (25,26). Il est exprimé au niveau des cellules mésenchymateuses condensées et au niveau des chondrocytes de réserve et des chondrocytes prolifératifs. Des mutations hétérozygotes au niveau du gène de SOX9 engendrent la dysplasie campomélique, une forme sévère de chondrodysplasie chez l'homme, caractérisée par une hypoplasie des éléments squelettiques endochondraux (27,28). L'haploinsuffisance de SOX9 engendre également une chondrodysplasie chez la souris et une perte complète de SOX9 au niveau du mésenchyme péri-chondrogénique des membres inhibe complètement la chondrogenèse (25,29,30). Des études récentes ont montré que SOX9 est indispensable à l'initiation de la condensation mésenchymateuse et qu'il est nécessaire au déroulement des étapes ultérieures de différenciation chondrocytaire (31). En effet, des cellules souches embryonnaires invalidées pour le gène de SOX9 (SOX9  $-/-$ ) ont été injectées dans des blastocystes de type sauvage et il a été constaté que les cellules SOX9  $-/-$  ne contribuent pas aux condensations mésenchymateuses chondrogéniques et n'expriment pas les marqueurs chondrogéniques, le collagène (Col2a1) et l'aggrécane (Acan) (25). Par conséquent, SOX9 est défini comme le régulateur principal de la chondrogenèse et comme un régulateur important de l'expression des gènes codant pour des protéines spécifiques de la matrice des chondrocytes comme le collagène de type II et l'aggrécane (32,33). SOX9 régule la différenciation des chondrocytes en liaison avec SOX5 et SOX6 (29,34). Ces trois facteurs

se lient de manière coopérative et aux gènes spécifiques de la MEC du cartilage et activent leur expression (35,36).

### 3.1.2. RUNX2

RUNX2 est un facteur de transcription à domaine runt (domaine de liaison à l'ADN), il joue un rôle important dans la promotion de l'hypertrophie des chondrocytes. Il est initialement exprimé au niveau du mésenchyme chondrogénique, ultérieurement à SOX9 (29,37). Après la formation du cartilage anlage, RUNX2 est exprimé principalement au niveau des cellules péri-chondriales et des ostéoblastes ainsi qu'au niveau des chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques. Plusieurs études ont soutenu que RUNX2 est un régulateur positif de l'hypertrophie. En effet, les souris RUNX2 - / - sont dépourvues de chondrocytes hypertrophiques au niveau de plusieurs éléments squelettiques en développement (38,39). De plus, la surexpression de RUNX2 dans les chondrocytes entraîne l'hypertrophie précoce, et corrige également les défauts d'hypertrophie observée chez les souris RUNX2 - / - (40-42). En outre, l'expression d'un mutant dominant négatif de RUNX2 inhibe l'hypertrophie chondrocytaire (42). Le rôle de RUNX2 dans l'hypertrophie des chondrocytes est assuré de manière coopérative avec RUNX3. En effet, la suppression simultanée des deux engendre un blocage complet de l'hypertrophie dans tous les éléments du squelette endochondrale (43). Enfin, RUNX2 régule le développement de la plaque de croissance par des mécanismes indirects, en régulant l'expression péri-chondriale de FGF18, qui active à son tour différentes voies de signalisation au niveau des chondrocytes (44). D'autre part, RUNX2 joue un rôle primordial dans la différenciation des ostéoblastes. La délétion homozygote de RUNX2 ou de ses gènes cibles chez la souris engendre une absence totale d'ostéoblastes et d'ossification (le squelette reste cartilagineux) (45,46). De façon intéressante, l'absence de RUNX2 au niveau du péri-chondrium (contenant normalement des progéniteurs ostéogéniques), conduit à l'hypoplasie (45,46), indiquant que RUNX2 serait nécessaire pour la production et la maintenance des progéniteurs. En plus de la différenciation des ostéoblastes, RUNX2 est indispensable pour la fonction des ostéoblastes matures (47).

## 3.2. Régulation par des facteurs extracellulaires

### 3.2.1. PTHrP

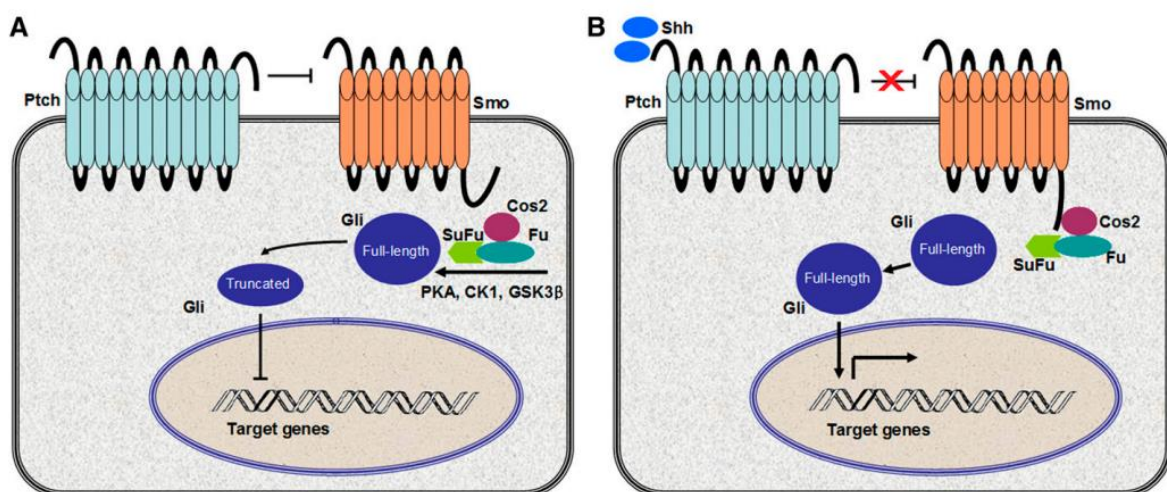
PTHrP (parathyroïde hormone-related peptide) est un facteur paracrine fortement exprimé par les cellules de la région péri-articulaire et par les chondrocytes de réserve près de

la surface articulaire (48). Le récepteur de PTHrP (PTHR1) est exprimé au niveau des chondrocytes prolifératifs et au niveau des chondrocytes pré-hypertrophiques à des niveaux plus élevés (49,50). L'inactivation ciblée du gène codant pour PTHrP ou de son récepteur chez la souris entraîne une létalité néonatale et un nanisme avec des membres courts dû à une hypertrophie prématurée des chondrocytes (51,52), indiquant ainsi un rôle clé de la signalisation PTH dans la suppression de l'hypertrophie des chondrocytes au niveau de la plaque de croissance. De même chez l'homme, des mutations inactivatrices au niveau du récepteur PTHR1 induisent la chondrodysplasie de Blomstrand qui est caractérisée par une maturation squelettique précoce avec un raccourcissement des os longs et une augmentation de la densité osseuse (51,53,54). Les mutations activatrices du gène de PTHR1 causent une chondrodysplasie métaphysale de Jansen (55,56). PTHrP semble retarder l'hypertrophie chondrocytaire, principalement en activant la signalisation dépendante de l'AMPC qui augmente l'activité de SOX9 (57,58).

### 3.2.2. Ihh

Ihh (Indian Hedgehog) est un membre de la famille des molécules de signalisation Hedgehog (HH). Cette famille comprend trois types de protéines : Indian Hedgehog (Ihh), Sonic Hedgehog (SHH) et Desert Hedgehog (DHH). Elle joue un rôle fondamental dans le développement et est conservée au cours de l'évolution (59–61). La transduction du signal HH est assuré par Smoothened (SMO), un récepteur à sept domaines transmembranaires et contrôle l'activation et la localisation subcellulaire des facteurs de transcription Gli (Glioma-Associated Oncogene Homolog) (Gli 1-3) qui régulent en aval l'expression des gènes cibles (**Figure 6**). Au cours du développement du cartilage, Ihh est principalement exprimé au niveau des chondrocytes pré-hypertrophiques. Il agit sur les chondrocytes prolifératifs et les cellules péri-chondriales sous-jacentes (49,50). Il se lie à la protéine membranaire patch1 (Ptc), qui bloque l'activité de Smo en l'absence des ligands Ihh. Lorsque Ihh se lie à Ptc, Smo est activé. L'activation de Smo conduit à la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de HH, y compris le gène de Ptc (**Figure 6**) (60). Les embryons Ihh *-/-* ont montré une réduction sévère de la prolifération chondrocytaire et une accélération de l'hypertrophie (49,62). Des manipulations génétiques ultérieures de Smo dans les chondrocytes ont révélé que la signalisation directe d'Ihh est nécessaire pour la prolifération des chondrocytes (62), mais pas pour la régulation de l'hypertrophie des chondrocytes. La signalisation directe d'Ihh régule également l'organisation des chondrocytes en colonne à partir des chondrocytes de réserve au niveau de la zone proliférative (63,64). L'hypertrophie dépend principalement de PTHrP

(49,62,65). En effet, *Ihh* régule l'initiation de la différenciation hypertrophique par une boucle de rétro-contrôle négatif liée à PTHrP. Il stimule l'expression de PTHrP au niveau des chondrocytes périarticulaires ce qui inhibe l'hypertrophie des chondrocytes et maintient les cellules en phase proliférative (66). En outre, il est également rapporté que *IHH* stimule la prolifération et la maturation des chondrocytes indépendamment de PTHrP (64). Le contrôle de PTHrP par *Ihh* semble se faire par la signalisation directe d'*IHH* dans les cellules cibles, ainsi l'inactivation tissu spécifique de *Smo* (avec *Col2a1-CreERTM*) entraîne une perte correspondante de l'expression de PTHrP dans la région périarticulaire (63). Enfin, le rôle de l'*Ihh* dans la prolifération des chondrocytes et l'expression de PTHrP est principalement médié par l'activation du répresseur de *GLI3*. *GLI3* jouerait un rôle positif dans l'hypertrophie, son activation par *Ihh* inhibe l'hypertrophie. L'élimination simultanée de *GLI3* et d'*Ihh* rétablit la prolifération normale, l'expression de PTHrP et l'hypertrophie (67,68). *Ihh* stimule également la différenciation des cellules progénitrices en ostéoblastes au niveau du péri-chondre. Dans l'ensemble, ces études appuient un modèle dans lequel *Ihh* et PTHrP régulent conjointement la prolifération et la maturation des chondrocytes.



**Figure 6 : Mécanisme de transduction de la signalisation IHH.** A) En l'absence de son ligand (HH), le récepteur Ptc inhibe Smo. Le régulateur négatif *Sufu* (*suppressor of fused*) interagit avec les formes activatrices des facteurs de transcription Gli associées à la voie HH et les maintient en dehors du noyau. La forme répressive des facteurs Gli générée migre dans le noyau et bloque la transcription des gènes cibles. B) En présence de HH, l'inhibition exercée par Ptc sur Smo est levée. Smo active Gli et la translocation de ce dernier dans le noyau permet d'induire la transcription des gènes cibles de la voie, comme *Ptc* et *Gli1* (69).



### 3.3. Régulation par les facteurs de croissance

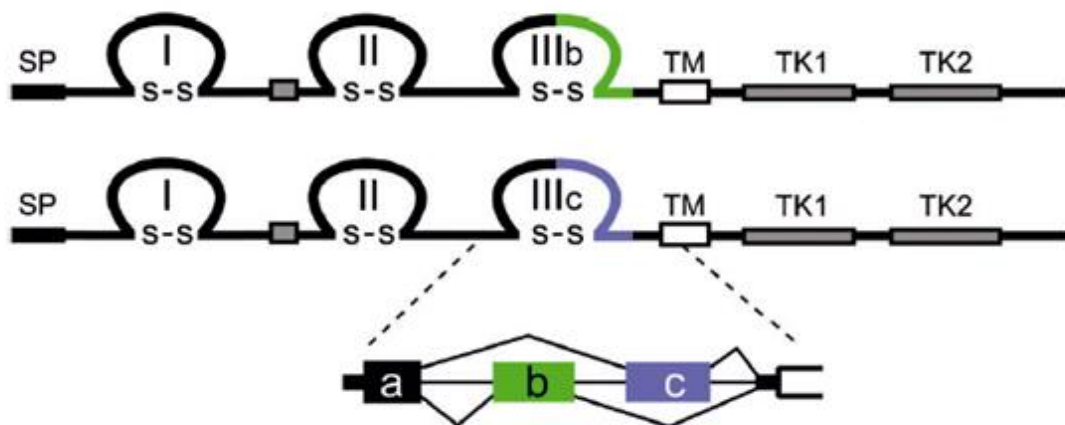
#### 3.3.1. FGF

La famille des FGF (Fibroblast Growth Factor) de mammifères comporte 22 gènes, dont 18 codent pour des protéines qui signalent à travers les récepteurs FGF à tyrosine kinase. Les FGFs sont regroupés en plusieurs sous-familles selon la fonction biochimique, les similarités de séquence, et les relations évolutives. Il existe 5 sous-familles de FGF paracrine, une sous-famille de FGF endocriniens et une sous-famille de FGFs intracellulaires (70–75) (**Tableau I**). Les FGFs se lient à leurs récepteurs de haute affinité : les récepteurs FGFR1-4 et médient leurs réponses cellulaires avec une affinité distincte pour chaque FGFR. Comme d'autres récepteurs à tyrosine kinases (RTK), un FGFR prototype contient un domaine extracellulaire de liaison au ligand, une région transmembranaire hydrophobe, et un domaine tyrosine kinase intracellulaire (76). Les FGFRs ont deux isoformes majeures générées par l'épissage alternatif de la troisième boucle immunoglobuline extracellulaire, boucle au niveau des transcrits FGFR, IIIb et IIIc (77) (**Figure 7**). Les FGFs se lient au domaine extracellulaire des FGFRs et induisent une dimérisation des récepteurs et une phosphorylation des résidus tyrosine au niveau de leur domaine intracellulaire. Le FGFR activé recrute des protéines cibles au niveau de l'extrémité de son domaine cytoplasmique et les modifie principalement par phosphorylation (78). Plusieurs voies effectrices de la signalisation des FGFs existent, telles que les voies STAT, MAPK, PI3K / AKT, PLC $\gamma$  /PKC. Ces voies de signalisation sont associées à la phosphorylation de résidus tyrosine spécifiques et régulent plusieurs fonctions cellulaires, telles que la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie et la production matricielle (78,79).

Sous famille de FGF	FGF	Type of FGF	Récepteur
Sous famille FGF1	FGF1 FGF2	Canonique/Paracrine	FRGR 1, 2, 3, 4
Sous famille FGF4	FGF4 FGF5 FGF6	Canonique/Paracrine	FRGR 1, 2, 3, 4
Sous famille FGF7	FGF3 FGF7 FGF10 FGF22	Canonique/Paracrine	FGFR 1, 2
Sous famille FGF8	FGF8 FGF17 FGF18	Canonique/Paracrine	FRGR 1, 2, 3, 4

Sous famille FGF9	FGF9 FGF16 FGF20	Canonique/Paracrine	FRGR 1, 2, 3, 4
Sous famille FGF11	FGF11 FGF12 FGF13 FGF14	Intracellulaire	Pas de récepteur
Sous famille FGF15/19	FGF15/19 FGF21 FGF23	Hormonale/Endocrine	FGFR 1, 2, 3 FGFR 1, 3 FGFR 1, 3, 4

**Tableau I : Les différentes sous-familles de FGFs.** Les différents FGFs sont regroupés en plusieurs sous-familles. Il existe cinq sous-familles paracrines, une sous famille endocrine et une sous famille de FGF intracellulaires (D'après Ornitz and Itoh, 2015). Les FGFs (paracrines et endocrines) se lient aux différents FGFRs (1-4) avec une affinité distincte et médient leurs réponses cellulaires spécifiques.

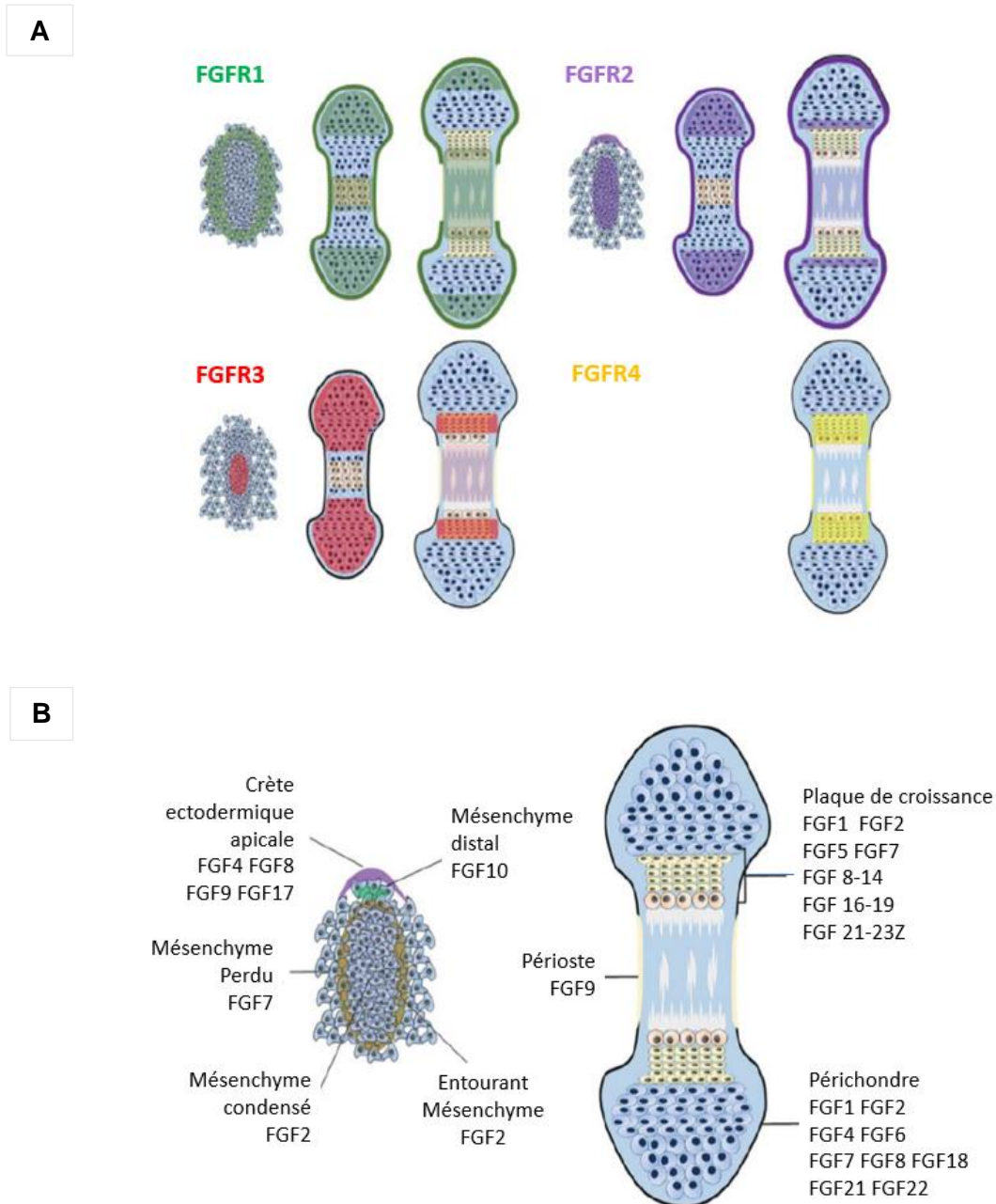


**Figure 7 : Représentation schématique de la structure du FGFR.** Le FGFR est un récepteur tyrosine kinase d'environ 800 acides aminés, il est constitué de plusieurs domaines, trois domaines extracellulaire de type immunoglobuline (I, II et III), un domaine transmembranaire hydrophobe (TM) et deux domaines de tyrosine kinase intracellulaire (TK1 et TK2). SP indique une séquence signal de sécrétion clivable. La famille FGFR est composée de quatre membres, FGFR1-FGFR4. Parmi eux, FGFR1, FGFR2 et FGFR3 génèrent deux variants d'épissage du domaine III, appelés IIIb et IIIc, qui sont des déterminants essentiels de la spécificité de liaison au ligand (D'après Ornitz and Itoh, 2015).

### 3.3.1.1. L'expression des FGFs et de leurs récepteurs durant le développement du squelette

L'expression spatio-temporelle des FGFs et de leurs récepteurs FGFRs durant le développement squelettique est bien caractérisée (3,81,82). FGFR1 est exprimé de manière diffuse au niveau du mésenchyme des bourgeons des membres et au niveau des somites. Il est également exprimé au niveau des chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques et au niveau du péricondrium. Il est fortement exprimé dans les ostéoblastes différenciés et dans les ostéocytes (83–86). FGFR2 a été détecté au niveau du mésenchyme de condensation des bourgeons précoces des membres (87–89) et apparaît comme le premier marqueur de la condensation préchondrogénique. FGFR2 est principalement exprimé au niveau du péricondrium et du périoste. Il est faiblement exprimés au niveau de l'endoste et de l'os trabéculaire au cours du développement des membres (90). En outre, l'expression de FGFR2 a été observée dans le cartilage, en particulier dans la zone de repos (85,91–93). Dans les sutures crâniennes, FGFR2 a été détecté dans les cellules ostéoprogénitrices et dans les ostéoblastes (94). L'expression du FGFR3 a été observée dans les chondrocytes situés dans le noyau central de la condensation mésenchymateuse (95). Une fois la plaque de croissance épiphysaire formée, FGFR3 est exprimé dans tous les chondrocytes sauf les chondrocytes hypertrophiques (82,83,87,95–97). L'expression du FGFR3 a également été retrouvée dans les ostéoblastes et dans les ostéocytes (98,99). En outre, FGFR3 a été détecté au niveau du périoste de la tête et au niveau des fronts suturaux ostéogéniques (87,91). FGFR4 est faiblement exprimé au niveau des ostéoblastes des os calvaires et au niveau des zones de repos et prolifératifs de la plaque de croissance (85,100,101). FGF1 a été retrouvé au niveau des chondrocytes prolifératifs et hypertrophiques (102). FGF2 est exprimé dans les bourgeons des membres, dans les chondrocytes et les ostéoblastes (85,103–105). Quatre FGFs sont exprimés dans la partie apicale de la crête ectodermique (AER) de la souris : FGF4, FGF8, FGF9 et FGF17 (106,107). FGF1, 2, 4, 8, 9 et en particulier le FGF18, qui est produit par le péricondrium, se lie à et active le FGFR3 (108). FGF9 est exprimé au niveau du mésenchyme environnant les condensations cartilagineuses et également au niveau des chondrocytes, des tissus spongieux primaires et du péricondrium / périoste (109). FGF10 est exprimé au niveau du domaine présomptif des membres (110–112), et son expression persiste dans le mésenchyme sous l' AER (Apicale Ectodermal Ridge) après formation initiale du bourgeon des membres (112). FGF18 est exprimé au niveau du péricondrium, des cellules mésenchymateuses et des ostéoblastes (113,114). FGF1, 2, 6, 7, 9, 18, 21 et 22 sont exprimés au niveau du péricondrium, alors que FGF2, 7, 18 et 22 sont exprimés dans la plaque de

croissance chez le rat (85). Les transcrits des FGF1, 2, 5, 8-14, 16-19 et 21 ont également été détectés dans la plaque de croissance, mais seul les FGF1, 2, 17 et 19 ont été retrouvés au niveau protéique (102). Le FGF23 est principalement synthétisé par les ostéocytes et les ostéoblastes (115). Récemment, l'expression du FGF23 a été détectée dans les chondrocytes au repos et les chondrocytes hypertrophiques (116) (**Figure 8**).



**Figure 8 : Expression des différents FGFs et de leurs récepteurs durant l'ossification endochondrale et le développement de la plaque de croissance. L'expression des**

récepteurs est illustrée par des codes couleurs sur le schéma (A) et l'expression des FGFs est représenté sur le schéma (B) (D'après Ornitz and Itoh, 2015).

### 3.3.1.2. Le rôle des FGFs durant le développement du squelette

La signalisation FGFs / FGFRs joue un rôle important dans la régulation du développement osseux. Des mutations au niveau des gènes codant pour les différents FGFs et FGFRs sont responsables de plusieurs anomalies du développement squelettique (117–123). En effet, des mutations activatrices au niveau du gène du FGFR3 sont à l'origine de plusieurs dysplasies tel que l'hypochondroplasie (HCH), l'achondroplasie (ACH) et la dysplasie thanatophorique (DT) avec une ossification endochondrale dérégulée (124,125). Des souris portant des mutations au niveau du FGFR3 semblables à celles retrouvées chez les individus atteints de l'ACH présentent un corps de taille réduite, un crâne en forme de dôme et des os longs raccourcis avec une plaque de croissance désorganisée (2,121,126–129). Des souris mimant la TDII humaine suite à la mutation de la Lysine 644 en acide glutamique (K644E) au niveau du FGFR3 montrent une augmentation de la taille de la zone des chondrocytes prolifératifs et une réduction de celle des chondrocytes hypertrophiques indiquant ainsi que FGFR3 régule négativement la prolifération et la différenciation des chondrocytes au cours du développement embryonnaire (130,131).

En effet, des études ont indiqué que l'activation de la signalisation du FGFR3 inhibe la prolifération des chondrocytes en induisant l'expression de p21 *via* la voie de signalisation de STAT1 (131–134) et favorise la différenciation hypertrophique terminale des chondrocytes *via* la voie de signalisation des MAPK (135,136). Chen et al., (1999) ont montré que les modèles de souris d'ACH présentent une forte expression des inhibiteurs du cycle cellulaire, notamment p16 et p19 au niveau de la plaque de croissance. D'autres études ont montré que les protéines p21 et p27 sont augmentées lors du traitement par le FGF2 et que l'expression de p21 est augmentée dans les chondrocytes des enfants atteints d'achondrodysplasie (137,138). Ces résultats indiquent que l'augmentation des inhibiteurs du cycle cellulaire par la voie de signalisation FGF/FGFR contribue à l'arrêt de la croissance cellulaire des chondrocytes. D'autre part, il a été montré que le FGFR3 inhibe la prolifération des chondrocytes par la diminution de l'expression de la transcriptase inverse et la réduction de l'activité de la télomérase (139). FGFR3 peut induire également l'apoptose des chondrocyte (70,140–143). FGFR3 est également impliqué dans la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Minina et al., (2002) ont révélé que la signalisation FGF / FGFR3 accélère la différenciation hypertrophique des chondrocytes au niveau des membres inférieurs en culture. Inversement,

le déficit en FGFR3 chez la souris provoque l'augmentation de la longueur des os grâce à l'augmentation de la taille de la zone des chondrocytes hypertrophiques (96,118).

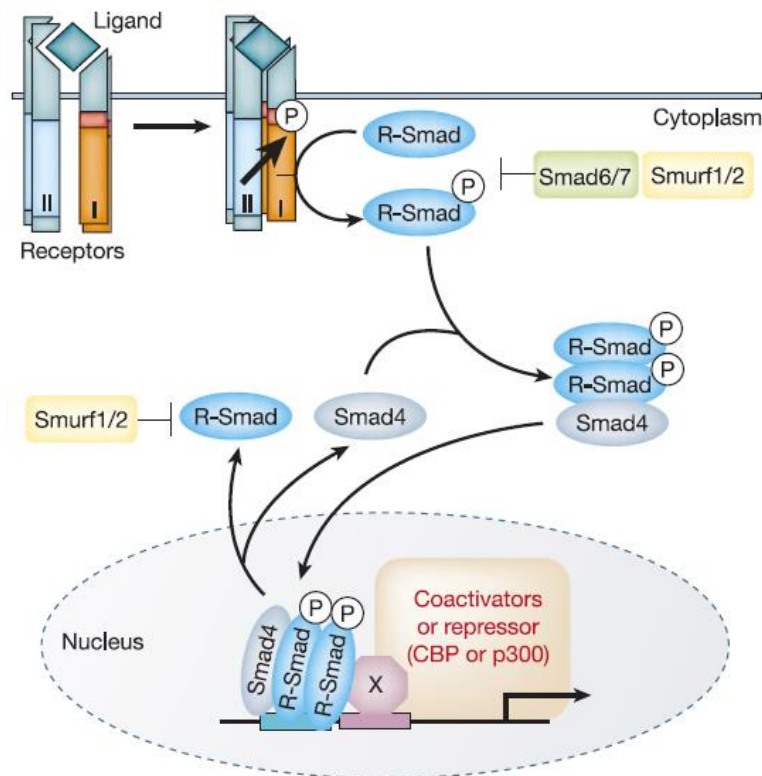
FGFR3 est également impliqué dans la voie de signalisation IHH. En effet, le FGFR3 engendre la diminution de la signalisation d'IHH au niveau des chondrocytes de la plaque de croissance et des cellules du péri-chondre (127,130). La voie JAK / STAT a été décrite comme médiateur de la régulation négative de la signalisation PTH / PTHRP par le FGFR3 (144,145). Shung et ses collègues ont montré que les mutations au niveau du FGFR3 engendrent une dérégulation au niveau de l'expression de SOX9 et de la  $\beta$ -caténine et de leurs activités au niveau des plaques de croissance et ils ont suggéré que cette dérégulation pourrait être le mécanisme à l'origine des dysplasies squelettiques induites par les mutations du FGFR3 (146).

FGFR3 régule également l'ostéogénèse (Marie et al. 2012). Les souris portant la mutation P244R au niveau du récepteur FGFR3 mimant le syndrome de Muenke, présentent un crâne arrondi, un museau raccourci et une diminution de l'épaisseur corticale et de la densité osseuse, indiquant ainsi que le FGFR3 participe à la régulation de l'ostéogénèse (147). Mugniery et ses collègues ont montré que l'activation des voies de signalisation du FGFR3 peut affecter la formation de l'os trabéculaire par un mécanisme paracrine et que le FGFR3 exerce un effet direct sur les ostéoblastes (148). La délétion conditionnelle du FGFR3 dans les ostéoblastes conduit à une altération de la formation et du remodelage osseux, indiquant le rôle vital du FGFR3 dans la différenciation et la fonction des ostéoblastes. FGFR3 exerce également un rôle indirect sur les ostéoclastes. En effet, la suppression ou l'activation du FGFR3 conduisent à une minéralisation défectueuse des os et à une ostéopénie avec une activité ostéoclastique modifiée, indiquant un effet sur les ostéoclastes (98,149).

### 3.3.2. TGF $\beta$

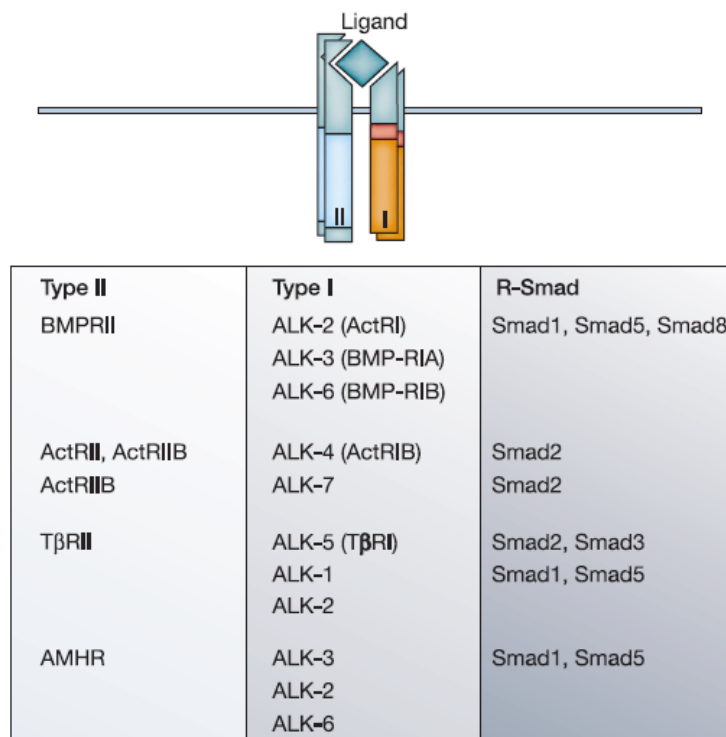
Les membres de la superfamille des facteurs TGF $\beta$ s (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) sont des molécules de signalisation qui régulent de nombreux aspects du développement notamment, la croissance et la différenciation (150,151). Cette famille comprend plusieurs isoformes : les activines, les inhibines, les facteurs de croissance et de différenciation (GDF) et les protéines de morphogénèse osseuse (BMP). Il existe trois TGF $\beta$ s chez les mammifères : TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3. Ils induisent leur réponse cellulaire par interaction avec un complexe tétramérique de récepteurs qui comprend deux récepteurs TGF $\beta$  type I (TGF $\beta$ RI/ALK5) et deux récepteurs kinases (TGF $\beta$ RII). TGF $\beta$ RII phosphoryle TGF $\beta$ RI

(**Figure 9 et 10**) et engendre la phosphorylation et l'activation des récepteurs Smads (R-Smads), Smad2 et Smad3. Les R-Smads interagissent avec un Smad commun, Smad4, avant d'être transloqués dans le noyau, où ils recrutent des cofacteurs tels que la CREB binding protein (CBP) ou p300 pour réguler la transcription de gènes cibles (**Figure 9**). Des études récentes ont montré que les TGFβs peuvent activer également un autre groupe de R-Smad, les Smads 1, 5 et 8 par interaction avec ALK1 (**Figure 10**). Ils activent également TAK1 (TGF-β Activated Kinase 1) et sa protéine de liaison TAB1 (TGF-β Activated Kinase 1 Binding Protein 1) qui initie la cascade des MKKs (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase) et active les MAPKs : P38 et ERK. La signalisation Smad est régulée par les E3 ubiquitine ligases Smurf1 et Smurf2, qui sont recrutées par les inhibiteurs Smads (I-Smads : Smad6 et Smad7) (152). Le Smad7 qui est universellement exprimé inhibe la signalisation de tous les R-Smads, tandis que le Smad6 qui est plus sélectivement exprimé inhibe préférentiellement la voie Smad 1/5/8 (153).



**Figure 9 : Mécanisme général de l'activation du récepteur TGF-β et des Smads.** A la surface cellulaire, le TGF-β se lie au récepteur TGFβ de type II (TGFβRII), et recrute le récepteur TGFβ de type I (TGFβRI) et forme un complexe hétéromère, permettant au TGFβRII de trans-phosphoryler le domaine GS de TGFβRI. Le TGFβRI active Smad2 et

Smad3 par phosphorylation sur des sérines C-terminales. Les R-Smads activés par le récepteur s'associent ensuite à un co-Smad (Smad4) et forment des complexes de Smads qui se transloquent dans le noyau où ils s'associent avec d'autres cofacteurs de transcription (comme CBP ou p300) au niveau de séquences d'ADN régulatrices des gènes cibles en les activant ou en les réprimant. L'activation de R-Smads par les récepteurs de type I, est inhibées par Smad6 et Smad7. Les ubiquitine ligases E3, Smurf1 et Smurf2, médient l'ubiquitinylation et la dégradation consécutive des R-Smads, mais peuvent aussi interagir avec Smad6 / 7 et ainsi ubiquitinyler les récepteurs de type I (D'après Derynck and Zhang., 2003) (154).



**Figure 10 : Les différents récepteurs de la signalisation TGFβ.** Il existe deux types de récepteurs de la super famille TGFβ. Les interactions combinatoires des récepteurs de type II et de type I définissent les réponses de signalisation. Par exemple, TGFβ active Smad2 et Smad3 par une combinaison du récepteur TβRII avec le récepteur ALK5 (TβRI) et il active Smad1 et Smad5 par le récepteur TβRII avec le récepteur ALK1. Seules les combinaisons de récepteurs les mieux documentées et leurs R-Smads sont listées ci-dessus. (D'après Derynck and Zhang., 2003).



### 3.3.2.1. Expression des TGF $\beta$ et de leurs récepteurs durant le développement du squelette

Le TGF $\beta$  est produit par les chondrocytes sous forme latente en association avec la protéine de liaison au TGF $\beta$  latente (LTBP). Dans les chondrocytes des plaques de croissance, le stockage du TGF $\beta$  par LTBP dépend de la maturation cellulaire. La plasmine, la transglutaminase et les MMPs aident à la libération et à l'activation du TGF- $\beta$  (155–159). Au niveau de la plaque de croissance épiphysaire, le TGF $\beta$ 1 et le TGF $\beta$ 3 sont exprimés au niveau des zones de réserve, de prolifération et d'hypertrophie chez les rats âgés de 6 à 24 semaines. Le TGF $\beta$ 2 est exprimé dans des zones similaires à l'âge de 6 semaines, mais son expression diminue pendant la croissance. L'expression des TGF $\beta$ s dans les chondrocytes hypertrophiques est faible. Le TGF $\beta$ RI est coexprimé avec les ligands TGF $\beta$  au niveau des zones de réserve, de prolifération et hypertrophique tout au long du processus de développement. Le TGF $\beta$ RII quant à lui est détecté chez des rats âgés de 6 semaines mais diminue par la suite. Chez l'homme, TGF $\beta$ 2 est exprimé dans toutes les zones d'ossification endochondrale, l'expression la plus élevée est observée au niveau de la zone hypertrophique et de la zone minéralisée. Le TGF $\beta$ 3 est exprimé dans les chondrocytes de la zone proliférative et la zone hypertrophique. Le TGF $\beta$ 1 ne se trouve que dans les zones proliférative et hypertrophique. Les TGF $\beta$ RI et  $\beta$ RII sont fortement exprimés dans les zones hypertrophiques et minéralisées. L'expression des Smads spécifiques du TGF $\beta$  est corrélée à celle du TGF $\beta$ 1 et de ses récepteurs. Alors que Smad2 est fortement exprimé dans les chondrocytes prolifératifs, Smad3 se trouve principalement dans les chondrocytes matures. Smad3 est également présent dans le périchondre des cartilages en développement au cours de la formation de l'os endochondral. Smad4 est présent dans toutes les zones de la plaque de croissance. Smad6 et Smad7 sont principalement détectés dans les chondrocytes matures (160–163). Les différents TGF $\beta$ s sont également exprimés au niveau du périchondre et du périoste chez la souris. Les ARNm du TGF $\beta$ 1, 2 et 3 sont synthétisés au niveau du périchondre et du périoste chez la souris à partir de stade embryonnaire E13.5 jusqu'à après la naissance (164–167). De même que pour les TGF $\beta$ s, l'expression des récepteurs du TGF $\beta$  est également détectée au niveau du périchondre (162,168,169). Cette localisation spécifique des différents TGF $\beta$ s, de leurs récepteurs et des différents Smads au niveau de la plaque de croissance, indique que les TGF $\beta$ s et leurs cascades de signalisation jouent un rôle important dans la différenciation et la maturation des chondrocytes et dans le développement de la plaque de croissance épiphysaire.

### 3.3.2.2. La signalisation du TGF $\beta$ durant le développement de la plaque de croissance

Les membres de la superfamille TGF $\beta$ , en particulier les TGF $\beta$ s et les BMPs, jouent un rôle important dans plusieurs étapes de la chondrogenèse embryonnaire. Le TGF $\beta$ 1 favorise la chondrogenèse des cellules mésenchymateuses indifférenciées en culture (170–172) et inhibe la différenciation terminale des chondrocytes dans des cultures de pellets de chondrocytes à haute densité ou d'os longs en culture (173–177). Le TGF $\beta$  active les voies de signalisation MAPK, p38, ERK et JNK dans les CSMs, ce qui conduit à une diminution de l'expression de la N-cadhérine en bloquant la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine médiée par Wnt (178). La réduction de l'expression de la N-cadhérine est une étape nécessaire pour passer de la condensation mésenchymateuse à la différenciation chondrocytaire. La signalisation par le TGF $\beta$  est connue aussi pour activer les inhibiteurs de la cycline D kinase (CDK) : p16, p21 et p53, qui arrêtent les CSMs à la phase G1 du cycle cellulaire et induisent ainsi la sénescence cellulaire (179). Des souris transgéniques exprimant une mutation dominante négative du récepteur TGF $\beta$  de type II (DNIIR) au niveau du périchondre, du périoste et de la plaque de croissance, montrent une augmentation de la différenciation terminale des chondrocytes et une expression accrue d'IHH dans les chondrocytes de la plaque de croissance, indiquant que le TGF $\beta$  régule la différenciation hypertrophique *in vivo* (180). L'IHH agissant normalement en tant qu'inhibiteur de la différenciation des chondrocytes, il a été proposé que le TGF $\beta$  est nécessaire pour l'inhibition de l'hypertrophie induite par IHH (181). Il a été montré également que le TGF $\beta$  et PTHrP agissent dans une cascade de signalisation commune pour réguler la différenciation des chondrocytes (169). De plus, Smad2 et Smad3 activés par la signalisation TGF $\beta$  interagissent avec Sox9 recrutent CBP / p300 et augmente son activité transcriptionnelle (182,183). Le TGF $\beta$ 1 induit également l'expression de protéines spécifiques de la MEC des chondrocytes : le collagène de type II et l'aggrécane via l'activation de ERK  $\frac{1}{2}$  et de Smad2/Smad3 (184). Les souris TGF $\beta$ 2 *-/-* présentent des anomalies squelettiques sévères au niveau de l'os endochondral et des os intramembranaires. Cependant les souris TGF $\beta$ 1 *-/-* et TGF $\beta$ 3 *-/-* présentent un squelette normal, indiquant ainsi que le TGF $\beta$ 2 est essentiel pour le développement embryonnaire du squelette (185–187).

Les souris dépourvues de TGF $\beta$ RI/ALK5 ou de TGF $\beta$ RII au niveau des CSMs présentent une réduction de la taille des os longs et des défauts du développement ostéoarticulaire (188–190). La suppression spécifique du TGF $\beta$ RII et d'ALK5 au niveau des CSMs favorise l'hypertrophie chondrocytaire et diminue la prolifération des chondrocytes,

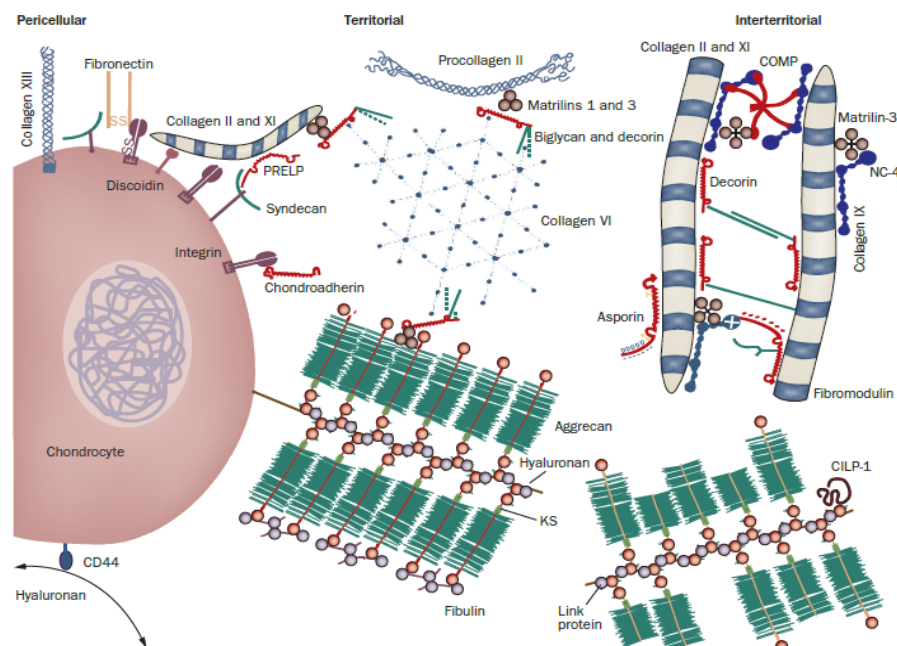
également observée chez les souris transgéniques DN-TGF $\beta$ RII (180,188–190). Ainsi, la signalisation TGF $\beta$  favorise la prolifération des chondrocytes mais bloque la transition des chondrocytes prolifératifs en chondrocytes hypertrophiques. Les souris dépourvues de TGF $\beta$ RII ou d'ALK5 au niveau des chondrocytes présentent des anomalies de développement à la base du crâne et au niveau des vertèbres comme celles observées chez les souris invalidées pour le gène du TGF $\beta$ 2 (187,191). Cependant, ces souris présentent un développement normal des os longs (191), indiquant ainsi que TGF $\beta$  pourrait réguler le développement de plaque de croissance, en grande partie, par médiation de la sécrétion de cytokines paracrines par les cellules du péri-chondre. La signalisation du TGF $\beta$  favorise également la formation osseuse en favorisant l'enrichissement en ostéoprogéniteurs. En effet, la suppression de ALK5 dans les CSMs entraîne une réduction de la masse osseuse corticale et trabéculaire associée à une diminution du nombre d'ostéoblastes (189). L'étude a montré que le TGF $\beta$ , par le biais du TGF $\beta$ RI, favorise l'engagement pré-ostéoblastique et une différenciation précoce (189). Cependant, la suppression de TGF $\beta$ RII dans les ostéoblastes entraîne une augmentation inattendue de la masse osseuse, probablement en raison de la signalisation PTHrP (168).

# Chapitre 4 : La Matrice Extracellulaire du cartilage

#### 4. La matrice extracellulaire du cartilage

La matrice extracellulaire est la substance fondamentale du cartilage qui baigne les chondrocytes et assure leur agglomération. Elle est constituée principalement d'eau (65-80%), de collagènes (10-30%), de PGs (5-10%), d'acide hyaluronique, et en quantité moins importante, de protéines non-collagéniques et de lipides (192). Elle est organisée en trois zones différentes (**Figure 11**).

- La matrice péri-cellulaire : c'est une fine couche spécialisée de MEC qui entoure immédiatement les chondrocytes. Elle est considérée comme le microenvironnement des chondrocytes. Elle se distingue du reste de la matrice, car elle canalise la communication entre les chondrocytes et la MEC. En plus du collagène de type II et des protéoglycanes, le collagène de type VI est un élément structural majeur de cette matrice (193,194). Elle contient également la décorine, biglycan et la matriline (195). Elle est également considérée comme un champ de régulation des facteurs de croissance, ou ils sont activés, dégradés ou transportés.
- La matrice territoriale : elle entoure la matrice péri-cellulaire et est présente tout au long du cartilage (193,194). Elle entoure un chondrocyte tout seul ou un groupe de chondrocytes y compris leurs matrices péri-cellulaire. Elle est composée de fines fibrilles de collagène qui sont organisées d'une manière croisée pour former un panier qui entoure les clusters de chondrocytes pour les protéger des contraintes mécaniques (195).
- La matrice interterritoriale : c'est la plus grande des trois régions matricielles et elle est caractérisée par les faisceaux orientés de fibrilles de collagène de grande de taille, disposés parallèlement à la surface de la zone superficielle. Les protéoglycanes y sont abondants (195).



**Figure 11 : Organisation et composition et de la MEC.** La matrice cartilagineuse entourant les chondrocytes est organisée en zones définies par leur distance par rapport à la cellule. La matrice péricellulaire se trouve immédiatement autour de la cellule. Elle comporte les molécules qui interagissent avec les récepteurs de la surface. Après la matrice péricellulaire, légèrement plus loin de la cellule, se trouve la matrice territoriale. A plus grande distance de la cellule se trouve la matrice interterritoriale. Les types de collagènes et les protéines de liaison au collagène qui forment les matrices sont différentes dans chaque zone.

#### 4.1. Composition de la matrice extracellulaire

##### 4.1.1. L'eau

Le cartilage possède un contingent hydrique très important. L'eau existe sous forme libre et liée aux PGs. L'interaction entre l'eau et les macromolécules de la matrice influence les propriétés mécaniques du tissu. Du fait de l'absence de vascularisation, le chondrocyte vit en hypoxie. Il est nourri par l'apport de nutriments de faibles poids moléculaires, en provenance du liquide synovial et qui diffusent au travers de la MEC. L'apport de ces métabolites se fait grâce aux mouvements de l'eau entre le cartilage et la cavité synoviale. Sous l'effet d'une charge, l'eau est chassée dans les régions du cartilage hors charge et vers la cavité articulaire, entraînant à l'extérieur du tissu les déchets métaboliques des chondrocytes, notamment l'acide lactique. Le phénomène étant réversible, lorsque la charge cesse, un flux inverse se crée de la cavité articulaire vers le cartilage, ramenant le cartilage à son hydratation basale, et amenant avec lui les nutriments nécessaires au fonctionnement cellulaire, en particulier le glucose. Un échange continu s'effectue entre les molécules d'eau fixées par les charges négatives des PGs et la phase libre circulant en dehors du champ d'attraction des PGs, ce qui contribue à sa régénération.

##### 4.1.2. Les collagènes

###### 4.1.2.1. Le collagène de type II

Le collagène de type II est une protéine sécrétée homotrimérique composée de trois hélices  $\alpha 1$  (Col2a1). Il est le principal composant du cartilage hyalin et il est l'un des marqueurs du phénotype chondrocytaire. Durant le développement de la plaque de croissance, le collagène de type II est abondamment exprimé dans les chondrocytes immatures et son expression diminue dans les chondrocytes matures ou hypertrophiques (196,197). Il représente 90% des collagènes (dont dix types sont actuellement identifiés) présents dans le

cartilage. Les collagènes de types IX et XI interagissent avec le collagène de type II et contrôlent sa fibrillation en particulier le diamètre des fibres. Ainsi, une délétion dans la chaîne  $\alpha 1$  du collagène XI chez la souris conduit à la formation de fibres de collagènes de type II de diamètre anormalement élevé et par conséquent à une fragilité du cartilage (198,199). Les chaînes Col2a1 présentent une composition riche en hydroxylysine, glucosyl et en galactosyl. Ces résidus lui permettent de se lier aux PGs présents dans la MEC (200). Le collagène forme un réseau dense dont les mailles emprisonnent les agrégats de PGs limitant ainsi l'entrée d'eau dans le tissu. En effet l'hydratation accrue du cartilage observée dans des modèles expérimentaux d'arthrose serait due à un affaiblissement de ce réseau. Un large spectre de chondrodysplasies a été associé à des mutations au niveau du gène codant pour Col2a1. Une mutation hétérozygote au niveau du Col2a1 dans les chaînes  $\alpha$  est à l'origine de l'achondrogenèse-hypochondrogenèse de type II, caractérisée par une létalité périnatale et un nanisme important (201,202). D'autres études ont montré que des mutations au niveau du gène Col2a1 engendrent la dysplasie Kniest caractérisée par un tronc et des membres courts, la cyphoscoliose, l'hypoplasie frontonasale, une myopie sévère et la perte auditive (203). Le syndrome de Stickler est également décrit chez des individus présentant une forme tronquée de Col2a1 (204). Des mutations dominantes au niveau du gène de Col2a1 induisent la dysplasie spondyloépipimetaphysale de type Strudwick caractérisée par une petite taille, une malformation crânienne et une scoliose (205), indiquant ainsi le rôle important de Col2a1 dans le développement squelettique.

#### 4.1.2.2. Le collagène de type X

Le collagène de type X est une protéine sécrétée qui fait partie de la famille des collagènes, il est sous forme d'un homotrimère de triple hélice  $\alpha 1$  (Col10a1) avec une longue région C-terminale et une petite région N-terminale. Il est codé par le gène *COL10A1* et il est exprimé spécifiquement dans les chondrocytes hypertrophiques (il est utilisé comme marqueur d'hypertrophie chondrocytaire) (206,207). En tant que composant majeur de la zone hypertrophique, le collagène de type X influence le dépôt d'autres molécules de la MEC au niveau de cette région et assure un environnement propice à l'hématopoïèse et à la minéralisation, qui représentent des événements essentiels à l'ossification endochondrale (208,209). Les mutations ou une expression anormale de *COL10A1* conduisent à une hypertrophie anormale des chondrocytes observée dans plusieurs cas de dysplasie squelettique et dans la pathologie arthrosique (Dreier, 2010; Drissi et al., 2005; Lamas et al., 2010; Zheng et al., 2005). Une mutation dominante au niveau du gène du *COL10A1* humain induit la

chondrodysplasie métaphysale de Schmid (MCDS) caractérisée par une petite taille, une coxa vara, associée à une plaque de croissance désorganisée et des défauts de formation des os endochondraux (208,209). En plus de Sox9 qui régule l'expression de Col10a1 (Dy et al 2012), d'autres études ont rapporté que Runx2 se lie au promoteur de Col10a1 durant la chondrogenèse et régule son expression (220,221). Ainsi, des souris avec une haplo insuffisance de RUNX2 présentent une ossification endochondrale défectueuse avec une diminution de l'expression de Col10a1 et une zone hypertrophique réduite (219). Il a été également rapporté que le cartilage arthrosique humain présente une augmentation de l'expression de Col10a1 et une hypertrophie chondrocytaire accrue, alors que les cellules souches mésenchymateuses de patients souffrant d'arthrose exprimaient de manière constitutive le collagène de type X (212,215,222,223). Toutes ces études montrent le rôle important du collagène X dans le développement du squelette et dans les pathologies liées à ce système.

#### 4.1.3. Les protéoglycanes (PGs)

Les protéoglycanes (PGs) sont des macromolécules complexes composées d'une protéine centrale sur laquelle sont attachées une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs). Les PGs sont des composants majeurs de la MEC et ils sont impliqués dans divers processus biologiques tels que le dépôt et l'organisation de la MEC, la différenciation, l'adhérence, la migration, et la prolifération cellulaire (224–226). Ils sont également impliqués dans le stockage de facteurs de croissance, de chimiokine, de cytokine et dans l'établissement de gradients de morphogène durant le développement des tissus. Ils régulent aussi la diffusion de ces facteurs dans la MEC.

##### 4.1.3.1. Les chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs)

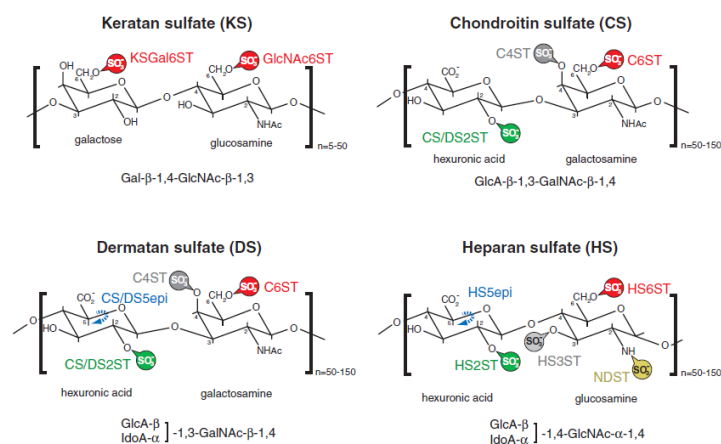
Les GAGs sont liés de manière covalente sur des résidus de sérine spécifiques de la protéine centrale. Les GAGs sont polyanioniques, longs, non ramifiés, formés d'unités disaccharidiques répétitives. Les disaccharides sont formés d'un sucre aminé (N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) ou N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc) et d'un acide uronique (acide D-glucuronique (GlcA) ou acide L-iduronique (IdoA). Ces résidus sont sulfatés à diverses positions. Les GAGs sont classés en deux groupes : les non sulfatés contenant uniquement de l'acide hyaluronique (HA également appelé hyaluronane) et les sulfatés, qui sont à leur tour subdivisés en chondroïtine sulfate (CS), dermatane sulfate (DS), kératane sulfate (KS),



héparine et héparane sulfate (HS). Le hyaluronane n'est pas lié à une protéine core et consiste en un long polysaccharide avec un seul motif répétitif de disaccharide. Il diffère des autres GAGs par sa taille moléculaire et par sa voie de biosynthèse (227). Les CS contiennent des GlcA alors que dans les DS le GlcA est épimérisé en IdoA et est lié à la protéine centrale par O-glycosylation. Les KS ne contiennent pas de résidus d'acides uronique mais plutôt des résidus de Gal et sont liés à la protéine centrale par O- et N-glycosylation. Les HS et l'héparine sont les GAGs les plus complexes et les plus sulfatés. Ils sont liés à la protéine core par O-glycosylation. Les unités répétitives sont représentées dans la **Figure 12**.

La charge négative sur les GAGs est due aux résidus de sucre acides et à la présence de groupes sulfates. Par conséquent, les GAGs absorbent l'eau et jouent le rôle d'hydrogel et de lubrifiant dans les articulations. Ils interagissent également avec des facteurs de croissance et modulent leur activité et biodisponibilité. En effet, les PGs tels que la décorine, le biglycan et la fibromoduline régulent l'activité du TGFβ en le séquestrant dans la MEC (228,229) alors que les syndécans et glypicans régulent l'activité des facteurs FGFs et Wnts grâce à leurs chaînes de GAGs à HS (230,231).

La protéine porteuse est attachée à une ou plusieurs chaînes de GAGs. Les chaînes de GAGs sont synthétisées par addition progressive de sucres UDP par des glycosyltransférases spécifiques (GT) (226). De plus, ces résidus sont modifiés par addition de groupes sulfates par des sulfotransférases spécifiques. Les résidus sont également épimérisés par enzymes spécifiques. La synthèse des chaînes de GAGs a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE) et la lumière de l'appareil de Golgi. Les GAGs sont des macromolécules très complexes dues à la sulfatation à diverses positions. En effet, les octasaccharides forment un milliard de séquences de sulfatations différentes (232).



**Figure 12 : Les différents unités disaccharidiques formant les différents types de GAGs.**

#### 4.1.3.2. Les protéoglycanes essentiels de la MEC

La matrice cartilagineuse est constituée d'une variété de PGs essentiels aux propriétés physiques/mécaniques et biochimiques du cartilage et à la fonction de ce tissu. Ils sont présents dans le cartilage et peuvent être de faible masse moléculaire comme le biglycan, la décorine ou la fibromoduline, mais aussi de haut poids moléculaire comme l'aggrécane. Il existe quatre classes principales de PGs en fonction de leur localisation cellulaire et subcellulaire. La première classe correspond aux PGs intracellulaires et ne contient qu'un seul membre appelé serglycine, qui est emballé dans des granules à l'intérieur des cellules et libéré à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules (233). La seconde classe correspond aux PGs de la surface cellulaire et contient : les syndécans (1-4), le CSPG4, le bétaglycan et le phosphacan, qui sont fixés à la membrane cellulaire par le biais du domaine transmembranaire et les glypicans (1-6) fixés à la membrane cellulaire par un ancrage glycosyl phosphatidyl-inositol (GPI). La troisième classe concerne les PGs péricellulaires et les PGs de la membrane basale. Ils sont fixés à la surface de la cellule par des intégrines et sont également présents sur les membranes basales. Ces groupes comprennent le perlécan, l'agrine, les collagènes XVIII et XV. La quatrième classe est constituée des PGs extracellulaires, dont : aggrécane, versican, neurocan et brevican, ainsi que les SLRP tels que la décorine et le biglycan (225). Les PGs sont également classés selon leurs chaînes de GAGs en : PGs à héparane-sulfate (HSPG), dermatane-sulfate (DSPG), chondroïtine-sulfate (CSPG) et kératane-sulfate (KSPG) (225,226).

##### - L'aggrécane

L'aggrécane est un PG de type CSPG sécrété dans la MEC. Il est composé d'une protéine de 250 kDa, de 100 chaînes de CS et de 30 chaînes de KS. C'est le PG le plus abondant dans la MEC du cartilage (234,235). Il est exprimé par les chondrocytes de réserve et prolifératifs sous le contrôle de Sox9 (25,236). Des mutations au niveau du gène humain *ACAN* sont retrouvés chez des patients atteints de dysplasie spondylophysale de type Kimberley, caractérisée par un nanisme sévère et chez des patients atteints de dysplasie spondylophysale de type aggrécane, caractérisée par un nanisme sévère, une dysmorphie faciale (237), l'ostéochondrite disséquant de petite taille et une arthrose précoce. De plus, des études sur un modèle animal ont montré que des mutations au niveau du gène de l'aggrécane induisent la chondrodysplasie chez la souris (238,239). Ces études révèlent le rôle de *ACAN* dans le développement du squelette et dans sa fonction. L'aggrécane est hautement anionique et se lie aux cations et à l'eau, ce qui crée une pression osmotique, conférant au cartilage ses

propriétés de résistance aux forces de compression (240). Il se lie de manière non covalente au Col2a1 et à l'acide hyaluronique qui relie la MEC aux surfaces des cellules (235). De plus, il a été constaté que l'aggrécane se lie à l'IHH (241,242), via ses chaînes de CS (243). Ceci suggère que l'aggrécane établit un gradient d'IHH dans la plaque de croissance épiphysaire (244). Ce gradient est nécessaire pour contrôler le processus de différenciation cellulaire (243).

#### - Le versican

Le Versican appartient également à la famille des CSPG, avec une protéine centrale d'environ 400 kDa (V0). La protéine principale contient deux domaines conservés (G1 et G3) aux deux extrémités et la région centrale possède plusieurs sites de fixation des GAGs. Le domaine N-terminal (G1) a un domaine IgG et interagit avec la protéine de liaison pour la fixation du HA. Le domaine C-terminal (G3) contient deux répétitions de type EGF, un domaine de régulation complémentaire et un domaine lectine de type C. L'épissage alternatif du gène du versican produit quatre isoformes avec différents sites de fixation des GAGs. Les trois isoformes (V0, V1, V2) contiennent les chaînes de GAGs, mais une isoforme (V3) ne contient aucune chaîne de GAGs. Dans la version complète (V0), le domaine de fixation central des GAGs est divisé en une région courte  $\alpha$  et une région  $\beta$  relativement grande. Le versican (V1) n'a que la région  $\beta$  et le versican (V2) ne contient que la région  $\alpha$ . Le versican (V3) ne contient que la protéine centrale ayant les domaines G1 et G3 mais ne possède pas le domaine de fixation des GAGs. Récemment, Kischel et ses collègues ont rapporté un nouvel isoforme du versican (V4) surexprimé dans le cancer du sein. Le versican (V4) possède le domaine G1, les premiers 398 acides aminés de la région  $\beta$ -GAG et le domaine G3 (245,246). Le versican joue un rôle crucial dans la régulation de la migration cellulaire, de l'adhésion, de l'inflammation et interagit avec d'autres composants de la MEC. Dans l'inflammation, il facilite la migration des leucocytes et l'interaction avec des récepteurs tels que CD44, la glycoprotéine P-sélectine 1 (PSGL-1) et le récepteur Toll-like 2 (TLR2) (246). Durant le développement de la plaque de croissance, le versican est exprimé au niveau des cellules mésenchymateuses indifférenciées des bourgeons précoces des membres et durant la condensation périchondrogénique. Il disparaît avec la différenciation chondrocytaire (247,248), contrairement à l'expression de l'aggrécane, qui augmente au cours de la chondrogenèse et de la différenciation chondrocytaire (249).

## - Les syndécans

Les syndécans (SYND) sont une famille de HSPG transmembranaires de type I (250). La protéine core possède un domaine cytoplasmique au niveau de la région C-terminale qui est commun à tous les membres de la famille, un seul domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire au niveau de la région N-terminal qui est unique pour chaque membre de la famille avec un ou plusieurs sites de clivages potentiels (251). Chez les vertébrés, la famille des syndécans compte quatre membres : syndécan1 (SYND1), syndécan2 (SYND2), syndécan3 (SYND3) et syndécan4 (SYND4) (252). Bien que toutes les cellules, à l'exception des érythrocytes, expriment au moins un membre de la famille des SYND, chaque membre est exprimé de façon tissu spécifique et son expression est régulée durant le développement (252,253). Chez la souris, le SYND1 est exprimé à partir de l'ectoderme lors de la gastrulation puis localisé au niveau des cellules mésodermiques. Il est exprimé de manière permanente par les cellules épithéliales et il est fortement exprimé dans le cartilage articulaire lors de la dégradation du cartilage. Le SYND2 est exprimé par les cellules du périchondre, du périoste et des tissus conjonctifs (252). Le SYND3 est abondants dans les bourgeons des membres, le cerveau, le tube neural (252) et dans les chondrocytes de la zone de prolifération durant le développement de la plaque de croissance (235). Le SYND4 est exprimé par les tissus cartilagineux au cours de l'embryogenèse chez la souris. Il est fortement exprimé par les chondrocytes prolifératifs, les chondrocytes hypertrophiques et le cartilage épiphysaire au cours de l'ossification endochondrale. Le SYND4 est fortement exprimé dans le cartilage articulaire chez l'homme et la souris au cours de l'arthrose (252).

Les SYND sont impliqués dans une variété de fonctions. Ils servent de molécules d'adhésion, en se liant à des chimiokines, des cytokines, des facteurs de croissance, des morphogènes, des pathogènes et des métalloprotéinases (MMP) (251,252). Cette liaison est médiée aussi bien par la protéine core que par les chaînes de GAGs (240). Le SYND4 interagit avec la protéine kinase C (PKC) via sa région variable et régule l'expression des molécules d'adhésion y compris la fibronectine et son récepteur intégrine. Ainsi, l'interaction SYND4-fibronectine favorise la formation d'adhérences focales et la réorganisation du cytosquelette d'actine. L'expression du SYND4 est associée à une surexpression de MMP et d'intégrines et à une inhibition de l'expression du Col2a1. Il intervient ainsi dans la dégradation de la matrice du cartilage, comme le montre la réduction significative de la perte de PG cartilagineux et de la gravité de l'arthrose chez les souris déficientes en SYND4 (252). En revanche, le SYND est capable de lier des agents pathogènes tels que le virus de l'immunodéficience humaine1 (VIH1), le VIH2, le virus de l'herpès papillome, le virus de l'immunodéficience simienne et

le virus de l'hépatite C par l'intermédiaire de leurs chaînes HS (251). Ces agents pathogènes utilisent les SYND en tant que récepteurs qui facilitent leur entrée dans les cellules hôtes (251). En plus de ces activités, le SYND peut se lier aux morphogènes et limiter leur disponibilité aux cellules réceptrices ainsi que leur perte dans l'espace extracellulaire, créant ainsi un gradient de morphogène. Le SYND3 se lie à l'IHH en favorise la prolifération des chondrocytes (252).

Le SYND subit un clivage protéolytique régulé, dans le domaine variable, selon un processus appelé « shedding » (253), qui est médié par des facteurs externes tels que la plasmine, la thrombine et les MMPs (252). Ce clivage génère un HSPG soluble pouvant entrer en compétition avec le SYND intact pour la liaison du ligand *via* ses chaînes de GAGs (252). Le SYND1 et le SYND4 sont tous les deux clivés par les MMPs après une lésion, ce qui favorise la migration cellulaire et facilite la cicatrisation des plaies (252,253). Par conséquent, les MMPs jouent un rôle essentiel dans le renouvellement normal de la matrice et dans le remodelage pathologique lors de l'inflammation, de l'invasion et des métastases. D'autre part les SYNDs sont protégés des MMPs en se liant à un inhibiteur tissulaire de métalloprotéinases (TIMP) *via* leurs chaînes de GAGs (253).

#### - Les glypicans

La protéine porteuse (60-70 kDa) des glypicans possède une région globulaire extracellulaire comportant trois à quatre sites d'attachement des chaînes de HS. La séquence consensus DSGSGSG, sur laquelle s'attachent les chaînes de GAGs, est située entre le domaine central et l'extrémité C-terminale. La partie C-terminale possède la séquence signal nécessaire à l'insertion des glypicans au niveau de la membrane plasmique *via* l'ancre GPI. Les glypicans sont capables, grâce à leurs chaînes de HS, de stabiliser l'interaction du ligand tel que le Wnt avec son récepteur ou de jouer un rôle de co-récepteur de faible affinité. Les glypicans peuvent être libérés dans le milieu extracellulaire sous l'action de la phosphatidylinositol phospholipase C, D et/ou de protéases. Ils peuvent, en piégeant des ligands extracellulaires, en contrôler la diffusion. Ils interviennent au niveau de la signalisation et du transport des facteurs de croissance (254,255)

#### - Le bétaglycane

Le bétaglycane appartient au groupe des HSPGs et contient deux sites de fixation des chaînes de GAGs ; il a une masse moléculaire d'environ 93 kDa. Le bétaglycane fait partie de la superfamille des corécepteurs TGF $\beta$ , également appelés récepteurs TGF $\beta$  de type III (TGF $\beta$ R3). Il présente un seul segment transmembranaire. Le domaine extracellulaire contient

un site pour la fixation des GAGs en position 534 et 545 et des séquences sensibles aux protéases à proximité du domaine transmembranaire. Les chaînes de GAGs sont importantes pour son bon fonctionnement et pour la signalisation en aval du TGF $\beta$ . Les chaînes de GAGs du bétaglycane régulent la migration cellulaire par interaction avec d'autres corécepteurs dans la MEC (256). Cependant, le mécanisme par lequel les modifications des chaînes de GAGs du bétaglycane régulent la migration cellulaire est encore inconnu. Le domaine extracellulaire contient également un site de clivage pour les protéases qui libèrent la forme soluble du bétaglycane. La forme soluble inhibe la signalisation du TGF $\beta$  et inhibe la migration des lignées cellulaires du cancer du sein (257). Le domaine intracellulaire court contient de nombreux résidus sérine et thréonine qui sont phosphorylés par la kinase PKC (258). Le domaine intracellulaire contient également un domaine de liaison à PDZ. Les bétaglycanes régulent la migration cellulaire par interaction avec la  $\beta$ -arrestine2 via le domaine PDZ et assurent la médiation de l'activation de Cdc42 (256). Les souris knock-out pour le bétaglycane (TGF $\beta$ R3 - / -) présentent une létalité embryonnaire (259).

#### - Les petits protéoglycans riches en leucine (SLRP)

Les SLRPs (Small Leucin Rich protein) constituent un sous-groupe de la famille des protéines LRRs (*Leucine-Rich- Repeat*) caractérisées par de multiples domaines adjacents portant un motif commun riche en leucine (260). Les SLRPs comptent treize membres dont la plupart sont des PGs sécrétés (Hocking et al., 1998). Dans le cartilage, on retrouve quatre types de SLRPs, la décorine, le biglycan (CS ou DS), le lumican, et la fibromoduline (KS). La région protéique est caractérisée par la présence de domaines riches en cystéines capables de former des ponts disulfures et peut également être *N*-glycosylée. La taille de la protéine porteuse de ces SLRPs est d'environ 40 kDa. Leur classification repose sur l'organisation génique, le nombre de domaines riches en leucine et le type de chaînes de GAGs. Leur forme en fer à cheval leur permet d'interagir avec les fibres de collagène (de type VI XII, XIV) et d'autres composants matriciels tels que la fibronectine et l'élastine (261). Ils assurent également un rôle de protection des fibrilles de collagène contre l'action des collagénases. Ils sont capables d'interagir avec des facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) et le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha).

#### 4.1.3.3. Synthèse des chaînes de GAGs

Les GAGs sont des polymères hétéropolysaccharidiques linéaires, fortement polaires et chargés négativement. Ils sont constitués de répétitions d'unités disaccharidiques formées par

un sucre aminé et un acide uronique. Ils diffèrent par la composition de leur unité disaccharidique élémentaire, les liaisons entre ces unités, la longueur des chaînes, la présence et la position des groupements sulfates et/ou N-acétyles. Le sucre aminé est une *N*-Acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) ou une *N*-Acétyl-D-galactosamine (GalNAc) et un acide uronique (l'acide D-glucuronique (GlcA) ou l'acide L-iduronique (IdoA), son épimère en C5). La composition des unités disaccharidiques déterminera le type de GAG : GlcNAc-acide uronique dans le cas des héparine / héparane sulfates (Hep/HS) et GalNAc-acide uronique dans le cas des chondroïtine-sulfates/dermatane sulfates (CS/DS). La synthèse des GAGs fait intervenir un grand nombre de glycosyltransférases (GTs) et nécessite au préalable la formation d'une amorce tétrasaccharidique (GlcA1,3Galβ1,3Galβ1,4Xyl-O-sérine) permettant l'ancrage de la chaîne de GAG à la protéine "core". La formation de cette amorce fait intervenir une xylosyltransférase (XT) qui fixe un résidu xylose à partir du nucléotide sucre UDP-Xylose sur des résidus sérine spécifiques de la protéine "core". Ensuite, deux galactosyltransférases, GalT-I (β4GalT7) et GalT-II (β3GalT6), assurent la fixation de deux résidus galactose sur le xylose. Enfin, la galactose 1,3-glucuronosyltransférase-I (GlcAT-I) catalyse l'étape finale de la synthèse de l'amorce tétrasaccharidique par addition d'un acide glucuronique (GlcA). La polymérisation des chaînes de GAGs à HS est assurée par les enzymes EXT1/EXT2 alors que celle des CS est réalisée par les CS-polymérase (226).

## Chapitre 5 : Xylosyltransférases



## 5. Les xylosyltransférases

Les xylosyltransférases (XTs) catalysent le transfert du xylose à partir de l'UDP-xylose sur des résidus sérine spécifiques de la protéine core des PGs initiant ainsi la synthèse des chaînes de GAGs, CS et HS. Cette étape est limitante dans la biosynthèse des chaînes de GAGs. Il existe deux isoformes de de XT, la XT-I et la XT-II.

### 5.1. Spécificité de la xylosyltransférase

Gregory et al., (1964) ont montré l'incorporation du xylose radiomarqué au niveau des résidus sérine de la protéine core des PGs par la XT (262). Ensuite, l'incorporation du xylose radiomarqué au niveau des sérines est confirmée en utilisant diverses sources tissulaires telles que l'oviducte de poule, le mastocytome murin et le cartilage de poulet embryonnaire (263,264). Divers accepteurs ont été utilisés pour la xylosylation et la synthèse de GAGs (265,266). La fibroïne de soie contenant les répétitions Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly, les peptides courts Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly et Gln-Ser-Gly ont également été utilisés comme accepteurs de la xylosylation (267,268). Le remplacement de la sérine par la thréonine a également été testé pour l'activité XT.

La mutagenèse dirigée du résidu sérine en thréonine dans le motif de fixation des GAGs de la décorine (Asp-Glu-Ala-**Ser**-Gly-Ile-Gly) ne montre que 10% de glycosylation (269). Le motif le plus court connu est le motif Ser-Gly. Ce motif de fixation des GAGs est présent dans de nombreux tissus naturels tels que le cartilage, la bikunine et d'autres protéines (270). Cependant, la présence de résidus acides en position -2 de la sérine joue un rôle important dans la reconnaissance de ce motif par la XT (271). La XT de différentes espèces utilise le même substrat accepteur et n'est donc pas spécifique de l'espèce. Par exemple, le peptide de type bikunine a servi de substrat accepteur pour la XT humaine, de *C. elegans* et de la *Drosophile* (270).

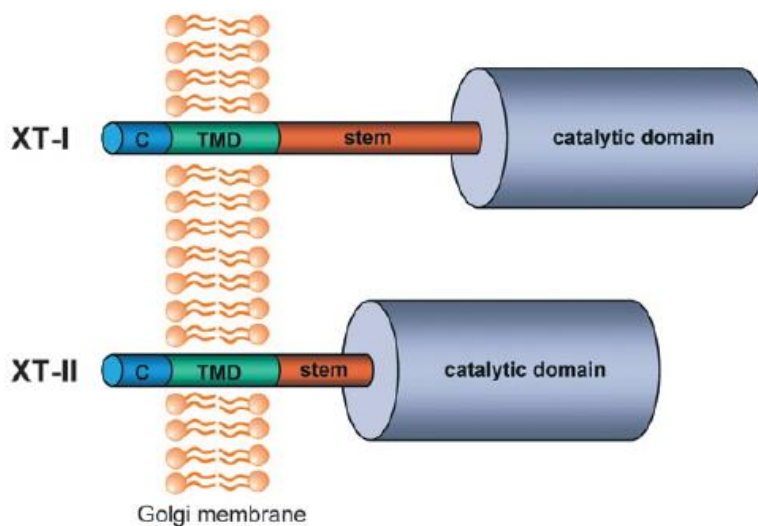
### 5.2. Structure des XTs

Chez l'homme, la XT-I est codée par le gène *XYLT1* situé sur le chromosome 16p13.1 et contient 12 exons d'une longueur totale d'environ 300 kb. Celui-ci code pour une protéine de 959 résidus, d'un poids moléculaire d'environ 100 kDa.

Comme d'autres glycosyltransférases (GTs), la XT-I présente une topologie membranaire de type II avec un domaine cytoplasmique court, un segment transmembranaire et un domaine intraluminal contenant le site catalytique et une région stem (**Figure 13**). Les parties

cytoplasmique et transmembranaire sont codées par les exons 1 et 2, tandis que le domaine extracellulaire est codé par les exons 3 à 12. La forme soluble de l'enzyme, dépourvue de ses domaines cytoplasmique et transmembranaire, a montré une activité catalytique (272). La XT-II est codée par le gène *XYLTII* présent sur le chromosome 17q21.3 contenant 11 exons d'une taille de 15 kb. Le gène de la XT-II code pour une protéine de 865 acides aminés avec un poids moléculaire de 97 kDa. La XT-II présente également une topologie membranaire de type II contenant un domaine cytoplasmique court, un domaine intraluminal contenant le site catalytique et une région stem courte (**Figure 13**). Le clivage au niveau de la région stem libère la forme soluble de l'enzyme (272).

La XT-II a été découverte en 2000 par Götting et ses collègues et l'activité catalytique de la XT-II a été démontré en 2007 (273–275). La XT-I et la XT-II ont une activité enzymatique similaire pour le peptide bikunine (QEEEEGSGGQKK). Afin d'étudier la spécificité du substrat entre la XT-I et la XT-II, la mutagenèse dirigée a été utilisée pour remplacer les résidus glycines environnants le résidu sérine dans le peptide. Les peptides mutés ont été utilisés pour mesurer l'activité des deux isoformes et la plupart de ces mutants ont été utilisés comme substrat par la XT-I mais pas par la XT-II. Cela indiquerait que la reconnaissance du substrat accepteur par la XT-I était plus flexible comparée à la XT-II (276).



**Figure 13 : Topologie transmembranaire de la XT-I et de la XT-II.** La XT-I et la XT-II ont une structure similaire, elles sont composées de quatre domaines : un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intraluminal composé d'un domaine catalytique et d'une région stem qui est plus grande chez la XT-I. (D'après Gotting et al., 2007)

### 5.3. Relation structure / fonction

Bien que la XT a été purifiée, une grande partie de l'information structure-fonction a été obtenue par la mutagenèse dirigée d'acides aminés spécifiques par délétion et troncation de régions spécifiques. La plupart des familles de GTs contiennent un motif DXD qui permet la fixation de  $Mn^{2+}$ , cofacteur important pour l'activité enzymatique (277,278). De même, les XTs contiennent deux motifs DXD présents dans les extrémités N et C de la protéine. Le motif DXD de la XT-I est présent dans les exons 4 et 11, alors que le motif DXD de la XT-II est situé dans les exons 5 et 10. Au niveau de la XT-I, les mutations du motif DXD N-terminal (<sup>314</sup>DED<sup>316</sup>) n'ont pas altéré l'activité catalytique de l'enzyme indiquant que ce motif pourrait ne pas être crucial. Cependant, le motif DXD C-terminal (<sup>745</sup>DWD<sup>747</sup>) joue un rôle important dans l'activité catalytique. En effet, la mutation de l'acide aspartique 745 en glycine entraîne une diminution de 95% de l'activité catalytique. Cependant, la mutation du résidu acide aspartique conservé 745 en acide glutamique ne modifie pas l'activité de la XT-I. Par conséquent, la charge négative du motif DXD est importante pour l'activité de l'enzyme (279).

La suppression de douze résidus d'acides aminés (de 261 à 272) réduit de 98% l'activité enzymatique, indiquant que le motif (<sup>261</sup>GKEAISALSR<sup>272</sup>) est important pour l'activité catalytique de la XT-I. La délétion de ces acides aminés a entraîné une perte de fonction sans altération significative de la liaison au substrat (280). Les liaisons disulfures sont importantes pour la stabilité et le repliement de la protéine et sont donc importantes pour maintenir la structure 3D et l'activité catalytique. Comme les autres enzymes, les GTs contiennent également plusieurs résidus cystéines conservés (281,282). L'analyse de plusieurs séquences de XT-I issues de différentes espèces a révélé que la XT-I contient 14 résidus cystéines hautement conservés. Ces résidus ont été analysés par mutagenèse dirigée pour explorer leur importance dans la fonction de l'enzyme. Chacun de ces résidus a été muté en alanine. Les résidus cystéine en position 471 et 574 sont les plus importants pour l'activité catalytique de l'enzyme et leur mutation en alanine bloque l'activité catalytique (283).

Récemment, la structure cristallographique de la XT-I humaine a été déterminée pour la première fois en complexe avec l'UDP-xylose comme donneur et plusieurs peptides dérivés de PGs comme accepteurs. Cette étude a démontré le mécanisme catalytique de la XT-I et les bases moléculaires de la sélection des sites d'attachement des GAGs. La structure montre plusieurs caractéristiques qui ne sont pas observées chez les autres glycosyltransférases. Premièrement, une liaison Cis-arginine-lysine qui interagit avec la partie diphosphate du donneur (UDP-xylose). Un site actif « flap » sous forme de « volet » qui joue un rôle

important dans la liaison avec le peptide accepteur et un domaine Xylo-C non catalytique. Ils ont suggéré que la spécificité de l'UDP-xylose en tant que donneur est susceptible d'être stricte, compte tenu de la forme restrictive de la poche de liaison du xylose. En revanche, il a été démontré que la spécificité de l'accepteur peptidique est laxiste, à l'exception de l'identité du résidu modifié et de son voisin immédiat (284).

#### 5.4. Localisation intracellulaire

Les GTs qui initient la N-glycosylation sont localisées dans le réticulum endoplasmique (ER) (285), mais la plupart des GTs impliquées dans la synthèse des GAGs sont localisées dans le Golgi (Dick et al., 2012). La localisation de la XT est encore contradictoire. Certaines études indiquent que la XT est localisée dans le RE et d'autres suggèrent plutôt une localisation dans le Golgi (270). Nuwayhid et ses collègues ont montré que la xylosylation se produit dans un compartiment riche en Golgi dans le foie, suggérant la localisation de la XT dans le Golgi (287). Une autre étude menée à partir des chondrosarcomes de rat suggère également que la xylosylation se produit principalement dans un compartiment du Golgi (288).

Cependant, la culture de fractions embryonnaires de cartilage de poussin a montré que les chaînes de CS sont initiées dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) (289). Hofmman et ses collègues ont également suggéré que la xylosylation se produit dans le RER et par conséquent, la XT est localisée dans le RER (290). Par la suite, Vertal et al., (1993) ont eu recours à la microscopie électronique pour visualiser le processus de xylosylation et ont montré que la XT était localisée dans le RE (291). Le même groupe a montré qu'après la xylosylation dans le RE, l'élongation des chaînes de GAGs a lieu dans le Golgi (292). Récemment, Schon et al. ont démontré que la XT-I et la XT-II étaient localisées dans le Golgi. Ils ont transfecté les cellules HEK-293 avec les plasmides XT-I et XT-II marqués à la GFP et ils ont utilisé l'immunofluorescence pour détecter la localisation. Selon leurs résultats, la XT-I et la XT-II sont toutes deux localisées dans le cis-Golgi (293).

Les isozymes XT sont exprimées différemment dans divers tissus et lignées cellulaires. Les hépatocytes expriment fortement la XT-II alors que la XT-I est principalement exprimée dans les chondrocytes au niveau du cartilage (272,276,294). De manière similaire, la xylosylation à partir du tissu hépatique a montré une localisation dans le Golgi (287) et le tissu cartilagineux a montré que la xylosylation se produit dans le RE (289). Ces études indiquent que les deux isoformes (XT-I et XT-II) pourraient avoir une localisation différente.

## 5.5. La XT et les pathologies ostéoarticulaires

Les PGs sont sécrétés dans la MEC et jouent un rôle important dans la physiopathologie de plusieurs processus biologiques. La XT est sécrétée dans la MEC avec les PGs nouvellement synthétisés, mais la fonction de la XT sécrétée est toujours inconnue. Par conséquent, la XT dans le sérum est utilisée comme biomarqueur potentiel pour les conditions pathologiques associées aux anomalies liées à la synthèse des GAGs des PGs (295). Récemment, il a été montré que la XT-II est la principale XT présente dans le sérum et qu'elle dérive des plaquettes (296,297). Une activité XT élevée a été trouvée dans le sérum de patients atteints de sclérodémie systémique (ScS), fibrose cutanée, fibrose hépatique, PXE, cardiomyopathie dilatée, arthrose, perturbation de la barrière hémato-encéphalique et de fibrose pulmonaire (295).

Récemment, plusieurs études ont associé différentes pathologies du développement osseux à des mutations retrouvées au niveau du gène de la XT-I et de la XT-II. La plupart des dysplasies osseuses sont associées à des mutations au niveau du gène *XYLT1* et une seule mutation a été décrite au niveau du gène *XYLT2*. En effet, Munns et ses collègues ont montré une mutation homozygote induisant un décalage du cadre de lecture (p.Ala174Profs \* 35) au niveau de la XT-II avec un codon stop prématuré conduisant à une forme tronquée de cette enzyme. Les patients sont atteints du syndrome spondylo-oculaire et présentent des os fragiles avec des fractures de compression vertébrale, une perte auditive neurosensorielle et des malformations oculaires et cardiaques (298). Ils ont émis l'hypothèse que l'expression des PGs dans le cristallin, la rétine, le muscle cardiaque, l'oreille interne et les os dépendait de la XT-II.

Une mutation faux-sens homozygote (c.1441C> T [p.Arg481Trp]) au niveau de la XT-I a été rapportée chez des patients atteints du syndrome autosomique récessif de petite taille. Les patients présentent un nanisme important, une ossature légère, des traits faciaux distinctifs et des capacités intellectuelles réduites (**Tableau II**). Les fibroblastes des patients présentent une proportion de décorine dépourvue de ses chaînes de GAGs et une expression réduite de la XT-I. L'activité enzymatique de la XT-I *in vitro* a été mesurée en utilisant la bikunine en tant que peptide accepteur et elle était similaire chez les patients et chez les témoins (299).

Plusieurs études ont montré que différentes mutations au niveau du gène de la XT-I sont à l'origine de la dysplasie Desbuquois type II. En effet, en 2014, Bui et ses collègues ont montré cinq mutations de la XT-I chez des patients atteints de dysplasie Desbuquois de type II (DBQD-II). Ces mutations comprennent une mutation faux-sens (c.1792C> T [p.Arg598Cys])

située dans le domaine catalytique de la XT-I, deux mutations non-sens résultant en un codon stop prématuré (c.276dupG [p.Pro93Alafs \* 69], c.439C> T [p.Arg147 \*]) engendrant ainsi une forme tronquée de l'enzyme, deux mutations du site d'épissage (c.1290-2A> C, c.1588-3C> T) situées dans les exons 6 et 8, respectivement. Ces mutants ont entraîné une diminution de la synthèse des chaînes de GAG. Les patients présentaient un nanisme prononcé, un visage plat avec des yeux proéminents, des extrémités courtes, des os longs raccourcis avec un élargissement métaphysaire, une dysplasie épiphysaire et une ossification prématurée du carpe et du tarse (**Tableau II**) (300).

En 2015, van Koningsbruggen et al., ont identifié le premier patient avec une délétion hétérozygote du gène *XYLTI* (partielle et complète), associées à une dysplasie squelettique avec une sévère réduction de la taille des membres, mais sans les caractéristiques de la dysplasie de Desbuquois de type II. Le patient présente des membres de petite taille, une fente labiale, un nez aplati et un large abdomen avec des problèmes respiratoires, une tachypnée et des rétractions intercostales (**Tableau II**) (301).


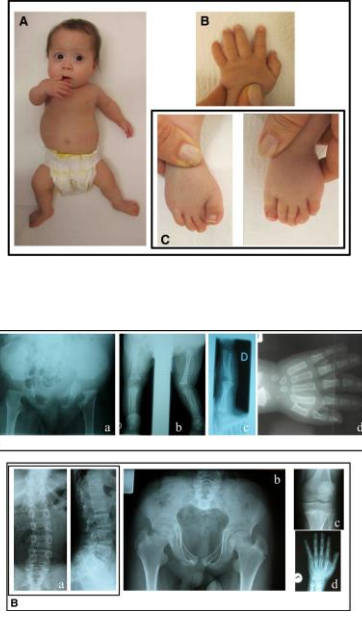
En 2016, d'autres mutations du gène *XYLTI* ont été associées au syndrome DBQD-II. Guo et ses collègues ont rapporté une nouvelle mutation récurrente de la XT-I chez trois patients issus de deux familles, atteints de la DBQD-II. Jamsheer et al., (2016) ont montré deux mutations hétérozygotes au niveau du gène *XYLTI* chez un patient atteint de la DBQD-II et présentant un déficit en hormone de croissance. Silvera et ses collaborateurs ont montré un autre patient présentant un phénotype compatible avec DBQD-II chez lequel une mutation homozygote du gène *XYLTI* avait été identifiée (**Tableau II**) (302–304).



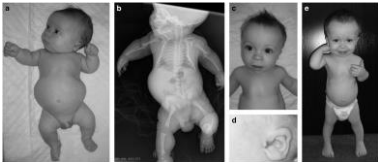


En 2017, Al-Jazawi et al ont identifié un nouveau variant homozygote (c.2169dupA) de la XT-I conduisant à un frame shift et un codon stop (p.Val724Sers\*10) chez un patient diagnostiqué d'une DBQD-II, caractérisée par un raccourcissement des os longs, un visage plat, des têtes de fémurs avec une apparence modérée de wrensh monkey. L'immunofluorescence sur des cellules Hela transfectées avec un plasmide contenant ce variant de la XT-I a montré une localisation subcellulaire défectueuse de la XT-I par rapport au sauvage suggérant une rétention endoplasmique de ces mutants comme mécanisme de perte de l'activité (**Tableau II**) (305).

Chez la souris, la mutation W932R de la XT-I induite par le traitement à la N-éthyl-N-nitrosourée (ENU), appelée mutation du pug, a entraîné une réduction de la longueur du corps (nanisme). En effet, les mutants pug, présentent une réduction (15 à 20%) de la longueur du squelette au stade embryonnaire E14.5. À l'âge adulte, les mutants pug ont également montré une réduction de la taille du corps, une cage thoracique plus petite, des côtes plus larges, un

petit crâne, des membres courts et une petite queue comparés aux souris de type sauvage. L'analyse des mécanismes moléculaires indique que les chondrocytes des mutants pug présentent une maturation précoce car ils expriment plus de collagène X et ont une signalisation IHH accrue. Les mutants pug ont moins d'activité XT et par conséquent ils présentent une synthèse réduite des chaînes de GAGs (306).

Toutes ces études montrent une altération de la fonction de *XYLT1* qui induit des anomalies d'ossification et de croissance. Ce qui suggère que la XT-I joue un rôle important dans le cartilage de croissance et que sa déficience n'est pas compensée par la XT-II dans ce tissu.

Mutation de XT-I	Syndrome	Caractéristiques	Références
<p>Une mutation faux sens homozygote</p> <p>c.1441C&gt;T[p.Arg481Trp]</p>	<p>Syndrome autosomique récessif de petite taille</p>		<p>Screml et al 2013</p>
<p>Une mutation faux sens</p> <p>c.1792C&gt;T[p.Arg598Cys]</p> <p>Deux mutations nonsense</p> <p>c.276dupG [p.Pro93Alafs * 69]</p> <p>c.439C&gt; T [p.Arg147 *]</p> <p>Deux mutations de site d'épissage</p> <p>c.1290-2A&gt; C</p> <p>c.1588-3C&gt; T</p>	<p>DBQD II</p>		<p>Bui et al 2014</p>

<p>Délétion hétérozygote Complète : 3.3Mb du chromosome 16 Partielle : 18 pb jonction exon7/exon8</p>	<p>Short limb skeletal Dysplasia</p>		<p>Van Koningsbruggen et al 2015</p>
<p>Délétion homozygote c.1792delC[p.R598Afs*7] Mutation de site d'épissage c.1290-2AC</p>	<p>DBQD II</p>		<p>Guo et al 2016</p>
<p>Deux mutations hétérozygotes c.595C4 &gt; T[p.Gln199*] c.1651C4 &gt; T[p.Arg551Cys]</p>	<p>DBQD II</p>		<p>Jamsheer et al 2016</p>
<p>Mutation homozygote c.1651C&gt;T[p.Arg551Cys]</p>	<p>DBQD II</p>		<p>Silveira et al 2016</p>
<p>Duplication homozygote c.2169dupA [p.Val724Serfs*10]</p>	<p>DBQD II</p>		<p>El-Jezawi et al 2017</p>

**Tableau II : Les différents variants génétiques de la XT-I et les différentes dysplasies osseuses associées.**



# *Matériel et méthodes*

## 1. Soins et élevage des souris :

Des souris C57BL/6J ont été invalidées pour le gène de la XT-I par délétion de l'exon 1 et une partie de la séquence du promoteur (10.5 kb). Toutes les expériences qui ont été menées sur ces souris, ont été approuvées par le comité d'éthique lorrain et elles ont été effectuées selon les directives du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Durant l'acclimatation et l'expérimentation, les souris ont été gardées dans des conditions standards de température ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) et d'humidité ( $55 \pm 10\%$ ) et dans un environnement à lumière contrôlée (12h jour/12h nuit), avec libre accès à l'eau et à la nourriture. Les souris invalidées pour le gène de la XT-I ont été générées à l'Institut Clinique de la Souris de Strasbourg. Pour obtenir les souris XT-I KO (XT-I<sup>-/-</sup>), des souris XT-I hétérozygotes (XT-I<sup>+/-</sup>) mâles ont été croisées avec des souris XT-I hétérozygotes (XT-I<sup>+/-</sup>) femelles et les embryons ont été collectés à différents stades du développement embryonnaires.

## 2. Préparation des embryons et génotypage

### 2.1. Frottis cellulaire

Avant de procéder à l'accouplement des souris XT-I hétérozygotes, un frottis cellulaire est effectué chez les souris XT-I hétérozygotes femelles afin de déterminer la phase du cycle œstrale de ces dernières. Une goutte (50 à 70  $\mu\text{l}$ ) d'eau distillée est déposée à l'orifice du canal vaginal de la souris et plusieurs aller-retour de la goutte d'eau sont effectués. La goutte d'eau est récupérée et déposée sur une lame en verre puis séchée à température ambiante. Une fois la goutte de cellules sèche, la lame est plongée dans une solution de bleu Crystal (0,1%) pendant 30 secondes puis lavée deux fois à l'eau distillée. Ensuite les lames sont montées au Pertex (Histolab) et les frottis cellulaires sont observés et analysés au microscope. Le cycle œstral de la souris est divisé en quatre phases et chaque phase est caractérisée par un ou plusieurs types cellulaires spécifiques : proœstrus (cellules épithéliales nucléées), œstrus (cellules épithéliales cornifiées), métœstrus (cellules cornifiées et des leucocytes) et diœstrus (leucocytes et des cellules épithéliales). Les souris XT-I hétérozygotes en phase proœstrus sont mises en accouplement.

### 2.2. Récupération des embryons

Une souris XT-I<sup>+/-</sup> mâle et une ou deux femelles XT-I<sup>+/-</sup> en phase proœstrus, sont mises en accouplement dans une cage. Les souris XT-I<sup>+/-</sup> femelles sont d'abord pesées à J0 (le jour de l'accouplement) puis à J10,5 (après l'accouplement). Une prise de poids de 2g

caractérise les souris gestantes. Ces dernières sont mises à mort au dioxyde de carbone et les embryons sont récupérés à différents stades du développement embryonnaire (E12.5, E13.5, E14.5, E15.5, E16.5, E18.5 et E19.5).

### 2.3. Extraction de l'ADN

Le génotype des embryons de la même portée est réalisé à partir d'une biopsie de chaque embryon et de la souris mère. L'ADN génomique est extrait à partir de chaque biopsie en utilisant deux solutions d'extraction d'ADN (solution 1 : 25 mM NaOH, 0,2 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  pH=12 ; solution 2 : 40 mM Tris-HCL pH=5). Les biopsies sont d'abord lavées trois fois au PBS (1X) pour éviter la contamination avec l'ADN de la souris mère puis 50  $\mu\text{l}$  de la solution 1 (25 mM NaOH, 0,2 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH=12) sont ajoutés et les biopsies sont incubées 15 minutes à 95°C sous agitation (450 rpm). Puis une incubation de 15 minutes dans la glace est effectuée avant d'ajouter 50  $\mu\text{l}$  de la solution 2 (40 mM Tris-HCL, pH=5). Ensuite les échantillons sont vortexés et centrifugés pendant 6 minutes à 14000 xg. Enfin 80  $\mu\text{l}$  du surnageant contenant l'ADN génomique sont récupérés.

### 2.4. Génotypage

Le génotypage est effectué en accord avec le protocole de l'Institut de la Clinique de la Souris. Quatre séquences d'amorces ont été utilisées pour amplifier le gène de la XT-I et les séquences LoxP. Ef/Wr ont été utilisées pour amplifier la partie 5' du locus cible de l'allèle sauvage et Ef2/Lxr ont été utilisées pour amplifier les séquence spécifiques de LoxP (**Tableau III**). Une PCR est réalisée pour chaque ADN génomique en utilisant le kit QIAGEN HotStart Taq® Plus Master Mix Kit (QIAGEN, Allemagne), suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, chaque réaction de PCR est faite dans un volume de 20  $\mu\text{l}$  contenant 6  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  RNase Free, 10  $\mu\text{l}$  de Hot start Taq, 2  $\mu\text{l}$  Coal Red, 0,5  $\mu\text{l}$  d'amorce sens (10 pmol) et 0,5  $\mu\text{l}$  amorce anti-sens (10 pmol). Les conditions de PCR sont listées dans le **Tableau IV**. Des fragments de tailles différentes sont générées selon le génotype de la souris : KO (364 pb), WT (404pb), hétérozygote (364 pb et 404 pb) (**Figure 15**).

Nom de l'amorce	Sens de l'amorce	Séquence
EF	WT Forward	CTATTCCATGGTGAACACGGC
WR	WT Reverse	GCTCTTCATTCACATGTCCTCATCACC
EF2	KO Forward	ACAGAATTTGCAGCTGGGTGCTTTG
LXR	KO Reverse	GAAGTTATACTAGAGCGGCCGTTAC

**Tableau III : Séquences des amorces utilisées pour le génotypage des embryons**

Étape	Temps (minutes)	Température (°C)	Nombre de cycle
Activation de la polymérase	5	95	1
Dénaturation	0,5	94	30
Hybridation	0,5	62	
Extension	1	72	
Extension finale	10	72	1
Hold	∞	4	

**Tableau IV : Conditions d'amplification utilisées pour la PCR du génotypage**

### 3. Coloration du squelette au Bleu Alcian et au Rouge Alizarine

Le squelette des embryons XT-I WT et XT-I KO ont été colorés au Bleu Alcian et au Rouge Alizarine selon la méthode décrite par Behringer et ses collègues dans leur ouvrage en 2007 (15). Les embryons récupérés aux stades embryonnaires E14.5, E16.5 et E18.5, sont dépiautés, éviscérés puis déshydratés à l'éthanol 96% pendant 24h. Ensuite les embryons ont été placés dans une solution de coloration au Bleu Alcian (20% acide acétique glacial, 80% d'éthanol et 0,03% de Bleu Alcian 8GX) pendant 24h afin de marquer les tissus cartilagineux, puis ils ont été lavés avec une solution de KOH 1,5% pendant 24h. Afin de marquer les tissus minéralisés, les embryons ont été incubés dans une solution de coloration Rouge Alizarine (1% KOH, 0,03% Rouge Alizarine) pendant une nuit puis lavés dans une succession de bains de KOH (1%, 0,5%) et placés dans une solution contenant 50% de glycérol et 50% de KOH (0,5%) afin de clarifier les tissus mous. Enfin, ils ont été stockés à température ambiante dans une solution contenant 50% de glycérol.

### 4. Coupes histologiques

Les embryons XT-I KO et sauvages ont été récupérés à différents stades embryonnaires, E14.5, E16,5 et E18,5. Les membres ont été disséqués indépendamment les

uns des autres et ont été fixés pendant 24h à température ambiante dans du paraformaldéhyde 4% (Sigma Aldrich) ou dans du Formol 10%. Ensuite, ils ont été déshydratés dans une série de bains d'éthanol (70%, 90%, 100%) puis passés dans un bain de toluène avant qu'ils soient inclus dans de la paraffine. Après inclusion, des coupes de 5 µm ont été réalisées à l'aide du Microtome Leica.

## 5. Colorations histologiques

Afin d'analyser la plaque de croissance des embryons XT-KO et de leurs congénères sauvages, plusieurs colorations histologiques ont été effectuées en utilisant un automate de coloration, le Sakura Auto Stainer (XL).

### 5.1. Bleu Alcian

La coloration au bleu Alcian a été utilisée pour mettre en évidence la matrice cartilagineuse de la plaque de croissance. C'est une coloration spécifique des chaînes de GAGs des PGs constitutifs de la matrice. Une solution de Bleu Alcian dans de l'acide acétique à 3%, pH=1,3 est utilisée ainsi qu'une solution de Kernechtrot (0,1 g de Kernechtrot dans une solution de sulfate d'aluminium de 5%) comme contre coloration. Les coupes d'embryons ont été d'abord déparaffinées puis incubées 2h dans la solution de Bleu Alcian et 5 minutes dans la solution de kernechtrot.

### 5.2. Safranine-O

La coloration Safranine-O permet également de mettre en évidence les PGs de la plaque de croissance. Elle est réalisée à l'aide d'une solution de Safranine-O avec le Fast Green comme contre colorant. Brièvement après les étapes de déparaffinage, les coupes sont incubées dans une solution de Fast Green 0,03% pendant 5 minutes puis dans une solution d'acide acétique 1% pendant 20 secondes. Après un lavage à l'eau, elles ont été incubées dans une solution de Safranine-O (0.1% pH=5,3) pendant 5 minutes, puis les lames ont été déshydratées, montées au Pertex (Histolab) et analysées au microscope DMD108 (Leica).

### 5.3. Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran

La coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) a été utilisée afin d'étudier l'aspect cellulaire de la plaque de croissance des embryons XT-I KO et XT-I WT. C'est une coloration trichromatique qui contient trois colorants, l'Hématoxyline qui colore les noyaux en bleu-

violet, l'Eosine qui colore le cytoplasme en rose et le Safran qui colore les collagènes des tissus conjonctifs en jaune. Les coupes d'embryons ont été d'abord déparaffinées et réhydratées puis elles ont été incubées dans une solution d'hématoxyline de Harris (RAL) pendant 5 minutes puis elles ont été lavées à l'eau et incubées dans de l'alcool ammoniacal pendant 1 minute puis dans une solution d'Eosine (0,01% Erythrosine, RAL) pendant 5 minutes puis dans une solution de Safran (0,01% Safran du Gatinais) pendant 5 minutes. Enfin les lames sont montées et les photos ont été prises au microscope optique DMD 108 (Leica).

#### 5.4. Rouge Alizarine

La coloration au Rouge Alizarine a été réalisée manuellement dans une solution de Rouge Alizarine afin de mettre en évidence l'ossification et les zone minéralisées au niveau de la plaque de croissance. Les coupes d'embryons ont été d'abord déparaffinées puis incubées dans une solution de Rouge Alizarine (2% de Rouge Alizarine, 10% ammonium, pH=4,1~4,3) pendant 2 minutes puis elles ont été déshydratées dans un bain d'acétone, ensuite dans un bain d'acétone-xylène (1 : 1) et enfin dans un bain de xylène, puis les coupes ont été montées avec le Pertex (Histolab) et numérisées au microscope optique DMD 108 (Leica).

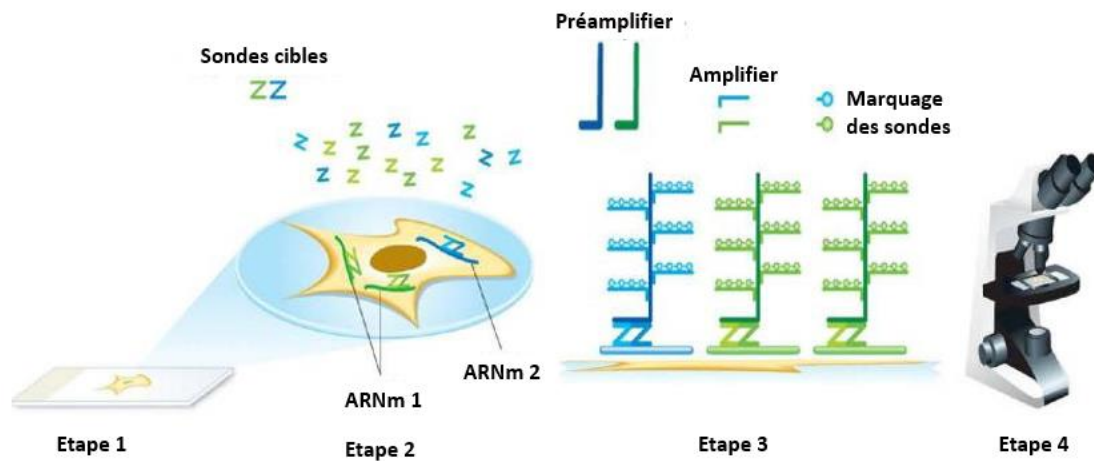
#### 5.5. Rouge Sirius

Le rouge Sirius a été utilisé pour mettre en évidence les collagènes constitutifs de la plaque de croissance. Après le déparaffinage, les coupes d'embryons ont été incubées dans une solution de rouge Sirius (0,1% dans de l'acide picrique saturé) pendant une heure puis dans une solution de HCl (0,01N) pendant 2 minutes. Après montage, les lames ont été analysées au microscope optique DMD 108 (Leica) avec une lumière standard et avec une lumière polarisée.

### 6. Hybridation in situ par la technique du RNAscope (ISH)

Pour analyser l'expression des différents gènes impliqués dans le développement ostéoarticulaire, nous avons choisi l'hybridation *in situ* par la technique du RNAscope (Advanced Cell Diagnostic). RNAscope est une nouvelle technique très sensible, grâce à la conception unique des sondes et à l'amplification du signal (**Figure 14**). Les sondes sont sous forme d'un double Z formé d'une région de 18 à 25 pb complémentaire à l'ARNm cible, d'un

“espaceur“ et d’une queue de 14 pb. Les deux séquences queue du double Z forment un site de 28 pb qui va s’hybrider avec un préamplificateur contenant 20 sites de fixation pour l’amplificateur. Ces derniers à leur tour contiennent chacun 20 sites de marquage. Une région de 1 kb de l’ARN cible est marquée par 20 paires de Z qui s’hybrident séquentiellement ce qui peut théoriquement générer 8000 marquages pour chaque molécule d’ARN cible. La sonde peut être marquée soit par fluorescence et visualisée par un microscope à épifluorescence ou conjuguée à la phosphatase alcaline ou à la Horseradish peroxydase (HRP) et être visualisée par microscopie optique. Nous avons choisi la révélation chromogénique avec le système HRP/DAB (3,3’-Diaminobenzidine) pour nos réactions de RNAscope. Les coupes de 5 µm d’embryons ou de membres d’embryons XT-I KO et XT-I WT ont été déparaffinées dans un bain de xylène pendant 10 minutes puis dans deux bains successifs d’éthanol à 95 % pendant 2 minutes chacun. Les sections ont été ensuite incubées avec une solution de peroxyde d’hydrogène pendant 10 min à température ambiante afin de saturer les peroxidases endogènes, puis elles ont été lavées à l’eau Milli-Q avant qu’elles soient incubées dans un tampon Retrieval (1X) maintenu à température d’ébullition (98°C – 102°C) pendant 15 minutes. Après deux lavages à l’eau Milli-Q, une barrière hydrophobique a été dessinée autour de la section. Ensuite, les sections ont été traitées avec la protéase-plus pendant 30 min à 40°C, puis l’hybridation avec les sondes spécifiques a été effectuée pendant 2 h à 40°C. Une série de 6 “amplificateurs“ a été ensuite appliquée pendant 30 min et 15 min successivement. Après chaque hybridation deux lavages ont été effectués avec du tampon de lavage (1X). Enfin 120 µl de DAB sont ajoutés à chaque section pour la révélation chromogénique de l’expression des gènes, suivie par une contre coloration à l’hématoxyline de Mayer. Les lames ont été ensuite montées avec du Pertex (Histolab) et analysées au microscope Leica DMD108. Les sondes qui ont été utilisées durant cette étude sont : Xylt1, Xylt2, Col2a1, Col10a, ACAN, Sox9, Runx2, Ihh, Pthrp, Gli1, FGFR3 et TGFβR2. La sonde PPIB (Peptidyl-Propyl Isomérase B) a été utilisée comme contrôle positif et la sonde DAPB (Dihydro-dipicolinate Réductase B) comme contrôle négatif.



**Figure 14 : Schéma descriptif de la procédure de la technique RNAscope.**

Etape 1 : les cellules ou les tissus sont fixés et perméabilisés pour permettre l'accès à la sonde cible. Etape 2 : les sondes spécifiques de l'ARN cible (Z) sont hybridées par paires (ZZ) à de multiples cibles d'ARN. Etape 3 : de multiples molécules d'amplification de signal sont hybridées, chacune reconnaissant une sonde cible spécifique, et chaque sonde possède un marqueur unique qui est conjuguée soit à un fluorophore ou à une enzyme différente. Etape 4 : les signaux sont détectés à l'aide d'un microscope à épifluorescence (pour un marquage fluorescent) ou d'un microscope optique (pour un marquage enzymatique).

## 7. Immunohistochimie

Les réactions d'immunohistochimie ont été réalisées avec le kit Dako Envision. Des coupes de 5  $\mu\text{m}$  d'embryons ou de membres d'embryons XT-I KO et XT-I WT ont été déparaffinés dans un bain de Tissu Clear et dans une série de bains d'alcool (100 %, 95%, 70%) puis elles ont été incubées dans une solution de citrate (10 mM, pH=6) pendant toute la nuit. Les coupes ont été ensuite bloquées dans une solution de BSA (2% p/v) après une incubation pendant 10 minutes avec du Dual Endogenous Enzyme Block. Après trois lavages au TBST (500 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% Tween 20), les coupes ont été incubées avec des anticorps primaires spécifiques pendant une heure à température ambiante. Une incubation de 30 minutes avec l'anticorps secondaire Labelled-polymer-HRP a été effectuée puis les lames ont été révélées avec la DAB. Après une contre-coloration à l'hématoxyline, les lames sont montées et analysées au microscope Leica DMD 108. Les anticorps qui ont été utilisés en immunohistochimie sont listés dans le **Tableau V**.



## 8. Microscopie de génération de seconde harmonique (GSH)

Des coupes de 5µm ont été effectuées sur des membres d'embryons au stade E19.5. Après un déparaffinage au Tissu Clear et dans une série de bains d'alcool (100 %, 95%,70%), elles ont été montées au Pertex (Histolab) et analysées par microscopie de génération de seconde harmonique (GSH) pour visualiser l'orientation et l'organisation des fibres de collagènes de la plaque de croissance des embryons.

## 9. Coloration Tartrate Resistant Acid Phosphate (TRAP)

Afin de mettre en évidence les ostéoclastes au niveau des tissus osseux chez les embryons, une coloration TRAP à l'aide du kit Acid Phosphatase Leucocyte (TRAP) (Sigma Aldrich, France) a été réalisée. Brièvement, les coupes des membres d'embryons au stade E19.5 ont été déparaffinées puis placées dans une solution de coloration TRAP préchauffée à 37°C et incubées pendant 30 minutes à cette même température. Ensuite, les lames ont été lavées deux fois à l'eau distillée et contre-colorées au Fast-Green pendant 1 minute. Après des lavages à l'eau distillée les coupes ont été déshydratées, montées au Pertex (Histolab) et analysées à l'aide du microscope Leica DMD 108.

## 10. Préparation des chondrocytes primaires

Les chondrocytes primaires ont été préparés à partir de cage thoraciques d'embryons selon la méthode décrite par Gosset et ses collègues (307). Brièvement, les embryons ont été récupérés au stade embryonnaire E18.5, ils ont été éviscérés puis lavés au PBS stérile (1X). Les cages thoraciques ont été isolées et nettoyées de tous les tissus mous et placées dans une plaque 6 puits (une cage thoracique par puits). Après deux lavages au PBS (1X) stérile, 2 ml de solution de collagénase D (3mg/ml) (Roche Diagnostic) ont été ajoutés dans chaque puit et incubées pendant 45 minutes à 37°C. Ensuite, elles ont été transférées dans une nouvelle plaque 6 puits et 2 ml de collagénase D (0,5mg/ml) ont été ajoutés puis incubées pendant une nuit à 37°C. Les fragments de cages thoraciques ont été passés à travers une pipette 10 ml puis 5 ml pour disperser les agrégats cellulaires et mettre en suspension les cellules isolées. Après une centrifugation à 400 xg pendant 10 minutes, un lavage au PBS (1X) a été effectué et le culot a été repris dans 5 ml de milieu DMEM (1g/L de glucose) supplémenté avec 10% SVF, 1% glutamine, 1% pénicilline/streptomycine. Les chondrocytes ont été cultivés à 37°C sous atmosphère, contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

## 11. Préparation des fibroblastes primaires

Les fibroblastes primaires sont préparés selon la méthode décrite par Jozefczuk et ses collègues (308). Des embryons XT-I WT et XT-I (+/-) et XT-I KO sont récupérés au stade E15.5 du développement embryonnaire, ils sont éviscérés et lavés avec du PBS stérile (1X). Ensuite ils sont découpés en petits morceaux et les tissus sont récupérés dans 1 ml de de trypsine. Après une incubation de 15 min à 37°C, 2ml de milieu DMEM/F12 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 1% de glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine sont ajoutés et une centrifugation pendant 5 min à 300g est effectuée. Le culot cellulaire est ensuite récupéré dans 10 ml de milieu et les fibroblastes sont mis en culture dans des T75 recouvert de 0,2 % de gélatine à 37°C sous atmosphère humide et contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

## 12. Anabolisme des protéoglycanes

Les chondrocytes issus des embryons XT-I WT et XT-I KO sont cultivés en plaque 6 puits jusqu'à 90% de confluence puis ils sont marqués pendant 24h avec du milieu DMEM contenant 10 µCi/ml de Na<sub>2</sub>[<sup>35</sup>S]SO<sub>4</sub>. Le milieu est récupéré puis centrifugé pendant 10 minutes à 14000 xg. Le surnageant contenant les PGs radiomarqués est digéré à la papaïne (0,1 µg/µl) pendant une nuit à 60°C pour libérer les chaînes de GAGs. Après la digestion, la papaïne est inhibée par chauffage à 100 °C pendant 10 minutes puis le milieu est centrifugé pendant 15 minutes à 14000 xg pour éliminer les débris cellulaires. Ensuite les chaînes de GAGs sont précipitées au CPC (Cetylpyridinium chloride) 5% (p/v) et incubé à 37°C pendant 4 h. Après une centrifugation de 15 minutes à 14000 xg, le culot est repris dans un volume de CPC 1% (p/v) et le mélange est incubé pendant 2 h à 37°C puis centrifugé à 14000 xg pendant 15 minutes. La même étape est répétée avec du CPC 0,5% (p/v) et enfin le culot de GAGs radiomarqués est récupéré et les échantillons sont analysés soit par comptage dans le scintillant soit par migration sur un gel de polyacrylamide 10% (SDS-PAGE).

## 13. Extraction des protéines

Les chondrocytes sont lavés au PBS (1X) puis récoltés dans un tampon de lyse (20 mM Tris-HCl (pH=7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycérophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub> VO<sub>4</sub>, 1 µg/ml leupeptin) dans la glace puis soniqués 3 fois 10 secondes, dans la glace. Le lysat est centrifugé à 14000 xg pendant 10 minutes à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Ensuite, les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (1976) et stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

## 14. Western Blot

Les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE 10% puis transférées sur une membrane PVDF (Millipore, Eschborn, Germany) préalablement équilibrée avec du tampon de transfert (25 mM Tris-Base, 200 mM glycine, 20% (v/v) méthanol). Après le transfert, les membranes sont incubées pendant une heure dans une solution de saturation contenant 5% (p/v) de lait écrémé dans du tampon TBST (Tris Buffer Saline Tween : 150 mM Tris-HCl (Ph=8,5), 10 mM NaCl, 0,5% (v/v) Tween 20) puis mises en contact avec des anticorps primaires spécifiques pendant toute la nuit à 4°C (**Tableau V**). Ensuite, plusieurs lavages au TBST sont effectués et les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase HRP. Enfin, la révélation se fait avec le kit ECL (BIORAD, Hercules, CA) selon les instructions du fournisseur et l'acquisition des images est effectuée avec l'appareil ImageLab. La  $\beta$ -actine est utilisée comme témoin de charge pour les lysats cellulaires.

Dénomination de l'anticorps	Utilisation	Origine
P-ERK	Western Blot dilution 1/1000 Immunohistochimie dilution 1/400	Cell signaling
P-P38	Western Blot dilution 1/1000	idem
P-AKT	idem	idem
P-Smad2	idem	idem
P-Samd3	idem	idem
DCN	idem	Santa Cruz
FGFR3	Western Blot dilution 1/1000 Immunohistochimie dilution 1/250	Sigma
TGFBR2	Western Blot dilution 1/1000 Immunohistochimie dilution 1/100	GeneTex
ERK	Western Blot dilution 1/1000	Cell signaling
P38	idem	idem
SMAD2	idem	idem
SMAD3	idem	idem
H3	idem	idem
P-PKC	idem	idem
$\beta$ -actine	Western Blot dilution 1/2000	idem
Anti-Souris	idem	idem
Anti-Lapin	idem	idem
Anti-chèvre	Western Blot dilution 1/8000	idem

**Tableau V : Listes des anticorps utilisés en Western blot et en immunohistochimie**

## 15. Extraction des ARN et RT-qPCR

### 15.1. Extraction d'ARN

L'extraction des ARN totaux à partir des cellules a été effectuée en utilisant le RNeasy Mini Kit (Qiagen) suivant les recommandations du fournisseur. Les cellules ont été lysées avec le tampon RLT contenant 1% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoéthanol, puis un volume d'éthanol 70% a été ajouté et le mélange a été déposé sur colonne RNeasy Mini spin. Ensuite la colonne a été centrifugée pendant 15 secondes à 8000 xg et lavée avec 700  $\mu$ l du tampon RW1 puis centrifugée pendant 15 secondes à 8000 xg. Deux lavages ont été effectués avec 500  $\mu$ l de tampon RPE et les colonnes ont été centrifugées à 8000 xg pendant 2 minutes. Enfin, les ARN totaux ont été élués avec 30  $\mu$ l d'eau "RNase-free" et la concentration des ARN a été mesurée avec le Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Un ratio d'absorbance à 260 nm et à 280 nm est utilisé pour évaluer la pureté des ARN (un ratio de  $\sim$ 2.0 indique généralement un ARN pure).

### 15.2. Transcription inverse

La transcription inverse a été réalisée en utilisant le iScript™ Reverse transcription Supermix for RT-QPCR (BIO-RAD). 500 ng d'ARN totaux ont été mélangés avec 4  $\mu$ l du SuperMix et complétés avec de l'eau "RNase free" pour un volume final de 20  $\mu$ L. Le mélange est incubé à 25°C pendant 5 minutes, puis à 46°C pendant 20 minutes et enfin à 95°C pendant 1 minute. Les ADNc synthétisés sont utilisés après dilution pour la PCR ou stockés à -20°C.

### 15.3. qPCR

La réaction de PCR quantitative a été réalisée avec le iTaq™ Universal SYBER Green supermix kit (BIO-RAD, Hercules, CA) en utilisant le StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), dans un volume final de 20  $\mu$ L en employant la méthode de la courbe standard relative. Les courbes standards ont été réalisées à l'aide de matrices regroupant l'ensemble des ADNc utilisés lors de la manipulation. Les ADNc dilués au 1/10<sup>ème</sup> ont été amplifiés par le Supermix iTaq Universel Syber Green, (10 $\mu$ L par réaction) auxquels ont été ajoutées 1 $\mu$ L (10 picomoles) d'amorces spécifiques de l'ADNc à détecter. Deux amplifications sont réalisées en parallèle, d'une part avec des oligonucléotides spécifiques du gène étudié, d'autre part avec des oligonucléotides correspondant à une séquence du gène de la protéine ribosomale S29 utilisée comme contrôle interne. Les conditions de PCR qui ont été

utilisées sont les suivantes : un cycle à 94°C pendant 30 secondes, puis 40 cycles à 95°C pendant 15 secondes et 60°C pendant 1 minute. La courbe de fusion a été utilisée pour examiner la spécificité des amplifications de PCR. L'expression du gène cible est normalisée par rapport à l'expression des ARNm de la protéine ribosomale S29 pour chaque échantillon. L'analyse de l'expression des gènes a été réalisée en utilisant la méthode comparative de CT. Les taux de variation ont été calculés à partir des valeurs de  $\Delta\Delta CT$  avec la formule  $2^{-\Delta\Delta CT}$  et les données sont relatives aux valeurs contrôles.

## 16. Transfection des chondrocytes et essai Luciférase

Les chondrocytes issus des embryons XT-I WT et XT-I KO ont étéensemencés à  $6 \times 10^4$  cellules/puit dans des plaques de 24 puits et cultivé dans le milieu DMEM à 80% de confluence. La transfection des chondrocytes a été effectuée en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Le mélange de transfection est préparé dans le milieu Opti-MEM®I (Invitrogen) en accord avec les instructions du fournisseur. Les chondrocytes ont été transfectés en duplicata avec le vecteur rapporteur TOP-FLASH-firefly (500 ng), le vecteur rapporteur TGF $\beta$ -firefly (500 ng), ou le vecteur rapporteur NF $\kappa$ B-firefly (500 ng) en association avec le vecteur pGL3-Basic (500 ng) ainsi qu'avec le vecteur pRL-TK (contrôle interne) à un ratio de 1 :10. 24 h après transfection, le milieu est remplacé. Pour les cellules de chaque puits les activités Firefly et Renilla ont été mesurées en utilisant le kit Dual-Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI), à l'aide de l'appareil Berthold Luminometer (Bad Wildbad, Germany). Les chondrocytes de chaque puits ont été lysés en utilisant 100  $\mu$ l du tampon de lyse passive pendant 20 minutes sous agitation à température ambiante. 20  $\mu$ l de lysat cellulaire ont été mélangés avec 50  $\mu$ l de LAR II puis l'activité Luciférase Firefly est mesurée. Ensuite 50  $\mu$ l du réactif Stop & Glo® ont été ajouté et l'activité Luciférase Renilla est mesurée. Les activités Luciférase Firefly ont été normalisées par rapport à l'activité du vecteur pRL-TK et par rapport à l'activité basale du vecteur vide pGL3-Basic.

## 17. Test de prolifération

La prolifération des chondrocytes XT-I WT et XT-I KO a été mesurée en utilisant le kit CyQUANT NF dye Cell prolifération (Invitrogen). Les chondrocytes ont été mis en culture dans des plaques 96 puits en triplicat à  $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$  et  $3 \times 10^4$  cellules/puits. L'intercalant d'ADN, le CyQUANT NF dye a été dilué au 1/500<sup>ième</sup> dans le tampon HBSS (1X) puis 100  $\mu$ l de cette solution ont été ajoutés dans chaque puits. Ensuite les chondrocytes sont incubés avec

cette solution pendant une heure à 37°C et l'intensité de la fluorescence de chaque échantillon a été mesurée à l'aide du Varioskan Flash (Thermo Scientific) avec une excitation à 485nm, et une émission et détection à 530 nm.

### 18. Traitement des chondrocytes

Les chondrocytes ont étéensemencés dans des plaque 6 puits à  $25 \times 10^4$  cellules/puits et ont été cultivées jusqu'à 80% de confluence dans du milieu DMEM 1g/l de glucose supplémenté avec 10% de SVF, 1% de glutamine, 1% de pénicilline/streptomycine. Les cellules ont été ensuite privées de SVF pendant deux heures puis traitées pendant 1 h avec 0,1  $\mu$ M et 1  $\mu$ M de PD173074 (Sigma Aldrich) un inhibiteur du récepteur FGFR3.

### 19. Tests statistiques

Les données ont été collectées à partir de trois souris au minimum de chaque génotypage (n=3 au minimum), issues de différentes portées. Les données ont été représentées sous forme de moyenne  $\pm$  S.D. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad PRISM, en utilisant le test de Student avec une significativité statistique déterminée à  $P < 0,05$  (\*). Une expérience représentative parmi trois expériences indépendantes est montrée à chaque fois dans les résultats.

## *Objectifs de l'étude*

## Objectifs de l'étude

Les PGs sont des macromolécules importantes composées d'une protéine core sur laquelle sont attachées une ou plusieurs chaînes de GAGs. Ils sont impliqués dans divers processus biologiques tels que la formation et le dépôt de la MEC, la prolifération, l'adhésion, la différenciation et la signalisation cellulaires. Ils jouent un rôle essentiel dans le stockage des facteurs de croissance, de chimiokines, de cytokines et dans l'établissement d'un gradient de morphogènes lors du développement tissulaire. Ils régulent également la diffusion des ligands à travers la MEC. Les PGs sont également impliqués dans de multiples situations pathologiques et dans le développement de plusieurs pathologies telles que le cancer, l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer, l'arthrose et dans certaines pathologies du développement squelettique. L'activité biologique des PGs est directement liée à leurs chaînes de GAGs. La biosynthèse des PGs est catalysée par plusieurs glycosyltransférases et nécessite la formation d'une amorce tétrasaccharidique composée d'un xylose, de deux galactoses et d'un acide glucuronique.

La XT-I est l'enzyme qui initie la synthèse des chaînes GAGs des PGs par transfert d'un xylose à partir d'un UDP-xylose sur des résidus sérine spécifiques de la protéine core. Elle catalyse l'étape limitante de la synthèse des chaînes de GAGs. Par conséquent, elle joue un rôle clé dans la régulation de biosynthèse des PGs. Des mutations au niveau du gène *Xylt1* codant pour la XT-I, sont à l'origine de plusieurs maladies génétiques. Plusieurs études cliniques ont rapporté des mutations non-sens, faux-sens et de site d'épissage au niveau du gène de la XT-I, qui ont été associées au syndrome de la dysplasie Desbuquois de type 2 (DBQD type II) caractérisé par un retard de croissance pré et postnatal, une luxation sévère des articulations et une hypoplasie du thorax et du visage. Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à l'origine des anomalies du développement induites par la plupart de ces mutations n'ont pas été encore élucidés.

L'objectif principal de ce projet est d'étudier le rôle physiologique et physiopathologique de la XT-I dans le développement ostéoarticulaire.

Les objectifs spécifiques sont :

- Le développement d'une souris invalidée pour le gène de la XT-I et le phénotypage de ces dernières aux différents stades du développement embryonnaire (E12.5, E13.5, E14.5, E16.5, E18.5, E19.5) et ceci afin de déterminer la présence d'éventuelles anomalies du développement squelettique et le stade embryonnaire d'apparition de ces anomalies.



- L'analyse histologique de l'organisation de la plaque de croissance, et de ses différentes zones constitutives ainsi que de la MEC des chondrocytes et de son contenu en GAGs et en collagène.
- L'étude des mécanismes et des facteurs à l'origine des anomalies par analyse des défauts de biosynthèse des PGs, des anomalies de maturation des chondrocytes et de l'expression des marqueurs de différenciation chondrocytaires SOX9, Col2a1, ACAN, Co10a1 et Runx2, ainsi que la dérégulation de la signalisation des facteurs FGFs, IHH, TGF $\beta$  qui régulent la chondrogenèse et la maturation chondrocytaire et dont l'action et la biodisponibilité sont régulés par les PGs.

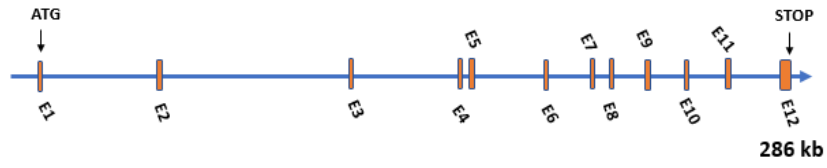
# *Résultats*

## 1. Génération des souris XT-I KO

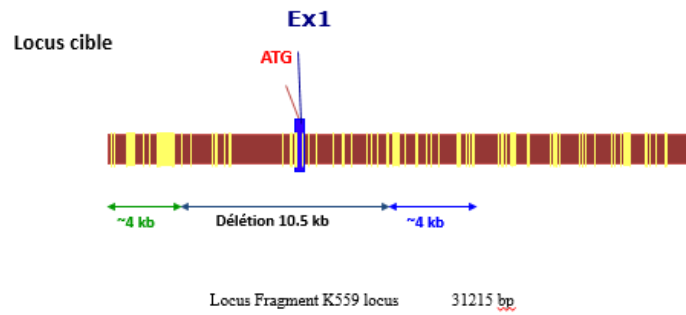
Afin d'étudier le rôle de la XT-I dans le développement ostéoarticulaire et comprendre les anomalies du développement chez les patients atteints du syndrome de Desbuquois Dysplasia type 2 (DBQD type II) lié au gène *Xylt1*, nous avons généré des souris XT-I KO par délétion de l'exon 1 et d'une partie de la séquence du promoteur du gène de la XT-I (Ce travail a été effectué au sein de l'Institut de Clinique de la Souris (ICS) à Strasbourg). Le gène *Xylt1* a une taille de 286 kb, il est constitué de 12 exons et de 11 introns. A cause de sa grande taille, il est difficile de le déléter totalement. C'est pourquoi, la stratégie suivante a été choisie (**Figure 15A et 15B**). Le gène de la XT-I a été isolé et cloné en intégrant des séquences (LoxP) au niveau de l'exon1 et du promoteur de *Xylt1*. Les cellules souches embryonnaires (ES) (cellules totipotentes) ont été transfectées avec le vecteur recombinant. Les cellules ES ayant intégrées le vecteur ont été sélectionnées et amplifiées puis elles ont été introduites dans des blastocystes de souris par micro-injection. Ensuite les embryons ont été réimplantés dans des mères porteuses, donnant ainsi naissance à des souris chimériques dont une partie des cellules dérivent de la masse cellulaire interne de l'embryon et l'autre partie des cellules ES modifiées. Les souris chimériques dont les cellules germinales ou gamètes sont issues des cellules ES ont été sélectionnées et croisées avec des souris exprimant la Cre-recombinase, conduisant ainsi à la délétion d'une région de 18 kb au niveau du gène de la XT-I chez la descendance. Enfin, ces souris ont été croisées avec des souris sauvages pour obtenir des souris XT-I hétérozygotes (XT-I<sup>+/+</sup>) possédant un allèle sauvage et un allèle muté. Ces dernières sont mises en accouplement entre elles afin d'obtenir les souris XT-I knock-out (XT-I KO, XT-I<sup>-/-</sup>).

Avant d'identifier les embryons et les souris XT-I KO, nous avons effectué le génotypage des souris en utilisant des biopsies de queue prélevées sur les différents individus issus du croisement des souris XT-I hétérozygotes. Après extraction de l'ADN à partir des biopsies, une PCR est effectuée en utilisant des amorces spécifiques qui permettent de distinguer entre les trois génotypes (XT-I WT, XT-I KO et XT-I<sup>+/+</sup>). Les différentes amorces utilisées sont illustrées dans la **figure 15C**. Nous avons choisi les amorces Ef /Wr pour déterminer si les souris sont XT-I WT et les amorces Ef2/Lxr pour identifier les souris XT-I KO. L'analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose (2% p/v) montre un produit PCR de 365 pb pour les souris XT-I KO, un produit de 404 pb pour les souris XT-I WT. Les souris XT-I<sup>+/+</sup> hétérozygotes pour le gène *Xylt1* montrent deux produits de PCR de 365 et de 404 pb (**Figure 15D**).

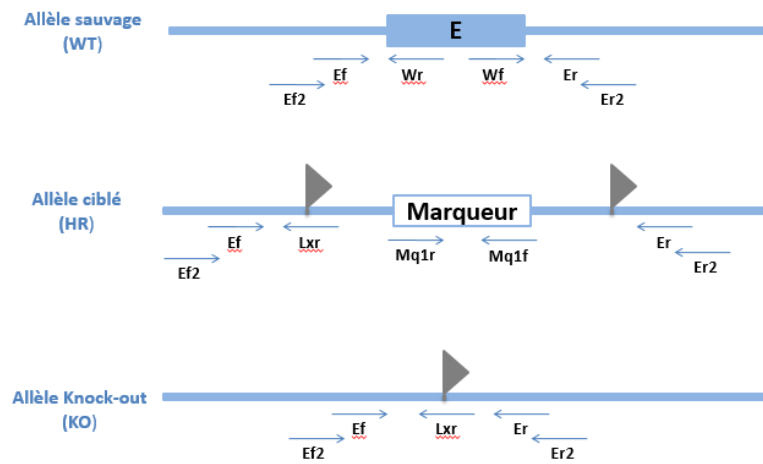
**A**



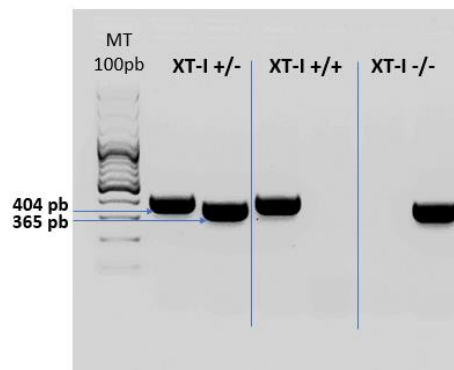
**B**



**C**



**D**

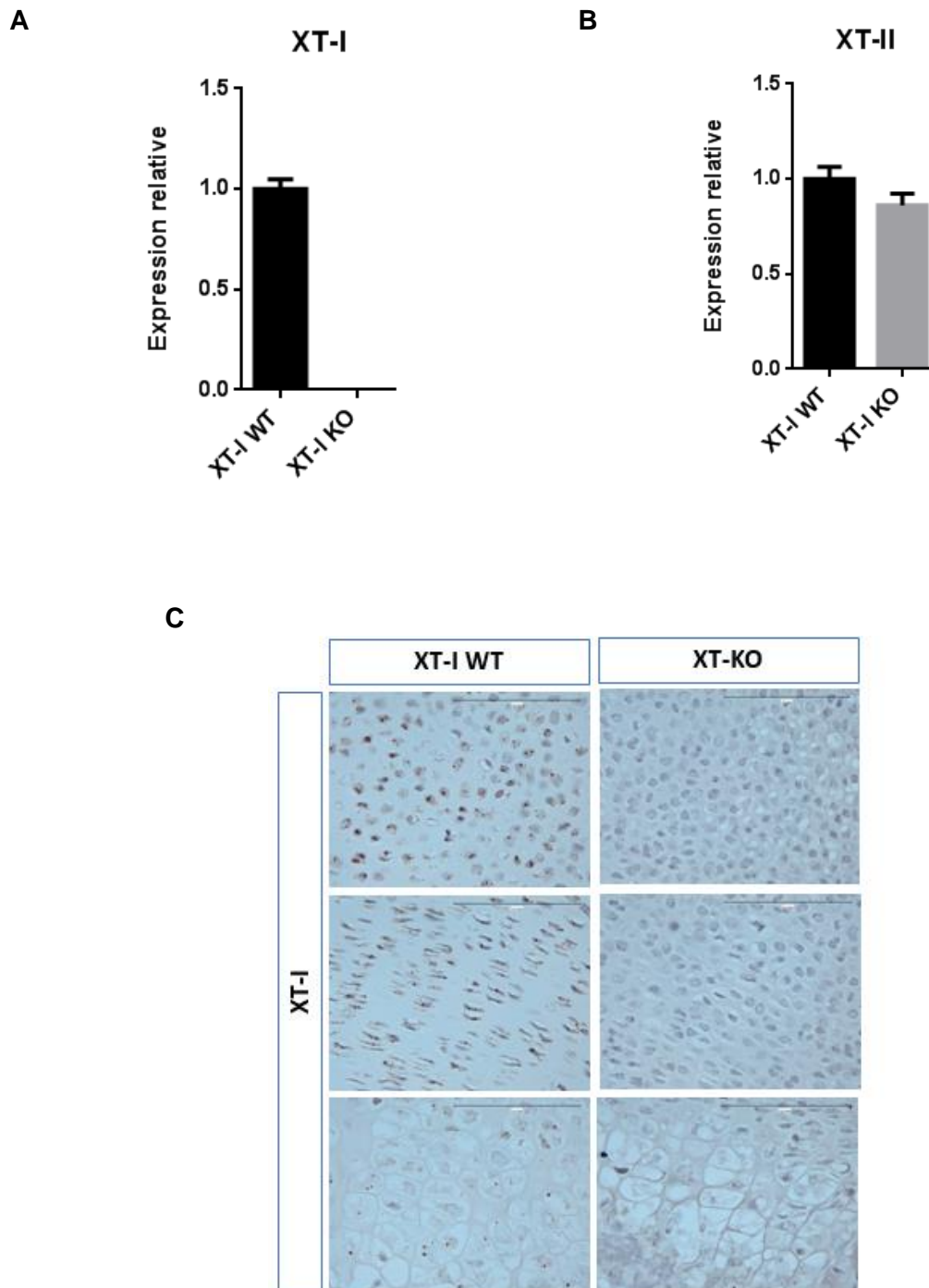


**Figure 15 : Génération des souris XT-I KO.** A) Organisation génique du gène de la XT-I. Structure des exons et des introns du gène *Xylt1* sur le chromosome 7. Le gène *Xylt1* est composé de 12 exons et de 11 introns. Les exons sont désignés par des boîtes et la barre horizontale bleue représente les introns, le codon d'initiation de la traduction ATG et le codon stop sont désignés par les flèches. B) Le locus cible pour l'inactivation du gène de la XT-I. Les souris XT-I KO ont été générées par délétion de l'exon 1 et d'une partie de la séquence du promoteur du gène entraînant ainsi une délétion de 18,5 kb du gène. C) stratégie d'inactivation du gène *Xylt1* et position des amorces utilisées pour le génotypage des souris. D) Analyse de l'ADN des embryons issus d'accouplement des souris XT-I hétérozygotes. L'ADN a été amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (2% p/v).

## 2. XT-I est moins exprimé dans les chondrocytes hypertrophiques

La XT-I est principalement exprimée au niveau du cartilage et au niveau des tissus nerveux (294). Afin de vérifier l'inactivation de l'expression de la XT-I chez les souris XT-I KO, nous avons analysé par qPCR l'expression de la XT-I dans des chondrocytes primaires issus des embryons XT-I KO et des embryons XT-I WT. Les chondrocytes XT-I WT expriment fortement la XT-I, alors qu'aucune expression de celle-ci n'est détectée dans les chondrocytes XT-I KO (**Figure 16A**). Ce résultat indique que *Xylt1* a été bien invalidé chez les embryons XT-I KO. Pour savoir si l'inactivation de la XT-I affecte l'expression de son homologue XT-II, nous avons analysé l'expression de cette dernière par qPCR dans les chondrocytes primaires. Les résultats obtenus montrent que les chondrocytes XT-I WT et les chondrocytes XT-I KO expriment la XT-II à des niveaux similaires (**Figure 16B**). Ces résultats indiquent que l'inactivation de la XT-I n'altère pas l'expression de la XT-II et que cette dernière ne compense pas la perte de la XT-I au niveau des chondrocytes.

Ensuite nous avons vérifié l'inactivation de la XT-I *in vivo* ; pour cela nous avons analysé par RNAscope l'expression de la XT-I sur des coupes d'humerus d'embryons. Les résultats obtenus montrent que la XT-I n'est pas exprimé chez les souris XT-I KO (**Figure 16C**), alors qu'elle est fortement exprimée au niveau des différentes zones de la plaque de croissance (zone de repos, proliférative et pré-hypertrophique) chez les souris XT-I WT. Nous avons constaté également que la XT-I est moins exprimé au niveau de la zone hypertrophique chez les souris sauvages (**Figure 16C**), suggérant que l'expression de la XT-I est régulée au cours de la différenciation des chondrocytes.



**Figure 16 : Analyse de l'expression de la XT-I et de la XT-II chez les embryons XT-I KO.** **A)** Analyse par RT-qPCR du taux d'expression des gènes de la XT-I et de la XT-II dans des chondrocytes primaires issues des embryons XT-I WT et XT-I KO. Les valeurs sont normalisées de sorte que les valeurs du WT sont définies comme étant égale à 1. Le taux d'expression de chaque gène est normalisé par rapport aux gènes rapporteurs RP29 et GAPDH. **B)** Analyse par RNAscope de l'expression de la XT-I au niveau de la plaque de croissance proximale de l'humerus issu des embryons XT-I KO et XT-I WT au stade E18.5 (grossissement X63, échelle = 100  $\mu$ m).

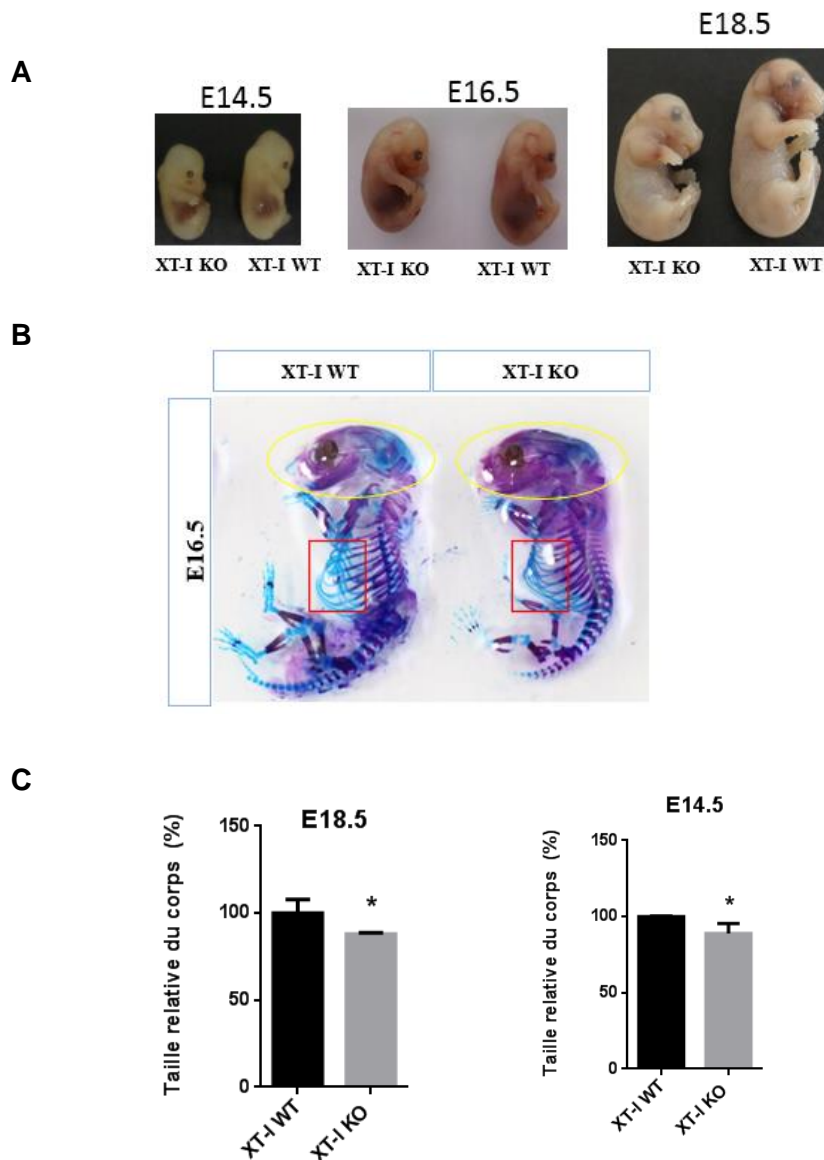
### 3. L'invalidation de la XT-I chez la souris conduit à une létalité périnatale

Nous avons commencé notre étude par l'analyse des souris à 15 jours postnatales (P15) mais après le génotypage, nous n'avons pas identifié de souris XT-I KO, suggérant ainsi une létalité *in utero* ou périnatale. Le moment de la létalité est important pour identifier les anomalies du développement liées à l'invalidation du gène étudié et par conséquent comprendre mieux la fonction biologique de celui-ci. La mort peut survenir à la fin du développement embryonnaire avant la naissance (mort fœtale), immédiatement à la naissance, à un jour (décès néonatal) ou après le premier jour de la vie postnatale (décès postnatal). Afin de déterminer le moment de la létalité des souris XT-I KO, des embryons ont été collectés à différents stades du développement embryonnaire. Au stade E14.5, le nombre des embryons XT-I KO respecte la répartition mendélienne et les embryons sont tous vivants (rythme cardiaque), ce qui suggère que les souris XT-I KO meurent après cette étape. Nous avons poursuivi notre analyse au stade embryonnaire E18.5, juste avant la naissance. A ce stade, le test de viabilité a permis de montrer que la plupart des embryons étaient capables de respirer quelques minutes après la naissance. Les embryons XT-I KO étaient réactifs à la stimulation, mais décèdent 30 minutes après la naissance et présentent une taille plus réduite que leurs congénères. Dans certains cas de décès périnatal, la mutation ou la suppression génétique peut entraîner une mort fœtale ou néonatale. L'analyse des embryons au stade embryonnaire E19.5 montre des résultats similaires qu'au stade E18.5, suggérant une létalité périnatale. Effectivement, à un jour de la naissance, des petits sont retrouvés morts et d'autres sont à moitié cannibalisés. Le génotypage de ces souriceaux a révélé qu'ils sont XT-I KO. Les événements majeurs qui représentent des défis potentiellement mortels pour le nouveau-né au cours des premières 24 heures après la naissance sont la parturition, la respiration, l'homéostasie néonatale et l'allaitement (309). Dans le cas présent, la délétion du gène de la XT-I entraîne la mort périnatale des souris, due probablement à des problèmes respiratoires. En effet, les souris XT-I KO présentent une hypoplasie frontonasale prononcée qui peut être la principale déficience entraînant plusieurs problèmes physiologiques tels que des défauts respiratoires.

### 4. Les souris XT-I KO présentent un nanisme et des anomalies squelettiques

L'analyse des embryons aux différents stades du développement embryonnaire (E14.5, E16.5, E18.5) a montré que les embryons XT-I KO présentent un nanisme et une hypoplasie frontonasale apparente par rapport à leur congénères sauvages (**Figure 17A et 17B**). Au stade E14.5, les embryons XT-I KO montrent une réduction de 11 % en taille et de 14% de la

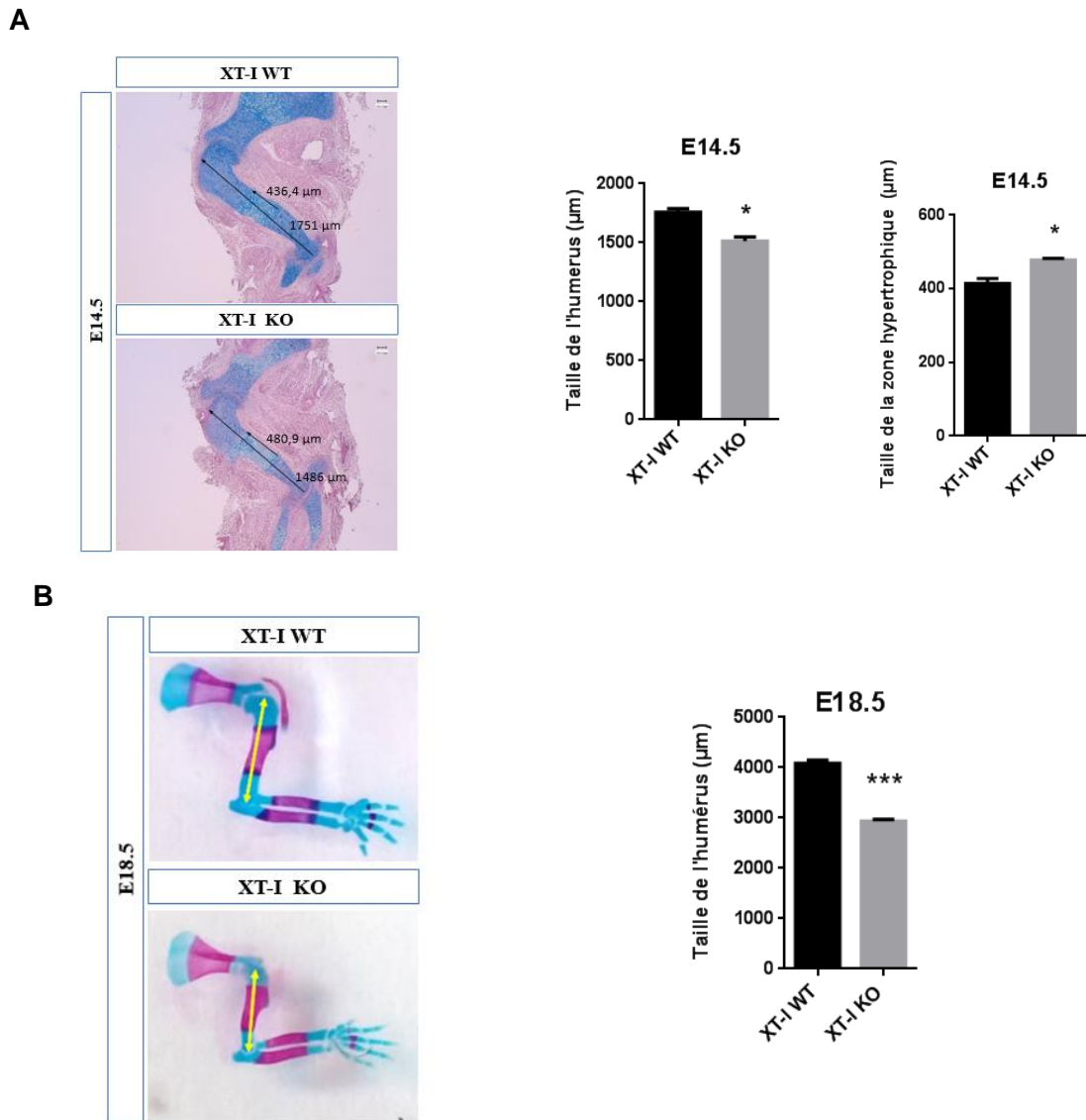
longueur de l'humérus (**Figure 18A**). Au stade E18,5, la taille des embryons XT-I KO est réduite de 13% (**Figure 17C**) et leurs humérus étaient également réduits de 28% (**Figure 18B**). Les embryons XT-I KO présentent un nanisme prononcé et une hypoplasie frontonasale apparente, traduisant des anomalies dans le développement squelettique, probablement due à un défaut de chondrogenèse d'ossification endochondrale.



**Figure 17 : Les embryons XT-I KO présentent un nanisme et une hypoplasie frontonasale. A)** Les embryons XT-I KO aux différents stades embryonnaires (E14.5, E16.5, E18.5) montrent une réduction de la taille globale du corps. **B)** Les graphes représentant la longueur relative du corps total des souris XT-I KO par rapport à leurs congénères WT aux stades embryonnaires E14.5 et E18.5, les valeurs sont normalisées de telle sorte que la longueur du corps des embryons XT-I WT est définie à 100%. **C)** Squelette des embryons au stade E16.5 coloré au Rouge Alizarine et au Bleu Alcian. Rouge = os marqué par le Rouge



Alizarine ; Bleu = cartilage marqué par le Bleu Alcian. Les embryons XT-I KO présentent une dysplasie frontonasale avec un visage plat et une dysplasie crânienne (cercle jaune), ils présentent également une cage thoracique réduite (carré rouge).

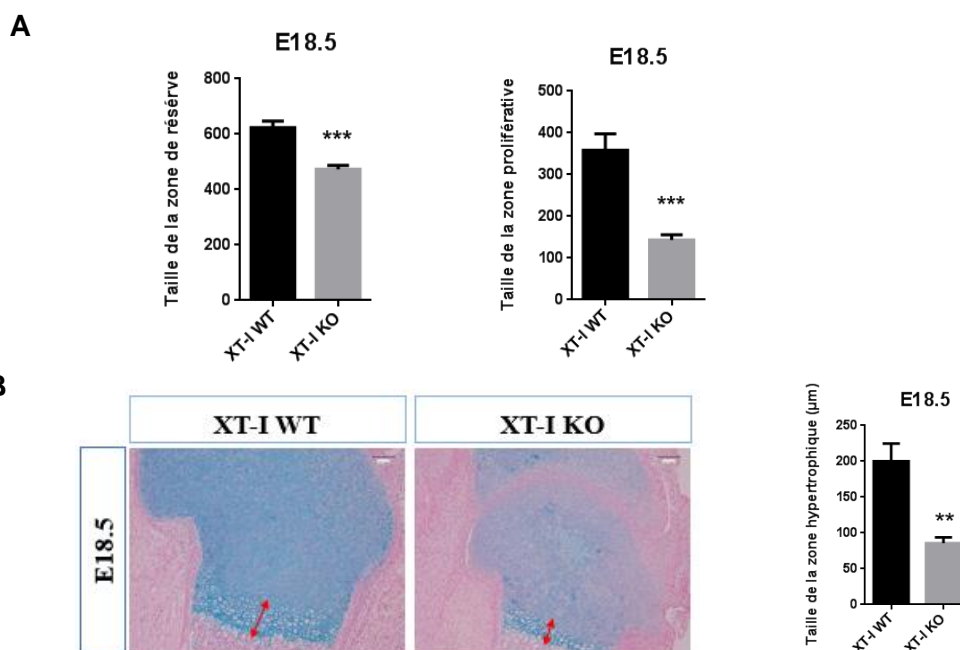


**Figure 18 : Analyse morphologique et histologique de l'humerus chez les embryons XT-I sauvages et KO. A)** Coupes d'humerus au stade E14.5 colorées au Bleu Alcian. L'humerus et la zone hypertrophique sont représentés avec les flèches noires. **B)** Humerus d'embryons à E18.5 colorés au Blue Alcian et au Rouge Alizarine montrant une réduction de la longueur de l'humerus (flèches jaunes).

### 5. Les souris XT-I KO présentent une plaque de croissance de taille réduite

La plaque de croissance est le centre de la chondrogenèse et de l'ossification endochondrale. Nous avons analysé la plaque de croissance des embryons XT-I KO. Des coupes

histologiques ont été effectuées sur les différents membres des embryons et analysées par coloration HES et Bleu Alcian. Nous avons observé une désorganisation et une réduction importante de la taille de la plaque de croissance chez les souris XT-I KO. Les zones de réserve, proliférative et hypertrophique sont nettement réduites aux différents stades embryonnaires étudiés. Au stade E18.5, nous avons observé une réduction de 24% de la taille de la zone de réserve, 60% de réduction au niveau de la zone proliférative et 57,6% de réduction au niveau de la zone hypertrophique de la plaque de croissance chez les embryons XT-KO comparés au embryons sauvages (**Figure 19A**). La taille de la zone hypertrophique est considérablement diminuée à E18.5 (réduction de 57.6%) (**Figure 19B**), alors qu'elle est plus importante au stade E14.5 (augmentation de 15%) (**Figure 18A**). La formation du centre d'ossification primaire chez la souris se produit au stade embryonnaire E15.5, mais avant cette étape, au stade E14.5 la zone hypertrophique se développe et s'étend dans la diaphyse ce qui permet de préparer à l'initiation de l'ossification. L'élargissement de la zone hypertrophique chez les souris XT-I KO à E14.5, suggère une maturation prématurée des chondrocytes qui pourrait conduire à une ossification précoce. La réduction de la taille de la zone hypertrophique chez les souris XT-I KO au stade E18.5 suggère que les chondrocytes hypertrophiques se différencient plus rapidement, rentrant en phase terminale de façon précoce pour être remplacées par les ostéoblastes et les tissus minéralisés. Il est important de noter que chez les embryons XT-I KO et à tous les stades embryonnaires étudiés, les chondrocytes prolifératifs (zone proliférative) ne sont ni aplatis ni organisés en colonne, deux caractéristiques importantes des chondrocytes de cette zone. Ces résultats suggèrent des anomalies de chondrogenèse et une ossification précoce chez les souris XT-I KO, probablement à l'origine du nanisme.



**Figure 19 : Etude de la plaque de croissance chez les embryons XT-I KO et sauvages. A)**

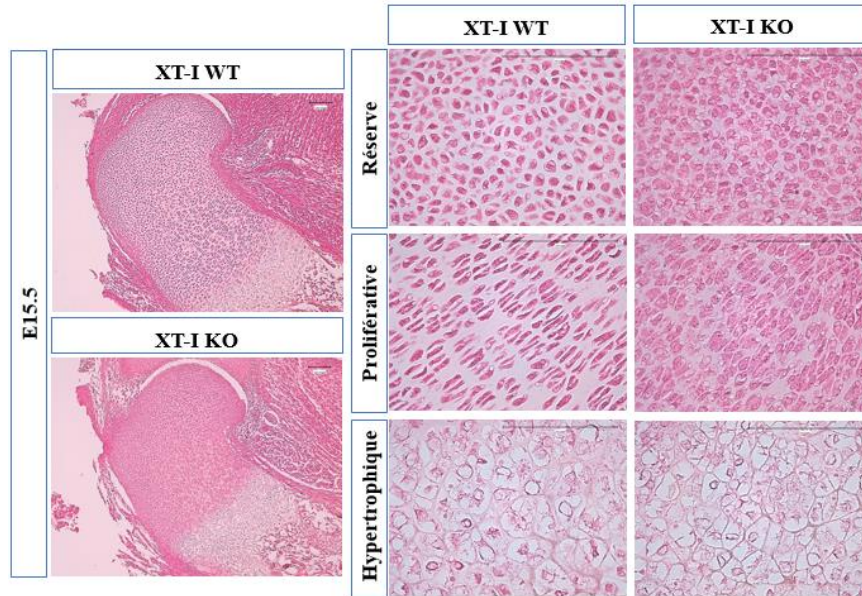
Les graphes montrent la longueur de la zone de réserve et la zone proliférative chez les embryons XT-I KO et XT-I WT au stade E18.5. **B)** Coupe histologique de la plaque de croissance au niveau de l'humérus des souris XT-I WT et XT-I KO au stade E18.5 (coloration au Bleu Alcian) indiquant une zone hypertrophique très réduite chez les embryons XT-I KO par rapport aux embryons sauvages (flèches rouges), le graph représente la taille de la zone hypertrophique.

**6. Prolifération plus importante des chondrocytes chez les embryons XT-I KO**

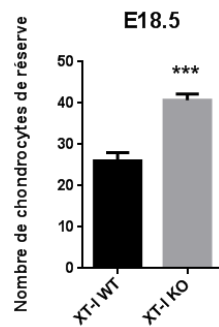
L'analyse de la plaque de croissance a révélé une forte densité cellulaire chez les embryons XT-I KO par rapport à la plaque de croissance des embryons sauvages (**Figure 20B**). Les chondrocytes sont fortement tassées au niveau des différentes zones de la plaque de croissance des embryons XT-I KO et leur nombre est plus élevé. A E18.5 le nombre de chondrocytes de la zone de réserve chez les souris XT-I KO est supérieure de 56% comparé à celui observé chez les souris XT-I sauvages (**Figure 20C**). Ces résultats suggèrent une augmentation du taux de prolifération des chondrocytes embryonnaires en l'absence de la XT-I. Les coupes histologiques montrent clairement que chez les souris sauvages, les chondrocytes au niveau de la plaque de croissance sont bien séparés. On note la présence d'une MEC importante entre les chondrocytes, alors que chez les souris XT-I KO, les chondrocytes sont entassés et entourés de très peu de MEC (**Figure 20A**). Ces résultats indiquent que l'invalidation de la XT-I conduit à un défaut de synthèse et/ou de dépôt de la MEC chez les embryons XT-I KO.

L'homéostasie cellulaire ainsi que l'organisation de la plaque de croissance dépendent d'un équilibre entre la prolifération et la différenciation des chondrocytes. Afin de déterminer si la prolifération est perturbée chez les souris XT-I KO, le taux de prolifération des chondrocytes primaires isolés à partir du cartilage costal des embryons XT-I KO, a été analysé. Les résultats montrent que le taux de prolifération à 24h des chondrocytes chez les embryons XT-I KO est 2 fois plus élevé que celui observé chez les chondrocytes des embryons XT-I sauvages (**Figure 20D**).

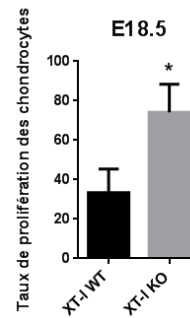
A



C



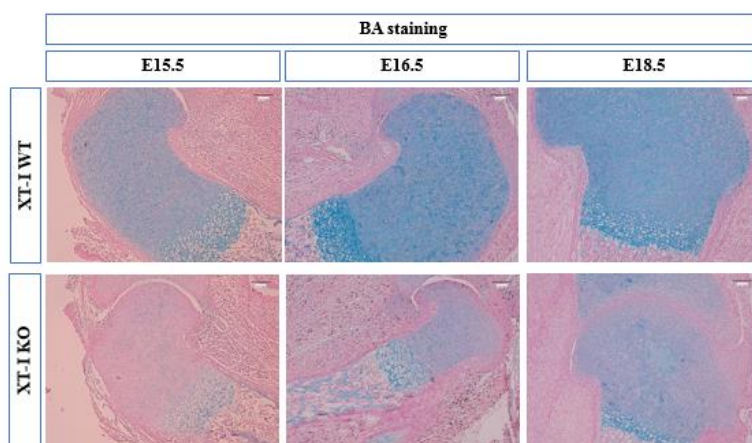
D



**Figure 20 : Etude de la plaque de croissance chez les embryons XT-I KO et sauvages. A et B) La coloration HES de la plaque de croissance proximale de l’humerus des souris sauvages (A) et XT-I KO (B) au stade E15.5 montre une taille réduite chez les embryons XT-I KO. La zone de réserve, la zone proliférative et la zone hypertrophique montrant des chondrocytes entassées présentant un caractère hypertrophique. C et D) Analyse de la prolifération des chondrocytes chez les embryons sauvages et XT-I KO. C) Analyse du nombre des chondrocytes au niveau de la zone de réserve. (D) Analyse du taux de prolifération à 24h des chondrocytes issus des embryons sauvages et XT-I KO.**

## 7. Synthèse des protéoglycanes est perturbée chez les souris XT-I KO

L'analyse histologique des coupes réalisées sur les embryons XT-I sauvages et mutés aux différents stades du développement embryonnaire a révélé une différence d'intensité de coloration au Bleu Alcian, un marqueur des PGs et de leurs chaînes de GAGs, entre les embryons XT-I KO et XT-I WT (**Figure 21**). En effet, nous avons observé une forte réduction de la coloration chez les embryons XT-I KO par rapport aux embryons XT-I WT, indiquant ainsi un défaut de synthèse des PGs et de leurs chaînes de GAGs suite à l'inactivation du gène de la XT-I. Nous avons observé cette diminution au niveau du cartilage de croissance des membres supérieurs et inférieurs des embryons à différents stades du développement embryonnaire, suggérant un rôle important des PGs et de leurs chaînes de GAGs dans le processus d'ossification endochondrale.



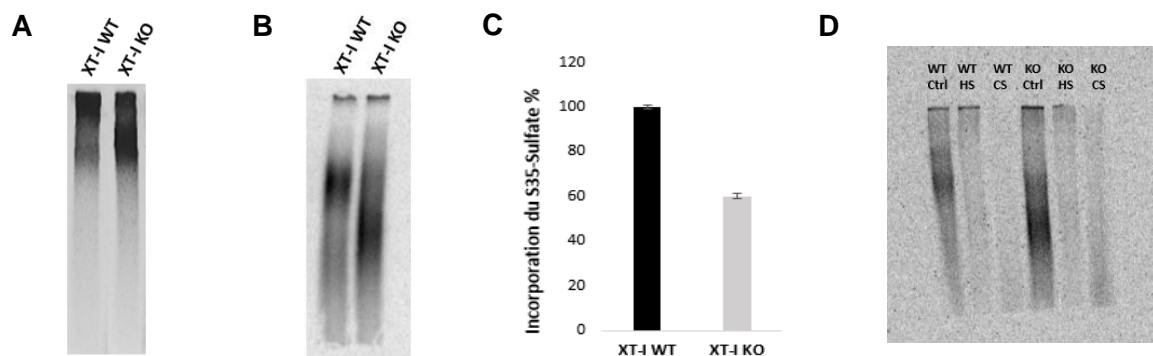
**Figure 21 : Défaut de synthèse des protéoglycanes chez les embryons XT-I KO.** Coupes histologiques de la plaque de croissance de l'humerus des embryons sauvages et XT-I KO au stades E15.5, E16.5, E18.5 colorés au Bleu Alcian. Elles montrent une forte diminution de la coloration Bleu Alcian chez les souris XT-I KO indiquant ainsi une diminution de la synthèse des chaînes de GAGs des PGs (Grossissement x4, échelle = 100  $\mu$ m).

## 8. Déficience d'anabolisme des protéoglycanes chez les souris XT-I KO

Afin de déterminer si l'inactivation de la XT-I affecte la synthèse des PGs, des chondrocytes primaires ont été mis en culture en présence du sulfate radiomarqué ( $S^{35}$ -sulfate) afin de marquer les chaînes de GAGs par incorporation de sulfate radiomarqué. Les PGs sont ensuite analysés par SDS-PAGE et radiographie. De façon intéressante, le profil des PGs des chondrocytes XT-I KO est différent de celui des PGs des chondrocytes WT (**Figure 22A**). En

effet, les PGs produits par les chondrocytes XT-I KO sont majoritairement de petites tailles comparés à ceux synthétisés par les chondrocytes sauvages, indiquant que la perte de la XT-I induit des défauts de synthèse des PGs de grandes tailles. Afin de déterminer si la synthèse des chaînes GAG est perturbée, les PGs des chondrocytes issus des embryons XT-I KO et XT-I WT ont été radiomarqués et leurs chaînes de GAGs ont été analysés par SDS-PAGE. Les résultats obtenus montrent que les chaînes de GAGs des PGs issus des chondrocytes XT-I KO sont de petites tailles par rapport à celles des PGs des chondrocytes issus des embryons WT (**Figure 22B**). L'analyse du taux de synthèse des PGs par l'évaluation du taux d'incorporation du sulfate radiomarqué indique que le taux de synthèse des chaînes de GAGs est réduit de 40% chez les souris XT-I KO par rapport aux souris sauvages (**Figure 22C**).

La XT-I catalyse l'étape initiale de la synthèse des chaînes de GAGs des deux classes majeurs de PGs, les PG à héparane-sulfates (HSPGs) et à chondroïtine-sulfates (CSPGs). Afin de déterminer si ces deux classes ont été affectées par la perte de la XT-I, nous avons analysés par SDS-PAGE les HS et les CS, après digestion des GAGs radiomarqués par la chondroitinase et l'héparanase, respectivement. Aucune différence n'a été observée au niveau du profil des CS et des HS chez les chondrocytes XT-I KO (**Figure 22D**). En effet, les chaînes de GAGs sont sensibles aux chondroitinases et aux héparanases indiquant que l'invalidation de la XT-I semble avoir le même effet sur les deux classes de PGs.



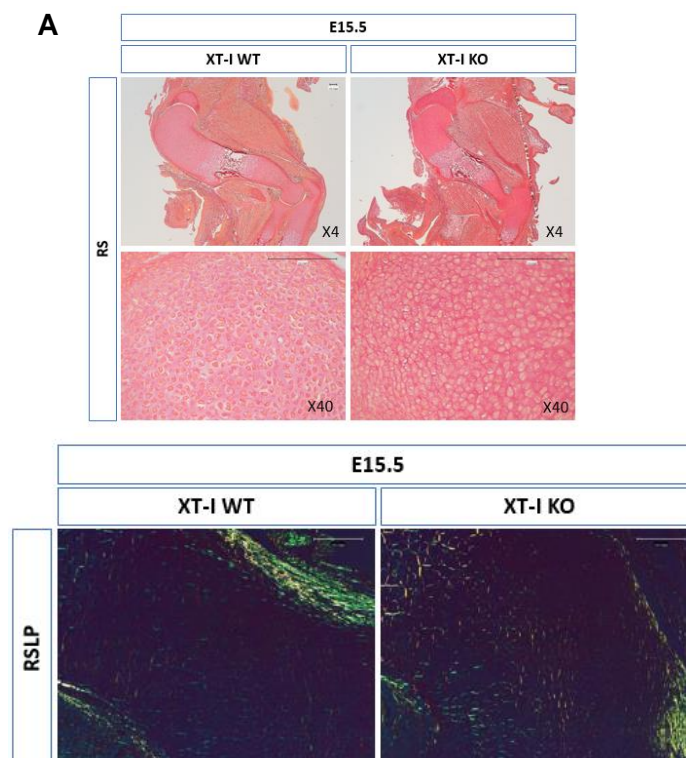
**Figure 22 : Défauts d'anabolisme des protéoglycanes chez les souris XT-I KO**

**A)** Analyse par SDS-PAGE des PGs radiomarqués au <sup>35</sup>S-sulfate produits dans le milieu de culture des chondrocytes primaires costales des embryons XT-I WT et XT-I KO. **B)** Analyse par SDS-PAGE des chaînes de GAGs des PGs radiomarqués au <sup>35</sup>S-sulfate produits dans le milieu de culture des chondrocytes sauvages et XT-I KO. **C)** Analyse du taux de synthèse des PGs dans les chondrocytes sauvages et XT-I KO par l'évaluation du taux d'incorporation du <sup>35</sup>S-sulfate au niveau des chaînes de GAGs des PGs. **D)** Analyse par SDS-PAGE de la

synthèse des HSPGs et des CSPGs produits par les chondrocytes XT-I KO et sauvages après digestion par la chondroitinase et l'héparanase, respectivement. Ctrl : Control (sans digestion), HS : Héparane Sulfate, CS : Chondroïtine Sulfate.

### 9. Désorganisation des fibres de Collagène au niveau de la plaque de croissance des embryons XT-I KO

En plus des PGs, la MEC des chondrocytes au niveau de la plaque de croissance, est constituée de fibres de collagène. En effet, le collagène représente 10 à 30 % de la composition de la matrice et joue un rôle important dans son organisation et l'arrangement des chondrocytes. Dans le but d'examiner l'effet de l'invalidation de la XT-I et des anomalies engendrées dans la synthèse des PGs sur les collagènes de la MEC, nous avons analysé des coupes histologiques d'humerus d'embryons XT-I WT et XT-I KO au stade embryonnaire E15.5 par coloration au Rouge Sirius (colorant spécifique des fibres de collagène). Cette analyse a révélé une différence d'intensité de coloration entre les embryons XT-I WT et XT-I KO. En effet, la coloration en Rouge Sirius est plus intense au niveau de la plaque de croissance des embryons XT-I KO comparé aux embryons XT-I WT, indiquant un taux élevé de fibres de collagène au niveau de la plaque de croissance des embryons XT-I KO (**Figure 23A**). L'analyse de ces coupes par lumière polarisée au microscope Leica DMD108 a révélé une organisation différente des fibres de collagènes entre les embryons XT-I KO et les embryons XT-I WT. Tandis que les fibres de collagènes sont organisées parallèlement les unes aux autres chez les embryons XT-I WT, elles présentent une organisation aléatoire chez les embryons XT-I KO (**Figure 23B**).

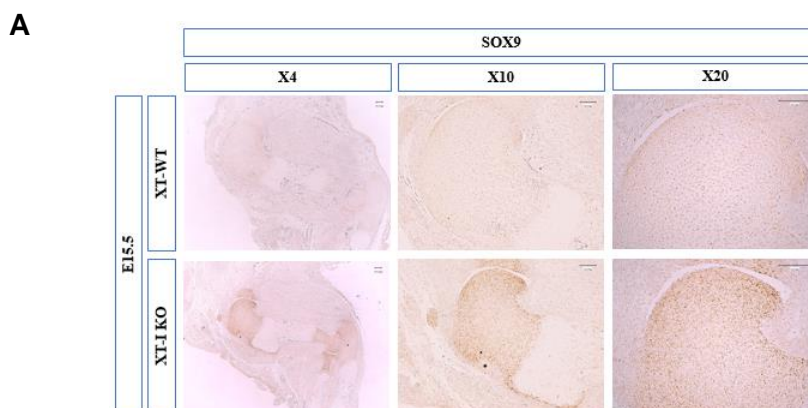


**Figure 23 : Désorganisation des fibres de collagènes chez les embryons XT-I KO.**

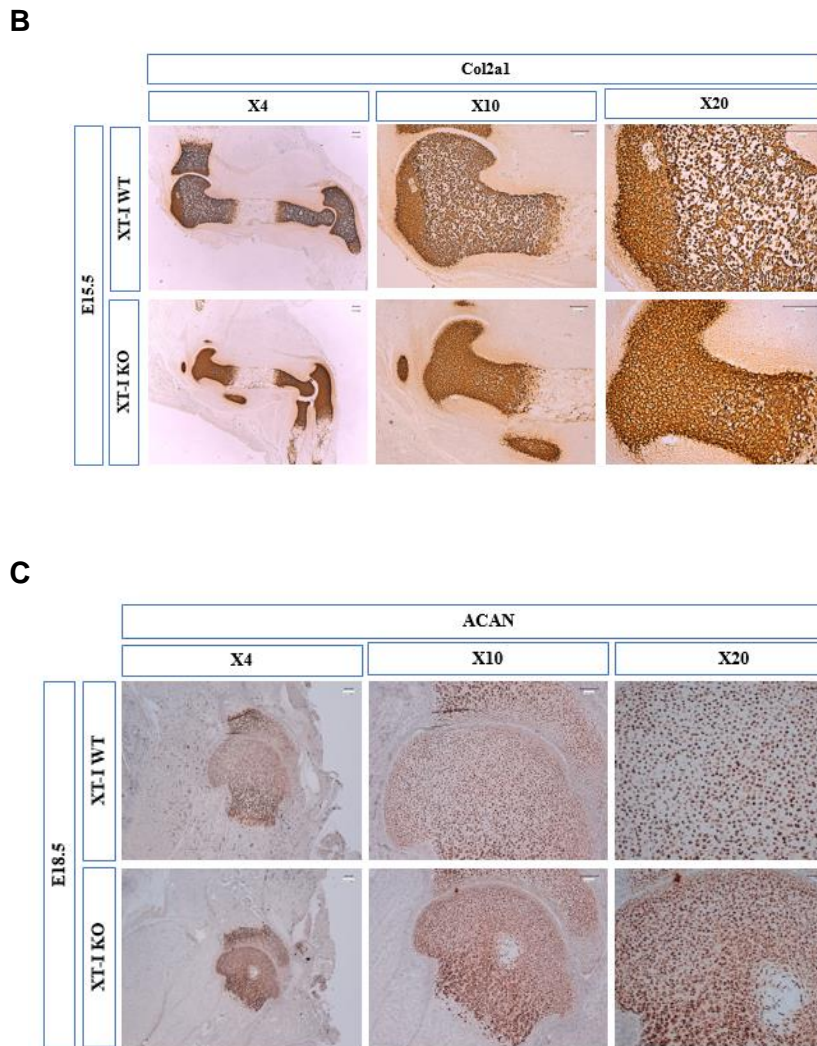
**A)** Coloration Rouge Sirius réalisée sur des coupes d’humerus d’embryons XT-I WT et XT-I KO au stade E15.5 (échelle = 100µm). **B)** Analyse par la lumière polarisée des coupes d’humerus d’embryons au stade E15.5 montrant l’organisation des fibres de collagène au niveau de la plaque de croissance des embryons (Grossissement x20, échelle = 100µm).

**10. L’expression de Sox9 est augmentée chez les souris XT-I KO**

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires qui sont à l’origine des anomalies du développement chez les souris XT-I KO, nous avons analysé l’expression de Sox9 qui est un facteur de transcription et régulateur clé des premières étapes de la chondrogenèse. Ce facteur est exprimé au niveau des chondrocytes de réserve, prolifératifs et préhypertrophiques. SOX9 est nécessaire à la différenciation chondrocytaire et le control de l’expression du collagène de type 2 et de l’aggrécane, les constituants majeurs de la MEC (29,33). L’analyse par RNAscope de l’expression de SOX9 au niveau de la plaque de croissance des embryons sauvages et mutés au stade E15.5 montre une augmentation de l’expression de SOX9 au niveau de la plaque de croissance des embryons XT-I KO (**Figure 24A**). Afin de déterminer si l’expression du gène du collagène de type 2 (*COL2A1*) et de l’aggrécane (*ACAN*) est affectée par l’expression de SOX9, nous avons analysé leur expression par RNAscope. De façon intéressante, nous avons observé une augmentation de l’expression du gène *ACAN* au niveau de la plaque de croissance des embryons XT-I KO comparé avec leurs congénères sauvages, cependant nous n’avons pas observé de différence significative dans l’expression du gène *Col2a1* (**Figure 24 B et C**).







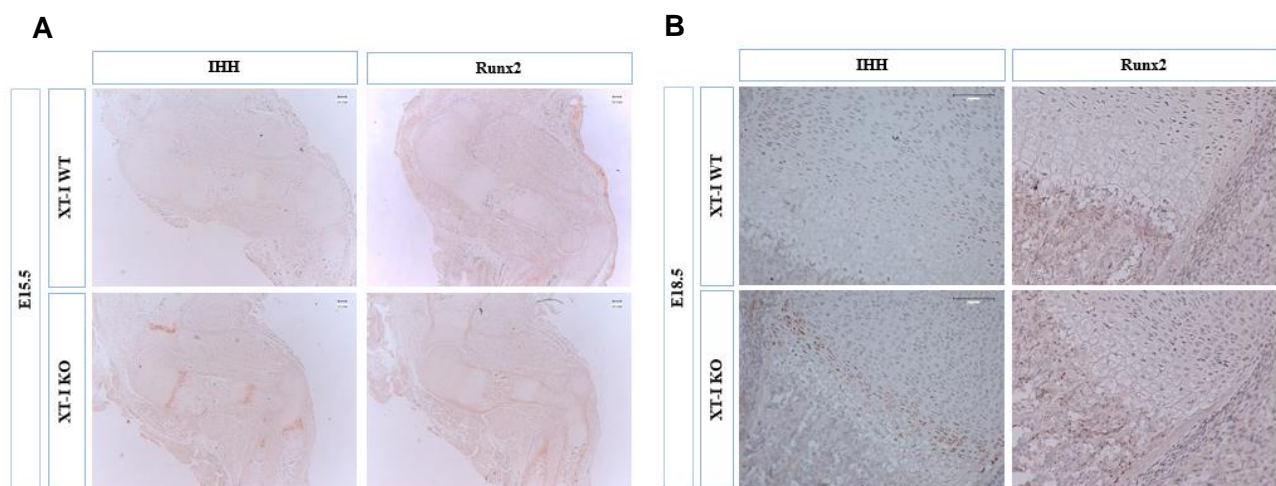
**Figure 24 : Analyse de l'expression de SOX9, du collagène de type 2 et d'aggrécane dans la plaque de croissance des embryons sauvages et XT-I KO.** Des coupes histologiques d'humerus d'embryons sauvages et XT-I KO aux stades embryonnaire E15.5 et E18.5 analysées pour l'expression (A) *Sox9*, (B) COL2A1 et (C) ACAN en utilisant la technique de RNAscope (échelle = 100µM).

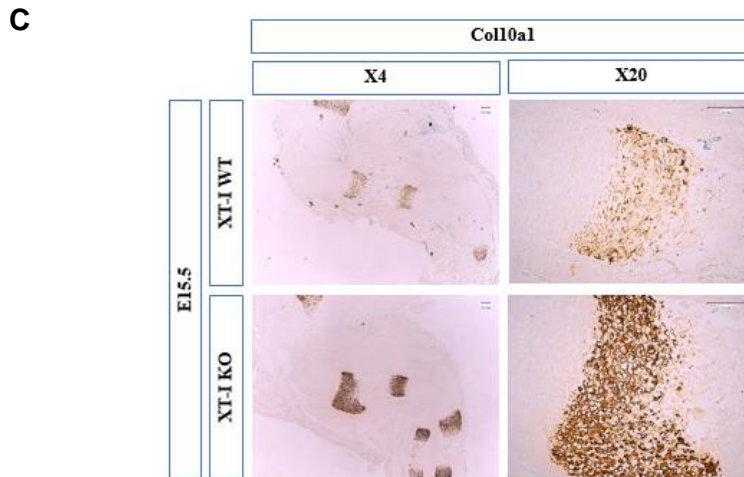
### 11. L'inactivation de XT-I affecte la signalisation Ihh

Plusieurs voies de signalisation régulent la chondrogenèse et la maturation des chondrocytes au niveau de la plaque de croissance (3,310). Ihh, un membre de la famille Hedgehog, est exprimé au niveau des chondrocytes préhypertrophiques et des chondrocytes hypertrophiques précoces (50). Il régule la prolifération des chondrocytes et active leur différenciation hypertrophique (62). Ihh est également impliqué dans la différenciation des ostéoblastes (311). Pour déterminer si l'inactivation de la XI-I affecte la signalisation d'Ihh et

la maturation chondrocytaire, nous avons analysé l'expression des ARNm d'Ihh au niveau de la plaque de croissance des embryons sauvages et mutés aux stades E15.5 et E18.5. Nous avons observé une forte expression d'Ihh chez les embryons XT-I KO par rapport à leurs congénères sauvages (**Figure 25A et 25B**). Cette surexpression d'Ihh peut être à l'origine de l'augmentation de la prolifération montrée précédemment chez les embryons XT-I KO et peut également accélérer la maturation des chondrocytes *via* la stimulation de l'expression de Runx2. Afin de vérifier si la surexpression d'Ihh affecte celle de Runx2, nous avons examiné l'expression de ce dernier par RNAscope. Les résultats montrent une expression élevée de Runx2 au niveau de la plaque de croissance des embryons XT-I KO par rapport aux sauvages (**Figure 25A et 25B**).

Nous avons également analysé l'expression du collagène de type 10 (*COL10A1*), collagène spécifiquement exprimé par les chondrocyte hypertrophiques et dont l'expression est régulée par Ihh et Runx2. Les résultats obtenus montrent une plus forte expression du collagène de type 10 au niveau de la plaque de croissance des embryons XT-I KO au stade E15.5 par rapport aux embryons sauvages. Ces résultats suggèrent une différenciation hypertrophique précoce des chondrocytes chez les embryons XT-I KO. L'ensemble de ces résultats montre que l'inactivation de la XT-I conduit à une surexpression d'Ihh, de Runx2 et du COL10A1 au niveau de la plaque de croissance, indiquant ainsi des anomalies de prolifération et de maturation des chondrocytes chez les embryons XT-I KO.



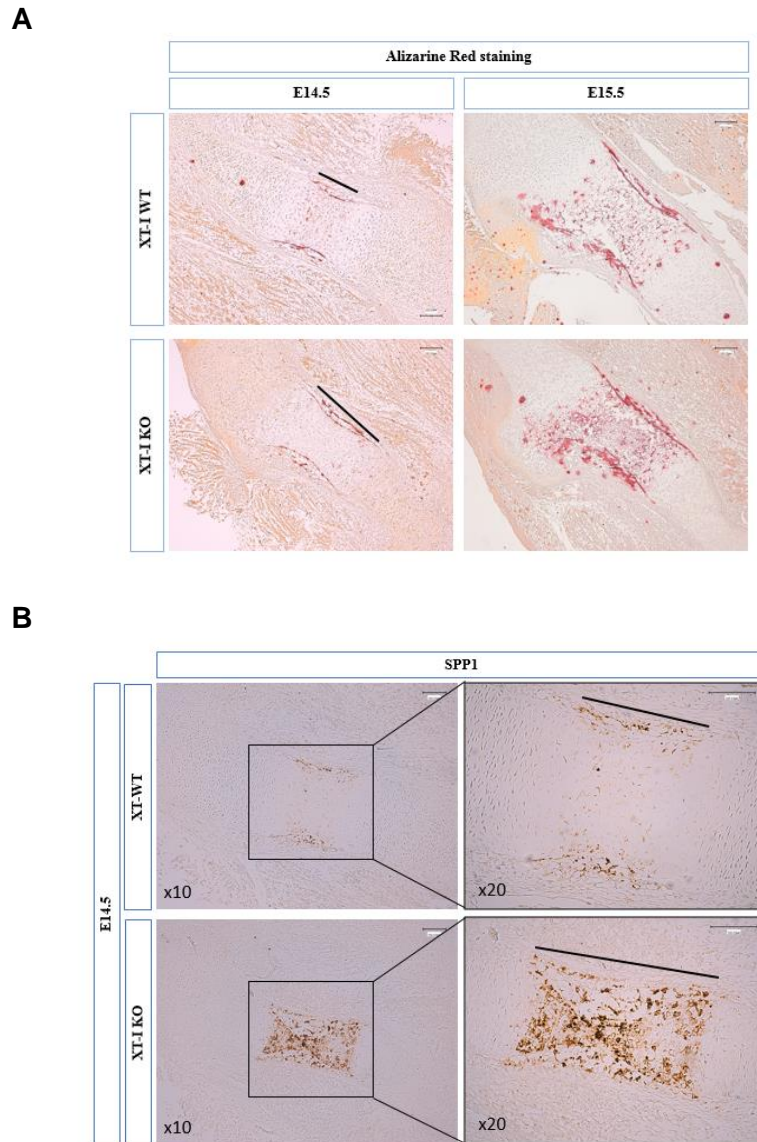


**Figure 25** : Analyse de l'expression d'*IHH*, de *RUNX2* et du *COL10A1* au niveau de la plaque de croissance des embryons sauvages et XT-I KO. Hybridation *in situ* par RNAscope des sondes *Ihh* et *Runx2* au niveau des plaques de croissance de l'humerus d'embryons sauvages et mutés au stades E15.5 (**A**) et E18.5 (**B**). **C**) Analyse par RNAscope de l'expression du gène *COL10A1* au niveau de la plaque de croissance des embryons sauvages et XT-I KO au stade E15.5 (échelle = 100µM).

## 12. L'invalidation de XT-I affecte la formation du centre d'ossification primaire

L'analyse de la plaque de croissance de l'humerus chez les embryons XT-I KO au stade embryonnaire E14.5 a montré une région hypertrophique plus importante par rapport à la plaque de croissance des embryons XT-I WT (**Figure 16**), suggérant une hypertrophie précoce ou une différenciation accélérée des chondrocytes vers l'hypertrophie. Au stade embryonnaire E18,5 nous avons observé une zone hypertrophique réduite chez les embryons XT-I KO (**Figure 16**), indiquant une différenciation terminale accélérée des chondrocytes hypertrophiques et un remplacement accéléré de ces chondrocytes matures par les tissus osseux. Ces résultats suggèrent une formation précoce du centre d'ossification primaire (POC) chez les embryons XT-I KO. Les POCs se forment au stade embryonnaire E15.5 (16). Pour analyser la formation du POC chez les embryons XT-I KO, nous avons procédé à une coloration rouge Alizarine des coupes de l'humérus E15.5, qui colore les dépôts de calcium au niveau des tissus minéralisés. Nous n'avons pas observé de différence significative de coloration entre XT-I WT et XT-I KO (**Figure 26A**). Cependant, lorsque nous avons réalisé cette coloration sur des sections d'humérus au stade embryonnaire E14.5, nous avons observé une grande région minéralisée chez les embryons XT-I KO par rapport aux embryons XT-I

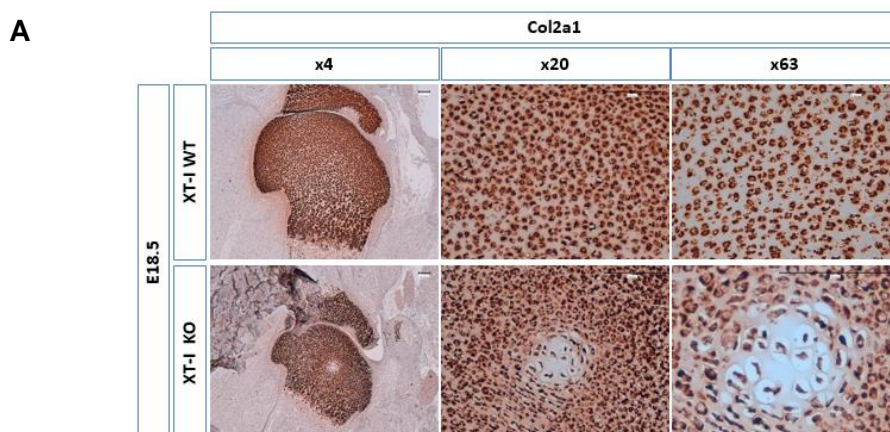
WT (**Figure 26A**). En outre, l'analyse par RNAscope du gène SPP1, un gène marqueur des chondrocytes hypertrophiques terminaux et des tissus osseux minéralisés, révèle une augmentation de l'expression de ce gène chez les embryons XT-I KO par rapport à leurs homologues sauvages (**Figure 26B**). Ces résultats suggèrent que l'inactivation de la XT-I affecte la formation de POC et la minéralisation osseuse.

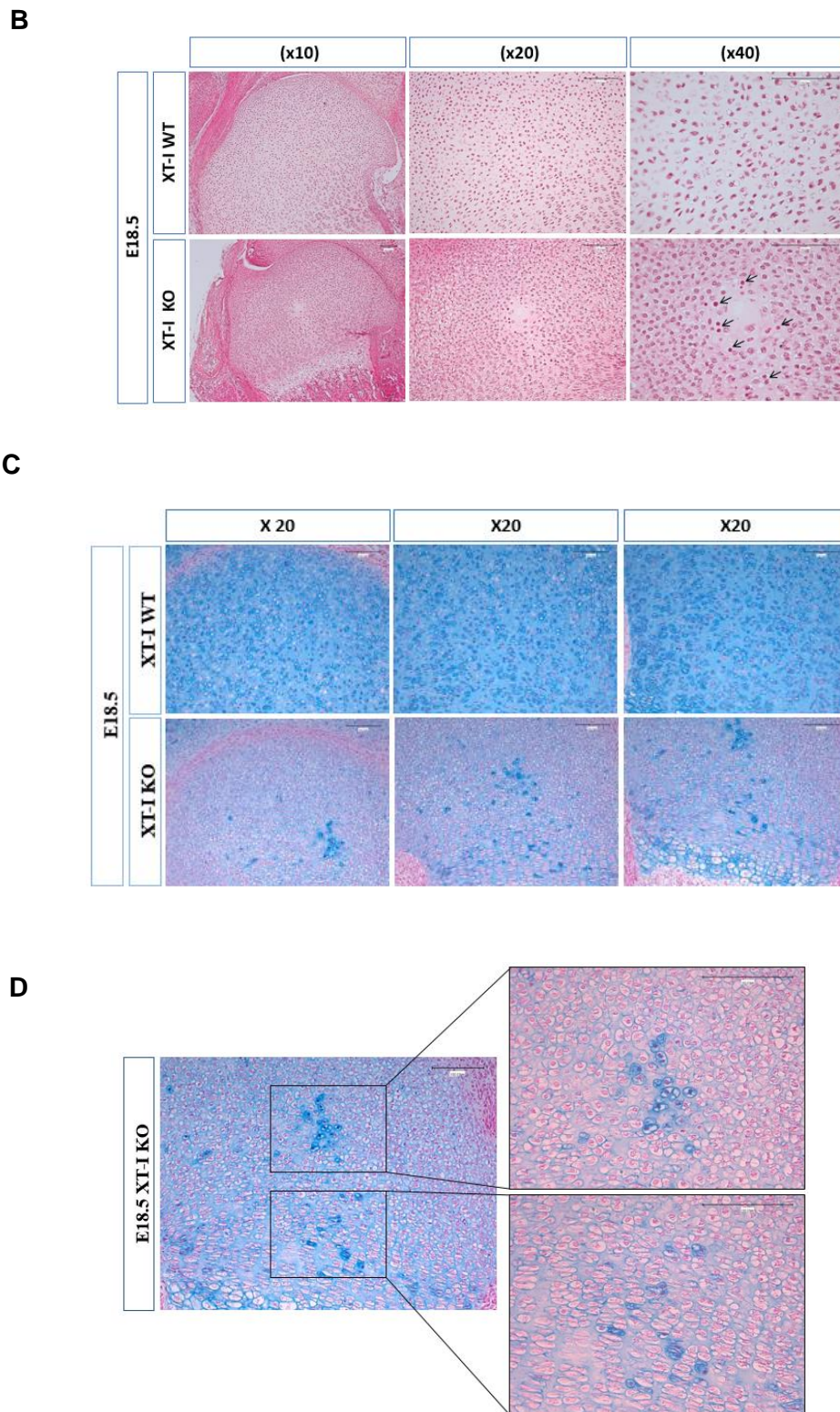


**Figure 26 : L'inactivation de XT-I conduit à une formation accélérée du POC chez les souris. A) Des coupes d'humerus aux stades embryonnaires E14.5 et E15.5 colorées au Rouge Alizarine, marqueur des tissus minéralisés. B) Analyse de l'expression du gène SPP1, marqueur des chondrocytes hypertrophiques tardives et des tissus minéralisés, par hybridation *in situ* sur des coupes d'humerus au stade E14.5. La barre noire représente la taille de la zone minéralisée. (Échelle =100µm).**

### 13. Formation précoce du centre d'ossification secondaire chez les souris XT-I KO

Alors que le centre d'ossification primaire des os endochondraux se forme à E15.5 au cours du développement embryonnaire de la souris, le centre d'ossification secondaire (SOC) commence normalement à se former après la naissance vers 5 à 7 jours après la naissance. Cependant, chez les souris XT-I KO nous avons observé la formation du SOC au cours du développement embryonnaire et non pas durant le développement postnatal. La coloration HES des coupes des membres supérieurs des embryons XT-I KO au stade E18.5 révèle des cellules volumineuses au niveau des régions épiphysaires du cartilage. Ces cellules présentent le même aspect que les chondrocytes hypertrophiques présents dans les épiphyses au cours de la formation du SOC chez les souris post-natales. À haute résolution, le groupe de cellules au centre des épiphyses est distinct des chondrocytes ronds de réserve qui les entourent, elles ont une plus grande surface cytoplasmique (**Figure 27A**). Ces cellules sont distinctes des cellules hypertrophiques des plaques de croissance par leurs noyaux qui sont plus denses et le volume cellulaire plus réduit (**Figure 27B**), mais ressemblent morphologiquement aux chondrocytes hypertrophiques des centres d'ossification secondaires décrits dans des travaux antérieurs (312). L'apparition de canaux cartilagineux, qui entraînent une vascularisation de la région épiphysaire et, éventuellement, une invasion des cellules ostéogéniques, est un événement important dans la formation du SOC. La coloration au Bleu Alcian des coupes de l'humérus au stade E18.5 montre un groupe de cellules migrant du péri-chondre et envahissant la plaque de croissance jusqu'à la zone du SOC, suggérant la formation de canaux cartilagineux (**Figure 27C**). Ces cellules présentent les mêmes noyaux condensés que les cellules au centre du SOC, mais leur forme est différente, elles ne sont pas volumineuses comme les chondrocytes hypertrophiques mais de façon intéressante, elles montrent une forte coloration, suggérant une synthèse accrue des PGs (**Figure 27D**). Tous ces résultats indiquent une formation prématurée du centre d'ossification secondaire suggérant une maturation de la plaque de croissance et une ossification précoces chez les embryons XT-I KO.





**Figure 27 : Formation précoce du centre d'ossification secondaire chez les embryons XT-I KO.** Plaque de croissance proximale de l'humerus des embryons XT-I KO au stade E18.5. **A)** Hybridation *in situ* par RNAscope des ARNm du gène *COL2A1* montrant un groupe de cellules de forme distinctes des cellules (rondes) de la zone de réserve avec une large aire cytoplasmique au niveau du centre de l'épiphyse. **B)** La coloration HES montre des cellules larges avec un noyau plus condensé différent de celui des chondrocytes

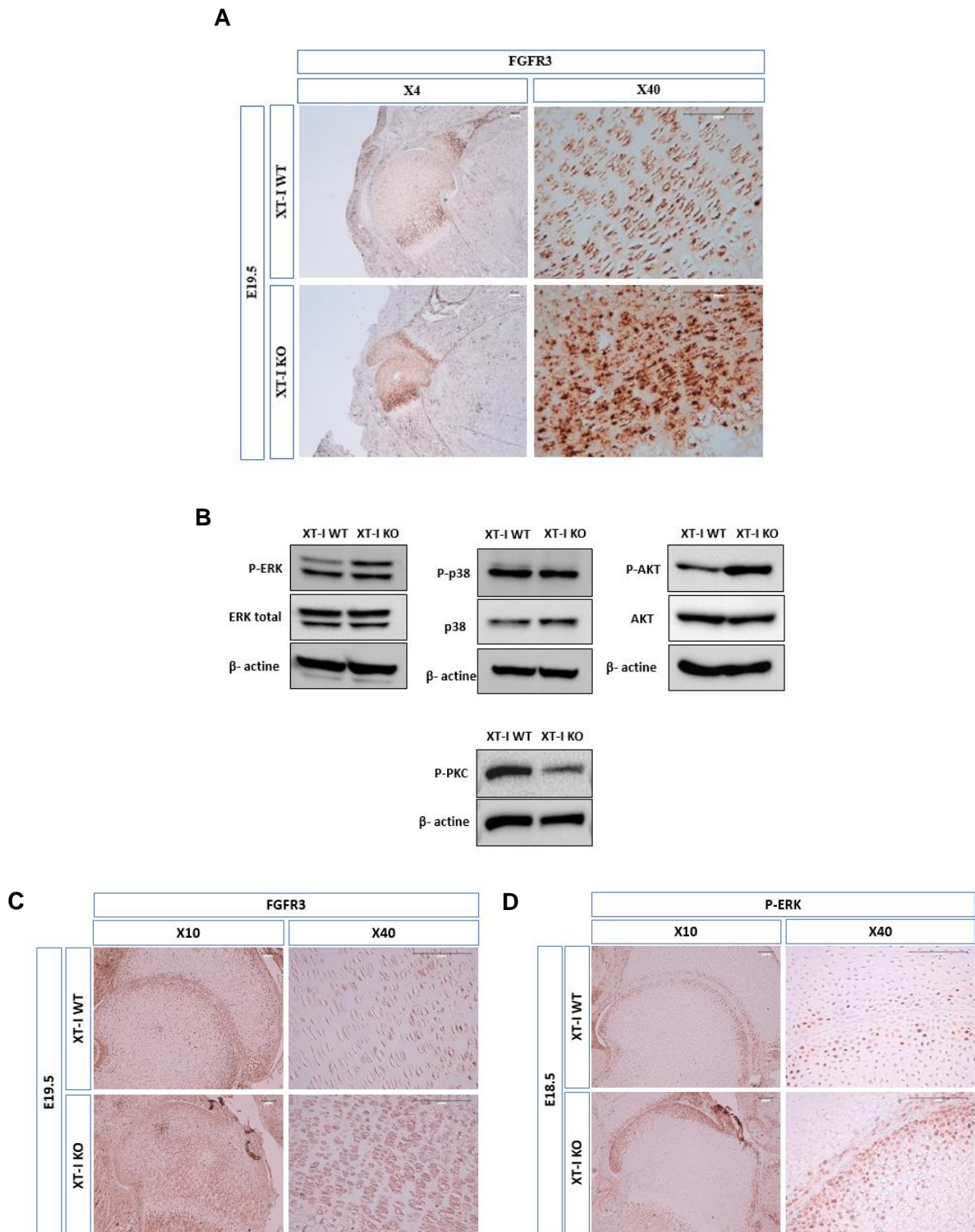
hypertrophiques. **C et D**) La coloration Bleu Alcian montre un groupe de cellules migrant du périchondrium et envahissant la plaque de croissance jusqu'à l'aire du SOC indiquant la formation des canaux du cartilage.

#### 14. L'invalidation de XT-I affecte l'expression et la signalisation de FGFR3

La signalisation du FGF joue un rôle clé dans la régulation de la maturation des chondrocytes. L'achondroplasie la plus commune chez l'homme est associée à une mutation activatrice (gain de fonction) au niveau du récepteur FGFR3. Nous avons analysé l'expression des ARNm du FGFR3 au niveau de la plaque de croissance des embryons sauvages et XT-I KO à différents stades du développement embryonnaire. Les résultats obtenus montrent une surexpression du FGFR3 chez les embryons XT-I KO par rapport aux embryons XT-I WT (**Figure 28A**). Nous avons par la suite analysé l'activation des voies de signalisation sous-jacentes ERK1/2, p38, AKT et PKC dans les chondrocytes primaires en culture. Nous avons observé que la surexpression de FGFR3 chez les souris XT-I KO induit fortement la phosphorylation d'ERK1/2 et d'AKT et réduit la phosphorylation de PKC alors que l'activation de p38 est inchangée comparé aux chondrocytes sauvages (**Figure 28B**). Compte tenu du rôle important de la voie de signalisation ERK1/2 dans différenciation terminale des chondrocytes (135,136) et dans la prolifération cellulaire, ces résultats suggèrent que la surexpression de FGFR3 peut être à l'origine de la maturation précoce des chondrocytes chez les souris XT-I KO à travers l'induction de l'activation de la voie ERK1/2. La voie PI3K/AKT a pour fonction d'inhiber l'activité des molécules cibles tel que le facteur de transcription de classe forkhead box (FOXO1), un effecteur pro-apoptotique, qui est inactivé par la phosphorylation d'AKT. AKT active également le complexe mTOR 1 stimulant la croissance et la prolifération cellulaire. Cette voie participerait à la stimulation de la prolifération chondrocytaire chez les embryons XT-I KO, en plus de la voie ERK1/2. PKC est fortement exprimé dans les CSMs en voie de différenciation, il régule positivement la différenciation chondrocytaire par l'inhibition de la voie ERK1/2. L'inhibition de PKC et l'activation d'ERK1/2 au niveau des chondrocytes XT-I KO pourrait entraîner une différenciation accélérée en chondrocytes hypertrophiques.

L'analyse par IHC de l'expression du FGFR3 sur des coupes d'embryons au stade E18.5 a permis de confirmer l'augmentation de l'expression protéique de ce récepteur chez les embryons XT-I KO (**Figure 28C**). Nous avons vérifié également l'activation de d'ERK1/2 *in vivo*. En accord avec les résultats obtenus dans les chondrocytes en culture, le niveau

d'expression d'ERK1/2 phosphorylé (p-ERK1/2) est fortement élevé chez les embryons XT-I KO par rapport aux sauvages (**Figure 28D**).



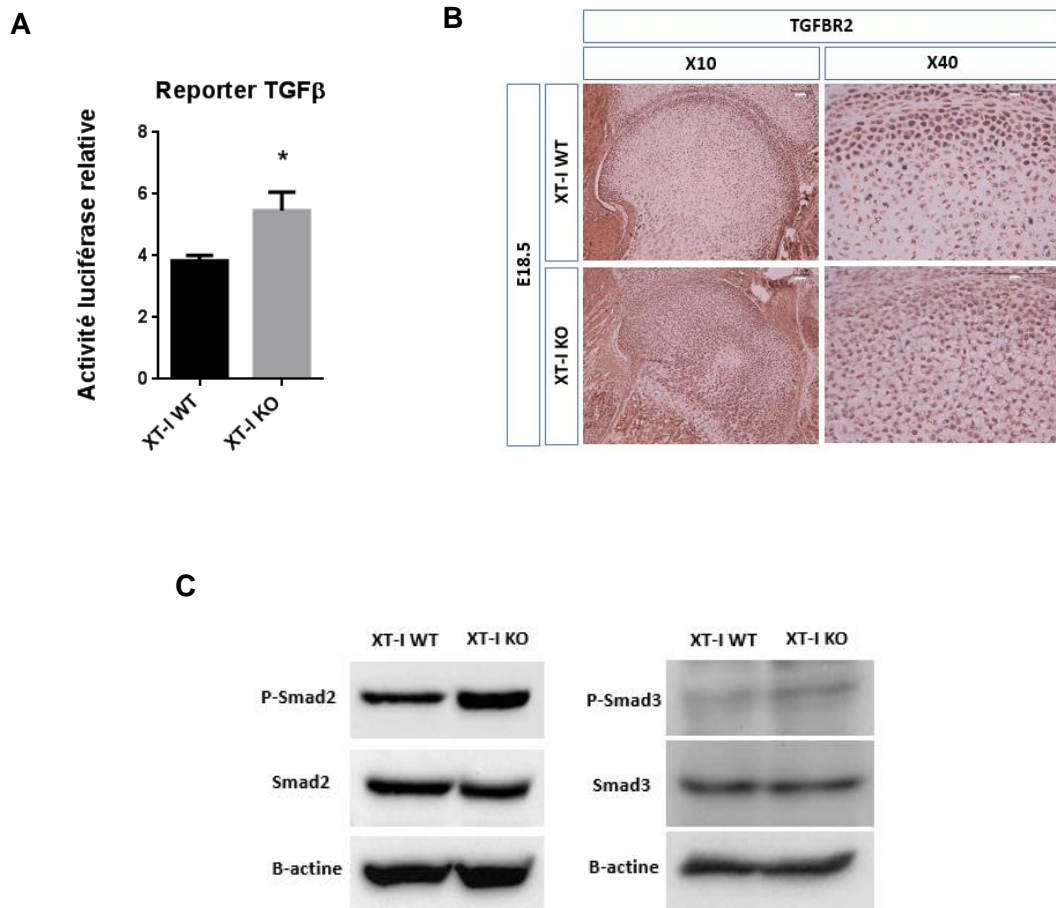
**Figure 28 : Analyse de l'expression du FGFR3 et des voies de signalisation sous-jacentes chez les souris sauvages et XT-I KO. A) Hybridation *in situ* des ARNm du gène *FGFR3* effectué sur des coupes histologiques d'humérus au stade embryonnaire E18.5 avec une**



contre-coloration à l'hématoxyline (Bleu-gris) (échelle=100µm). **B)** L'augmentation de l'expression du FGFR3 dans les chondrocytes XT-I KO se traduit par une activation importante d'ERK1/2 et d'AKT et l'inhibition de PKC. L'actine a été utilisée comme control. **C)** Analyse de l'expression de la protéine FGFR3 sur des coupes histologiques d'humerus d'embryons sauvages et mutés au stade E18.5. **D)** Analyse *in vivo* de l'activation d'ERK1/2 (pERK1/2) par IHC sur des coupes d'humérus d'embryons E18.5 (échelle=100µm).

### 15. La signalisation du TGFβR2 est altérée chez les souris XT-I KO

La superfamille du TGFβ est primordiale dans tous les stades de la chondrogenèse embryonnaire (179,310). Il a été montré que l'inhibition de l'expression du TGFβR2 pendant la chondrogenèse altère la différenciation des chondrocytes et la formation des articulations (16,190,313). Afin de déterminer si l'inactivation de la XT-I affecte la signalisation du TGFβ, nous avons transfecté des chondrocytes primaires en culture par un vecteur qui contient des éléments de réponse au TGFβ au niveau du promoteur contrôlant l'expression du gène de la luciférase (gène rapporteur) et évalué l'activité luciférase. Les résultats obtenus montrent que l'activité luciférase est de 30% plus importante dans les chondrocytes des embryons XT-I KO comparé aux chondrocytes sauvages, indiquant que la signalisation du TGFβ est augmentée dans les chondrocytes en l'absence de la XT-I (**Figure 29A**). Nous avons ensuite analysé par immunohistochimie l'expression du TGFβR2 au niveau de la plaque de croissance d'humérus des embryons au stade E18.5. L'analyse montre une surexpression de ce récepteur au niveau de la plaque de croissance d'embryons XT-I KO comparé aux sauvages (**Figure 29B**). Afin de vérifier si la signalisation en aval de TGFβR2 est affectée par la surexpression de ce récepteur, nous avons analysé par Western blot l'activation des protéines Smad2 et Smad3 dans les chondrocytes en culture. Les résultats indiquent que la surexpression du TGFβR2 engendre une augmentation de l'activation de Smad2 et Smad3 au niveau des chondrocytes XT-I KO comparés aux chondrocytes sauvages (**Figure 29C**). En effet, le taux de p-Smad2 et p-Smad3 est élevé dans les chondrocytes XT-I KO. Ces résultats indiquent que l'inactivation de la XT-I stimule la signalisation du TGFβ. Du fait de l'importance de cette signalisation dans le développement endochondral, l'activation de la voie TGF pourrait participer aux anomalies de chondrogenèse à l'origine des défauts de développement ostéoarticulaire chez les souris XT-I KO.

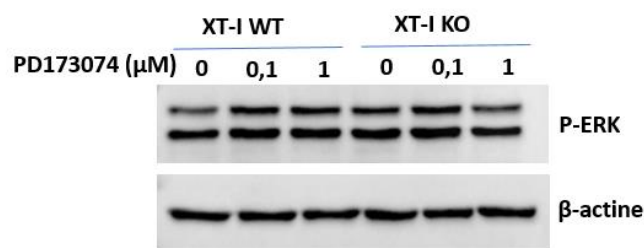


**Figure 29 : Analyse de l'expression du TGFβ2 et de la voie de signalisation Smad. A)** Expression du vecteur rapporteur de l'activité TGFβ dans les chondrocytes primaires issus des embryons sauvages et XT-I KO. **B)** Analyse par immunohistochimie de l'expression du TGFβ2 dans des coupes histologiques d'humerus issus des embryons sauvages et XT-I KO au stade E18.5. **C)** Analyse par Western blot de la phosphorylation de Smad2 et de Smad3 dans les chondrocytes primaires issus des embryons sauvages et mutés au stade E18.5. L'actine est utilisée comme control.

## 16. L'inhibition du FGFR3 restaure l'activation optimale d'ERK1/2 dans les chondrocytes XT-I KO

PD173074 est un inhibiteur spécifique du récepteur FGFR3. Il inhibe l'activité kinase de ce dernier et par conséquent la phosphorylation des tyrosines et des protéines de signalisation en aval tel que ERK1/2. Les embryons XT-I KO montrent une surexpression de FGFR3 et une augmentation de la signalisation d'ERK1/2. Nous avons traité les chondrocytes primaires d'embryons sauvages et XT-I KO avec différentes concentrations de PD173074

pendant 1h et nous avons analysé l'activation de d'ERK1/2 par Western blot. A 0,1  $\mu$ M, le PD173074 n'a pas montré d'effet sur l'activation d'ERK1/2 ni dans les chondrocytes XT-I KO, ni dans les chondrocytes sauvages. En revanche, à 1 $\mu$ M l'inhibiteur réduit le taux de phosphorylation d'ERK1/2 dans les chondrocytes XT-I KO à un niveau similaire à celui des chondrocytes sauvages. Ce résultat suggère que l'inhibition du FGFR3 chez les souris XT-I KO par le PD173074 pourrait restaurer l'activation optimale d'ERK1/2 et pourrait avoir des effets positifs sur le développement ostéoarticulaire des souris XT-I KO. Ces résultats suggèrent également que FGFR3 est une cible potentielle à explorer en vue de développer un traitement contre la DBQD type 2 (**Figure 30**).



**Figure 30 : Inhibition *in vitro* de la voie de signalisation FGFR3 dans les chondrocytes sauvages et XT-I KO.** Les chondrocytes primaires issus des embryons sauvages et XT-I KO ont été traités avec 0,1 et 1 $\mu$ M d'inhibiteur du FGFR3, le PD173074, pendant 1h. L'activation d'ERK1/2 a été analysée par Western blot. La  $\beta$ -actine a été utilisée comme contrôle.

# *Discussion*

## 1. La XT-I est impliquée dans plusieurs pathologies du développement squelettique

La XT-I joue un rôle important dans la biosynthèse des PGs, elle catalyse l'initiation de la synthèse des chaînes de GAGs des PGs par le transfert d'un résidu xylose sur les résidus sérines de la protéine core. Récemment, plusieurs études cliniques ont montré que les mutations au niveau du gène de la XT-I sont associées à des pathologies du développement stéartoarticulaire chez l'homme (299–305).

En 2013, Schreml et ses collaborateurs ont montré pour la première fois la présence d'une mutation homozygote au niveau du gène de la XT-I chez des patients atteints d'un syndrome de petite taille. Les deux enfants de la même famille présentent une petite taille, un squelette fragile, des caractéristiques faciales distinctes et des capacités intellectuelles réduites. En 2014, Bui et ses collègues ont décrit plusieurs mutations au niveau du gène *Xylt1* chez sept individus atteints de la dysplasie de Desbuquois type II (DBQD-II). Tous les individus présentent une petite taille (pré- et post-natal), un visage plat avec des yeux proéminents, des membres courts, des dislocations avec des fémurs sous forme de « Monkey Wrench ». Ils présentent également un raccourcissement des os longs avec un élargissement des métaphyses, une dysplasie des épiphyses et une ossification précoce des carpes et des tarses. En 2015, Koningsbruggen et al., ont identifié le premier patient avec une délétion hétérozygote au niveau du gène *Xylt1* associées à une dysplasie squelettique avec des membres courts mais ne présentant pas les caractéristiques du syndrome DBQD-II. Ensuite, trois études ont associé des mutations du gène *Xylt1* au syndrome de dysplasie de Desbuquois de type II. Guo et al., (2016) ont identifié une nouvelle mutation du gène *Xylt1* chez deux familles. Jamsheer et al., (2016) ont rapporté deux nouvelles mutations hétérozygotes du gène *Xylt1* chez un patient présentant un nanisme associé à un déficit en hormone de croissance. Silvera et ses collaborateurs (2016) ont décrit un autre patient présentant un phénotype compatible avec DBQD-II chez lequel une mutation homozygote du gène *Xylt1* est identifiée. En 2017, Al-Jazawi et al., ont identifié une nouvelle variante homozygote du gène *Xylt1*.

L'identification des mutations au niveau du gène *Xylt1* dans plusieurs chondrodysplasies indique que la XT-I joue un rôle important dans l'ossification et le développement ostéartoarticulaire. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sont à l'origine des anomalies squelettiques associés à la plupart de ces mutations ne sont pas encore élucidés. Dans cette étude, nous avons étudié le rôle de la XT-I dans le développement squelettique par invalidation de ce gène chez la souris.

## 2. L'invalidation de la XT-I est létale et induit des anomalies squelettiques

L'étude phénotypique des souris issues des croisements hétérozygotes a révélé l'absence totale de souris XT-I KO au stade postnatal. L'étude des embryons aux différents stades embryonnaires a permis de montrer que l'invalidation de la XT-I engendre une létalité néonatale/périnatale. Elle a également révélé que les souris XT-I KO présentent un nanisme prononcé et une hypoplasie frontonasale apparente. L'analyse histologique des embryons par la double coloration du squelette au Bleu Alcian et au Rouge Alizarine a révélé une cage thoracique réduite, une sévère réduction de la taille des membres et un phénotype crâniofacial apparent.

La naissance, la respiration, l'allaitement et l'homéostasie néonatale sont les principaux événements qui représentent des défis menaçants pour le nouveau-né au cours des premières 24h après la naissance (309,314,315). Dans cette étude, la délétion du gène de la XT-I conduit à une létalité périnatale due probablement à des problèmes de respiration. En effet, les embryons XT-I KO présentent une hypoplasie frontonasale prononcée qui peut être le principal défaut qui entraîne plusieurs problèmes physiologiques, tels que des troubles respiratoires. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé des sections de visage de XT-I KO et XT-I WT pour comparer les éthmoïdes et les turbinâtes, deux structures cartilagineuses importantes des voies respiratoires nasales. Aucune différence dans ces structures n'a été décelée entre les embryons sauvages et mutés (Résultat non montré). Les souris XT-I KO présentent également une petite cage thoracique entraînant une compression de la cavité pulmonaire et provoquant probablement un défaut respiratoire.

## 3. Défauts de chondrogenèse et d'ossification endochondrale chez les embryons XT-I KO

Le nanisme et la réduction de la taille des membres chez les embryons XT-I KO par rapport aux sauvages reflètent des anomalies dans le développement du squelette qui serait probablement dues à un défaut d'ossification endochondrale. En effet, l'ossification endochondrale est le processus responsable de la formation de la plupart des os du corps. Il débute par la condensation des cellules souches mésenchymateuses, puis par la différenciation de ces cellules en chondrocytes qui vont ensuite proliférer et s'organiser en quatre zones distinctes, formant la plaque de croissance. Après l'invasion vasculaire des éléments cartilagineux, la matrice des os est déposée et les centres d'ossification sont formés (241,316). L'analyse histologique de la plaque de croissance révèle une réduction significative de celle-ci avec un raccourcissement de la taille des différentes zones constitutives et une densité

cellulaire élevée chez les souris XT-I KO, suggérant des défauts de chondrogenèse chez les souris mutées. En effet, l'analyse de la prolifération *in vitro* des chondrocytes issues des embryons sauvages et XT-I KO, a permis de montrer une augmentation de la prolifération des chondrocytes mutés par rapport aux chondrocytes sauvages.

La maturation des chondrocytes est aussi affectée chez les embryons XT-I KO. En effet, la perte de la XT-I est accompagnée par la dérégulation de l'expression de plusieurs marqueurs chondrogéniques et facteurs régulateurs qui sont critiques pour le processus de maturation chondrocytaire et le développement endochondral. Nous avons montré une augmentation de l'expression de Sox9 chez les embryons XT-I KO par rapport à leurs congénères sauvages. Sox9 est un facteur de transcription de la famille des protéines à boîte de haute mobilité associé à SRY, il a un rôle essentiel dans les différentes étapes successives de la différenciation des chondrocytes (29,317) par conséquent l'augmentation de l'expression de Sox9 chez les embryons XT-I KO peut affecter toutes les étapes de la différenciation chondrocytaire. En effet Sox9 peut induire l'expression des différents marqueurs chondrogéniques tel que l'aggrécane, et de Collagène de type 2 (29,32,33). L'aggrécane est le PG majeur de la MEC des chondrocytes. Il est exprimé au niveau de toutes les zones de la plaque de croissance. Nous avons analysé l'expression de ce gène et avons observé une augmentation de son expression chez les embryons XT-I KO. Cependant, nous n'avons pas observé une différence dans l'expression du collagène type 2 qui est le collagène spécifique du cartilage exprimé au niveau des chondrocytes de réserve, prolifératifs et préhypertrophiques. Nous avons également montré une augmentation de l'expression du Col10a1, le marqueur des chondrocytes hypertrophiques, suggérant ainsi une accélération de l'hypertrophie chez les souris XT-I KO. L'ensemble de ces résultats indique que l'invalidation de la XT-I affecte la maturation des chondrocytes au niveau de toutes les étapes de la chondrogenèse et suggère une maturation précoce des chondrocytes. Nous avons ensuite analysé l'expression du gène *SPP1* codant pour l'ostéopontine qui est un marqueur des chondrocytes hypertrophiques terminaux et des ostéoblastes. Nous avons montré une augmentation de l'expression de ce gène chez les embryons XT-I KO suggérant ainsi une accélération de la maturation terminale des chondrocytes hypertrophiques et une ossification précoce chez les souris XT-I KO.

Le développement de la plaque de croissance est un processus hautement régulé qui implique plusieurs molécules systémiques et locales et différentes voies de signalisation (3,16). La signalisation Ihh joue un rôle majeur dans la chondrogenèse et la maturation chondrocytaire (318,319). Les chondrocytes préhypertrophiques secrètent l'Ihh qui à son tour stimule la

prolifération des chondrocytes de réserve et l'expression de Runx2 au niveau du périchondrium (318,319). Runx2 est un facteur de transcription à domaine "runt", il joue un rôle important dans la promotion de l'hypertrophie des chondrocytes. Il est initialement exprimé au niveau du mésenchyme chondrogénique après l'expression de Sox9 (29,320), des cellules périchondriales et des ostéoblastes après formation du cartilage anlage et en fin au niveau des chondrocytes préhypertrophiques. Runx2 initie l'hypertrophie des chondrocytes. Il a été montré que la perte de Runx2 engendre des anomalies sévères de la maturation des chondrocytes au cours du développement (43,45,311). Les embryons XT-I KO présentent une augmentation de l'expression d'Ihh et une surexpression de Runx2. L'augmentation de l'expression de Runx2, probablement sous l'effet d'Ihh, en absence de la XT-I entrainerait l'hypertrophie précoce des chondrocytes chez les embryons XT-I KO. Runx2 exprimé au niveau du périchondre est responsable de la différenciation des ostéoblastes ce qui nous laisse supposer que la surexpression de Runx2 peut engendrer une ossification précoce.

#### 4. L'ossification primaire et secondaire sont précoces chez les embryons XT-I KO

L'analyse histologique par coloration au Rouge Alizarine de la plaque de croissance des embryons sauvages et XT-I KO au stade E14.5 a révélé une région minéralisée plus importante chez les embryons XT-I KO par rapport aux embryons sauvages. En accord avec ce résultat, l'analyse de l'expression du gène SPP1 montre une augmentation de son expression chez les embryons XT-I KO. Les embryons sauvages montrent quant à eux une faible expression de ce gène. L'ensemble de ces données sont en faveur d'un processus d'ossification précoce chez les embryons XT-I KO. Nous avons également noté que les embryons XT-I KO présentent une augmentation importante de l'expression de l'ostéopontine indiquant ainsi une ossification accrue de la matrice suite à la différenciation terminale des chondrocytes hypertrophiques qui serait accélérée sous l'effet de Runx2 et conduisant ainsi à la formation précoce du POC.

Nous avons également observé une formation précoce du SOC chez les embryons XT-I KO. En effet, l'analyse de la plaque de croissance au stade E18.5 a révélé la présence de chondrocytes hypertrophiques avec un noyau condensé au milieu de l'épiphyse ainsi qu'un groupe de cellules migrant du périchondre jusqu'à l'épiphyse reflétant la formation des canaux cartilagineux. Cette formation précoce du SOC doit être réconfortée par l'analyse des marqueurs d'ossification et des facteurs de vascularisation tels que le VEGF, le Col10a1 et la MM13 au niveau de l'épiphyse des plaques de croissance des embryons XT-I KO.



L'ensemble de ces résultats indique une ossification précoce qui serait probablement à l'origine du nanisme et des anomalies squelettiques observés chez les embryons XT-I KO.

#### 5. Défauts de synthèse des PGs chez les embryons XT-I KO entraînant des défauts de signalisation

L'analyse du taux de synthèse de PGs et des chaînes de GAGs ainsi que la coloration des sections des membres des embryons XT-I KO avec le Bleu Alcian indique une baisse dans la synthèse des PGs au niveau de la plaque de croissance et de la MEC des chondrocytes. Deux classes majeures de PGs, les HSPGs et les CSPGs, sont fortement exprimés au niveau de la MEC des chondrocytes et jouent un rôle important dans la régulation de la maturation chondrocytaire (321,322). Les HSPGs jouent le rôle de cofacteur dans les voies de signalisation canoniques du FGF et dans d'autres voies de signalisations incluant la signalisation d'Ihh, de Wnt et du TGF $\beta$  (230). Plusieurs études ont montré que la signalisation optimale des FGFs canoniques requiert l'héparine ou les HSPGs comme cofacteur. En effet, les HSPGs induisent la formation du complexe ternaire FGF-FGFR-HSPG qui active le domaine tyrosine kinase intracellulaire du FGFR3 par phosphorylation de résidus tyrosine spécifiques. Ensuite, le récepteur activé initie les voies de signalisation intracellulaires (231,323–325). Les embryons XT-I KO présentent des défauts d'anabolisme des PGs. En effet, nous avons montré que l'inactivation de la XT-I affecte de manière négative la synthèse des chaînes de GAGs des PGs en particulier les chaînes de haut poids moléculaires. Par conséquent, nous suggérons que l'altération de la synthèse des PGs chez les embryons XT-I KO pourrait induire des anomalies de liaison et/ou de diffusion des facteurs FGFs et altéré ainsi l'activation des cibles en aval.

Les embryons XT-I KO présentent également une augmentation de la phosphorylation d'AKT qui pourrait être due à la perturbation de la signalisation du FGFR3. Prior et al., (2006), ont montré que le FGF n'active pas AKT dans les chondrocytes, mais réduit son activation. Kita et al (2008), ont montré que l'activation d'AKT durant la chondrogenèse embryonnaire active la prolifération et inhibe la différenciation hypertrophique (326). L'augmentation de l'activation d'AKT peut contribuer à l'augmentation de la prolifération chez les embryons XT-I KO. L'inhibition de la différenciation hypertrophique par AKT montrée par Kita et al., (2008) est associée à une suppression de l'expression de Runx2. Cependant, dans notre étude nous avons montré une surexpression de Runx2 chez les embryons XT-I KO probablement due à la surexpression d'Ihh.

## 6. Surexpression du FGFR3 et perturbation de la signalisation sous-jacente en absence de la XT-I

En plus de la signalisation Ihh, le développement de la plaque de croissance est également contrôlé par la voie de signalisation du FGF (327). Une mutation activatrice au niveau du FGFR3 est à l'origine de la chondrodysplasie la plus commune chez l'être humain (328). FGFR3 est exprimé dans tous les chondrocytes de la plaque de croissance sauf au niveau des chondrocytes hypertrophiques avec une forte expression au niveau des chondrocytes préhypertrophiques. FGFR3 active plusieurs voies de signalisation dont principalement STAT, MAPK, PI3K/AKT et PLC $\gamma$ /PKC (80,327). FGFR3 régule négativement la prolifération et la différenciation, il inhibe la prolifération par la signalisation STAT1 (131) et active la maturation terminale des chondrocytes par la signalisation *via* les MAPK (79,132,136). Les embryons XT-I KO présentent une augmentation de l'expression de FGFR3 affectant les différentes voies en aval. Mis et al., (2013) ont reporté une augmentation de l'expression du FGFR3 chez la souris pug portant une mutation réduisant l'activité de la XT-I mais aucune différence dans l'activation d'ERK1/2 n'a été démontré chez ces souris. Contrairement à cette étude, les embryons XT-I KO montrent une augmentation de l'activation d'ERK1/2. En effet, les syndromes de petite taille le plus sévères sont associés à une signalisation aberrante de la voie RAS/ERK1/2 (102). En accord avec cette étude, nous pouvons supposer que l'augmentation de l'activation d'ERK1/2 suite à la surexpression du FGFR3 serait la voie de signalisation défectueuse engendrant le nanisme chez les embryons XT-I KO. Murakami et al., (2000) ont montré que la régulation de Sox9 par la signalisation FGF est médiée par les protéines MAPK spécifiquement par la signalisation ERK1/2 (329). Les embryons XT-I KO montrent une augmentation de l'expression de SOX9 due probablement à l'activation d'ERK1/2 au niveau des chondrocytes suite à la surexpression du FGFR3. Une activation constitutive des MAP2K, MEK1 responsable de l'activation d'ERK1/2 conduit à une persistance des chondrocytes prolifératifs et une suppression de la maturation hypertrophique (132). Cependant, des études *in vitro* utilisant des inhibiteurs pharmacologiques d'ERK1/2, ont montré que l'activation d'ERK1/2 est requise pour l'hypertrophie des chondrocytes (330). Beier et al., (1999) ont montré que c-Raf, MEK1/2, ERK1/2 sont requis pour une expression normale du collagène X qui est un marqueur des chondrocytes hypertrophiques (331). En accord avec cette étude, l'augmentation de l'expression de Col10a1 chez les embryons XT-I KO est due probablement à l'augmentation de l'activation d'ERK1/2.

## 7. Perturbation de la signalisation de TGF $\beta$ chez les embryons XT-I KO

La voie de signalisation du TGF $\beta$  est affectée chez les embryons XT-I KO probablement à cause de l'altération de la synthèse des PGs. En effet, nous avons montré une augmentation de l'expression du TGFBR2 au niveau de la plaque de croissance des embryons XT-I KO engendrant une augmentation de l'activation de Smad2 et Smad3. Plusieurs études ont montré que le betaglycan ou TGF $\beta$ RIII fonctionne comme un récepteur accessoire pour les TGF $\beta$ s (258,332). Bilandzic et Stenvers (2011) ont décrit le betaglycan comme un déterminant majeur de la réponse cellulaire aux différents membres de la superfamille du TGF $\beta$  par son rôle de présentation du ligand. Le betaglycan contient deux types de chaînes de GAGs, les chaînes HS et CS (228). En outre, les PGs tels que la décorine, le biglycan et la fibromoduline régulent l'activité du TGF- $\beta$  en le séquestrant dans la MEC (229). Les embryons XT-I KO présentent un défaut de synthèse des deux types de chaînes de GAG, ce qui pourrait entraîner un défaut au niveau des PGs portant ces chaînes, comme le betaglycan, conduisant ainsi à une expression accrue du TGFBR2 et à l'augmentation de l'activation des Smad2 et Smad3. Plusieurs études ont montré que Smad2 et Smad3 peuvent interagir avec Sox9 et recruter le co-activateur CBP/p300 et ainsi augmenter son activité transcriptionnelle (183,333). En effet, nous avons montré une augmentation de l'expression de SOX9 chez les embryons XT-I KO, suggérant que l'activation de Smad2 et Smad3 peut conduire à l'activation accrue de SOX9 chez les embryons XT-I KO. Il a été montré que le TGF- $\beta$ 1 induit l'expression de protéines spécifiques de la MEC telles que : le collagène de type II et l'aggrécane via l'activation d'ERK1/2 et de Smad2/Smad3 (184). L'ensemble de ces résultats indique que la XT-I joue un rôle important dans la régulation de la chondrogenèse et l'ossification endochondrale *via* le contrôle et la régulation de la signalisation du FGFR3 et du TGF $\beta$ RII.

## 8. La perte de la XT-I affecte l'organisation et la fibrillation du collagène

En plus des PGs, la MEC des chondrocytes est constituée de fibres de collagène. Le collagène de type II représente 90% des collagènes présents dans le cartilage. Il forme un réseau solide qui baigne les chondrocytes et assure leur agglomération au sein de la plaque de croissance en interagissant avec les PGs (200). Des mutations au niveau du gène *Col2a1* ont été associées à plusieurs dysplasies squelettiques et à un développement précoce de l'arthrose indiquant ainsi un rôle important du *Col2a1* dans le développement ostéoarticulaire (201,202,334,335). Au cours de notre étude, nous avons analysé le contenu en collagène de la plaque de croissance par coloration au Rouge Sirius. Nous avons observé une coloration plus importante chez les embryons XT-I KO indiquant un contenu plus important en collagènes

chez ces derniers. Nous avons également analysé ces coupes histologiques par lumière polarisée et nous avons observé une désorganisation des fibres de collagènes chez les embryons XT-I KO. L'interaction du collagène avec les PGs est nécessaire pour la formation d'une matrice organisée et la fibrillation du collagène est régulée par les PGs en particulier la décorine, ceci nous laisse suggérer un défaut de fibrillation du collagène chez les embryons XT-I KO qui serait dû à la perturbation de la synthèse des chaînes de GAGs des PGs en l'absence de la XT-I.

# *Conclusions et perspectives*

Ce travail nous a permis de mettre en évidence le rôle crucial de la XT-I dans le développement squelettique. Nous avons montré que l'inactivation de la XT-I est létale et les embryons XT-I KO présentent un nanisme prononcé et une hypoplasie frontonasale apparente. Les souris XT-I KO meurent 30 min après leur naissance probablement à cause de problèmes respiratoires. L'analyse histologique des squelettes des embryons a révélé une cage thoracique réduite, une sévère diminution de la taille des membres et un phénotype crâniofacial apparent. La perte de la XT-I induit des défauts de synthèse des PGs qui sont des macromolécules jouant un rôle important dans la structure de la matrice et l'organisation des chondrocytes au sein de la plaque de croissance. L'analyse de la plaque de croissance des embryons XT-I KO a permis de révéler que celle-ci est désorganisée et présente une taille réduite avec une densité cellulaire élevée. Les chondrocytes sont fortement tassés et peu de MEC les sépare. Nous avons montré que la perte de la XT-I conduit à l'augmentation de la prolifération des chondrocytes. Nous avons montré une zone proliférative réduite et désorganisée chez les embryons XT-I KO, les chondrocytes de cette zone ont perdu leur phénotype aplatis et leur organisation en colonne comparé aux chondrocytes prolifératives des embryons sauvages. Cette désorganisation pourrait être due à la désorganisation de la MEC et des fibres de collagène engendré par les défauts de synthèse des PGs et de leurs chaînes de GAGs. En effet, le collagène au niveau de la MEC est impliqué dans l'organisation en colonne des chondrocytes prolifératifs.

Le développement de la plaque de croissance est régulé par plusieurs facteurs de croissance et de transcription et par des constituants de la MEC. L'analyse des différents marqueurs chondrogéniques au niveau de la plaque de croissance des embryons XT-I KO révèle une surexpression de SOX9. L'analyse de l'anabolisme des PGs chez les embryons XT-I KO a montré une perte de synthèse des GAGs à longues chaînes. Les PGs jouent un rôle important dans le stockage des facteurs de croissance et la régulation de leur biodisponibilité au niveau de la matrice. Les HSPGs sont connus pour être des cofacteurs potentiels pour les voies de signalisation canoniques du FGF, d'IHH, de Wnt et du TGF $\beta$ . L'analyse de l'expression du FGFR3 montre une surexpression de ce dernier et une perturbation de l'activation des voies de signalisation cibles ERK1/2 et AKT. Nous avons suggéré que ces deux voies pourraient être à l'origine de l'augmentation de la prolifération des chondrocytes chez les embryons XT-I KO. En plus, l'activation d'ERK1/2 pourrait induire l'expression de Col10a1. Ihh est un marqueur des chondrocytes préhypertrophiques, il régule la prolifération des chondrocytes par la voie PTHRP et l'hypertrophie via le facteur Runx2. La surexpression d'Ihh chez les

embryons XT-I KO pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'expression du facteur Runx2.

Une zone hypertrophique plus importante et la surexpression du Col10a1 ainsi que de SPP1, un marqueur des chondrocytes terminaux indiquent une hypertrophie précoce chez les embryons XT-I KO qui pourrait être induite par Runx2. L'analyse de l'expression du récepteur TGF $\beta$ R2 a révélé une surexpression de ce dernier et une activation de Smad2 au niveau des chondrocytes XT-I KO. p-Smad2 induit l'expression de COL2A1 et d'ACAN et interagit avec SOX9 en augmentant son activité transcriptionnelle.

Nous avons montré également une formation précoce des centres d'ossification primaire et secondaire chez les embryons XT-I KO. En effet, au stade E14.5 nous avons observé une zone minéralisée plus importante chez les embryons XT-I KO et une surexpression de SPP1 couvrant une zone minéralisée plus large chez ces embryons et indiquant une accélération de la différenciation en phase terminale d'hypertrophie ainsi qu'une formation précoce du POC. Alors que le SOC se forme vers le 5-7 jours postnataux chez la souris, nous avons montré une formation de ce dernier au stade E18.5 chez les embryons XT-I KO indiquant ainsi une ossification précoce et accélérée chez ces derniers.

La déficience en XT-I engendre des défauts de synthèse des PGs et probablement une désorganisation de la MEC conduisant à la perturbation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la régulation du développement de la plaque de croissance et de l'ossification endochondrale. La perturbation de ces différentes voies conduit à l'augmentation de la prolifération et à une hypertrophie précoce des chondrocytes au niveau de la plaque de croissance des embryons XT-I KO. Ces anomalies de chondrogenèse engendrent une ossification précoce et accélérée qui conduit au nanisme et aux différentes anomalies du développement squelettique chez les embryons XT-I KO.

Pour la suite de ce projet et afin de compléter les résultats obtenus, il serait intéressant de mettre en évidence les causes de la létalité des souris XT-I KO en analysant les poumons des embryons XT-I KO ainsi que leurs cages thoraciques afin de confirmer les problèmes respiratoires chez ces souris. L'analyse d'autres organes responsables des fonctions vitales chez les embryons XT-I KO, tels que le cœur, les reins et le foie est importante pour déterminer l'origine de la létalité des souris mutées.

La XT-I est majoritairement exprimée au niveau du système osseux et du cerveau. Les patients portant la mutation c.1441C>T p.Arg481Trp au niveau du gène de la XT-I présentent

des capacités intellectuelles réduites. Il serait intéressant d'analyser le cerveau des embryons XT-I KO afin de mettre en évidence l'effet de l'invalidation de la XT-I sur le développement neuronal. Dans un premier temps, nous avons effectué des coupes transversales sur des têtes d'embryons sauvages et XT-I KO, il serait intéressant d'analyser ces coupes afin d'étudier la structure et le développement du cerveau chez les embryons XT-I KO.

Il serait également intéressant d'analyser les différents PGs de la plaque de croissance afin d'identifier ceux qui ont été affectés par l'invalidation de la XT-I et mettre en évidence ceux qui sont impliqués dans l'altération des différentes voies de signalisation chez les embryons XT-I KO.

Au cours de notre étude, nous avons montré une formation précoce du POC et du SOC chez les embryons XT-I KO. La vascularisation et la résorption de la matrice cartilagineuse sont deux événements importants pour l'ossification et la formation des centres d'ossification. Le VEGF est le facteur responsable de l'invasion vasculaire de la diaphyse et plus tard du centre de l'épiphyse. La vascularisation permet l'arrivée des ostéoblastes et des ostéoclastes et induit ainsi la minéralisation de la matrice cartilagineuse et la formation osseuse. La MMP13 est la principale métalloprotéase matricielle responsable de la dégradation de la matrice cartilagineuse au niveau de la plaque de croissance. Elle permet la mise en place d'une matrice minéralisée et la formation osseuse. Il serait intéressant d'analyser *in vivo* par IHC ou RNAscope l'expression du facteur VEGF et de ses récepteurs ainsi que l'expression de la MMP13 au niveau de la plaque de croissance des embryons XT-I KO afin d'appuyer l'hypothèse de l'ossification précoce chez les embryons XT-I KO.

Nous avons montré que l'invalidation de la XT-I engendre la perturbation de plusieurs voies de signalisation, il serait intéressant d'analyser les différentes voies sous-jacentes qui n'ont pas été analysées lors de cette étude et d'analyser l'interaction entre ces différentes voies afin de compléter les mécanismes moléculaires responsables des différents désordres du développement squelettiques retrouvés chez les embryons XT-I KO.

Le traitement des chondrocytes primaires XT-I KO avec l'inhibiteur spécifique du récepteur FGFR3 a permis de restaurer l'activation optimale d'ERK1/2. Il serait intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition *in vivo* du FGFR3 chez les embryons XT-I KO, en injectant les souris mères avec cet inhibiteur et analyser par la suite les embryons XT-I KO et leur croissance et voir s'il y'a des améliorations au niveau de leur développement ostéoarticulaire. Récemment, il a été montré que l'inhibition de la voie MAPK/ERK1/2 chez des individus atteints d'achondroplasie induite par une mutation activatrice du FGFR3 entraîne une correction du



phénotype des souris mutées avec une injection quotidienne du vosoritide (BMN111, analogue du peptide natriurétique de type C) et une accélération de la croissance chez le singe. Devant ces résultats prometteurs chez l'animal, le vosoritide est actuellement en cours d'essai chez l'homme. Il a été administré en une injection sous cutanée journalière, pendant six mois, chez 22 enfants âgés de 5 à 14 ans à l'inclusion (âge moyen : 7, 8 ans). Aucun effet indésirable grave n'a été rapporté. L'administration sous cutanée quotidienne de 15 µg/kg de vosoritide a permis une accélération de la vitesse de croissance (VC) de 2 cm/an (VC moyenne : 4 cm/an avant traitement vs. 6 cm/an avec le traitement), soit un gain de 4 cm supplémentaires avec le vosoritide durant les 30 mois de suivi. Il serait donc intéressant de tester cet inhibiteur et voir son effet sur les souris XT-I KO qui ont une forte activation d'ERK1/2. Il serait également intéressant de tester l'effet de l'inhibition du récepteur TGFβ sur le développement du squelette chez les souris XT-I KO

L'analyse histologique du squelette au stade E16.5 a révélé un début de développement des deux incisives centrales inférieures chez les embryons XT-I KO comparé aux embryons XT-I WT qui ne présentait pas encore ce processus. Il serait donc intéressant d'étudier le développement dentaire chez les embryons XT-I KO afin de vérifier l'effet de la déficience en XT-I sur la formation dentaire chez les embryons.

# *Références*

1. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone*. nov 2015;80:14-8.
2. Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev*. 2002;16(12):1446–1465.
3. Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1 janv 2013;5(1):a008334.
4. Usami Y, Gunawardena AT, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Wnt signaling in cartilage development and diseases: lessons from animal studies. *Lab Invest*. févr 2016;96(2):186-96.
5. Mallein-Gerin F, van der Rest M. La culture de chondrocytes : outil d'analyse de la différenciation et de l'organisation moléculaire du cartilage. *médecine/sciences*. 1996;12(10):1087.
6. Johnstone B, Cucchiarini M, Dodge G, Eglin D, Guilak F, Madry H, et al. Tissue engineering for articular cartilage repair – the state of the art. *Eur Cell Mater*. 2 mai 2013;25:248-67.
7. Musumeci G, Loreto C, Imbesi R, Trovato FM, Di Giunta A, Lombardo C, et al. Advantages of exercise in rehabilitation, treatment and prevention of altered morphological features in knee osteoarthritis. A narrative review. *Histol Histopathol*. juin 2014;29(6):707-19.
8. Mow VC, Guo XE. Mechano-Electrochemical Properties Of Articular Cartilage: Their Inhomogeneities and Anisotropies. *Annu Rev Biomed Eng*. août 2002;4(1):175-209.
9. Brocklehurst R, Bayliss MT, Maroudas A, Coysh HL, Freeman MA, Revell PA, et al. The composition of normal and osteoarthritic articular cartilage from human knee joints. With special reference to unicompartmental replacement and osteotomy of the knee. *J Bone Joint Surg Am*. janv 1984;66(1):95-106.
10. Nakagawa Y, Muneta T, Otabe K, Ozeki N, Mizuno M, Udo M, et al. Cartilage Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Expresses Lubricin In Vitro and In Vivo. Serra R, éditeur. *PLOS ONE*. 11 févr 2016;11(2):e0148777.
11. Ateshian GA, Warden WH, Kim JJ, Grelsamer RP, Mow VC. Biphasic material properties articular cartilage compression experiments. 1997;8.
12. Brighton CT. Morphology and biochemistry of the growth plate. *Rheum Dis Clin North Am*. avr 1987;13(1):75-100.
13. Iannotti JP. Growth plate physiology and pathology. *Orthop Clin North Am*. janv 1990;21(1):1-17.
14. Schoenwolf, Bleyl, Brauer, Francis-West. *Embryologie Humaine de larsen*. 2017.
15. Behringer, Gertsenstein M, Vintersten K, Nagy A. *Manipulating the Mouse Embryo : A laboratory Manual, Fourth Edition [Internet]. Fourth Edition*. 2007. Disponible sur:

[https://www.cshlpress.com/default.tpl?cart=155014605570760822&fromlink=T&linkaction=full&linksortby=oop\\_title&--eqSKUdatarq=982](https://www.cshlpress.com/default.tpl?cart=155014605570760822&fromlink=T&linkaction=full&linksortby=oop_title&--eqSKUdatarq=982)

16. Kozhemyakina E, Lassar AB, Zelzer E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development*. 1 mars 2015;142(5):817-31.
17. Abraham E. Remodeling potential of long bones following angular osteotomies. *J Pediatr Orthop*. févr 1989;9(1):37-43.
18. Albery A, Peltonen J, Ritsilä V. Effects of distraction and compression on proliferation of growth plate chondrocytes. A study in rabbits. *Acta Orthop Scand*. août 1993;64(4):449-55.
19. Hunziker EB. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech*. 15 août 1994;28(6):505-19.
20. Rauch F. Bone growth in length and width: the Yin and Yang of bone stability. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. sept 2005;5(3):194-201.
21. Kember NF, Walker KVR. Control of Bone Growth in Rats. *Nature*. févr 1971;229(5284):428.
22. Breur GJ, Vanenkevort BA, Farnum CE, Wilsman NJ. Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *J Orthop Res*. 1991;9(3):348-59.
23. Abad V, Uyeda JA, Temple HT, De Luca F, Baron J. Determinants of Spatial Polarity in the Growth Plate. *Endocrinology*. 1 févr 1999;140(2):958-62.
24. Abad V, Meyers JL, Weise M, Gafni RI, Barnes KM, Nilsson O, et al. The Role of the Resting Zone in Growth Plate Chondrogenesis. *Endocrinology*. 1 mai 2002;143(5):1851-7.
25. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet*. mai 1999;22(1):85-9.
26. Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res*. 15 mars 1999;27(6):1409-20.
27. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 8 déc 1994;372(6506):525-30.
28. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, et al. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*. 16 déc 1994;79(6):1111-20.

29. Akiyama H. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 1 nov 2002;16(21):2813-28.
30. Kist R, Schrewe H, Balling R, Scherer G. Conditional inactivation of Sox9: A mouse model for campomelic dysplasia. *genesis.* 1 févr 2002;32(2):121-3.
31. Barna M, Niswander L. Visualization of Cartilage Formation: Insight into Cellular Properties of Skeletal Progenitors and Chondrodysplasia Syndromes. *Dev Cell.* 5 juin 2007;12(6):931-41.
32. Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, et al. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet.* juin 1997;16(2):174-8.
33. de Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol.* déc 2001;13(6):721-8.
34. Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The Transcription Factors L-Sox5 and Sox6 Are Essential for Cartilage Formation. *Dev Cell.* 1 août 2001;1(2):277-90.
35. Han Y, Lefebvre V. L-Sox5 and Sox6 Drive Expression of the Aggrecan Gene in Cartilage by Securing Binding of Sox9 to a Far-Upstream Enhancer. *Mol Cell Biol.* 15 août 2008;28(16):4999-5013.
36. Lefebvre V, Li P, Crombrughe B de. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* 1 oct 1998;17(19):5718-33.
37. Akiyama H, Kim J-E, Nakashima K, Balmes G, Iwai N, Deng JM, et al. Osteochondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci.* 11 oct 2005;102(41):14665-70.
38. Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, et al. Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev Dyn.* avr 1999;214(4):279-90.
39. Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev.* 1 févr 1999;80(2):159-70.
40. Takeda S, Bonnamy J-P, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev.* 15 févr 2001;15(4):467-81.
41. Tu, Joeng KS, Long F. Indian Hedgehog Requires Additional Effectors besides Runx2 to Induce Osteoblast Differentiation. *Dev Biol.* 1 févr 2012;362(1):76-82.

42. Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, et al. Skeletal Malformations Caused by Overexpression of Cbfa1 or Its Dominant Negative Form in Chondrocytes. *J Cell Biol.* 2 avr 2001;153(1):87-100.
43. Yoshida CA. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev.* 15 avr 2004;18(8):952-63.
44. Hinoi E, Bialek P, Chen Y-T, Rached M-T, Groner Y, Behringer RR, et al. Runx2 inhibits chondrocyte proliferation and hypertrophy through its expression in the perichondrium. *Genes Dev.* 11 janv 2006;20(21):2937-42.
45. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturation Arrest of Osteoblasts. *Cell.* mai 1997;89(5):755-64.
46. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell.* mai 1997;89(5):765-71.
47. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, et al. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev.* 15 avr 1999;13(8):1025-36.
48. Lee K, Deeds JD, Segre GV. Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. *Endocrinology.* 1 févr 1995;136(2):453-63.
49. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 15 août 1999;13(16):2072-86.
50. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of Rate of Cartilage Differentiation by Indian Hedgehog and PTH-Related Protein. *Science.* 2 août 1996;273(5275):613-22.
51. Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM, et al. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev.* 2 janv 1994;8(3):277-89.
52. Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, et al. PTH/PTHrP Receptor in Early Development and Indian Hedgehog--Regulated Bone Growth. *Science.* 2 août 1996;273(5275):663-6.
53. Jobert AS, Zhang P, Couvineau A, Bonaventure J, Roume J, Merrer ML, et al. Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Blomstrand chondrodysplasia. *J Clin Invest.* 1 juill 1998;102(1):34-40.
54. Karperien M, van der Harten HJ, van Schooten R, Farih-Sips H, den Hollander NS, Kneppers SLJ, et al. A Frame-Shift Mutation in the Type I Parathyroid Hormone

- (PTH)/PTH-Related Peptide Receptor Causing Blomstrand Lethal Osteochondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 oct 1999;84(10):3713-20.
55. Schipani E, Kruse K, Juppner H. A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science.* 7 avr 1995;268(5207):98-100.
  56. Schipani E, Langman CB, Parfitt AM, Jensen GS, Kikuchi S, Kooh SW, et al. Constitutively Activated Receptors for Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Peptide in Jansen's Metaphyseal Chondrodysplasia. *N Engl J Med.* 5 sept 1996;335(10):708-14.
  57. Guo J, Chung U-I, Kondo H, Bringham FR, Kronenberg HM. The PTH/PTHrP Receptor Can Delay Chondrocyte Hypertrophy In Vivo without Activating Phospholipase C. *Dev Cell.* 1 août 2002;3(2):183-94.
  58. Huang W, Chung UI, Kronenberg HM, de Crombrughe B. The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 janv 2001;98(1):160-5.
  59. Huangfu D, Anderson KV. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development.* 1 janv 2006;133(1):3-14.
  60. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 12 janv 2001;15(23):3059-87.
  61. McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of Hedgehog signaling. In: *Current Topics in Developmental Biology.* Academic Press; 2003. p. 1-114.
  62. Long et al. Direct requirement for Ihh signaling in chondrocyte proliferation. 2001;10.
  63. Hilton MJ, Tu X, Long F. Tamoxifen-inducible gene deletion reveals a distinct cell type associated with trabecular bone, and direct regulation of PTHrP expression and chondrocyte morphology by Ihh in growth region cartilage. *Dev Biol.* 1 août 2007;308(1):93-105.
  64. Kobayashi T. Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1734-42.
  65. Karp SJ, Schipani E, St-Jacques B, Hunzelman J, Kronenberg H, McMahon AP. Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development.* 1 févr 2000;127(3):543-8.
  66. Kronenberg HM. PTHrP and Skeletal Development. *Ann N Y Acad Sci.* 1 avr 2006;1068(1):1-13.

67. Hilton MJ, Tu X, Cook J, Hu H, Long F. Ihh controls cartilage development by antagonizing Gli3, but requires additional effectors to regulate osteoblast and vascular development. *Development*. 1 oct 2005;132(19):4339-51.
68. Koziel L, Wuelling M, Schneider S, Vortkamp A. Gli3 acts as a repressor downstream of Ihh in regulating two distinct steps of chondrocyte differentiation. *Development*. 1 déc 2005;132(23):5249-60.
69. Ruat M, Hoch L, Faure H, Rognan D. Structure du récepteur Smoothed. *médecine/sciences*. oct 2013;29(10):855-60.
70. Krejci P, Prochazkova J, Smutny J, Chlebova K, Lin P, Aklian A, et al. FGFR3 signaling induces a reversible senescence phenotype in chondrocytes similar to oncogene-induced premature senescence. *Bone*. juill 2010;47(1):102-10.
71. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov*. mars 2009;8(3):235-53.
72. Itoh N. Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res*. oct 2010;342(1):1-11.
73. Itoh N, Ornitz DM. Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev Dyn*. 2008;237(1):18-27.
74. Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem (Tokyo)*. 1 févr 2011;149(2):121-30.
75. Oulion S, Bertrand S, Escriva H. Evolution of the FGF Gene Family. *Int J Evol Biol*. 2012;2012:298147.
76. Burdan F, Szumilo J, Korobowicz A, Farooquee R, Patel S, Patel A, et al. Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009;47(1):5-16.
77. Gong S-G. Isoforms of receptors of fibroblast growth factors. *J Cell Physiol*. déc 2014;229(12):1887-95.
78. Powers C. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*. 1 sept 2000;7(3):165-97.
79. Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. avr 2005;16(2):233-47.
80. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. mai 2015;4(3):215-66.
81. Du X, Xie Y, Xian CJ, Chen L. Role of FGFs/FGFRs in skeletal development and bone regeneration. *J Cell Physiol*. 2012;227(12):3731-43.



82. Ornitz DM. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev.* avr 2005;16(2):205-13.
83. Jacob AL, Smith C, Partanen J, Ornitz DM. Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteo-chondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation. *Dev Biol.* 15 août 2006;296(2):315-28.
84. Kyono A, Avishai N, Ouyang Z, Landreth GE, Murakami S. FGF and ERK signaling coordinately regulate mineralization-related genes and play essential roles in osteocyte differentiation. *J Bone Miner Metab.* 1 janv 2012;30(1):19-30.
85. Lazarus JE, Hegde A, Andrade AC, Nilsson O, Baron J. Fibroblast growth factor expression in the postnatal growth plate. *Bone.* 1 mars 2007;40(3):577-86.
86. Xiao L, Naganawa T, Obugunde E, Gronowicz G, Ornitz DM, Coffin JD, et al. Stat1 Controls Postnatal Bone Formation by Regulating Fibroblast Growth Factor Signaling in Osteoblasts. *J Biol Chem.* 25 juin 2004;279(26):27743-52.
87. Delezoide A-L, Benoist-Lassel C, Legeai-Mallet L, Le Merrer M, Munnich A, Vekemans M, et al. Spatio-temporal expression of FGFR 1, 2 and 3 genes during human embryo-fetal ossification. *Mech Dev.* 1 sept 1998;77(1):19-30.
88. Orr-Urtreger A, Bedford MT, Burakova T, Arman E, Zimmer Y, Yayon A, et al. Developmental Localization of the Splicing Alternatives of Fibroblast Growth Factor Receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol.* 1 août 1993;158(2):475-86.
89. Peters KG, Werner S, Chen G, Williams LT. Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development.* 1 janv 1992;114(1):233-43.
90. Yu K, Xu J, Liu Z, Susic D, Shao J, Olson EN, et al. Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Development.* 1 juill 2003;130(13):3063-74.
91. Rice DP, Aberg T, Chan Y, Tang Z, Kettunen PJ, Pakarinen L, et al. Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. *Development.* 1 mai 2000;127(9):1845-55.
92. Rice DPC, Rice R, Thesleff I. Fgfr mRNA isoforms in craniofacial bone development. *Bone.* 1 juill 2003;33(1):14-27.
93. Yin L, Du X, Li C, Xu X, Chen Z, Su N, et al. A Pro253Arg mutation in fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) causes skeleton malformation mimicking human Apert syndrome by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *Bone.* 1 avr 2008;42(4):631-43.
94. Iseki S, Wilkie AO, Morriss-Kay GM. Fgfr1 and Fgfr2 have distinct differentiation- and proliferation-related roles in the developing mouse skull vault. *Development.* 15 déc 1999;126(24):5611-20.

95. Peters K, Ornitz D, Werner S, Williams L. Unique expression pattern of the FGF receptor 3 gene during mouse organogenesis. *Dev Biol.* févr 1993;155(2):423-30.
96. Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet.* avr 1996;12(4):390.
97. Szebenyi G, Savage MP, Olwin BB, Fallon JF. Changes in the expression of fibroblast growth factor receptors mark distinct stages of chondrogenesis in vitro and during chick limb skeletal patterning. *Dev Dyn.* 1 déc 1995;204(4):446-56.
98. Su N, Sun Q, Li C, Lu X, Qi H, Chen S, et al. Gain-of-function mutation in FGFR3 in mice leads to decreased bone mass by affecting both osteoblastogenesis and osteoclastogenesis. *Hum Mol Genet.* 1 avr 2010;19(7):1199-210.
99. Valverde-Franco G, Binette JS, Li W, Wang H, Chai S, Laflamme F, et al. Defects in articular cartilage metabolism and early arthritis in fibroblast growth factor receptor 3 deficient mice. *Hum Mol Genet.* 1 juin 2006;15(11):1783-92.
100. Cool S, Jackson R, Pincus P, Dickinson I, Nurcombe V. Fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) expression in newborn murine calvaria and primary osteoblast cultures. *Int J Dev Biol.* 1 juill 2004;46(4):519-23.
101. Partanen J, Mäkelä TP, Eerola E, Korhonen J, Hirvonen H, Claesson-Welsh L, et al. FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO J.* juin 1991;10(6):1347-54.
102. Krejci P, Masri B, Salazar L, Farrington-Rock C, Prats H, Thompson LM, et al. Bisindolylmaleimide I Suppresses Fibroblast Growth Factor-mediated Activation of Erk MAP Kinase in Chondrocytes by Preventing Shp2 Association with the Frs2 and Gab1 Adaptor Proteins. *J Biol Chem.* 2 févr 2007;282(5):2929-36.
103. Fallon JF, Lopez A, Ros MA, Savage MP, Olwin BB, Simandl BK. FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science.* 1 avr 1994;264(5155):104-7.
104. Fei Y, Hurley MM. Role of fibroblast growth factor 2 and wnt signaling in anabolic effects of parathyroid hormone on bone formation. *J Cell Physiol.* 2012;227(11):3539-45.
105. Montero A, Okada Y, Tomita M, Ito M, Tsurukami H, Nakamura T, et al. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest.* 15 avr 2000;105(8):1085-93.
106. Mariani FV, Ahn CP, Martin GR. Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal–distal patterning. *Nature.* mai 2008;453(7193):401-5.
107. Moon AM, Boulet AM, Capecchi MR. Normal limb development in conditional mutants of Fgf4. *Development.* 1 mars 2000;127(5):989-96.

108. Moon AM, Capecchi MR. Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet.* déc 2000;26(4):455-9.
109. Hung IH, Yu K, Lavine KJ, Ornitz DM. FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod. *Dev Biol.* 15 juill 2007;307(2):300-13.
110. Martin GR. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev.* 6 janv 1998;12(11):1571-86.
111. Ohuchi H, Nakagawa T, Yamamoto A, Araga A, Ohata T, Ishimaru Y, et al. The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development.* 1 juin 1997;124(11):2235-44.
112. Xu X, Weinstein M, Li C, Naski M, Cohen RI, Ornitz DM, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development.* 15 févr 1998;125(4):753-65.
113. Liu Z, Xu J, Colvin JS, Ornitz DM. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev.* 4 janv 2002;16(7):859-69.
114. Ohbayashi N, Shibayama M, Kurotaki Y, Imanishi M, Fujimori T, Itoh N, et al. FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev.* 4 janv 2002;16(7):870-9.
115. Bonewald LF, Wacker MJ. FGF23 production by osteocytes. *Pediatr Nephrol.* 1 avr 2013;28(4):563-8.
116. Raimann A, Ertl DA, Helmreich M, Sagmeister S, Egerbacher M, Haeusler G. Fibroblast Growth Factor 23 and Klotho Are Present in the Growth Plate. *Connect Tissue Res.* 1 avr 2013;54(2):108-17.
117. Chen L, Li D, Li C, Engel A, Deng C-X. A Ser250Trp substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) results in craniosynostosis. *Bone.* 1 août 2003;33(2):169-78.
118. Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Is a Negative Regulator of Bone Growth. *Cell.* 22 mars 1996;84(6):911-21.
119. Harada M, Murakami H, Okawa A, Okimoto N, Hiraoka S, Nakahara T, et al. FGF9 monomer/dimer equilibrium regulates extracellular matrix affinity and tissue diffusion. *Nat Genet.* mars 2009;41(3):289-98.
120. Larsson T, Marsell R, Schipani E, Ohlsson C, Ljunggren Ö, Tenenhouse HS, et al. Transgenic Mice Expressing Fibroblast Growth Factor 23 under the Control of the  $\alpha 1(I)$  Collagen Promoter Exhibit Growth Retardation, Osteomalacia, and Disturbed Phosphate Homeostasis. *Endocrinology.* 1 juill 2004;145(7):3087-94.

121. Wang J, Du X, Li C, Yin L, Chen B, Sun J, et al. [Gly374Arg mutation in Fgfr3 causes achondroplasia in mice]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin J Med Genet.* déc 2004;21(6):537-41.
122. Xiao L, Esliger A, Hurley MM. Nuclear FGF2 Isoforms Inhibit Bone Marrow Stromal Cell Mineralization through FGF23/FGFR/MAPK In Vitro. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* janv 2013;28(1):35-45.
123. Zhou YX, Xu X, Chen L, Li C, Brodie SG, Deng CX. A Pro250Arg substitution in mouse Fgfr1 causes increased expression of Cbfa1 and premature fusion of calvarial sutures. *Hum Mol Genet.* 12 août 2000;9(13):2001-8.
124. He X, Xie F, Ren Z. Rapid detection of G1138A and G1138C mutations of the FGFR3 gene in patients with achondroplasia using high-resolution melting analysis. *Genet Test Mol Biomark.* avr 2012;16(4):297-301.
125. Krejci P. The paradox of FGFR3 signaling in skeletal dysplasia: Why chondrocytes growth arrest while other cells over proliferate. *Mutat Res Mutat Res.* 1 janv 2014;759:40-8.
126. Chen L, Adar R, Yang X, Monson EO, Li C, Hauschka PV, et al. Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *J Clin Invest.* 1 déc 1999;104(11):1517-25.
127. Naski MC, Colvin JS, Coffin JD, Ornitz DM. Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development.* 15 déc 1998;125(24):4977-88.
128. Segev O, Chumakov I, Nevo Z, Givol D, Madar-Shapiro L, Sheinin Y, et al. Restrained chondrocyte proliferation and maturation with abnormal growth plate vascularization and ossification in human FGFR-3(G380R) transgenic mice. *Hum Mol Genet.* 22 janv 2000;9(2):249-58.
129. Wang Y, Spatz MK, Kannan K, Hayk H, Avivi A, Gorivodsky M, et al. A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Proc Natl Acad Sci.* 13 avr 1999;96(8):4455-60.
130. Iwata T, Chen L, Li C, Ovchinnikov DA, Behringer RR, Francomano CA, et al. A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. *Hum Mol Genet.* 1 juill 2000;9(11):1603-13.
131. Li C. A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors. *Hum Mol Genet.* 1 janv 1999;8(1):35-44.
132. Murakami S. Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev.* 1 févr 2004;18(3):290-305.

133. Sahni M, Ambrosetti D-C, Mansukhani A, Gertner R, Levy D, Basilico C. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev.* 6 janv 1999;13(11):1361-6.
134. Su W-CS, Kitagawa M, Xue N, Xie B, Garofalo S, Cho J, et al. Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature.* mars 1997;386(6622):288.
135. Dailey L, Laplantine E, Priore R, Basilico C. A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation. *J Cell Biol.* 23 juin 2003;161(6):1053-66.
136. Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP Signaling Integrates Chondrocyte Proliferation and Hypertrophic Differentiation. *Dev Cell.* sept 2002;3(3):439-49.
137. Krejci P, Bryja V, Pachernik J, Hampl A, Pogue R, Mekikian P, et al. FGF2 inhibits proliferation and alters the cartilage-like phenotype of RCS cells. *Exp Cell Res.* 1 juill 2004;297(1):152-64.
138. Parafioriti A, Bianco SD, Barisani D, Armiraglio E, Peretti G, Albisetti W. Increased p21 expression in chondrocytes of achondroplastic children independently from the presence of the G380R FGFR3 mutation. *J Orthop Sci.* 1 sept 2009;14(5):623-30.
139. Mendelsohn AR, Larrick JW. Fibroblast Growth Factor-21 Is a Promising Dietary Restriction Mimetic. *Rejuvenation Res.* 22 nov 2012;15(6):624-8.
140. Elo T, Sipilä P, Valve E, Kujala P, Toppari J, Poutanen M, et al. Fibroblast growth factor 8b causes progressive stromal and epithelial changes in the epididymis and degeneration of the seminiferous epithelium in the testis of transgenic mice. *Biol Reprod.* mai 2012;86(5):157, 1-12.
141. Harada D, Yamanaka Y, Ueda K, Nishimura R, Morishima T, Seino Y, et al. Sustained phosphorylation of mutated FGFR3 is a crucial feature of genetic dwarfism and induces apoptosis in the ATDC5 chondrogenic cell line via PLC $\gamma$ -activated STAT1. *Bone.* 1 août 2007;41(2):273-81.
142. L'Hôte CGM, Knowles MA. Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res.* 1 avr 2005;304(2):417-31.
143. Yamanaka Y, Tanaka H, Koike M, Nishimura R, Seino Y. PTHrP Rescues ATDC5 Cells From Apoptosis Induced by FGF Receptor 3 Mutation. *J Bone Miner Res.* 2003;18(8):1395-403.
144. Chen L, Li C, Qiao W, Xu X, Deng C. A Ser(365)-->Cys mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in mouse downregulates Ihh/PTHrP signals and causes severe achondroplasia. *Hum Mol Genet.* 1 mars 2001;10(5):457-65.

145. Li M, Seki Y, Freitas PHL, Nagata M, Kojima T, Sultana S, et al. FGFR3 down-regulates PTH/PTHrP receptor gene expression by mediating JAK/STAT signaling in chondrocytic cell line. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 1 juin 2010;59(3):227-36.
146. Shung C-Y, Ota S, Zhou Z-Q, Keene DR, Hurlin PJ. Disruption of a Sox9- $\beta$ -catenin circuit by mutant Fgfr3 in thanatophoric dysplasia type II. *Hum Mol Genet*. 1 nov 2012;21(21):4628-44.
147. Twigg SRF, Healy C, Babbs C, Sharpe JA, Wood WG, Sharpe PT, et al. Skeletal analysis of the Fgfr3P244R mouse, a genetic model for the Muenke craniosynostosis syndrome. *Dev Dyn*. 2009;238(2):331-42.
148. Mugniery E, Dacquin R, Marty C, Benoist-Lasselin C, de Vernejoul M-C, Jurdic P, et al. An activating Fgfr3 mutation affects trabecular bone formation via a paracrine mechanism during growth. *Hum Mol Genet*. 1 juin 2012;21(11):2503-13.
149. Valverde-Franco G, Liu H, Davidson D, Chai S, Valderrama-Carvajal H, Goltzman D, et al. Defective bone mineralization and osteopenia in young adult FGFR3 $^{-/-}$  mice. *Hum Mol Genet*. 1 févr 2004;13(3):271-84.
150. Massagué J, Cheifetz S, Boyd FT, Andres JL. TGF- $\beta$  Receptors and TGF- $\beta$  Binding Proteoglycans: Recent Progress in Identifying Their Functional Properties. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;593(1):59-72.
151. Moses HL, Serra R. Regulation of differentiation by TGF- $\beta$ . *Curr Opin Genet Dev*. 1 oct 1996;6(5):581-6.
152. Budi EH, Duan D, Derynck R. Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility. *Trends Cell Biol*. 1 sept 2017;27(9):658-72.
153. Iwai T, Murai J, Yoshikawa H, Tsumaki N. Smad7 Inhibits Chondrocyte Differentiation at Multiple Steps during Endochondral Bone Formation and Down-regulates p38 MAPK Pathways. *J Biol Chem*. 10 mars 2008;283(40):27154-64.
154. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature*. oct 2003;425(6958):577-84.
155. D'Angelo M, Billings PC, Pacifici M, Leboy PS, Kirsch T. Authentic Matrix Vesicles Contain Active Metalloproteases (MMP) a role for matrix vesicle associated MMP-13 in activation of transforming growth factor- $\beta$ . *J Biol Chem*. 4 juin 2001;276(14):11347-53.
156. Maeda S, Dean DD, Gay I, Schwartz Z, Boyan BD. Activation of Latent Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 by Stromelysin 1 in Extracts of Growth Plate Chondrocyte-Derived Matrix Vesicles. *J Bone Miner Res*. 2001;16(7):1281-90.
157. Matsunaga S, Yamamoto T, Fukumura K. Temporal and spatial expressions of transforming growth factor-betas and their receptors in epiphyseal growth plate. *Int J Oncol*. juin 1999;14(6):1063-7.

158. Pedrozo HA, Schwartz Z, Robinson M, Gomez R, Dean DD, Bonewald LF, et al. Potential Mechanisms for the Plasmin-Mediated Release and Activation of Latent Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 from the Extracellular Matrix of Growth Plate Chondrocytes. *Endocrinology*. 1 déc 1999;140(12):5806-16.
159. Rosenthal AK, Gohr CM, Henry LA, Le M. Participation of transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor  $\beta$ 1 in aging articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 2000;43(8):1729-33.
160. Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Stimulation of articular cartilage repair in established arthritis by local administration of transforming growth factor-beta into murine knee joints. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. févr 1998;78(2):133-42.
161. Horner A, Kemp P, Summers C, Bord S, Bishop NJ, Kelsall AW, et al. Expression and distribution of transforming growth factor- $\beta$  isoforms and their signaling receptors in growing human bone. *Bone*. 1 août 1998;23(2):95-102.
162. Sakou T, Onishi T, Yamamoto T, Nagamine T, Sampath TK, Dijke P ten. Localization of Smads, the TGF- $\beta$  Family Intracellular Signaling Components During Endochondral Ossification. *J Bone Miner Res*. 1999;14(7):1145-52.
163. Verdier M-P, Seité S, Guntzer K, Pujol J-P, Boumédiène K. Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta isoforms and their receptors in human cartilage from normal and osteoarthritic femoral heads. *Rheumatol Int*. 1 mars 2005;25(2):118-24.
164. Gatherer D, Dijke PT, Baird DT, Akhurst RJ. Expression of TGF-beta isoforms during first trimester human embryogenesis. *Development*. 1 oct 1990;110(2):445-60.
165. Millan FA, Denhez F, Kondaiah P, Akhurst RJ. Embryonic gene expression patterns of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 suggest different developmental functions in vivo. *Development*. 1 janv 1991;111(1):131-43.
166. Pathi S, Rutenberg JB, Johnson RL, Vortkamp A. Interaction of Ihh and BMP/Noggin Signaling during Cartilage Differentiation. *Dev Biol*. 15 mai 1999;209(2):239-53.
167. Pelton RW, Dickinson ME, Moses HL, Hogan BL. In situ hybridization analysis of TGF beta 3 RNA expression during mouse development: comparative studies with TGF beta 1 and beta 2. *Development*. 1 oct 1990;110(2):609-20.
168. Qiu T, Wu X, Zhang F, Clemens TL, Wan M, Cao X. TGF- $\beta$  type II receptor phosphorylates PTH receptor to integrate bone remodelling signalling. *Nat Cell Biol*. mars 2010;12(3):224-34.
169. Serra R, Karaplis A, Sohn P. Parathyroid Hormone-related Peptide (PTHrP)-dependent and -independent Effects of Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) on Endochondral Bone Formation. *J Cell Biol*. 17 mai 1999;145(4):783-94.

170. Denker AE, Nicoll SB, Tuan RS. Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor- $\beta$ 1. *Differentiation*. 1 juill 1995;59(1):25-34.
171. Kulyk WM, Rodgers BJ, Greer K, Kosher RA. Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor- $\beta$ . *Dev Biol*. 1 oct 1989;135(2):424-30.
172. Leonard CM, Fuld HM, Frenz DA, Downie SA, Massague J, Newman SA. Role of transforming growth factor- $\beta$  in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: Stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF- $\beta$  and evidence for endogenous TGF- $\beta$ -like activity. *Dev Biol*. 1 mai 1991;145(1):99-109.
173. Ballock RT, Heydemann A, Wakefield LM, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB. TGF- $\beta$ 1 Prevents Hypertrophy of Epiphyseal Chondrocytes: Regulation of Gene Expression for Cartilage Matrix Proteins and Metalloproteases. *Dev Biol*. 1 août 1993;158(2):414-29.
174. Böhme K, Winterhalter KH, Bruckner P. Terminal Differentiation of Chondrocytes in Culture Is a Spontaneous Process and Is Arrested by Transforming Growth Factor- $\beta$ 2 and Basic Fibroblast Growth Factor in Synergy. *Exp Cell Res*. 1 janv 1995;216(1):191-8.
175. Dieudonné SC, Semeins CM, Goei SW, Vukicevic S, Nulend KJ, Sampath TK, et al. Opposite effects of osteogenic protein and transforming growth factor  $\beta$  on chondrogenesis in cultured long bone rudiments. *J Bone Miner Res*. 1994;9(6):771-80.
176. Kato Y, Iwamoto M, Koike T, Suzuki F, Takano Y. Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: regulation by transforming growth factor beta and serum factors. *Proc Natl Acad Sci*. 1 déc 1988;85(24):9552-6.
177. Tschan T, Böhme K, Conscience-Egli M, Zenke G, Winterhalter KH, Bruckner P. Autocrine or paracrine transforming growth factor-beta modulates the phenotype of chick embryo sternal chondrocytes in serum-free agarose culture. *J Biol Chem*. 3 mai 1993;268(7):5156-61.
178. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ, et al. Transforming Growth Factor- $\beta$ -mediated Chondrogenesis of Human Mesenchymal Progenitor Cells Involves N-cadherin and Mitogen-activated Protein Kinase and Wnt Signaling Cross-talk. *J Biol Chem*. 17 oct 2003;278(42):41227-36.
179. Cleary MA, Osch GJVM van, Brama PA, Hellingman CA, Narcisi R. FGF, TGF $\beta$  and Wnt crosstalk: embryonic to in vitro cartilage development from mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;9(4):332-42.
180. Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, LaBorde J, Sheehan DM, Derynck R, et al. Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal



- tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol.* 20 oct 1997;139(2):541-52.
181. Alvarez J, Sohn P, Zeng X, Doetschman T, Robbins DJ, Serra R. TGF $\beta$ 2 mediates the effects of Hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression. *Development.* 15 avr 2002;129(8):1913-24.
  182. Blitz E, Viukov S, Sharir A, Shwartz Y, Galloway JL, Pryce BA, et al. Bone Ridge Patterning during Musculoskeletal Assembly Is Mediated through SCX Regulation of Bmp4 at the Tendon-Skeleton Junction. *Dev Cell.* 15 déc 2009;17(6):861-73.
  183. Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi N, Tajima Y, Asahara H. Smad3 Induces Chondrogenesis through the Activation of SOX9 via CREB-binding Protein/p300 Recruitment. *J Biol Chem.* 3 avr 2005;280(9):8343-50.
  184. Zhu Y, Tao H, Jin C, Liu Y, Lu X, Hu X, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces type II collagen and aggrecan expression via activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Smad2/3 signaling pathways. *Mol Med Rep.* oct 2015;12(4):5573-9.
  185. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, et al. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- $\beta$ 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet.* déc 1995;11(4):415.
  186. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci.* 15 janv 1993;90(2):770-4.
  187. Sanford LP, Ormsby I, Groot ACG, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, et al. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development.* 1 juill 1997;124(13):2659-70.
  188. Longobardi L, Li T, Myers TJ, O'Rear L, Ozkan H, Li Y, et al. TGF- $\beta$  Type II Receptor/MCP-5 Axis: at the Crossroad between Joint and Growth Plate Development. *Dev Cell.* 17 juill 2012;23(1):71-81.
  189. Matsunobu T, Torigoe K, Ishikawa M, de Vega S, Kulkarni AB, Iwamoto Y, et al. Critical roles of the TGF- $\beta$  type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development. *Dev Biol.* 15 août 2009;332(2):325-38.
  190. Seo H-S, Serra R. Deletion of Tgfbr2 in Prx1-cre expressing mesenchyme results in defects in development of the long bones and joints. *Dev Biol.* oct 2007;310(2):304-16.
  191. Baffi MO, Slattery E, Sohn P, Moses HL, Chytil A, Serra R. Conditional deletion of the TGF- $\beta$  type II receptor in Col2a expressing cells results in defects in the axial skeleton without alterations in chondrocyte differentiation or embryonic development of long bones. *Dev Biol.* 1 déc 2004;276(1):124-42.
  192. Gentili C, Cancedda R. Cartilage and bone extracellular matrix. *Curr Pharm Des.* 2009;15(12):1334-48.

193. Buckwalter JA. Maintaining and restoring mobility in middle and old age: the importance of the soft tissues. *Instr Course Lect.* 1997;46:459-69.
194. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect.* 1998;47:487-504.
195. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull.* 1 sept 2008;87(1):77-95.
196. Castagnola P, Dozin B, Moro G, Cancedda R. Changes in the expression of collagen genes show two stages in chondrocyte differentiation in vitro. *J Cell Biol.* 1 févr 1988;106(2):461-7.
197. Iyama K-I, Ninomiya Y, Olsen BR, Linsenmayer TF, Trelstad RL, Hayashi M. Spatiotemporal pattern of type X collagen gene expression and collagen deposition in embryonic chick vertebrae undergoing endochondral ossification. *Anat Rec.* 1 avr 1991;229(4):462-72.
198. Li Y, Lacerda DA, Warman ML, Beier DR, Yoshioka H, Ninomiya Y, et al. A fibrillar collagen gene, *Col11a1*, is essential for skeletal morphogenesis. *Cell.* 10 févr 1995;80(3):423-30.
199. Olsen BR. New insights into the function of collagens from genetic analysis. *Curr Opin Cell Biol.* 1 janv 1995;7(5):720-7.
200. Mayne R. Cartilage collagens. What Is Their Function, and Are They Involved in Articular Disease? *Arthritis Rheum.* 1989;32(3):241-6.
201. Godfrey M, Hollister DW. Type II achondrogenesis-hypochondrogenesis: identification of abnormal type II collagen. *Am J Hum Genet.* déc 1988;43(6):904-13.
202. Körkkö J, Cohn DH, Ala-Kokko L, Krakow D, Prockop DJ. Widely distributed mutations in the *COL2A1* gene produce achondrogenesis type II/hypochondrogenesis. *Am J Med Genet.* 2000;92(2):95-100.
203. Wilkin DJ, Artz AS, South S, Lachman RS, Rimoin DL, Wilcox WR, et al. Small deletions in the type II collagen triple helix produce Kniest dysplasia. *Am J Med Genet.* 1999;85(2):105-12.
204. Wilkin DJ, Liberfarb R, Davis J, Levy HP, Cole WG, Francomano CA, et al. Rapid determination of *COL2A1* mutations in individuals with Stickler syndrome: Analysis of potential premature termination codons. *Am J Med Genet.* 2000;94(2):141-8.
205. Tiller GE, Polumbo PA, Weis MA, Bogaert R, Lachman RS, Cohn DH, et al. Dominant mutations in the type II collagen gene, *COL2A1*, produce spondyloepimetaphyseal dysplasia, Strudwick type. *Nat Genet.* sept 1995;11(1):87.
206. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 28 nov 2003;55(12):1531-46.

207. Mundlos S, Olsen BR. Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* mars 1997;11(4):227-33.
208. Grskovic I, Kutsch A, Frie C, Groma G, Stermann J, Schlötzer-Schrehardt U, et al. Depletion of annexin A5, annexin A6, and collagen X causes no gross changes in matrix vesicle-mediated mineralization, but lack of collagen X affects hematopoiesis and the Th1/Th2 response. *J Bone Miner Res.* 2012;27(11):2399-412.
209. Shen G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8(1):11-7.
210. Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther.* 16 sept 2010;12(5):216.
211. Drissi H, Zuscik M, Rosier R, O'Keefe R. Transcriptional regulation of chondrocyte maturation: Potential involvement of transcription factors in OA pathogenesis. *Mol Aspects Med.* 1 juin 2005;26(3):169-79.
212. Girkontaite I, Frischholz S, Lammi P, Wagner K, Swoboda B, Aigner T, et al. Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies. *Matrix Biol.* 1 sept 1996;15(4):231-8.
213. Ikegawa S, Nishimura G, Nagai T, Hasegawa T, Ohashi H, Nakamura Y. Mutation of the Type X Collagen Gene (COL10A1) Causes Spondylometaphyseal Dysplasia. *Am J Hum Genet.* 1 déc 1998;63(6):1659-62.
214. Lamas JR, Rodríguez-Rodríguez L, Vigo AG, Álvarez-Lafuente R, López-Romero P, Marco F, et al. Large-scale gene expression in bone marrow mesenchymal stem cells: a putative role for COL10A1 in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 1 oct 2010;69(10):1880-5.
215. von der Mark K, Frischholz S, Aigner T, Beier F, Belke J, Erdmann S, et al. Upregulation of type X collagen expression in osteoarthritic cartilage. *Acta Orthop Scand Suppl.* oct 1995;266:125-9.
216. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, et al. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 $\alpha$  during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med.* juin 2010;16(6):678-86.
217. Tchetina EV, Di Battista JA, Zukor DJ, Antoniou J, Poole AR. Prostaglandin PGE2 at very low concentrations suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic articular cartilage: this involves a decrease in expression of proinflammatory genes, collagenases and COL10A1, a gene linked to chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Res Ther.* 7 août 2007;9(4):R75.
218. Warman ML, Abbott M, Apte SS, Hefferon T, McIntosh I, Cohn DH, et al. A type X collagen mutation causes Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Nat Genet.* sept 1993;5(1):79.

219. Zheng Q, Sebald E, Zhou G, Chen Y, Wilcox W, Lee B, et al. Dysregulation of Chondrogenesis in Human Cleidocranial Dysplasia. *Am J Hum Genet.* 1 août 2005;77(2):305-12.
220. Gu J, Lu Y, Li F, Qiao L, Wang Q, Li N, et al. Identification and characterization of the novel Col10a1 regulatory mechanism during chondrocyte hypertrophic differentiation. *Cell Death Dis.* oct 2014;5(10):e1469.
221. Zheng Q, Zhou G, Morello R, Chen Y, Garcia-Rojas X, Lee B. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J Cell Biol.* 1 sept 2003;162(5):833-42.
222. Mwale F, Girard-Lauriault P-L, Wang HT, Lerouge S, Antoniou J, Wertheimer MR. Suppression of genes related to hypertrophy and osteogenesis in committed human mesenchymal stem cells cultured on novel nitrogen-rich plasma polymer coatings. *Tissue Eng.* sept 2006;12(9):2639-47.
223. Petit A, Wang HT, Girard-Lauriault P-L, Wertheimer MR, Antoniou J, Mwale F. Novel insights into the mechanism of decreased expression of type X collagen in human mesenchymal stem cells from patients with osteoarthritis cultured on nitrogen-rich plasma polymers: Implication of cyclooxygenase-1. *J Biomed Mater Res A.* 2010;94A(3):744-50.
224. Couchman JR. Transmembrane Signaling Proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 10 nov 2010;26(1):89-114.
225. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* mars 2015;42:11-55.
226. Prydz K, Dalen KT. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci.* 15 janv 2000;113(2):193-205.
227. Cowman MK, Lee H-G, Schwertfeger KL, McCarthy JB, Turley EA. The Content and Size of Hyaluronan in Biological Fluids and Tissues. *Front Immunol.* 2015;6.
228. Bilandzic M, Stenvers KL. Betaglycan: A multifunctional accessory. *Mol Cell Endocrinol.* 6 juin 2011;339(1):180-9.
229. Hildebrand A, Romarís M, Rasmussen LM, Heinegård D, Twardzik DR, Border WA, et al. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor  $\beta$ . *Biochem J.* 1 sept 1994;302(2):527-34.
230. Lin X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development.* 15 déc 2004;131(24):6009-21.
231. Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *BioEssays.* 31 janv 2000;22(2):108-12.

232. Gandhi NS, Mancera RL. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chem Biol Drug Des.* 1 déc 2008;72(6):455-82.
233. Kolset SO, Pejler G. Serglycin: A Structural and Functional Chameleon with Wide Impact on Immune Cells. *J Immunol.* 15 nov 2011;187(10):4927-33.
234. Gibson BG, Briggs MD. The aggrecanopathies; an evolving phenotypic spectrum of human genetic skeletal diseases. *Orphanet J Rare Dis.* 28 juin 2016;11(1):86.
235. Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol.* 1 avr 2001;12(2):69-78.
236. Glumoff V, Savontaus M, Vehanen J, Vuorio E. Analysis of aggrecan and tenascin gene expression in mouse skeletal tissues by Northern and in situ hybridization using species specific cDNA probes. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr.* 22 nov 1994;1219(3):613-22.
237. Tompson SW, Merriman B, Funari VA, Fresquet M, Lachman RS, Rimoin DL, et al. A Recessive Skeletal Dysplasia, SEMD Aggrecan Type, Results from a Missense Mutation Affecting the C-Type Lectin Domain of Aggrecan. *Am J Hum Genet.* 9 janv 2009;84(1):72-9.
238. Watanabe H, Kimata K, Line S, Strong D, Gao L, Kozak CA, et al. Mouse cartilage matrix deficiency ( cmd ) caused by a 7 bp deletion in the aggrecan gene. *Nat Genet.* juin 1994;7(2):154.
239. Watanabe H, Nakata K, Kimata K, Nakanishi I, Yamada Y. Dwarfism and age-associated spinal degeneration of heterozygote cmd mice defective in aggrecan. *Proc Natl Acad Sci.* 24 juin 1997;94(13):6943-7.
240. Day JM, Olin AI, Murdoch AD, Canfield A, Sasaki T, Timpl R, et al. Alternative Splicing in the Aggrecan G3 Domain Influences Binding Interactions with Tenascin-C and Other Extracellular Matrix Proteins. *J Biol Chem.* 26 mars 2004;279(13):12511-8.
241. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* mai 2003;423(6937):332-6.
242. Maeda Y, Nakamura E, Nguyen M-T, Suva LJ, Swain FL, Razzaque MS, et al. Indian Hedgehog produced by postnatal chondrocytes is essential for maintaining a growth plate and trabecular bone. *Proc Natl Acad Sci.* 10 avr 2007;104(15):6382-7.
243. Domowicz MS, Cortes M, Henry JG, Schwartz NB. Aggrecan modulation of growth plate morphogenesis. *Dev Biol.* 15 mai 2009;329(2):242-57.
244. Yan D, Lin X. Shaping Morphogen Gradients by Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 9 janv 2009;1(3):a002493.
245. Kischel P, Waltregny D, Dumont B, Turtoi A, Greffe Y, Kirsch S, et al. Versican overexpression in human breast cancer lesions: Known and new isoforms for stromal tumor targeting. *Int J Cancer.* 2010;126(3):640-50.

246. Wight TN, Kang I, Merrilees MJ. Versican and the control of inflammation. *Matrix Biol.* 1 avr 2014;35:152-61.
247. Kimata K, Oike Y, Tani K, Shinomura T, Yamagata M, Uritani M, et al. A large chondroitin sulfate proteoglycan (PG-M) synthesized before chondrogenesis in the limb bud of chick embryo. *J Biol Chem.* 15 oct 1986;261(29):13517-25.
248. Shinomura T, Nishida Y, Ito K, Kimata K. cDNA cloning of PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan expressed during chondrogenesis in chick limb buds. Alternative spliced multiforms of PG-M and their relationships to versican. *J Biol Chem.* 7 mai 1993;268(19):14461-9.
249. Schwartz NB, Hennig AK, Krueger RC, Krzystolik M, Li H, Mangoura D. Developmental expression of S103L cross-reacting proteoglycans in embryonic chick. *Prog Clin Biol Res.* 1993;383B:505-14.
250. Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 2010;277(19):3904-23.
251. Choi Y, Chung H, Jung H, Couchman JR, Oh E-S. Syndecans as cell surface receptors: Unique structure equates with functional diversity. *Matrix Biol.* 1 mars 2011;30(2):93-9.
252. Pap T, Bertrand J. Syndecans in cartilage breakdown and synovial inflammation. *Nat Rev Rheumatol.* janv 2013;9(1):43-55.
253. Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J.* 2010;277(19):3876-89.
254. Fico A, Maina F, Dono R. Fine-tuning of cell signaling by glypicans. *Cell Mol Life Sci CMLS.* mars 2011;68(6):923-9.
255. Filmus J, Capurro M, Rast J. Glypicans. *Genome Biol.* 22 mai 2008;9(5):224.
256. Myhre K, Blobe GC. The type III TGF- $\beta$  receptor regulates epithelial and cancer cell migration through  $\beta$ -arrestin2-mediated activation of Cdc42. *Proc Natl Acad Sci.* 19 mai 2009;106(20):8221-6.
257. Elderbroom JL, Huang JJ, Gatz CE, Chen J, How T, Starr M, et al. Ectodomain shedding of T $\beta$ RIII is required for T $\beta$ RIII-mediated suppression of TGF- $\beta$  signaling and breast cancer migration and invasion. *Mol Biol Cell.* 15 août 2014;25(16):2320-32.
258. López-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massagué J. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell.* 15 nov 1991;67(4):785-95.
259. Sarraj MA, Escalona RM, Western P, Findlay JK, Stenvers KL. Effects of TGFbeta2 on Wild-Type and Tgbr3 Knockout Mouse Fetal Testis. *Biol Reprod [Internet].* 1 mars

2013 [cité 13 févr 2019];88(3). Disponible sur:  
<http://academic.oup.com/biolreprod/article/88/3/66>, 1-13/2514089

260. Roughley PJ. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater.* 30 nov 2006;12:92-101.
261. Scott JE. Proteodermatan and Proteokeratan Sulfate (Decorin, Lumican/Fibromodulin) Proteins Are Horseshoe Shaped. Implications for Their Interactions with Collagen. *Biochemistry.* 1 janv 1996;35(27):8795-9.
262. Gregory JD, Laurent TC, Rodén L. Enzymatic Degradation of Chondromucoprotein. *J Biol Chem.* 10 janv 1964;239(10):3312-20.
263. Grebner EE, Hall CW, Neufeld EF. Glycosylation of serine residues by a uridine diphosphate-xylose: Protein xylosyltransferase from mouse mastocytoma. *Arch Biochem Biophys.* 1 janv 1966;116:391-8.
264. Grebner EE, Hall CW, Neufeld EF. Incorporation of D-xylose-C14 into glycoprotein by particles from hen oviduct. *Biochem Biophys Res Commun.* 22 mars 1966;22(6):672-7.
265. Baker JR, Rodén L, Stoolmiller AC. Biosynthesis of Chondroitin Sulfate Proteoglycan xylosyl transfer to smith-dgraded cartilage proteoglycan and other exogenous acceptors. *J Biol Chem.* 25 juin 1972;247(12):3838-47.
266. Campbell SC, Krueger RC, Schwartz NB. Deglycosylation of chondroitin sulfate proteoglycan and derived peptides. *Biochemistry.* 30 janv 1990;29(4):907-14.
267. Brinkmann T, Weilke C, Kleesiek K. Recognition of Acceptor Proteins by UDP-D-xylose Proteoglycan Core Protein  $\beta$ -D-Xylosyltransferase. *J Biol Chem.* 25 avr 1997;272(17):11171-5.
268. Campbell P, Jacobsson I, Benzing-Purdie L, Rodén L, Fessler JH. Silk—A new substrate for UDP-d-xylose: Proteoglycan core protein  $\beta$ -d-xylosyltransferase. *Anal Biochem.* 1 mars 1984;137(2):505-16.
269. Mann DM, Yamaguchi Y, Bourdon MA, Ruoslahti E. Analysis of glycosaminoglycan substitution in decorin by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 25 mars 1990;265(9):5317-23.
270. Wilson IBH. The never-ending story of peptide O-xylosyltransferase. *Cell Mol Life Sci CMLS.* avr 2004;61(7-8):794-809.
271. Huber S, Winterhalter KH, Vaughan L. Isolation and sequence analysis of the glycosaminoglycan attachment site of type IX collagen. *J Biol Chem.* 15 janv 1988;263(2):752-6.
272. Götting C, Kuhn J, Zahn R, Brinkmann T, Kleesiek K. Molecular Cloning and Expression of Human UDP-d-Xylose:Proteoglycan Core Protein  $\beta$ -d-Xylosyltransferase and its First Isoform XT-II. *J Mol Biol.* déc 2000;304(4):517-28.

273. Cuellar K, Chuong H, Hubbell SM, Hinsdale ME. Biosynthesis of Chondroitin and Heparan Sulfate in Chinese Hamster Ovary Cells Depends on Xylosyltransferase II. *J Biol Chem.* 23 févr 2007;282(8):5195-200.
274. Pönighaus C, Ambrosius M, Casanova JC, Prante C, Kuhn J, Esko JD, et al. Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem.* 23 févr 2007;282(8):5201-6.
275. Voglmeir J, Voglauer R, Wilson IBH. XT-II, the second isoform of human peptide-O-xylosyltransferase, displays enzymatic activity. *J Biol Chem.* 2 mars 2007;282(9):5984-90.
276. Roch C, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C. Differences in gene expression of human xylosyltransferases and determination of acceptor specificities for various proteoglycans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1 janv 2010;391(1):685-91.
277. Breton C, Bettler E, Joziase DH, Geremia RA, Imberty A. Sequence-Function Relationships of Prokaryotic and Eukaryotic Galactosyltransferases. *J Biochem (Tokyo).* 1998;123(6):1000-9.
278. Wiggins CAR, Munro S. Activity of the yeast MNN1  $\alpha$ -1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci.* 7 juill 1998;95(14):7945-50.
279. Götting C, Müller S, Schöttler M, Schön S, Prante C, Brinkmann T, et al. Analysis of the DXD motifs in human xylosyltransferase I required for enzyme activity. *J Biol Chem.* 8 oct 2004;279(41):42566-73.
280. Müller S, Disse J, Schöttler M, Schön S, Prante C, Brinkmann T, et al. Human xylosyltransferase I and N-terminal truncated forms: functional characterization of the core enzyme. *Biochem J.* 15 févr 2006;394(Pt 1):163-71.
281. Holmes EH, Yen TY, Thomas S, Joshi R, Nguyen A, Long T, et al. Human alpha 1,3/4 fucosyltransferases. Characterization of highly conserved cysteine residues and N-linked glycosylation sites. *J Biol Chem.* 11 août 2000;275(32):24237-45.
282. Wang Y, Wong SS, Fukuda MN, Zu HY, Liu ZD, Tang QS, et al. Identification of Functional Cysteine Residues in Human Galactosyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 31 oct 1994;204(2):701-9.
283. Müller S, Schöttler M, Schön S, Prante C, Brinkmann T, Kuhn J, et al. Human xylosyltransferase I: functional and biochemical characterization of cysteine residues required for enzymic activity. *Biochem J.* 1 mars 2005;386(Pt 2):227-36.
284. Briggs DC, Hohenester E. Structural Basis for the Initiation of Glycosaminoglycan Biosynthesis by Human Xylosyltransferase 1. *Struct Lond Engl* 1993. 5 juin 2018;26(6):801-809.e3.



285. Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 nov 2013;1833(11):2430-7.
286. Nuwayhid N, Glaser JH, Johnson JC, Conrad HE, Hauser SC, Hirschberg CB. Xylosylation and glucuronosylation reactions in rat liver Golgi apparatus and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 10 mai 1986;261(28):12936-41.
287. Lohmander LS, Shinomura T, Hascall VC, Kimura JH. Xylosyl transfer to the core protein precursor of the rat chondrosarcoma proteoglycan. *J Biol Chem.* 11 mai 1989;264(31):18775-80.
288. Horwitz AL, Dorfman A. Subcellular Sites for Synthesis of Chondromucoprotein of Cartilage. *J Cell Biol.* 1 août 1968;38(2):358-68.
289. Hoffmann HP, Schwartz NB, Rodén L, Prockop DJ. Location of xylosyltransferase in the cisternae of the rough endoplasmic reticulum of embryonic cartilage cells. *Connect Tissue Res.* 1984;12(2):151-63.
290. Vertel BM, Walters LM, Flay N, Kearns AE, Schwartz NB. Xylosylation is an endoplasmic reticulum to Golgi event. *J Biol Chem.* 25 mai 1993;268(15):11105-12.
291. Kearns AE, Vertel BM, Schwartz NB. Topography of glycosylation and UDP-xylose production. *J Biol Chem.* 25 mai 1993;268(15):11097-104.
292. Schön S, Prante C, Bahr C, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C. Cloning and recombinant expression of active full-length xylosyltransferase I (XT-I) and characterization of subcellular localization of XT-I and XT-II. *J Biol Chem.* 19 mai 2006;281(20):14224-31.
293. Condac E, Silasi-Mansat R, Kosanke S, Schoeb T, Towner R, Lupu F, et al. Polycystic disease caused by deficiency in xylosyltransferase 2, an initiating enzyme of glycosaminoglycan biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci.* 29 mai 2007;104(22):9416-21.
294. Götting C, Kuhn J, Kleesiek K. Human xylosyltransferases in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* juin 2007;64(12):1498-517.
295. Condac E, Dale GL, Bender-Neal D, Ferencz B, Towner R, Hinsdale ME. Xylosyltransferase II is a significant contributor of circulating xylosyltransferase levels and platelets constitute an important source of xylosyltransferase in serum. *Glycobiology.* août 2009;19(8):829-33.
296. Kuhn J, Götting C, Beahm BJ, Bertozzi CR, Faust I, Kuzaj P, et al. Xylosyltransferase II is the predominant isoenzyme which is responsible for the steady-state level of xylosyltransferase activity in human serum. *Biochem Biophys Res Commun.* 10 avr 2015;459(3):469-74.
297. Munns CF, Fahiminiya S, Poudel N, Munteanu MC, Majewski J, Sillence DO, et al. Homozygosity for Frameshift Mutations in XYLT2 Result in a Spondylo-Ocular Syndrome with Bone Fragility, Cataracts, and Hearing Defects. *Am J Hum Genet.* 4 juin 2015;96(6):971-8.

298. Schreml J, Durmaz B, Cogulu O, Keupp K, Beleggia F, Pohl E, et al. The missing “link”: an autosomal recessive short stature syndrome caused by a hypofunctional *XYLT1* mutation. *Hum Genet.* 2013;133(1):29-39.
299. Bui C, Huber C, Tuysuz B, Alanay Y, Bole-Feysot C, Leroy JG, et al. *XYLT1* Mutations in Desbuquois Dysplasia Type 2. *Am J Hum Genet.* 6 mars 2014;94(3):405-14.
300. van Koningsbruggen S, Knoester H, Bakx R, Mook O, Knegt L, Cobben JM. Complete and partial *XYLT1* deletion in a patient with neonatal short limb skeletal dysplasia. *Am J Med Genet A.* 2015;170(2):510-4.
301. Guo L, Elcioglu NH, Iida A, Demirkol YK, Aras S, Matsumoto N, et al. Novel and recurrent *XYLT1* mutations in two Turkish families with Desbuquois dysplasia, type 2. *J Hum Genet.* 2016;62(3):447-51.
302. Jamsheer A, Olech EM, Kozłowski K, Niedziela M, Sowińska-Seidler A, Obara-Moszyńska M, et al. Exome sequencing reveals two novel compound heterozygous *XYLT1* mutations in a Polish patient with Desbuquois dysplasia type 2 and growth hormone deficiency. *J Hum Genet.* juill 2016;61(7):577-83.
303. Silveira C, Leal GF, Cavalcanti DP. Desbuquois dysplasia type II in a patient with a homozygous mutation in *XYLT1* and new unusual findings. *Am J Med Genet A.* nov 2016;170(11):3043-7.
304. Al-Jezawi NK, Ali BR, Al-Gazali L. Endoplasmic reticulum retention of xylosyltransferase 1 (*XYLT1*) mutants underlying Desbuquois dysplasia type II. *Am J Med Genet A.* 30 avr 2017;
305. Mis EK, Liem Jr. KF, Kong Y, Schwartz NB, Domowicz M, Weatherbee SD. Forward genetics defines *Xylt1* as a key, conserved regulator of early chondrocyte maturation and skeletal length. *Dev Biol.* 1 janv 2014;385(1):67-82.
306. Gosset M, Berenbaum F, Thirion S, Jacques C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc.* août 2008;3(8):1253-60.
307. Jozefczuk J, Drews K, Adjaye J. Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells. *J Vis Exp JoVE.* 21 juin 2012;(64).
308. Turgeon B, Meloche S. Interpreting Neonatal Lethal Phenotypes in Mouse Mutants: Insights Into Gene Function and Human Diseases. *Physiol Rev.* janv 2009;89(1):1-26.
309. Green JD, Tollemar V, Dougherty M, Yan Z, Yin L, Ye J, et al. Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering. *Genes Dis.* déc 2015;2(4):307-27.
310. Kim E-J, Cho S-W, Shin J-O, Lee M-J, Kim K-S, Jung H-S. *Ihh* and *Runx2/Runx3* Signaling Interact to Coordinate Early Chondrogenesis: A Mouse Model. Stein G, éditeur. *PLoS ONE.* 1 févr 2013;8(2):e55296.

311. Davoli MA, Lamplugh L, Beauchemin A, Chan K, Mordier S, Mort JS, et al. Enzymes active in the areas undergoing cartilage resorption during the development of the secondary ossification center in the tibiae of rats aged 0-21 days. II. Two proteinases, gelatinase B and collagenase-3, are implicated in the lysis of collagen fibrils. *Dev Dyn.* sept 2001;222(1):71-88.
312. Spagnoli A, O'Rear L, Chandler RL, Granero-Molto F, Mortlock DP, Gorska AE, et al. TGF- $\beta$  signaling is essential for joint morphogenesis. *J Cell Biol.* 18 juin 2007;177(6):1105-17.
313. Papaioannou VE, Behringer RR. Early Embryonic Lethality in Genetically Engineered Mice: Diagnosis and Phenotypic Analysis. *Vet Pathol.* 1 janv 2012;49(1):64-70.
314. Ward JM, Elmore SA, Foley JF. Pathology Methods for the Evaluation of Embryonic and Perinatal Developmental Defects and Lethality in Genetically Engineered Mice. *Vet Pathol.* 1 janv 2012;49(1):71-84.
315. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem.* 1 janv 2006;97(1):33-44.
316. Akiyama H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod Rheumatol.* juin 2008;18(3):213-9.
317. Kobayashi T. PTHrP and Ihh in chondrocytes. 2002;10.
318. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 15 août 1999;13(16):2072-86.
319. Akiyama H. Interactions between Sox9 and -catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* 22 avr 2004;18(9):1072-87.
320. Cortes M, Baria AT, Schwartz NB. Sulfation of chondroitin sulfate proteoglycans is necessary for proper Indian hedgehog signaling in the developing growth plate. *Development.* 15 mai 2009;136(10):1697-706.
321. Koziel L, Kunath M, Kelly OG, Vortkamp A. Ext1-Dependent Heparan Sulfate Regulates the Range of Ihh Signaling during Endochondral Ossification. *Dev Cell.* juin 2004;6(6):801-13.
322. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA. Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. 1996;7.
323. Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* févr 1991;64(4):841-8.
324. Zhang X, Ibrahim OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family: THE COMPLETE MAMMALIAN FGF FAMILY. *J Biol Chem.* 9 juin 2006;281(23):15694-700.

325. Kita K, Kimura T, Nakamura N, Yoshikawa H, Nakano T. PI3K/Akt signaling as a key regulatory pathway for chondrocyte terminal differentiation. *Genes Cells*. août 2008;13(8):839-50.
326. Xie Y, Zhou S, Chen H, Du X, Chen L. RECENT RESEARCH ON THE GROWTH PLATE: Advances in fibroblast growth factor signaling in growth plate development and disorders. *J Mol Endocrinol*. août 2014;53(1):T11-34.
327. Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Pelet A, Rozet JM, Maroteaux P, et al. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*. 15 sept 1994;371(6494):252-4.
328. Murakami S, Kan M, McKeehan WL, Crombrughe B de. Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci*. 1 févr 2000;97(3):1113-8.
329. Provot S, Nachtrab G, Paruch J, Chen AP, Silva A, Kronenberg HM. A-Raf and B-Raf Are Dispensable for Normal Endochondral Bone Development, and Parathyroid Hormone-Related Peptide Suppresses Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation in Hypertrophic Chondrocytes. *Mol Cell Biol*. 1 janv 2008;28(1):344-57.
330. Beier F, Taylor AC, LuValle P. Raf signaling stimulates and represses the human collagen X promoter through distinguishable elements. *J Cell Biochem*. 15 mars 1999;72(4):549-57.
331. Wang X-F, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, Weinberg RA. Expression cloning and characterization of the TGF- $\beta$  type III receptor. *Cell*. 15 nov 1991;67(4):797-805.
332. Blitz E, Sharir A, Akiyama H, Zelzer E. Tendon-bone attachment unit is formed modularly by a distinct pool of Scx- and Sox9-positive progenitors. *Development*. 1 juill 2013;140(13):2680-90.
333. Kannu P, Bateman JF, Randle S, Cowie S, du Sart D, McGrath S, et al. Premature arthritis is a distinct type II collagen phenotype. *Arthritis Rheum*. mai 2010;62(5):1421-30.
334. Rukavina I, Mortier G, Van Laer L, Frković M, Đapić T, Jelušić M. Mutation in the type II collagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with mild spondyloepiphyseal involvement. *Semin Arthritis Rheum*. août 2014;44(1):101-4.

# *Articles*

*Article 1 en soumission*

**Accelerated chondrocyte maturation and bone remodeling through upregulation of *Ihh* and misexpression *Wnt4* signaling are key features of a murine model of the skeletal defects caused by deficiency in *XylTI***

Dima Ghannoum, Mahdia Taieb, Lydia Barré, Mohamed Ouzzine\*

UMR 7365 CNRS-University of Lorraine, Biopôle, Faculty of Medicine, CS 50184, 54505, Vandoeuvre-Lès-Nancy, Cedex, France.

\*Address for correspondence:

Dr Mohamed OUZZINE

Corresponding author: UMR7365 CNRS-University of Lorraine

Biopôle, Faculty of Medicine, CS 50184,

54505, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Phone: +33 383 685 427

E-mail: [mohamed.ouzzine@univ-lorraine.fr](mailto:mohamed.ouzzine@univ-lorraine.fr)

## Abstract

Proteoglycans (PGs) are a group of complex macromolecules involved in many biological processes, including proliferation, cell-cell attachment and cartilage and bone homeostasis. Their proper function depends upon the glycosaminoglycans chains which are covalently attached to PG core proteins. Xylosyltransferase I (XT-I), is the enzyme catalyzing the first and rate limiting step in GAG chains synthesis. Genetic mutations in the *XylTI* gene are associated with Desbuquois dysplasia type II syndrome. The knock-out of *XylTI* gene in chondrocytes revealed numerous skeletal abnormalities. Histological studies and SHG microscopy (second harmonic generation) of the growth plate showed the importance of XT-I in extracellular matrix formation, fibrillation of collagen type II, maturation of chondrocytes and their columnar organization. Moreover, TRAP staining and histomorphometric analysis showed a stimulation of the osteoclasts activity in spongy bone leading to bone resorption, and increased ossification of the cortical bone. On the other hand, analysis of molecular mechanism indicates the implication of *Ihh* and *Wnts* signaling pathway in skeletal defects and impaired chondrogenesis. In the present study we provided evidence of the key role of XT-I in extracellular matrix organization, and bone remodelling, and highlighted the role of the *Wnt* pathway in developmental abnormalities induced by the loss of *XylTI*.

**Key words:** Xylosyltransferase I, proteoglycans, extracellular matrix, cartilage, bone formation, skeletal development

## Introduction

Proteoglycans (PGs) are cell surface-associated and extracellular matrix (ECM) components that play a critical role in key biological process and in homeostasis of different tissues including cartilage and bone (1, 2). Owing to their ability to interact with soluble ligands, PGs regulate morphogen gradient formation, growth factor function and act as co-receptors for several ligands (3, 4). PGs consist of glycosaminoglycan (GAG) chains that attached on the specific serine residues of a core protein. Based on the type of GAG chain disaccharides units, PGs could be divided into two types, heparan-sulphate PGs (HSPGs) and chondroitin/dermatan sulphate PGs (CS/DSPGs) (5). Both types of PGs shares a common tetrasaccharide linker region consisting of GlcA- $\beta$ 1,3-Gal- $\beta$ 1,3-Gal- $\beta$ 1,4-Xyl- $\beta$ -O. The synthesis of the linkage tetrasaccharide involves the coordinate action of xylosyltransferases I and II (XT-I and XT-II),  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I),  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase 6 (GalT-II) and  $\beta$ 1,3 glucuronyltransferase I (GlcAT-I) enzymes (6). The XT-I and II enzymes (EC 2.4.2.26) catalyze the initial and rate-limiting step in GAG synthesis by transfer of xylose residue from the activated sugar UDP-D-xylose to specific serine residues in the PG core protein (7, 8). Besides their enzymatic function similarity, their expression differs between species where all higher organisms have two xylosyltransferase isoforms while only XT-I isoform is expressed in the fly and the worm (9). Our previous studies on animal models and human cartilage showed that XT-I regulates the synthesis of PGs in cartilage and is necessary to maintain cartilage homeostasis (345,346).

Mutations in the genes encoding the enzymes involved in GAG biosynthesis pathway are associated with several syndromes and pathologies in human. It has been reported that mutations in *B4GALT-7* gene encoding GalT-I enzyme cause Ehlers-Danlos progeroid type 1 syndrome and Larsen of Reunion Island which are characterized by hyperlaxity and distinctive facial features (12, 13). Furthermore, mutations in *B3GALT-6* gene encoding GalT-II enzyme are associated with the Ehlers-Danlos progeroid type 2 syndrome and Spondylo-epimetaphyseal dysplasia with joint laxity type 1 (14). These syndromes are characterized by facial appearance, clubfeet, elbow malformation and kyphoscoliosis. Moreover, it has been reported that mutations in *B3GAT3* gene encoding GlcAT-I enzyme cause Larsen-like syndrome, characterized by multiple joint dislocations, short stature, craniofacial dimorphism and congenital heart defects (15).

Most skeletal elements in the appendicular and axial skeleton of the vertebrate body are formed through the process of endochondral ossification. Following chondrogenesis, the chondrocytes remain as resting cells to form the articular cartilage or undergo proliferation, terminal differentiation to chondrocyte hypertrophy, and apoptosis in a process termed endochondral ossification, whereby the hypertrophic cartilage is replaced by bone (16, 17). A similar sequence of events occurs in the postnatal growth plate, leading to rapid growth of the skeleton. Chondrogenesis is regulated by multiple signal transduction pathways and tight regulation of their signaling out is critical for normal skeletal development. The growth plate constitutes a dynamic tissue that promotes bone elongation through the chondrocyte



maturation and the production of extracellular matrix (ECM). The ECM plays a crucial role in the arrangement and geometry of chondrocytes, the morphology of the growth plate and the elongation of bones (18- 21). The ECM is mainly composed of collagens, elastin and PGs and functions as a reservoir for growth factors and cytokines, establishing concentration gradients and regulating their bioavailability, diffusion and function (22). The functional importance of the ECM is illustrated by the wide range of inherited connective tissue disorders caused by mutations in genes that encode components of the ECM (23).

Recently, several cases of patients with Desbuquois dysplasia type II (DBQD2) have been attributed to mutation in *XYLT1* (5, 24-28). This syndrome is characterized by severe prenatal and postnatal shortening of long bones, short stature and joint dislocation, and it frequently features developmental delay or intellectual disability (29).

In order to investigate the role of XT-I in chondrocyte maturation and skeleton development and to identify the molecular mechanism involved, we generated *Col2a1-CreER<sup>TM</sup>; XylT1<sup>flox/flox</sup>* mice with inducible deletion of *XylT1* specifically in chondrocytes. Ablation of XT-I in chondrocytes lead to dwarfism phenotype with shortened long bones associated with decreased trabecular bone number and increased cortical bone thickness. We found that the expression of the bone formation markers type I collagen, osteocalcin and alkaline phosphatase and of the osteoblast specific marker *Runx2* was increased in cortical bone of *XylT1*-cKO mice. Histochemical analyses of the growth plate of mutant mice revealed decreased PG content, loss of columnar organization of chondrocytes and shortened hypertrophic zone associated with enhanced bone remodelling. Second harmonic generation (SHG) microscopy revealed profound disorganisation of collagen fibrils in mutant mice. Importantly, we found that *Wnt4* is misexpressed and *Ihh* is upregulated in the growth plate of mutant mice which may participate to premature chondrocyte maturation and accelerated bone formation.

## Results

### *XylT1 deletion in chondrocytes causes dwarfism with reduced bone length*

To bypass of embryonic lethal phenotype of global XylT1 deletion, given that the *XylT1* knockout mice died immediately after birth, conditional knockout approach was used to determine the specific role of *XylT1* in cartilage. To this end, *XylT1<sup>fllox/fllox</sup>* mice with *XylT1* exon 5 flanked with two *LoxP* sites were generated (Fig. 1) and crossed with *Col2a1-CreER<sup>TM</sup>* carrying tamoxifen (TM)-inducible *Col2a1*-promoter driven Cre recombinase to generate *Col2a1-CreER<sup>TM</sup>;XylT1<sup>fllox/fllox</sup>*. XylT1-cKO mice carrying *XylT1* ablation in chondrocytes, were generated by TM administration in *Col2a1-CreER<sup>TM</sup>;XylT1<sup>fllox/fllox</sup>* mice. Age- and sex-matched *Col2a1-CreER<sup>TM</sup>;XylT1<sup>fllox/fllox</sup>* mice were separated in two groups and injected at 2-days or 1-week postnatal either with corn oil (control) or TM. Mice were then euthanized at 8 weeks for skeletal development evaluation. By 8 weeks XylT1-cKO mice were significantly smaller (20%) compared to control mice (Fig. 2A-C). Measurement of the length of long bones showed reduction of about 25% and 30% in the length of femurs and tibia, respectively (Fig. 2D-F). Other features of the skeletal phenotype in XylT1-cKO mice included shortening limbs with more pronounced shortening in forelimb elements, smaller ribcage, broadening of the ribs, early trachea ossification, shortening of the skull, reduced length tail, defects in cartilaginous content and reduced disc cartilage that separate the spine bones (Fig. 3). Taken together, these data suggest that functional XylT1 is crucial for cartilage development and endochondral bone formation.

### *Loss of XylT1 induces structural bone defects*

The persistence of shortening limb and body length after 3 months age demonstrate that XylT1-cKO mice phenotype cannot be due to a delay in skeletal development. To better emphasize bone defect, structural analysis of bone was carried out using Micro Computer Tomography ( $\mu$ CT).  $\mu$ CT analyses of the trabecular bone in femurs of wild-type and XylT1-cKO mice demonstrated changes in trabecular bone structure including reduced trabecular volume fraction (BV/TV), decreased trabecular number (Tb.N) increased trabecular thickness (Tb.Th) and increased trabecular pattern factor (Tb.Pf) in XylT1-cKO mice (Fig. 4A-A'', 4B-B'' and 4C). In addition, XylT1-cKO mice exhibit wider femoral epiphysis and more developed femoral head than that of control mice (Fig. 4D, E). Interestingly,  $\mu$ CT analyses of cortical bone in femurs of XylT1-cKO mice revealed increased thickness compared to control (Fig. 4A''', B'''), suggesting increased osteoblasts activity or impaired resorption. To test whether bone resorption and/or formation is impaired in XylT1-cKO mice, we first stained the femurs from XylT1-cKO and WT mice by TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) to determine whether the osteoclastic bone resorption is disturbed in mutant mice. Staining revealed TRAP-positive cells at several bone areas including the chondro-osseous junction, trabecular bone and cortical bone of cKO mice. Interestingly, chondro-osseous junction and trabecular bone areas showed an increase in the TRAP positive osteoclast surface and in the number of TRAP-positive cells in XylT1-deficient mice (Fig. 5A). The number of TRAP-

positive cells per surface (N.O/B.S) reveals two fold TRAP-positive cells in XylT1-cKO mice compared to WT mice (Fig. 5B). Altogether, these data are consistent with accelerated bone remodelling in XylT1 mutant mice.

In contrast, staining by TRAP of cortical bone did not show any significant differences between XylT1-cKO and WT mice (Fig. 5 C), suggesting that bone resorption is not altered in cortical bone of XylT1-cKO mice and that thickening of cortical bone is probably due to enhanced osteoblast secretory activity. To test whether bone formation activity is increased in cortical bone of mutant mice, the expression of type I collagen, osteocalcin and alkaline phosphatase considered as bone formation markers was analyzed. Interestingly, the results revealed that the expression of the bone formation markers was increased in cortical bone of XylT1-cKO mice compared to WT (Fig. 6), suggesting enhanced osteoblasts activity in mutant mice. Importantly, analysis of the expression of Runx2, a master osteoblast transcription factor which regulates osteoblast differentiation and osteoblast bone matrix synthesis showed significant increase in cortical bone of XylT1-cKO mice compared to WT (Fig 6). Altogether, these data strongly suggest that mutant mice osteoblasts exhibit enhanced secretory activity and/or enhanced differentiation rate.

### ***The cartilage growth plate of XylT1 mutant mice is disorganized and deficient in proteoglycans***

Having shown the importance of XylT1 in cartilage and bone development, we sought to explore the cellular mechanism by which XylT1 regulates skeletogenesis. Knee joints from control and 10-days old XylT1-cKO mice were examined histologically. Haematoxylin, eosin and Safran staining of the tibia growth plates from control mice showed a well-organized growth plate in which the resting, proliferative and hypertrophic zones were clearly distinguishable (Fig. 7A). In addition, the cells in the proliferative zone were closely aligned in well-ordered columns (Fig. 7B). However, XylT1-cKO mice developed a growth plate in which the proliferative zone had a disordered cellular organization and morphology (Fig. 7B). Notably, chondrocytes are of larger size, stacked, not fattened and seems not to rotate around each other upon cell division to form a column, a structure which is essential for proper linear growth of endochondral bones. In addition, the hypertrophic zone was severely reduced, suggesting accelerated maturation of chondrocytes (Fig. 7C). As expected, the growth plate from control mice stained strongly positive for PGs. However, the staining for proteoglycans was reduced overall the growth plate and nearly absent at the pericellular matrix in XylT1-cKO mice, reflecting a decrease in the synthesis of proteoglycans (Fig. 7). To determine whether defects observed in the growth plate at 10-days of age persist at advanced ages, histological analysis of the growth plate of tibia of control mice and 4-weeks old XylT1-cKO was performed. The data showed profound disruption of the columnar organization of proliferative chondrocytes in XylT1-cKO mice (Fig. 8A). Indeed, proliferative chondrocytes forms cell clusters rather than organized column. Furthermore, Alcian bleu staining indicates high amount of GAG-attached PGs in the pericellular matrix of chondrocytes in control mice but only small amount of GAGs was detected in the pericellular matrix of XylT1-cKO mice (Fig. 8 B), indicating impaired synthesis of PGs. Of note, similar results including loss of columnar organization of proliferative chondrocytes and impaired synthesis of proteoglycans

are observed in the growth plate of 8-week-old XylT1-cKO compared to age matched WT mice (Fig. 9). Altogether, these results suggest that XylT1 plays a key role in the synthesis of GAG-attached PGs and in the of regulation chondrocyte maturation and organization in the growth plate.

### ***The cartilage growth plate exhibits disturbance in collagen organization in XylT1 mutant mice***

The growth plate ECM plays a crucial role in the arrangement and geometry of chondrocytes, the morphology of the growth plate and the elongation of bones. It is mainly composed of collagens and PGs. The ECM located between the columns of chondrocytes (interterritorial) contains collagen fibrils that largely run parallel to each other and are proposed to play a role in guiding the chondrocytes to arrange in a columnar structure [21]. To assess the organization of collagen in the growth plate of XylT1-cKO mice, SHG (Second Harmonic Generation) microscopy was used. As expected, the intercolumnar collagen fibrils run parallel to each other in control mice. In contrast, they appear more abundant but randomly oriented in XylT1-cKO mice (Fig. 10), indicating profound alterations in the organisation of intercolumnar collagen fibrils in XylT1-cKO mice growth plate. These data suggest that loss of columnar organization of chondrocytes may result, in part, from disorganisation of intercolumnar collagen fibrils and support the notion that lack of XylT1 lead to disturbance of collagen fibrils organization in the growth plate.

### ***XylT1 deficient mice exhibit accelerated maturation of chondrocytes and enhanced bone formation***

To determine whether maturation was proceeding normally in XylT1-cKO mice, we examined several markers of chondrocyte maturation by mRNA *in situ* hybridization using RNAscope technique. We first evaluated the expression of chondrogenesis markers, aggrecan, collagen type II and collagen type 10. The mRNA encoding aggrecan core protein showed an increased expression in XylT1-cKO mice compared to control (Fig. 11A), suggesting that in an attempt to compensate the loss of GAG-attached aggrecan, chondrocytes increase the expression of the aggrecan core protein. Col2 $\alpha$ 1, the cartilage specific form of type II collagen is upregulated in XylT1-cKO mice compared to control and this may result from disorganization of the collagen network in the growth plate of mutant mice (Fig. 11A). Interestingly, the expression of collagen 10 (Col10), a marker for hypertrophic chondrocytes, was highly expressed in mutant mice growth plate (Fig. 11A). Of note, the hypertrophic region indicated by Col10 expression is noticeably reduced compared to that of control mice, thus confirming reduced hypertrophic zone in mutant mice. This may result from a higher percentage of cells exiting the hypertrophic state, suggesting accelerated terminal differentiation of chondrocytes and enhanced cartilage resorption. Interestingly, osteopontin gene *Spp1*, which is expressed in terminally differentiated hypertrophic chondrocytes and in osteoblasts, is highly expressed in XylT1-cKO mice (Fig. 11B),

suggesting enhanced terminal differentiation of hypertrophic chondrocytes. As observed for osteopontin, the expression of osteocalcin gene ( $\beta$ Glup) was also higher in XylT1-cKO mice (Fig. 11B). High expression of these bone markers, osteopontin and osteocalcin suggests elevated bone formation in XylT1-cKO mice. Altogether, these results suggest that loss of XylT-1 expression in chondrocytes not only affect chondrogenesis but also bone formation by enhancing endochondral ossification.

### ***Up-regulation of Ihh and misexpression of Wnt4 in the growth plate of XylT1 deficient mice***

Signaling pathways such as Ihh and Wnts have been shown to be involved in chondrocyte maturation and growth plate development (366,367). To explore the mechanism by which loss of XylT1 may affect chondrogenesis and bone formation, we analyzed whether the expression of Ihh and Wnts is altered in XylT1-cKO mice. Interestingly, the expression of Ihh in the growth plate of XylT1-cKO mice clearly shows enhanced expression compared to WT mice (Fig. 12A). On the other hand, it has been reported that Wnt-4 accelerates chondrocyte maturation and its overexpression in the growth plate leads to dwarfism in mice (366,368). Interestingly, analysis of the expression of Wnt-4 in the growth plate of WT mice showed high expression in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes (Fig. 12B), no expression was observed in proliferative columnar chondrocytes. In contrast, Wnt-4 is weakly expressed in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes in XylT1-cKO mice, but strongly expressed in proliferative and columnar chondrocytes (Fig. 12B), indicating that Wnt-4 is misexpressed in mutant mice growth plate. Of note, chondrocyte proliferation as measured by phospho-Histone H3 labeling revealed decreased number of proliferating cells in the proliferative and columnar zones of the XylT1-cKO mice growth plate, when compared with WT mice growth plate (Fig. 13), suggesting that chondrocytes exit cell cycle precociously probably because of an accelerated maturation process induced by Wnt-4.

## **Discussion**

In this study we investigated the role of Xylt1 in skeletal development. We showed that loss of Xylt1 in cartilage, using Col2 $\alpha$ 1-Cre mice, resulted in dwarfism, impaired chondrogenesis and bone defects. In addition, mutant mice exhibit defect in trachea where the cartilage was ossified, suggesting a tracheal respiratory problem related to XT-I deficiency. XT-I is a key enzyme of GAG biosynthesis pathway that initiates and regulates the synthesis of GAG chains of PGs (341,342). Owing to their ability to regulate the activity of soluble mediators including growth factors and cytokines, GAG chains of PGs play key role in diversified biological functions, ranging from mechanical support to intricate effects on various cellular processes such as cell adhesion, proliferation and differentiation (369). Mutations in the enzymes involved in GAG chains synthesis affect chondrocyte maturation and skeletal development (370–373). Recently, several cases of patients with Desbuquois dysplasia type II have been attributed to mutation in *XYLT1* gene (359–363,374). This syndrome is

characterized by severe prenatal and postnatal shortening of long bones, short stature and joint dislocation, and it frequently features developmental delay or intellectual disability (364,375). We showed that loss of XylT1 in cartilage leads to reduced GAG content in the growth plate. Further analysis revealed that GAG chains produced by XylT1-deficient chondrocytes exhibit a different pattern compared to that of GAGs from WT chondrocytes. Indeed, the GAG chains from mutant chondrocytes are predominantly of low molecular weight, whereas the GAG chains from WT contain high molecular weight in addition to low molecular weight GAGs, revealing deficiency in the synthesis of high molecular weight GAG chains in the mutant mice. These data indicate that loss of XylT1 affects the synthesis of specific GAG chains species, suggesting that XylT1 quantitatively and qualitatively regulates GAG synthesis process. On the other hand, we showed that the level of XylT2 expression in XylT1-deficient chondrocytes is similar to that measured in WT chondrocytes, suggesting that XylT2 did not compensate for loss of XylT1. However, XylT2 is probably the enzyme responsible for the synthesis of PGs produced by XylT1-deficient chondrocytes, which are mainly of low molecular weight GAG chains. Altogether, these data strongly suggest that skeletal defects induced by the knock-out of Xylt1 are rather related to the loss of high molecular GAG chains species than to the decrease in the GAG synthesis process.

Loss of XylT1 expression disturbed the cartilage growth plate morphogenesis. This was not due to defective growth plate patterning, but to a severe reduction in the size of hypertrophic zone, suggesting accelerated terminal differentiation of chondrocytes. In line with this, we observed that osteopontin, the bone formation marker, is highly expressed in the chondro-osseous junction of the mutant growth plate, indicating accelerated bone formation. Our study revealed that mutant chondrocytes in the columnar zone are not flattened but remain circular and some do not intercalate to form a column. In addition, the chondrocyte stacks are not oriented parallel to the longitudinal axis of the bone. The orientation of chondrocyte stacks along the longitudinal axis of the bone is considered as a key determinant of bone longitudinal growth and morphogenesis (376,377). Therefore, the altered columnar organization and orientation of chondrocyte stacks in mutant growth plate might be an important contribution to the reduced longitudinal growth of the mutant mice long bones. On the other hand, we showed that, in XylT1-deficient mice growth plate, collagene type 2 is highly expressed compared to WT mice, but collagen fibrils are heterogeneously distributed, disorganized and not arranged in parallel in the direction of limb growth. However, fibrils organization is suggested to play an important role in constraining chondrocytes to arrange in a columnar structure (22). In line with this, it has been shown that proliferative chondrocytes in Col2 $\alpha$  mutant mice growth plate were disorganized and unable to form distinct columns of cells along the bone longitudinal axis (378). Our study indicated that the expression of collagen 2 is not altered in XylT1-deficient mice growth plate, however collagen fibrils organization is disturbed, suggesting that lack of XylT1 probably leads to changes in collagen fibrillogenesis. It has been reported that small leucine rich PGs and particularly decorin interact with collagene 2 and play an important role both in guiding the proper assembly of collagen during fibrillogenesis [43,44] and in the organization and mechanical properties of the ECM [45]. Both decorin core protein and its GAG chain have been reported to contribute to these processes. Although in this study we have not addressed the mechanism underlying

loss of collagen organization, lack of XylT1 dramatically changed the synthesis of the GAG chains leading to PGs with short GAG chain, which is probably unable to fulfil the function of normal decorin GAG chain regarding collagen fibrillogenesis and assembly of fibrils into mature matrix suprastructures. Given that proliferative chondrocytes normally are embedded in a collagen and PG matrix, defect in GAG chain synthesis and in collagen arrangement may lead to the loss of constraint provided by the matrix leading to disruption of chondrocyte morphology and organization in XylT1-cKO mice. However, further investigations are needed in the future to test this hypothesis and to gain insight into the mechanism involved.

Recently studies described the characterization of two zebrafish mutant lines carrying point mutations in the ortholog of XylT1 [46] and pug mice with hypomorphic allele of Xylt1 [47]. Similar to knock-out mice, the fish and pug mice displayed premature maturation and ossification (383). Both pug mice and XylT1-cKO mice show dwarfism associated with significant changes in trabecular bone number and architecture. Interestingly, there are distinct differences between the pug and Xylt1-cKO mice. The pug mice cortical bone structure was not changed, whereas in XylT1-cKO mice the thickness of the cortical bone was significantly increased. We showed that the expression of *Ihh*, the osteo-inductive signal expressed by chondrocytes as they mature, is up-regulated in XylT1-cKO mice growth plate compared to WT. Of note, it has been reported that *Ihh* expression was increased in mutant fish leading to precocious differentiation of secretory osteoblasts in perichondria and hence to excessive production of bone matrix [46]. This, suggest that increased cortical bone mass in XylT1-cKO mice may result from *Ihh*-induced acceleration of osteoblast cell differentiation from perichondrial cells leading to excessive production of bone matrix. In line with this, we found that the expression of the bone formation markers type I collagen, osteocalcin and alkaline phosphatase and of the osteoblast specific marker *Runx2* was increased in cortical bone of XylT1-cKO mice compared to WT. Of note, it has been shown that cortical bone thickness was unchanged in pug mice, while the expression of *Ihh* was up-regulated in the growth plate of pug mice embryo. However, no data was reported to whether overexpression of *Ihh* is maintained in adult pug mice [47]. On the other hand, Wnts families are known to play critical roles in chondrogenesis and bone formation. PGs interact, via their GAG chains, with soluble ligands including Wnts and regulate their signaling. We and others have shown that PGs such as syndecans and glypicans regulates Wnt signaling [48]. Given that loss of XylT1 induces profound changes in the GAG chains of PGs, one can speculate that regulation of Wnt signaling may be altered in XylT1-cKO mice growth plate. Interestingly, we showed that *Wnt4* is misexpressed in XylT1-cKO mice growth plate showing high expression in proliferative chondrocyte but weak expression in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes. This pattern of expression is different from that observed in the growth plate of WT mice. Indeed, in contrast to mutant mice, *Wnt4* is expressed in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes but not detected in proliferative chondrocytes. These data suggest that chondrocytes may undergo premature prehypertrophy in mutant mice. Noteworthy, *Wnt4* signals through the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, our study showed that the expression of  $\beta$ -catenin is increased in chondrocytes from XylT-I-cKO mice compared to WT, suggesting up-regulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mutant chondrocytes. Importantly, it has been shown that misexpression of *Wnt4* accelerates

chondrocyte maturation and bone formation and that misexpression of  $\beta$ -catenin displays phenotype similar to Wnt4 misexpression, suggesting that Wnt4 influence on limb shortening may be mediated by  $\beta$ -catenin [32]. These observations suggest that misexpression of Wnt4 may be involved in the accelerated maturation of chondrocytes in XylT1-cKO mice and hence to dwarfism. However, as PGs regulates the action of different growth factors we cannot rule out the involvement of other factors in the observed phenotype of XylT1-cKO mice.

XylT1-cKO mice develop a dysplasia and have short-limbed dwarfism that is consistent in severity with the relevant human phenotype. Eventually, there is alteration of Ihh and Wnt4 expression leading to, premature maturation of chondrocytes added to that disruption of the organization of collagen fibers and of columnar proliferative chondrocytes in the cartilage growth plate, which is likely to be the cause of disrupted linear bone growth and the resulting short-limbed dwarfism in the mutant mice.

## Materials and methods

### *Mouse strains and generation of Col2a1-CreER<sup>TM</sup>;XylT1<sup>fllox/fllox</sup> mice*

To generate the *Col2a1-CreER<sup>TM</sup>;XylT1<sup>fllox/fllox</sup>* mice, male transgenics *Col2a1-CreER<sup>TM</sup>* (BALB/c background) were crossed with females *XylT1<sup>fllox/fllox</sup>* (C75BL/6 background). Offspring were genotyped by PCR for *Col2a1-CreER<sup>TM</sup>* and *XylT1<sup>fllox/fllox</sup>* using specific primers described below. Briefly, genomic DNA was extracted from tail biopsy using DirectPCR kit according to manufacturer's recommendations (VIAGEN Biotech). DNA was amplified by PCR using the HotStarTaq Plus PCR Master Mix Kit (Qiagen). The PCR cycling parameters were 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing 55°C for *Cre* and 62°C for *XylT1* for 30 seconds, and elongation for 90 seconds at 72°C. **LF** (5'- ATC CCT AAG ATG TGT TTT CCA GTC ACC AT -3'), **LR** (5'- GAG TTA GTT AAC CAG TGG GCT TGA GGT G -3'), **EF** (5'- CTA GAG ATG ACT GAC TGG CCC TGG GA -3'), **ER** (5'- TTT CCA AGG CAG CAC CTC TAG TTC A -3') and **LXR** (5'- CGA AGT TAT CTG CAG GTC GAC CTT AAG -3'). The PCR products were run on a 2% (w/v) agarose gel. *Col2a1-CreER<sup>TM</sup> ; XylT1<sup>fllox/fllox</sup>* homozygous DNA yielded DNA bands at 300 pb with LF/LR primers, 427 pb with EF/ER primers, 209 pb with LF/LXR primers and 100 pb with *Cre* primers.

### *Animal Handling*



The animal experiments were conducted according to the recommendations of European Directive 2010/63/UE and French legislation article R.214-88. The study was approved by the local ethical and animal care Committee (CEMLEA Comité éthique en Matière d'Expérimentation Animale). During acclimatization and experiments, the animals were kept in standard conditions of temperature ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and light-controlled environment (12 h light/12 h dark cycle), and with free access to water and pelleted food.

### ***Tamoxifen (TM) administration***

Tamoxifen (TM) was dissolved in 100% ethanol to prepare stock solution of 100 mg/ml by shaking for three hours at  $55^{\circ}\text{C}$  and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used. Before injected to mice, the TM stock solution was diluted in corn oil (Sigma) to appropriate concentrations and protected from light. TM was injected intraperitoneally at 100  $\mu\text{g/g}$  body weight for one-week-old or 60  $\mu\text{g/g}$  for two-days-old mice. Mice were taken at three different ages; 10 days, 4 weeks and 8 weeks. Mice were injected 3 times at the first week of age with tamoxifen or corn oil (vehicle), then they were euthanized at 4- or 8-week-old. The mice euthanized at 10-day-old, were injected at 2 days of age daily for 3 days with tamoxifen or corn oil. Mice injected with corn oil represent the control group (WT), however, mice injected with tamoxifen solution represent the group of *knockout* mice (XylT1-cKO).

### ***Morphometry assessment***

During all the period of experiment as well as after injection with TM or corn oil the mice weight and growth was regularly measured. Mice were tattooed 7 days after birth, then the body weight was measured with an appropriate balance. The length of hall skeleton, femurs and tibiae was done by using digital electronic caliper.

### ***Skeletal staining***

For the whole skeletal staining, 4-week-old mice skeletons were freed from adherent tissue, fixed in 95% ethanol and stained for cartilage with Alcian Blue and counterstained for bone with Alizarin Red. Briefly, mice were skinned, eviscerated and stained by Alcian Blue solution (0,015%, 80% ethanol and 20% acetic acid, Sigma-Aldrich) for one day, followed by washing in several changes of 1% potassium hydroxide solution over several days. Following counterstaining with Alizarin Red (0,01% in 1% KOH, Sigma-Aldrich), mice tissue was cleared in glycerol/ethanol solution (80/20) and preserved at 100% glycerol.

### ***High-Resolution Micro Computer Tomography assessment ( $\mu\text{CT}$ )***

The 8-weeks-old mice were euthanized, and the femurs were isolated, stripped of soft tissue, fixed in 4% formalin and stored in 70% ethanol. The bones were scanned using SKYSCAN 1272 High-Resolution X-Ray Microtomograph (Bruker microCT). Data were acquired with at 70 KV with 7  $\mu\text{m}$  cubic resolution. Three-dimensional reconstructions were generated with Microscan 1272 Bruker. The reconstruction, analysis and realistic visualization was done with NRECON software, with the following parameters: Smoothing: 0; Ring Artifact Correction: 2; Beam Hardening Correction: 35%; Minimum (Absorption coefficient): 0; Maximum (Absorption coefficient): 0.14. Both 2- and 3-D  $\mu\text{CT}$  data included bone volume to total volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N),

trabecular separation (Tb.Sp), trabecular pattern factor (Tb.Pf), Ep cortical thickness (CT.Th), bone density, tissue mineral density (TMD), trabecular bone density (BMD), and structure model index (SMI) were quantified. These analyses were performed by RMES - "Regenerative Medicine and Skeleton" "UFR d'Odontologie de Nantes" Nantes, France.

### ***Bone processing***

XylT1-cKO and WT mice (n = 6) were killed by CO<sub>2</sub> inhalation. Femur and tibia bones were harvested from wild-type and knockout mice. Attached tissue was rapidly removed from the bone using a scalpel, the cartilaginous part of both bone ends and cancellous bone were cut, bone marrow cells were discarded, and the bone was cut into small pieces before the bone was snap frozen in liquid nitrogen. The bone was stored at -80°C for later RNA isolation.

### ***RNA isolation from bone samples***

RNA isolation from bones was performed using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) and RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). 1ml TRIzol was added to bone pieces and homogenize using Ultra-Turrax in cold ice. Following pulverization, bone samples were centrifuged for 5 minutes at 12,000 × g at 4°C, then clear supernatants were transferred to a new tube. 200µl of chloroform reagent was added to samples, vortexed for 15 seconds then incubated for 3 minutes at room temperature. Samples were then centrifuged for 15 minutes at 12,000 × g at 4°C and aqueous phase containing the RNA was transferred to a new tube containing 500µl of isopropanol, followed by an incubation for 10 minutes then a centrifugation for 10 minutes at 12,000 × g at 4°C was performed. Precipitate RNAs were washed with 1 ml of 75% ethanol then centrifuged for 5 minutes at 12,000 × g at 4°C. Supernatant was discarded and RNA pellet was dried in a vacuum for 10 minutes, followed by solubilization in 100µl of RNase-free water. RNA samples were applied to purification columns (RNeasy Mini kit, Qiagen). Cleaned RNA was eluted from the column with 50µl RNase-free water. The absorbance ratio at 260 nm and 280 nm is used to evaluate the purity of the RNA (a ratio of ~ 2.0 is generally accepted as pure RNA).

### ***Histological analysis and staining***

Mice were euthanized at mentioned age to take the knee joints and bones specimens, fixed in 4% formalin for 24h at RT, decalcified in 10% EDTA (pH 7.6, Sigma-Aldrich) solution prepared in PBS at 4°C for around three weeks depending on the age of mice, dehydrated in Leica ASP 300S (Leica, Germany) tissue processor with programmed following steps formalin 1 for 30 minutes, formalin 2 for 30 minutes, ethanol 70% for 1 hour, ethanol 80% for 1.5 hours, ethanol 96% for 1.5 hours, ethanol absolute for 1 hour, ethanol absolute for 1.5 hours, ethanol absolute for 1.5 hours, xylene 1 for 1.5 hours, xylene 2 for 1.5 hours, paraffin 1 for 1 hour, paraffin 2 for 2 hours, paraffin 3 for 3 hours and embedded in paraffin. The sample was embedded in paraffin, and sections 5 µm thick were obtained from the specimen with manually Leica Leica RM 213 microtome (Leica, Germany). The sections were used either for staining or immunohistochemistry. The sections were stained with either Tartrate staining (Leukocyte Acid (TRAP) kit, Sigma-Aldrich), 0.001% Alcian Blue/0.001% kernechtrot staining, 0.1% Safranin-O/0.03% Fast Green staining, Harrys's hematoxyline/0.01% Eosine/0.01% Safran staining or 0.1 % Red Sirius in a SAKURA

Autostainer (SAKURA). Staining images were obtained by using Leica DMD 108 microscope (Leica, Germany).

TRAP staining is used to identify TRAP-positive cells in bone tissue. HES staining is used to visualize morphological cells, nucleus, cytoplasm and for identifying morphology alterations in tissues. This staining facilitates the recognition of different tissues in a histological section. Alcian blue stains especially GAG chains with blue color, whereas kernechtrot stains nucleus a pink color. Safranin-O/Fast green staining is frequently used to stain articular cartilage and growth plate. Therefore, Safranin-O by its hydrophobic group stains GAG chains attached to PGs with a red-orange color and Fast green binds to non-collagenous protein which are stained with green color. Hematoxylin identify the nucleus by the staining of nucleic acids a deep blue-purple color, eosin stains proteins non-specifically a pink color, whereas safran stains collagen fibers a yellow color. Therefore, in knee-sections, nuclei are stained blue purple, cytoplasm and matrix are stained pink which exhibits varying degrees.

### ***Second harmonic generation microscopy (SHG)***

To visualize collagen fibers in ECM of growth plate we used multi-photons excitation microscope having water immersion objective lens and a Ti: sapphire laser oscillator system. The 8-weeks-old tibias specimens were collected and treated (see previously, histological analysis and staining) then were cut in 10  $\mu\text{m}$  sections. Following dewaxing and mounting, sections were evaluated by SHG microscopy as described before [49].

### ***RNA scope in situ hybridization procedures***

RNA *in situ* hybridization on mice knee joint sections was performed as previously described [50] with a few modifications. Briefly, 5  $\mu\text{m}$  tissue sections were dewaxing at 60°C, then in xylene, followed by dehydration in an ethanol series. Tissue sections were then incubated in citrate buffer (10 nmol/L, pH 6) maintained at 96°C in an incubator for 15 minutes, rinsed in wash buffer, and immediately treated with 10 g/mL protease (ACD) at 40°C for 30 minutes in a HybEZ hybridization oven (ACD, Hayward, CA). Hybridization with target probes, preamplifier, amplifier, and label probe were performed according to manufacturer's recommendations. Chromogenic detection was performed using DAB followed by counterstaining with hematoxylin dehydrating and mounting. We used probes purchased from ACD company to detect *Col10a1*,  *$\beta$ -Glap*, *Spp1*, *Col2a1*, *Ihh* and *Acan*. RNA hybridization images were obtained by using Leica DMD 108 microscopy.

### ***Immunohistochemistry and antibodies***

Immunohistochemical analysis was performed on the paraffin-embedded sections prepared from knee joints of 10-days-old mice using the Dako Envision kit. Paraffin-embedded sections were dewaxing in alcohol baths, then washed two times by PBS, followed by citrate treatment for overnight at 55°C. Subsequently, sections were blocked, incubated with primary and secondary antibodies and mounted. Primary antibodies and dilutions used were: Wnt4 (Santa Cruz, 1/500), and phospho-H3 (Celle Signaling, 1/200). Immunohistochemistry images were obtained by using Leica DMD 108 microscopy.

### ***Real-time Quantitative PCR (RT-qPCR)***

Total RNA from bones was isolated using TRIzol and RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA concentration was measured by Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). The absorbance ratio at 260 nm and 280 nm is used to evaluate the purity of the RNA (a ratio of ~ 2.0 is generally accepted as pure RNA). The first strand cDNA synthesis reaction was performed using 500 ng of total RNA with oligo (dT) primer and iScript™ Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad). Quantitative PCR was carried out using iTaq™ Universal SYBER Green Supermix kit (Bio-Rad, Hercules, CA) and validated RT-PCR primers for mice Col1, OCN, ALP1 and Runx2. Cycling parameters were 30 s at 95 ° C; 40 cycles of 15 s at 95 ° C and 1 min à 60 ° C. Gene expression was determined in triplicate in three separate experiments and normalized using the housekeeping genes ribosomal protein S29. Analyses and fold differences between the WT and XylT1-cKO mice were determined with the formula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . The data are relative to the control values (WT). The expression change was calculated from the values of  $\Delta\Delta CT$ .

### ***Statistics***

Differences between experimental groups were assessed using ANOVA test and t-test. The significance threshold was at  $P \leq 0.05$ . Statistical analyses were performed using GraphPad PRISM (v6). All values are shown as mean  $\pm$  SD.

## **Acknowledgements**

We thank professor Samir Taha and Chaza Harmouch for helpful discussion and the University of Lebanon and AZM and Saade association for Mrs Ghannoum's scholarship.

## **Conflict of interest**

The authors disclose no conflict of interest

## **FUNDING**

Generation of mutant mice was funded by a grant from INSERM.

## References

- [1] De Andrea, C.E., Prins, F.A., Wiweger, M.I., Hogendoorn, P.C. (2011) Growth plate regulation and osteochondroma formation: insights from tracing proteoglycans in zebrafish models and human cartilage, *J. Pathol.*, **224**, 160–168.
- [2] Myhre, K., Blobe, G.C. (2009) Proteoglycan Signaling Co-receptors: Roles in Cell Adhesion, Migration and Invasion, *Cell. Signal.*, **21**, 1548–1558.
- [3] Yan, D., Lin, X. (2009) Shaping morphogen gradients by proteoglycans, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**, a002493.
- [4] Cortes, M., Baria, A.T., Schwartz, N.B. (2009) Sulfation of chondroitin sulfate proteoglycans is necessary for proper Indian hedgehog signaling in the developing growth plate, *Dev. Camb. Engl.*, **136**, 1697–1706.
- [5] Iozzo, R.V., Schaefer, L. (2015) Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans, *Matrix Biol.*, **42**, 11–55.
- [6] Prydz, K., Dalen, K.T. Synthesis and sorting of proteoglycans, *J. Cell Sci.*, **113**, 193–205.
- [7] Kearns, A.E., Campbell, S.C., Westley, J., Schwartz, N.B. (1991) Initiation of chondroitin sulfate biosynthesis: a kinetic analysis of UDP-D-xylose: core protein beta-D-xylosyltransferase, *Biochemistry (Mosc.)*, **30**, 7477–7483.
- [8] Schön, S., Prante, C., Bahr, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2006) Cloning and recombinant expression of active full-length xylosyltransferase I (XT-I) and characterization of subcellular localization of XT-I and XT-II, *J. Biol. Chem.*, **281**, 14224–14231.
- [9] Müller, S., Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2005) Human xylosyltransferase I: functional and biochemical characterization of cysteine residues required for enzymic activity, *Biochem. J.*, **386**, 227–236.
- [10] Venkatesan, N., Barré, L., Bourhim, M., Magdalou, J., Mainard, D., Netter, P., Fournel-Gigleux, S., Ouzzine, M. (2012) Xylosyltransferase-I Regulates Glycosaminoglycan Synthesis during the Pathogenic Process of Human Osteoarthritis. *PloS One* **7**, 1–9.
- [11] Khair, M., Bourhim, M., Barré, L., Li, D., Netter, P., Magdalou, J., Fournel-Gigleux, S., Ouzzine, M. (2013) Regulation of xylosyltransferase I gene expression by interleukin 1 $\beta$  in human primary chondrocyte cells: mechanism and impact on proteoglycan synthesis. *J. Biol. Chem.*, **288**, 1774–1784.

- [12] Malfait, F., Kariminejad, A., Van Damme, T., Gauche, C., Syx, D., Merhi-Soussi, F., Gulberti, S., Symoens, S., Vanhauwaert, S., Willaert, A., Bozorgmehr, B., Kariminejad, MH., Ebrahimiadib, N., Hausser, I., Huysseune, A., Fournel-Gigleux, S., De Paepe, A. (2013) Defective initiation of glycosaminoglycan synthesis due to B3GALT6 mutations causes a pleiotropic Ehlers-Danlos-syndrome-like connective tissue disorder, *Am. J. Hum. Genet.*, **92**, 935–945.
- [13] Cartault, F., Munier, P., Jacquemont, ML., Vellayoudom, J., Doray, B., Payet, C., Randrianaivo, H., Laville, J.M., Munnich, A., Cormier-Daire, V. (2015) Expanding the clinical spectrum of B4GALT7 deficiency: homozygous p.R270C mutation with founder effect causes Larsen of Reunion Island syndrome, *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*, **23**, 49–53.
- [14] Nakajima, M., Mizumoto, S., Miyake, N., Kogawa, R., Iida, A., Ito, H., Kitoh, H., Hirayama, A., Mitsubuchi, H., Miyazaki, O., Kosaki, R., Horikawa, R., Lai, A., Mendoza-Londono, R., Dupuis, L., Chitayat, D., Howard, A., Leal, G.F. *et al.* (2013) Mutations in B3GALT6, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders, *Am. J. Hum. Genet.*, **92**, 927–934.
- [15] Budde, B.S., Mizumoto, S., Kogawa, R., Becker, C., Altmüller, J., Thiele, H., Rüschenhoff, F., Toliat, M.R., Kaleschke, G., Hämmerle, J.M., Höhne, W., Sugahara, K., Nürnberg, P., Kennerknecht, I., (2015) Skeletal dysplasia in a consanguineous clan from the island of Nias/Indonesia is caused by a novel mutation in B3GAT3, *Hum. Genet.*, **134**, 691–704.
- [16] Salazar, V.S., Gamer, L.W., and Rosen, V. (2016) BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **12**, 203–221.
- [17] Hunziker, E.B. (1994) Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc. Res. Tech.*, **28**, 505–519.
- [18] Kresse, H., and E. Schönherr (2001) Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J. Cell. Physiol.*, **189**, 266–274.
- [19] Aszodi, A., Hunziker, E.B., Brakebusch, C., and Fässler, R. (2003) Beta1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis, *Genes Dev.*, **17**, 2465–2479.
- [20] Tamamura, Y., Otani, T., Kanatani, N., Koyama, E., Kitagaki, J., Komori, T., Yamada, Y., Costantini, F., Wakisaka, S., Pacifici, M., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M. (2005) Developmental Regulation of Wnt/Beta-Catenin Signals Is Required for Growth Plate Assembly, Cartilage Integrity, and Endochondral Ossification, *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 19185–19195.

- [21] Prein, C., Warmbold, N., Farkas, Z., Schieker, M., Aszodi, A., Clausen-Schaumann, H. (2016) Structural and mechanical properties of the proliferative zone of the developing murine growth plate cartilage assessed by atomic force microscopy, *Matrix Biol.*, **50**, 1–15.
- [22] Macri, L., Silverstein, D., and Clark, R.A.F. (2007) Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **59**, 1366–1381.
- [23] Bateman, J.F., Boot-Handford, R.P., and Lamandé, S.R. (2009) Genetic diseases of connective tissues: cellular and extracellular effects of ECM mutations, *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 173–183.
- [24] Al-Jezawi, N.K., Ali, B.R., and Al-Gazali, L. (2017) Endoplasmic reticulum retention of xylosyltransferase 1 (XYLT1) mutants underlying Desbuquois dysplasia type II, *Am. J. Med. Genet. A.*, **999**, 1–9.
- [25] Silveira, C., Leal, G.F., Cavalcanti, D.P. (2016) Desbuquois dysplasia type II in a patient with a homozygous mutation in XYLT1 and new unusual findings, *Am. J. Med. Genet. A.*, **170**, 3043–3047.
- [26] Jamsheer, A., Olech, EM., Kozłowski, K., Niedziela, M., Sowińska-Seidler, A., Obara-Moszyńska, M., Latos-Bieleńska, A., Karczewski, M., Zemojtel, T. (2016) Exome sequencing reveals two novel compound heterozygous XYLT1 mutations in a Polish patient with Desbuquois dysplasia type 2 and growth hormone deficiency, *J. Hum. Genet.*, **61**, 577–583.
- [27] Bui, C., Huber, C., Tuysuz, B., Alanay, Y., Bole-Feysot, C., Leroy, JG., Mortier, G., Nitschke, P., Munnich, A., Cormier-Daire, V. (2014) XYLT1 Mutations in Desbuquois Dysplasia Type 2, *Am. J. Hum. Genet.*, **94**, 405–414.
- [28] Schreml, J., Durmaz, B., Cogulu, O., Keupp, K., Beleggia, F., Pohl, E., Milz, E., Coker, M., Ucar, S.K., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Kuhn, J., Ozkinay, F. (2013) The missing ‘link’: an autosomal recessive short stature syndrome caused by a hypofunctional XYLT1 mutation, *Hum. Genet.*, **133**, 29–39.
- [29] Faivre, L., Cormier-Daire, V., Elliott, A.M., Field, F., Munnich, A., Maroteaux, P., Le Merrer, M., Lachman, R. (2004) Desbuquois dysplasia, a reevaluation with abnormal and ‘normal’ hands: radiographic manifestations, *Am. J. Med. Genet. A.*, **124A**, 48–53.
- [30] Lee, H.H., Behringer, R.R. (2007) Conditional Expression of Wnt4 during Chondrogenesis Leads to Dwarfism in Mice, *PLoS ONE*, **2**, e450.

- [31] Yang, J., Andre, P., Ye, L., Yang, Y.Z. (2015) The Hedgehog signalling pathway in bone formation, *Int. J. Oral Sci.*, **7**, 73–79.
- [32] Hartmann, C., Tabin, C.J. (2012) Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb, *Dev. Camb. Engl.*, **127**, 3141–3159.
- [33] Linhardt, R.J., and Toida, T. (2004) Role of glycosaminoglycans in cellular communication, *Acc. Chem. Res.*, **37**, 431–438.
- [34] Hilton, M.J., Gutiérrez, L., Martínez, D.A., and Wells, D.E. (2005) EXT1 regulates chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral bone development, *Bone*, **36**, 379–386.
- [35] Domowicz, M.S., Cortes, M., Henry, J.G., and Schwartz, N.B. (2008) Aggrecan modulation of growth plate morphogenesis, *Dev. Biol.*, **329**, 242–257.
- [36] Watanabe, Y., Takeuchi, K., Higa Onaga, S., Sato, M., Tsujita, M., Abe, M., Natsume, R., Li, M., Furuichi, T., Saeki, M., Izumikawa, T., Hasegawa, A., Yokoyama, M., Ikegawa, S., Sakimura, K., Amizuka, N., Kitagawa, H., Igarashi, M. (2010) Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 is required for normal cartilage development, *Biochem. J.*, **432**, 47–55.
- [37] Wilson, D.G., Phamluong, K., Lin, W.Y., Barck, K., Carano, R.A., Diehl, L., Peterson, A.S., Martin, F., Solloway, M.J. (2012) Chondroitin sulfate synthase 1 (Chsy1) is required for bone development and digit patterning, *Dev. Biol.*, **363**, 413–425.
- [38] Guo, L., Elcioglu, N.H., Iida, A., Demirkol, Y.K., Aras, S., Matsumoto, N., Nishimura, G., Miyake, N., Ikegawa, S. (2017) Novel and recurrent XYLT1 mutations in two Turkish families with Desbuquois dysplasia, type 2, *J. Hum. Genet.*, **62**, 447–451.
- [39] Faivre, L., Le Merrer, M., Al-Gazali, L.I., Ausems, M.G., Bitoun, P., Bacq, D., Maroteaux, P., Munnich, A., Cormier-Daire, V. (2003) Homozygosity mapping of a Desbuquois dysplasia locus to chromosome 17q25.3, *J. Med. Genet.*, **40**, 282–284.
- [40] Karsenty G., and Wagner, E.F. (2002) Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development, *Dev. Cell*, **2**, 389–406.
- [41] Shum, L., Coleman, C.M., Hatakeyama, Y., and Tuan, R.S. (2003) Morphogenesis and dysmorphogenesis of the appendicular skeleton, *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.*, **69**, 102–122.
- [42] Barbieri, O., Astigiano, S., Morini, M., Tavella, S., Schito, A., Corsi, A., Di Martino, D., Bianco, P., Cancedda, R., Garofalo, S. (2003) Depletion of cartilage collagen fibrils



in mice carrying a dominant negative Col2a1 transgene affects chondrocyte differentiation, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **285**, C1504-1512.

- [43] Banos, C.C., Thomas, A.H., and Kuo, C.K. (2008) Collagen fibrillogenesis in tendon development: current models and regulation of fibril assembly," *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.*, **84**, 228–244.
- [44] Zhang, G., Ezura, Y., Chervoneva, I., Robinson, P.S., Beason, D.P., Carine, E.T., Soslowsky, L.J., Iozzo, R.V., Birk, D.E. (2006) Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development, *J. Cell. Biochem.*, **98**, 1436–1449.
- [45] Reese, S.P., Underwood, C.J., and Weiss, J.A. (2013) Effects of decorin proteoglycan on fibrillogenesis, ultrastructure, and mechanics of type I collagen gels, *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*, **32**, 414–423.
- [46] Eames, B.F., Yan, Y.L., Swartz, M.E., Levic, D.S., Knapik, E.W., Postlethwait, J.H., Kimmel, C.B. (2011) Mutations in *fam20b* and *xylt1* reveal that cartilage matrix controls timing of endochondral ossification by inhibiting chondrocyte maturation, *PLoS Genet.*, **7**, e1002246.
- [47] Mis, E.K., Liem, K.F., Kong, Y., Schwartz, N.B., Domowicz, M., Weatherbee, S.D. (2014) Forward genetics defines *Xylt1* as a key, conserved regulator of early chondrocyte maturation and skeletal length, *Dev. Biol.*, **385**, 67–82.
- [48] Xie Z, Khair M, Shaukat I, Netter P, Mainard D, Barré L, Ouzzine M (2018) Non-canonical Wnt induces chondrocyte de-differentiation through Frizzled 6 and DVL-2/B-raf/CaMKII $\alpha$ /syndecan 4 axis, *Cell Death Differ.*, **25**, 1442.
- [49] Saitou, T., Kiyomatsu, H., and Imamura, T. (2018) Quantitative Morphometry for Osteochondral Tissues Using Second Harmonic Generation Microscopy and Image Texture Information," *Sci. Rep.*, **8**, 2826.
- [50] Staines, K.A., MacRae, V.E., and Farquharson, C. (2012) The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling, *J. Endocrinol.*, vol. **214**, 241–255.

## Figure legends:

### Figure 1. Generation of *Col2a1-CreER<sup>TM</sup>;XylT1<sup>flox/flox</sup>* mice

Scheme of different mice strains and strategy used for the generation of *Col2a1-CreER<sup>TM</sup>;XylT1<sup>flox/flox</sup>* mice. CreF, CreR, LF, LXR, LR, EF and ER are the primers used for genotyping. EX5 (exon 5)

### Figure 2. *XylT1-cKO* mice display reduced skeletal body and elements length

**Panel A.** Graph showing cKO mice body length compared to WT littermates at 8-week-old. Values are normalized such that wild-type body length are set to 100%. cKO postnatal mice skeletons display 20% reduction in body length at 8-week-old compared to wild-type mice. **Panels B and C)** Adult 8-week-old *XylT1-cKO* mice show an overall reduction in body size, in addition to shortened snouts, limbs, and tails compared to WT littermates. **Panel D)** Graph showing *XylT1-cKO* elements length compared to WT littermate at 8-week-old. Values are normalized such that WT femurs and tibias are set to 100%. cKO postnatal mice display 25% reduction in femurs length and a 30% reduction in Tibia at 8-week-old. **Panels E and F)** Adult 8-week-old cKO mice show a reduction in femurs length compared to WT littermate. Scale bar in **E and F** = 0.75cm. WT (Wild-type); *XylT1-cKO* (conditional knock-out).

### Figure 3. *XylT1-cKO* mice showed defects in different skeleton elements and pronounced ossification

**Panels A to J)** Postnatal skeleton mice; red = bone marked by alizarin red staining; blue = cartilage marked by Alcian blue staining. **Panel A)** *XylT1-cKO* postnatal mice showed a dwarfism phenotype characterized by shortened axial and appendicular skeletons. **Panels B and C)** Adult skeletons reveal shortening of the skull (**B**), and smaller rib cage with broadening of the ribs (**C**, red circles) in *XylT1-cKO* mice compared to WT. **Panel D and E)** Adult *XylT1-cKO* mice display reduced disc cartilage that separate the spine bones compared to WT littermates. **E**, Adult trachea mice show an early ossification marked by red staining and defects in cartilage marked by blue staining in *XylT1-cKO* mice compared to WT. **Panel F)** *XylT1-cKO* mice displayed reduced tail length. **Panel G-J)** Adult mice limbs reveal shortening in humerus (**G**), Ulna/Radius (**H**), femurs (**I**), tibias/Fibulas (**J**) of cKO mice compared to WT.

### Figure 4. 8-week-old *XylT1* deficient mice display trabecular number reduction and increased trabecular and cortical thickness

**Panels A-A''', B-B''')**  $\mu$ CT scans of *XylT1-cKO* and WT mice femurs revealed defects in trabecular bone content within the diaphysis and cortical bone in *XylT1-cKO* mutants. *XylT1-cKO* mice exhibit reduced in trabecular number associated in some regions with high density (marked in red **B''**).  $\mu$ CT analysis showed thicker cortical bone in *XylT1-cKO* mice (**B'''**) compared to WT littermate (**A'''**). **Panel C)** Graph showing several measurements of trabecular and cortical bone parameters. Values are normalized such the control is defined as 1. *XylT1-cKO* mice show an increase in the thickness of the trabecular and cortical bone,

while the trabecular number is reduced. Regarding the other parameters, XylT1-cKO mice did not show any significant difference from WT littermate. **Panels D and E)** XylT1-cKO mice showed a larger femoral epiphysis and an abnormality in the femoral head that appears to be more developed and more ossified than that of WT mice (compare E and D, white squares),.

**Figure 5. Increased osteoclast numbers in XylT1-cKO mice with 8 weeks of age**

**Panel A)** TRAP staining for the detection of osteoclasts (red spots) was performed on histological sections of tibias bone of 8-week-old mice and counter-stained with Fast-Green solution. **(i, ii)** TRAP staining of WT and XylT1-cKO mice (magnification x4). **(iii, iv)** TRAP staining of cancellous bone of WT and XylT1-cKO mice (magnification x10). **C)** TRAP staining cortical bone of WT and XylT1-cKO mice (magnification x4). **Panel B)** Quantification of the number of osteoclasts per bone surface (Oc.N/B.S). Red arrows indicate osteoclasts. Scale bar: 100  $\mu$ m.

**Figure 6. Effect of XylT1 deficiency on bone formation**

Expression level of mRNA from cortical bones of wild-type (WT) and mutated (XylT1-cKO) mice. mRNA expression level of Col1, OCN, Alp1 and Runx2 are determined by RT-qPCR. Values are normalized such as WT measurements are defined as 1. Genes expression is normalized to the reporter gene S29. Statistical significance is assessed using the t-test,  $p < 0.05$  (\*), or  $p < 0.001$  (\*\*\*), #: not significant.

**Figure 7. Histological analyses of the growth plate of 10-day-old mice**

**Panels A to C)** and Hematoxylin/Eosin/Safran and Alcian blue, a specific dye of GAG chains, staining of 5  $\mu$ m tibias sections of WT and XylT1-cKO mice of 10-days of age. RZ = Resting zone; PZ = Proliferative zone; PhZ = Prehypertrophic zone; HZ = Hypertrophic zone. **Panel A)** Well-organized growth plate in which resting, proliferative and hypertrophic zones are well distinguishable in WT mice. **Panel B)** Proliferative zone shows disordered cellular organization and morphology in XylT1-cKO mice. **Panel C)** Reduced pre and hypertrophic zones in cKO mice. Scale bar: 100  $\mu$ m. **Panel D)**, Alcian bleu staining of the growthplate of WT and XylT1-cKO mice shows reduced GAG content in mutant mice.

**Figure 8. Histological analyses of the growth plate of 4 weeks-old mice**

**Panels A and B)** Alcian blue and Hematoxylin/Eosin/Safran staining of 5  $\mu$ m knee joints sections of WT-and XylT1-cKO mice. **Panel A)** The growth plate of XylT1-cKO mice exhibits disruption of chondrocytes columnar organization. **Panel B)** The XylT1-cKO mice growth plate shows reduced amount of GAG-attached PGs in the pericellular matrix. Scale bar: 100  $\mu$ m.

### **Figure 9. Histological studies of the growth plate of 8 weeks-aged mice**

**Panel A)** Hematoxylin/Eosin/Safran staining of the growth plate of XylT1-cKO mice showing disruption of columnar organization of chondrocytes. Scale bar: 100  $\mu$ m. **Panel B)** Alcian blue staining, a specific dye of GAG chains, shows reduced GAGs in the growth plate of XylT1-cKO mice compared to WT.

### **Figure 10. The Matrix collagen fibrils in the growth plate are disorganized in XylT1-deficient mice.**

**Panels i to vi)** Images taken by SHG harmonic technology of tibias histological sections (10  $\mu$ m) of 8-week-old mice. **Panels i and ii)** Autofluorescence in growth plate. **Panels iii and iv)** Alignment and abundance of collagen fibrils in WT and XylT1-cKO mice. Collagen fibrils are thicker and not aligned in XylT1-cKO mice. **Panels v and vi)** Merge between collagen fibrils and cells. Scale bar: 40  $\mu$ m.

### **Figure 11. In situ hybridization of chondrogenic and osteogenic markers in XylT1-deficient mice (at 4 weeks of age)**

**Panel A)** Analysis of the expression of chondrogenic markers (Acan, Col2 $\alpha$ 1 and Col10) by mRNA in situ hybridization using histological sections of the tibia from XylT1-cKO and WT mice. The analysis shows an increased expression of the studied markers in XylT1-cKO mice compared to WT littermates. **Panel B)** Analysis of the expression of osteogenic markers  $\beta$ -Glup and Spp1 shows an up-regulation of both genes in XylT1-cKO mice. Spp1 or osteopontin mRNA expression is higher especially at chondro-osseous junction and spongy bone of XylT1-deficient mice.

### **Figure 12. Overexpression of Ihh and misexpression of Wnt4 in XylT1-deficient mice**

**Panel A)** Analysis of the expression of Ihh and Wnt4 in the growth plate of 10-days old WT and XylT1-cKO by *in Situ* hybridization. XylT1-cKO mice show an overexpression of Ihh compared to WT in pre-hypertrophic zone. **Panel B)** i, ii, Expression of Wnt-4 in the growth plate; iii, iv, expression of Wnt-4 in proliferative and hypertrophic zones. WT mice show high expression of Wnt-4 in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes but no expression is observed in proliferative zone. In contrast, Wnt-4 is expressed in prehypertrophic and hypertrophic zone and is overexpressed in proliferative zone of XylT1-cKO. Scale bar: 100  $\mu$ m.

### **Figure 13. Decreased phospho-H3 expression in XylT1-cKO mice**

Immunohistochemistry analysis of phospho-H3 in the growth plate of 10-days old WT and XylT1-cKO mice. XylT1-cKO showed a decrease of H3 phosphorylation in proliferative and columnar zones. Scale bar: 100  $\mu$ m. Quantification of phospho-H3 positive cells in proliferative and columnar zones showed decrease of proliferation in XylT1-cKO mice compared to WT.

Figure 1

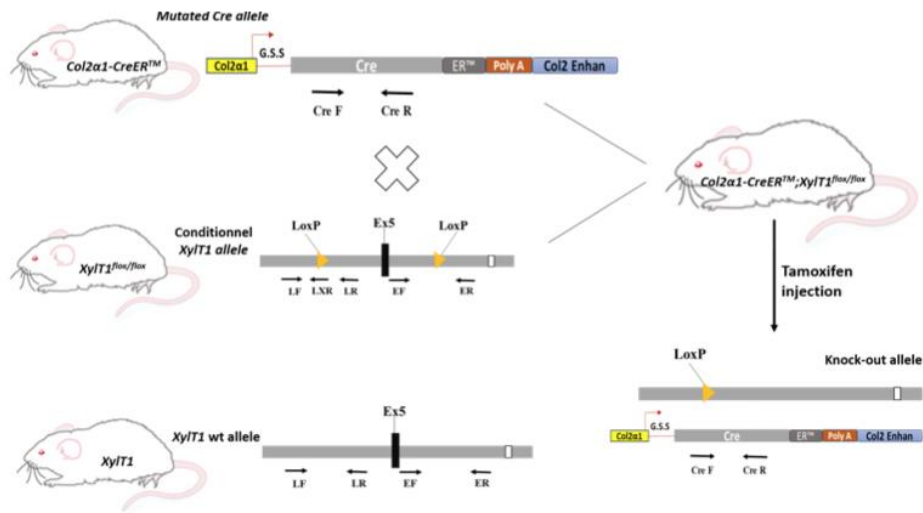


Figure 2

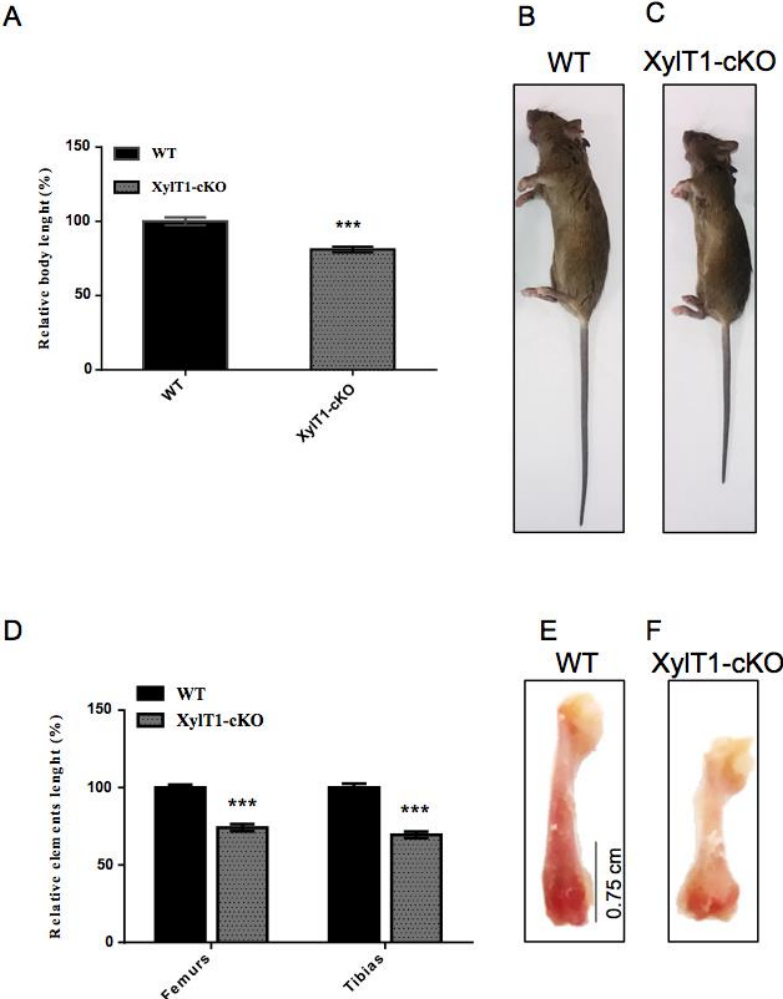


Figure 3

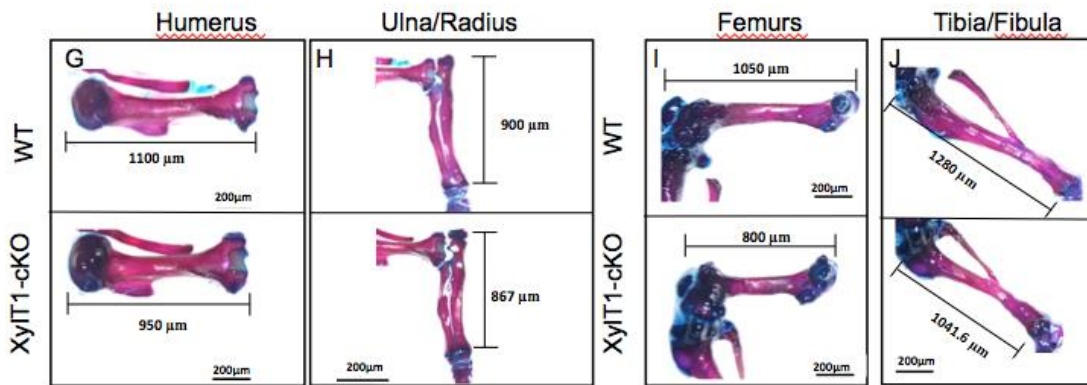
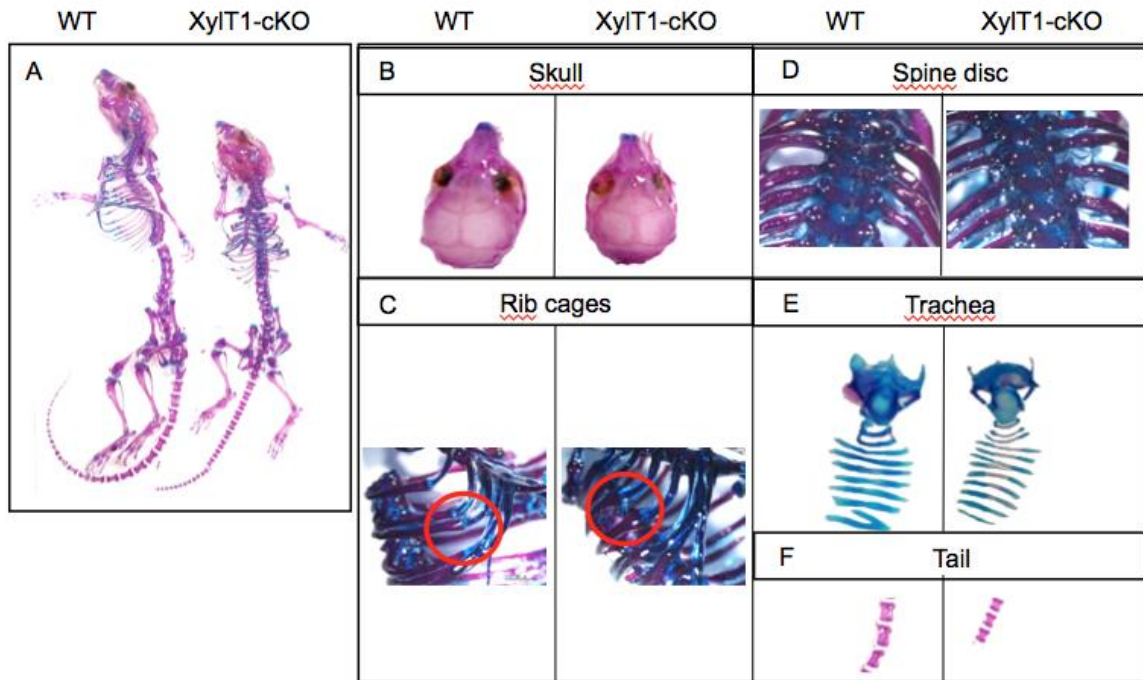


Figure 4

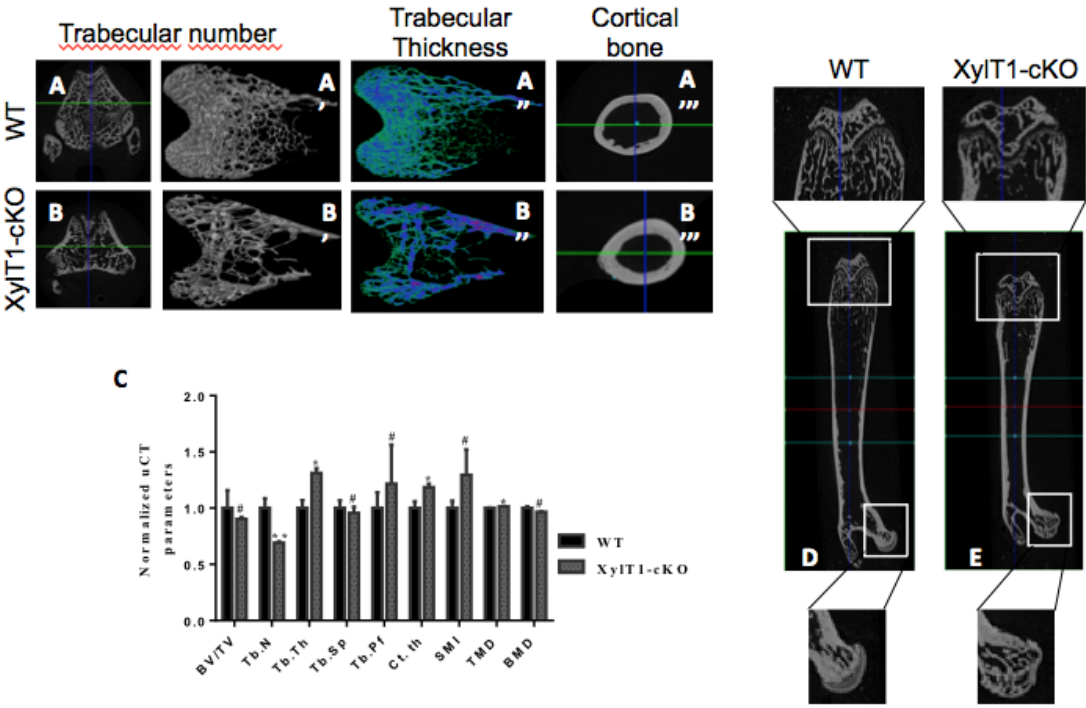




Figure 5

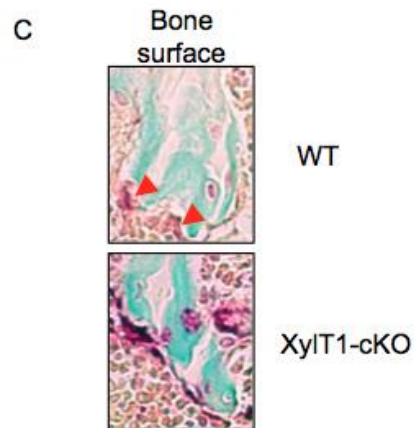
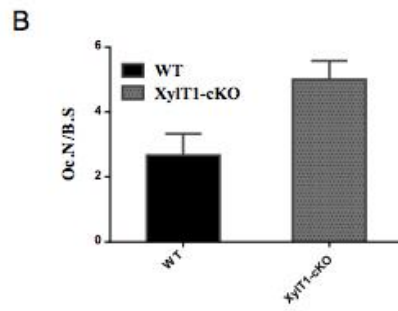
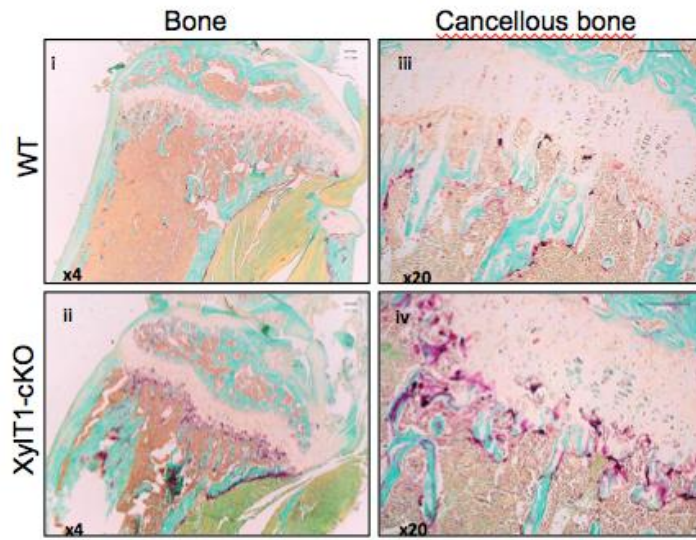


Figure 6

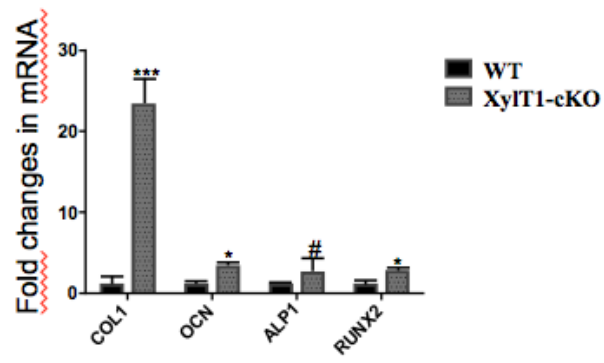


Figure 7

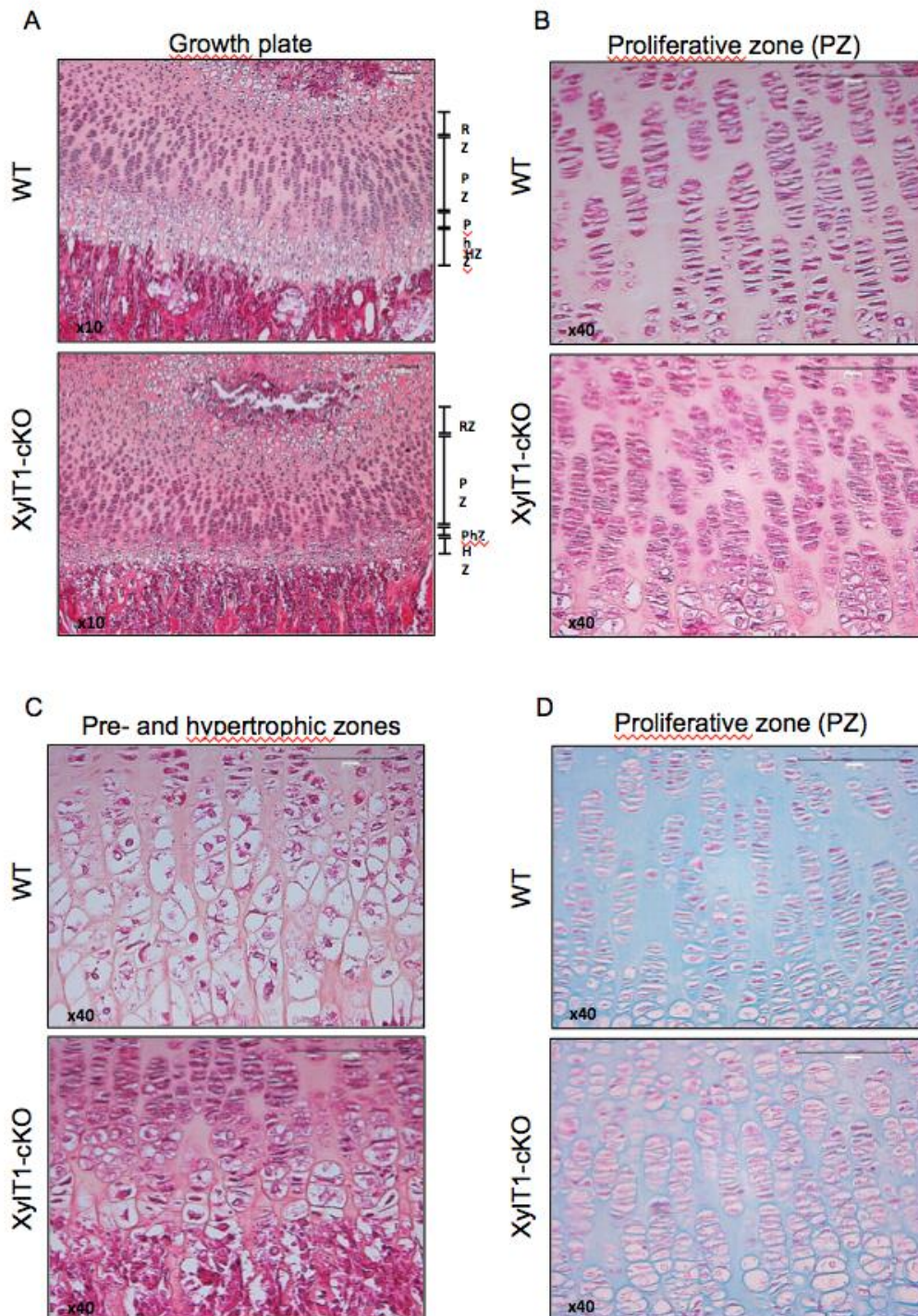


Figure 8

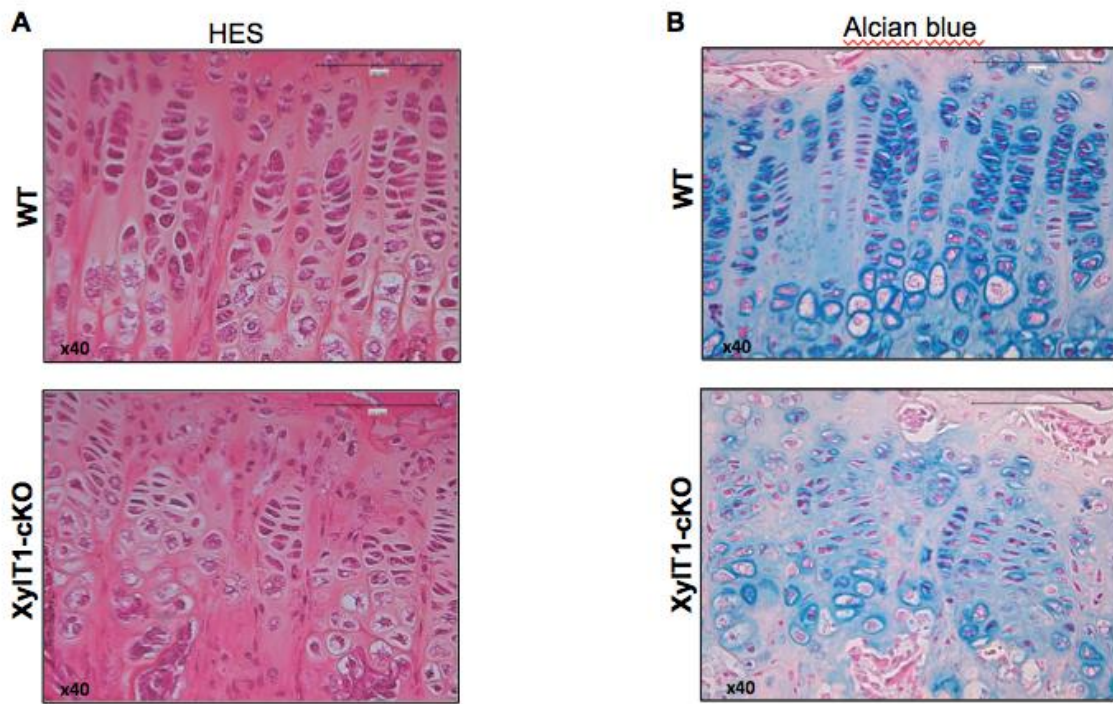


Figure 9

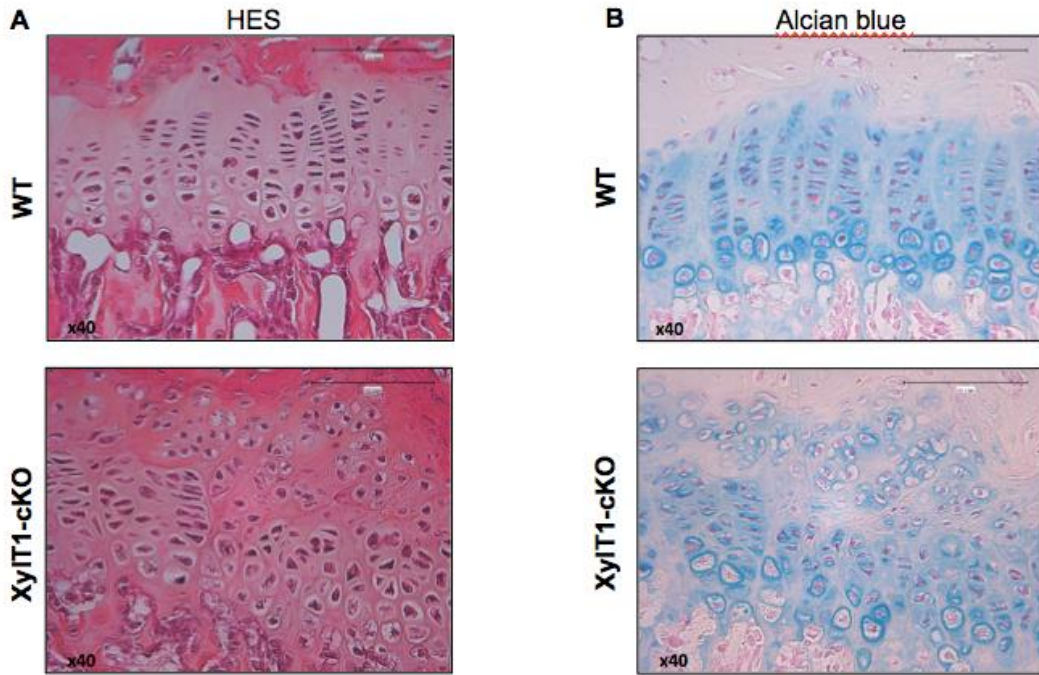


Figure 10

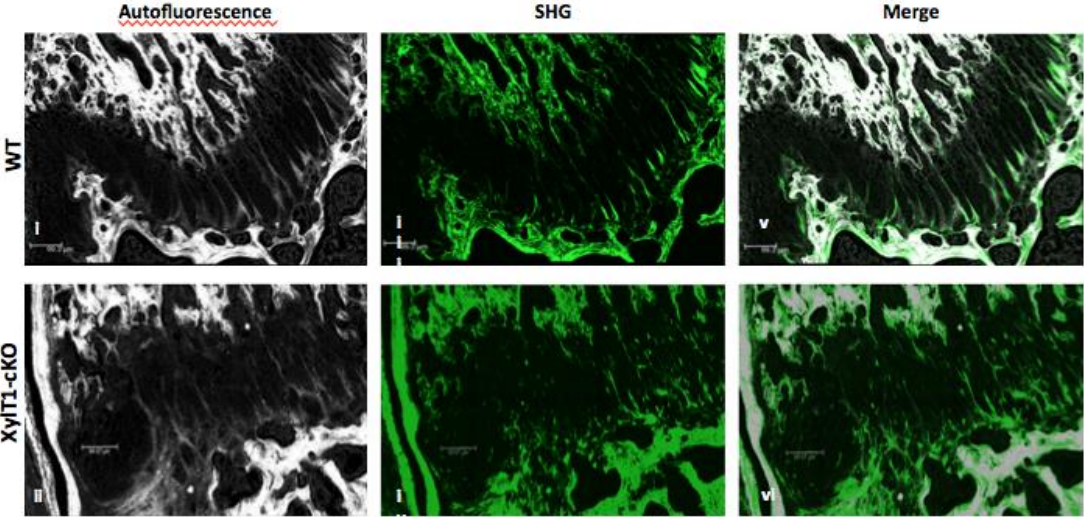


Figure 11

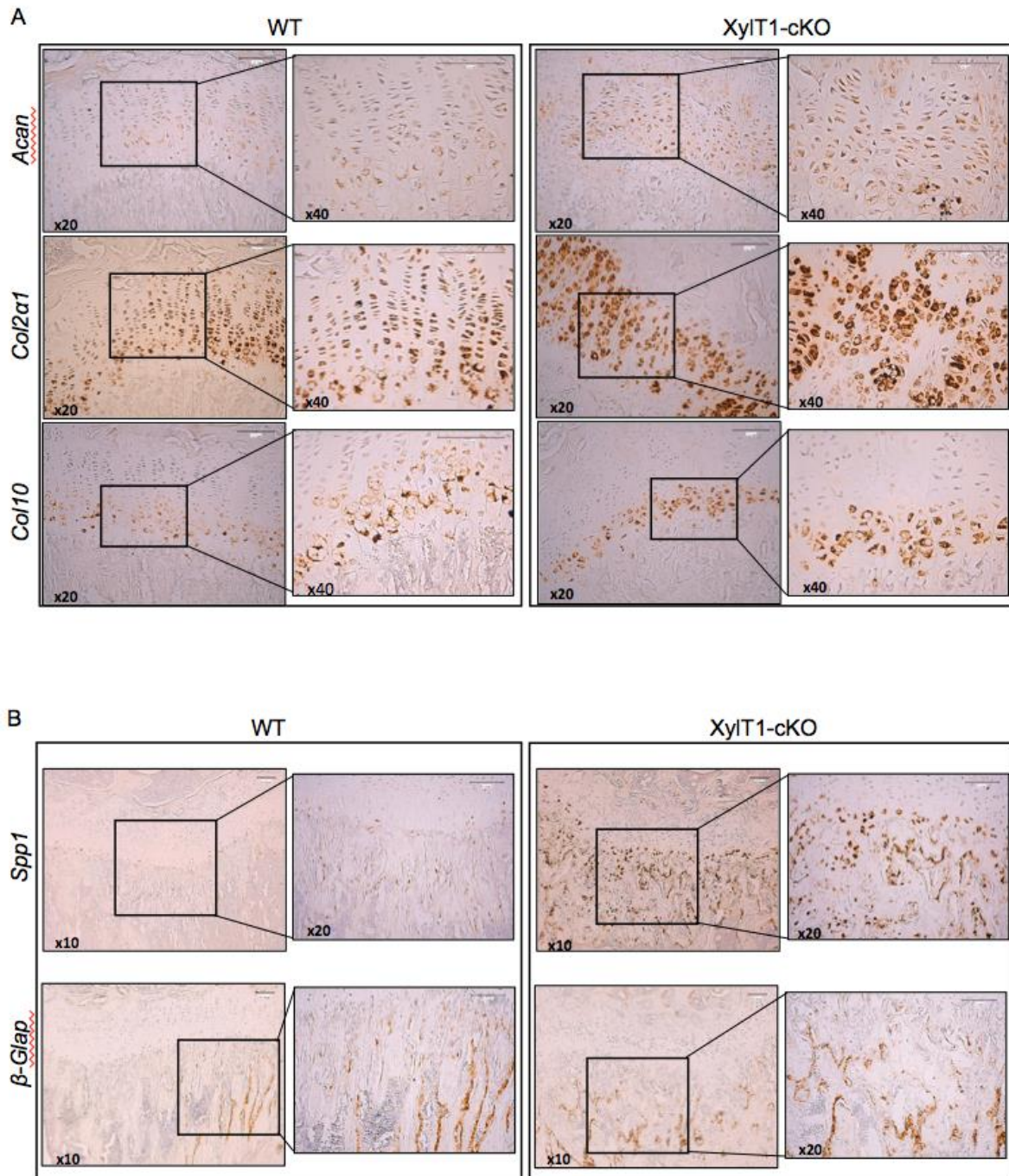


Figure 12

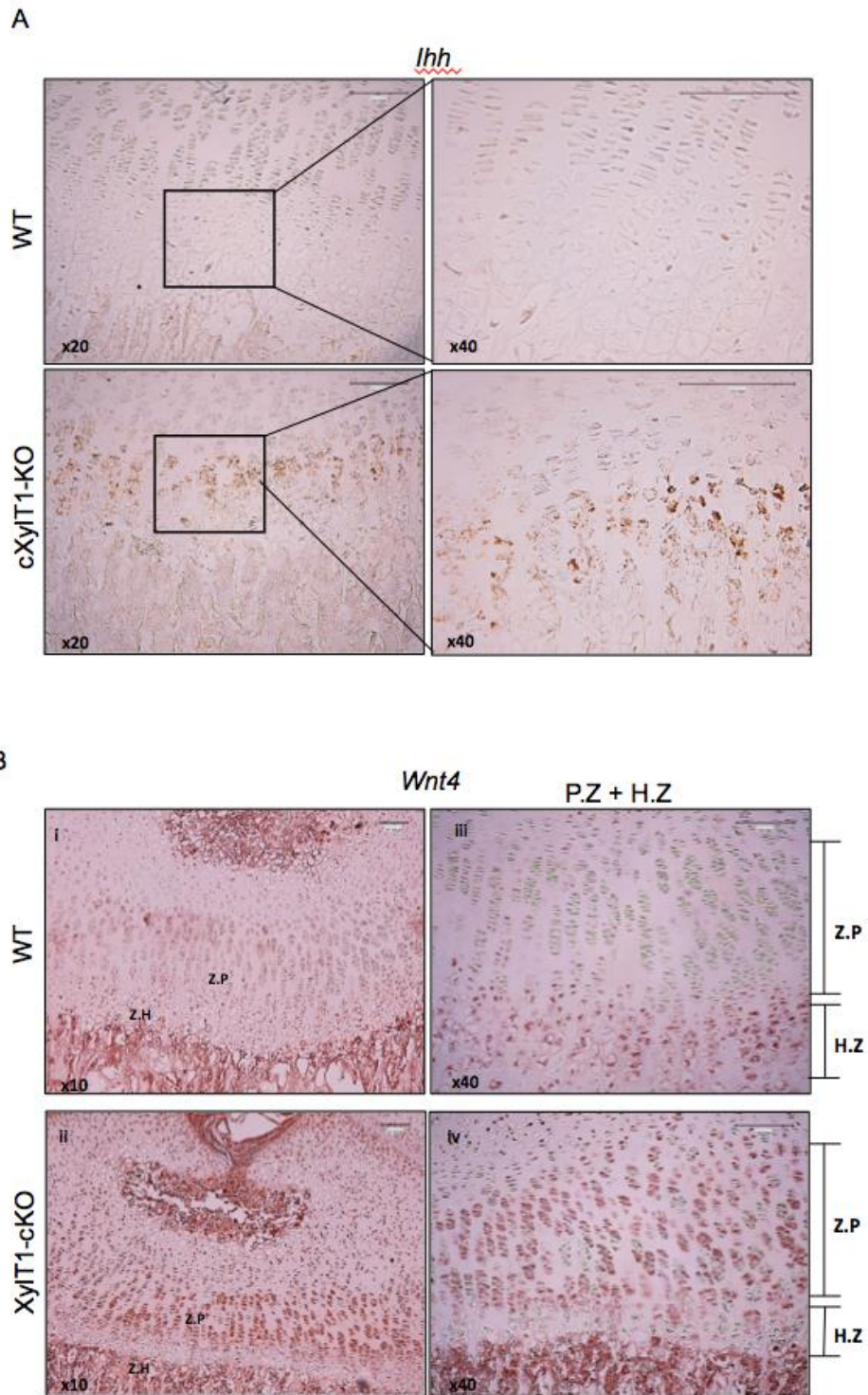
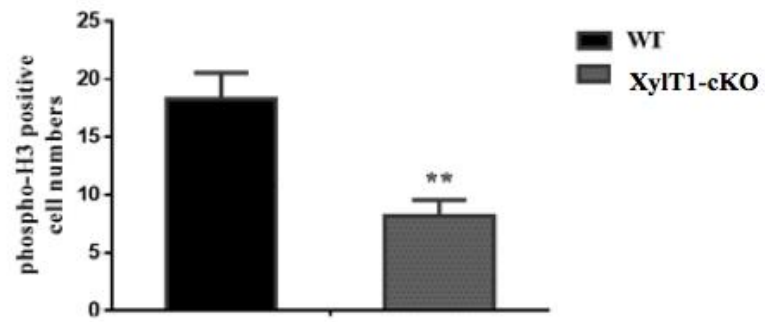
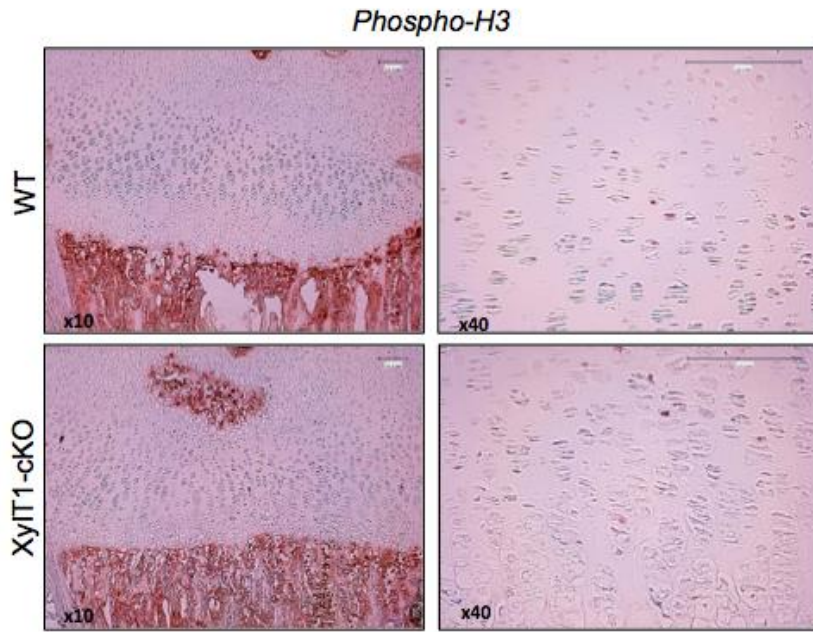




Figure 13



***Article 2 en soumission***

**XylT1 regulates endochondral ossification through activation of FGF signaling**

Mahdia Taieb, Dima Ghannoum, Lydia Barré, Mohamed Ouzzine\*

UMR 7365 CNRS-University of Lorraine, Biopôle, Faculty of Medicine, CS 50184, 54505  
Vandœuvre-Lès-Nancy

\*Adress for correspondence

Dr Mohamed OUZZINE

Corresponding author: UMR 7365 CNRS-University of Lorraine

Biopôle, Faculty of Medicine, CS 50184

54505, Vandœuvre-Lès-Nancy, France

Phone : +33 383 685 427

Email : [mohamed.ouzzine@univ-lorraine.fr](mailto:mohamed.ouzzine@univ-lorraine.fr)

## **Abstract**

Proteoglycans (PGs) are macromolecules composed of a core protein to which several chains of glycosaminoglycans (GAGs) are attached. The initiation of the synthesis of GAG chains of PGs is catalyzed by xylosyltransferase I (XT-I). Recently several studies have shown different mutations in XT-I gene associated with the Desbuquois syndrome type II, characterized by skeletal abnormalities. To study the role of XT-I in osteoarticular development, we generated knockout mice for the XT-I gene (XT-I KO). XT-I KO mice show pronounced dwarfism and apparent frontonasal hypoplasia, thus indicating abnormalities of skeletal development. Histological analysis of the growth plate revealed an apparent disorganization of the proliferative zone and a significant reduction of the hypertrophic zone. Evaluation of the PG content revealed a strong decrease in PGs synthesis in XT-I KO mice. To identify the mechanisms and factors responsible for skeletal abnormalities in XT-I KO mice, the expression of several genes involved in skeletal development and in the regulation of chondrogenesis was analyzed by in situ hybridization, using the RNAscope technique. The results showed a strong expression of hypertrophy markers, thus suggesting an early maturation of chondrocytes in XT-I KO mice. The XT-I KO embryos show also an early formation of the secondary ossification center, indicating an early ossification which ultimately leads to the growth abnormalities seen in XT-I KO mice. The study of the signaling pathways involved in differentiation and chondrocyte maturation revealed overexpression of the FGFR3 receptor and a significant activation of the downstream signaling pathways. In this present study, we provided evidence of the key role of the XT-I in skeletal development, in chondrocyte maturation and ECM formation and highlighted the role of FGF signaling pathway in abnormalities development in XT-I KO mice.

**Key words:** Xylosyltransferase I, proteoglycan, cell signaling , growth plate, skeletal development

## INTRODUCTION

Proteoglycans (PGs) are important bio-macromolecules composed of core protein and glycosaminoglycans (GAGs) chains (387,388) . They are involved in various biological processes such as extracellular matrix deposition, cell proliferation, adhesion, migration and differentiation (224,225,389). They play an essential role in storage of growth factors, chemokine, cytokine, and in establishing a morphogen gradient during tissue development (390,391) and regulate diffusion of nutrients and metabolites through tissue extracellular matrix (ECM) (392) . PGs are also involved in multiple pathological situations and in the development of several pathologies such as cancer (393), atherosclerosis (394), Alzheimer's disease (395) osteoarthritis (396) and in skeleton development disorders(397).

During skeletal development different proteoglycans are expressed in a highly defined pattern that is regulated spatially and temporally. Versican a large chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) is expressed in early stages of chondrogenesis, inversely, Aggrecan is expressed during establishment and maturation of the chondrogenic cells (397) . Chondrogenesis is the earliest step for endochondral bone formation. It begins with the condensation of mesenchymal stem cells (MSCs) which differentiate into chondrocytes expressing type II collagen as well as cartilage specific proteoglycans. After a period of cell proliferation, chondrocytes undergo maturation and become organized into four distinct zones, resting zone, proliferative zone, prehypertrophic zone and hypertrophic zone forming a growth plate (398–400). The development of the growth plate is a highly regulated process which involves several transcription factors such as Sox9 and Runx2, growth factors like FGF and TGF $\beta$  and ECM compounds, collagens, elastin and PGs (16,241,316,400).

PGs constitutes 7% of the cartilage ECM volume and their biological activity is highly related to their chains of GAGs. Biosynthesis of GAG chains is catalyzed by several glycosyltransferases and requires formation of common linker of four sugar residues: D-GlcA-B1-3-Gal-B1-3-B1-4-Xyl-Ser. This process is initiated by Xylosyltransferase I (XT-I) and II (XT-II) which catalyze the transfer of xylose from UDP-xylose to a specific serine residue of the core protein. Then two galactose residues are added by  $\beta$ 1,4 galactosyltransferase I (GalT-I) and  $\beta$ 1,3 galactosyltransferase II (GalT-II) respectively and one glucuronic acid residue by B1,3 glucuronyltransferase I (GlcAT-I). Once this linker is formed, GAGs chains are extended by addition repeating disaccharides units forming different GAG chains; chondroitin sulfate (CS), dermatane sulfate (DS), heparane sulfate (HS) and keratane sulfate (KS). XT-I catalyze the rate limiting step controlling the biosynthesis of proteoglycans. Mutations in *Xylt1* gene encoding XT-I is at the origin of

genetic diseases. Indeed, the mutation of XT-I in zebrafish causes chondrocyte hypertrophy associated with premature perichondral ossification and reduced cartilage (401). Recently, several clinical studies have reported nonsense, missense and splice site mutations in XT-I gene associated with Desbuquois Dysplasia type 2 (DBQD type II) among different ethnicities (304,305,402–406). However, the cellular and molecular mechanisms underlying disorders caused by the most of these mutations have not yet elucidated.

To better understand the physiological role of XT-I in skeletal development, we generated XT-I knock-out (XT-I KO) mice by deletion of XT-I exon 1 and a part of the XT-I promoter sequence. Deletion of *Xylt1* lead to a neonatal/perinatal lethality and XT-I knock-out mice showed a pronounced dwarfism and an apparent frontonasal malformation suggesting defects in ossification. To elucidate cellular and molecular mechanisms underlying those disorders, histological studies were performed on limb sections of XT-I mice knock-out and their WT littermates. Analyze of the growth plate by HES coloration, showed a shortened growth plate with an apparent disorganization in different zones suggesting abnormalities in chondrogenesis. Expression of the different zone markers were assessed by RNAscope in situ hybridization, we showed an increased expression in *Col10a1* the marker of hypertrophic chondrocyte and *IHH* the marker of pre-hypertrophic chondrocytes suggesting an early maturation of chondrocytes in XT-I KO mice. To identify factors regulating chondrogenesis and endochondral ossification underlying disorders in XT-I KO mice, we analyze genes expression of two signaling pathways implicated in endochondral ossification regulation, FGF and TGF $\beta$  signaling. We showed an increased expression of *FGFR3* which lead to increase several downstream of *FGFR3* signaling, such as P-ERK, P-AKT, P-P38 and P-PKC in XT-I KO. We showed also an increased expression of *TGF $\beta$ 2* leading to an increased activation of *Smad2/3* downstream. Alcian blue and Safranin-O staining showed a decrease of proteoglycans synthesis in XT-I KO mice. Defect in proteoglycan processing and subsequent defect in *FGFR3* and *TGF $\beta$ 2* signaling in XT-I KO mice, highlights a key role of *Xylt1* in regulation of chondrogenesis and bone development.

## RESULTS

### 1. Generation of XT-I Knock-out mice

Several articles showed that mutations of XT-I gene cause many skeleton development diseases in human (304,305,402–406). To elucidate the role of XT-I in skeletogenesis and to understand abnormalities in Desbuquois Dysplasia type 2 (DBQD type II), XT-I KO mice

were generated by deletion of a part of the most regions of promoter and of the Exon1 of the *Xylt1* gene. The *Xylt1* gene has a size of 286 kb and consists of 12 exons and 11 introns (**Figure 1A**). Because of its large size, it was difficult to totally delete it. Indeed, we chose to invalidate it by deletion of the exon1 and a part of the sequences of its promoter (**Figure 1B**). The XT-I gene was first isolated and cloned by integrating homology arms (loxP) covering all the exon1 and a part of the *Xylt1* promoter sequences. Once the vector construction was done, embryonic stem cells (ES) (totipotent cells) were transfected with the vector. The ES cells having integrated the vector were selected and amplified and then they were introduced into mouse blastocysts by microinjection. Then the embryos were replanted into surrogate mothers, giving rise to chimeric mice whose part of the cells derive from the internal cell mass of the embryo and another part of the cells derive from the modified ES cells. The chimeric mice whose gametes are derived from the ES cells were selected and they were crossed with mice carrying the Cre-recombinase, thus resulting in the deletion of an 18 kb region at the level of the XT-I gene. Finally, these mice are crossed with wild mice (having the invalidated XT-I gene) to obtain heterozygous XT-I mice (XT-I (+/-)) having a wild-type allele and an invalidated allele. These latter are mated with each other to obtain XT-I knockout mice (XT-I (-/-)) which are characterized in this study.

## **2. XT-I invalidation in mice cause neonatal / perinatal lethality**

In initial analysis of 15 postnatal (P15) day mice, Genotyping failed to detect XT-I knock-out mice suggesting an in utero or perinatal lethality. In further analysis, embryos are collected at different stage of embryonic development. At the embryonic day E14.5, most embryos XT-I knock-out were found at Mendelian ratio at this stage and they were all living (heart beat), it suggested that they die after this stage. The next time point of analysis was embryonic stage E18.5 which is just before birth. At this stage, all the embryos were subjected to viability test; most them was able to breath after a few minutes when placed on a hot plate at 37°C. Several XT-I knock-out fetuses were reactive to forceps but were unable to breathe (no cry upon stimuli). These fetuses died 30 minutes after delivery and displayed frontonasal hypoplasia. Their size was considerably smaller, and their air pinnae were reduced (**Figure 2A**). The timing of lethality represents an important clue to identify the underlying developmental defects resulting from the deletion of XT-I and consequently the biological function of this gene. Death can occur at the end of development prior the birth (fetal death) immediately at birth or within one day (neonatal death) or after the first day of postpartum life (postnatal death). In some complex cases of perinatal death, the genetic mutation or deletion can result

in fetal death as well as in neonatal death<sup>28-30</sup>. Analysis of embryos at E19.5 embryonic stage showed same results with E18.5 stage suggesting a perinatal lethality. Effectively one day within the birth some pups are found dead and some others were half cannibalized. Genotyping of these pups revealed they are XT-I Knock-out. The major events that represent life-threatening challenges to the newborn during the first 24h after birth namely parturition, breathing, suckling and neonatal homeostasis (309,314,315). Here, XT-I gene deletion leads to perinatal death of mice, due probably to breathing problems and XT-I KO mice display a pronounced frontonasal hypoplasia which can be the primary defect who leads a several physiological problems like breathing defects.

### **3. XT-I knock-out mice display dwarfism and skeletal defects**

To elucidate the role of XT-I in skeletal development and to circumvent the lethality of XT-I knock-out mice; embryos are collected at different stages of embryonic development (E13.5, E14.5, E15.5, E16.5, E18.5, and E19.5). Embryos analysis shows that XT-I knock-out embryos exhibit a small length than their wild-type littermates, display apparent frontonasal hypoplasia and reduced air pinnae (**Figure 2A**). At E14.5, embryos XT-I KO showed 11,09 % reduction of the whole-body length, and 14% reduction in humerus length. At E18.5 the length of XT-I KO embryos was 13.52 % reduced and their humerus was 28.11% reduced also (**Figure 2B, Figure 3**). In addition, whole skeletal staining of XT-I KO embryos and their littermates showed a smaller ribcage in XT-I KO embryos and early tooth formation (**Figure 2C**). XT-I KO embryos exhibit pronounced dwarfism and apparent frontonasal hypoplasia, thus reflecting abnormalities in skeletal development, du probably to a defect in endochondral ossification and in chondrogenesis, the both processes that allow growth.

### **4. Growth plate is shortened and expanded in XT-I KO mice**

To better understand the skeletal development defect in XT-I KO mice, 5µm sections were performed and stained with H&E. We showed marked shortening of the growth plate with severe disorganization in different constituent zones in XT-I KO mice (**Figure 4A, 4B**). Resting, proliferative and hypertrophic zones were markedly reduced at several embryonic stages studied here. At E18.5, we showed 24 % reduction in the length of resting zone, 60% reduction in proliferative zone and 57.6% reduction in hypertrophic zone showed in proximal forelimb growth plate (**Figure 4C, Figure 3B**). Hypertrophic zone was considerably decreased at E18.5 (57.6% reduction), however at E14.5, we observed a large hypertrophic zone in XT-I embryos, it was 15% larger than wild type hypertrophic zone (**Figure 3A**).

Primary ossification center formation occurs at E15.5, but before this step, hypertrophic zone forms and expands in the diaphysis at E14.5, this step used to allow the beginning of ossification. A largest zone at this stage suggests a premature maturation of chondrocyte that could lead an early ossification. In addition, the smaller or the thinner hypertrophic zone at E18.5 suggests that hypertrophic chondrocytes in XT-I mice at this stage mature more rapidly and are quickly replaced by osteoblasts and mineralized tissue. These results suggest an early ossification in XT-I KO mice which may be the origin of dwarfism. Proliferative zone in XT-I KO embryos was devoid of the characteristic flattened chondrocyte and their organization in columns at all embryonic stages. In addition, of the longitudinal proliferation, chondrocytes of this zone showed a horizontal proliferation (**Figure 4A2, 4B2**) that results an expanded growth plate which can leads a rhizomelic shortening of limb bones described by mis and al (2013) (306) in the pug mutant. These results suggest that XT-I deletion leads to a shortened and expanded growth plate with a pronounced disorganization in the zones of the plate. These findings suggest that XT-I play a critical role in promoting chondrocyte maturation, organization and ossification.

### **5. Chondrocyte proliferation is increased in XT-I KO embryos**

At high magnification, analysis of the growth plate revealed a higher cell density in XT-I KO embryos compared to wild-type littermates (**Figure 4A,4B**). Chondrocytes of different zones in XT-I KO embryos were highly packed and the number of chondrocytes was greater in XT-I KO embryos than the wild type. At E18.5 the number of resting zone chondrocytes was 56% higher compared to the XT-I WT resting zone (**Figure 5**). These results suggest an increased proliferative rate of XT-I KO embryonic chondrocytes in absence of XT-I. In addition of the higher density of cells, MEC was reduced in XT-KO embryos (**Figure 6A**). In XT-I WT growth plate, chondrocytes were separated by a condensed MEC however in XT-I KO growth plate, chondrocytes were tightly packed and showed less MEC between them (**Figure 5**). These results indicate that XT-I deletion leads to a defect in the MEC surrounding chondrocytes in XT-I KO embryos which suggest that the high proliferation was for compensate the lake of MEC. Since cell number homeostasis as well as the normal organization of the growth plate result directly from a balance between cell proliferation and maturation, and to make sure that the proliferation is higher in XT-I KO mice, we assessed proliferation rate of chondrocytes isolated from the hyaline costal cartilage by using CyQUANT NF Cell Proliferation kit. The test showed that the rate of proliferation in XT-I KO embryos was 84%, 88% and 76% higher than in the wild, after 24h, 48h and 72h of



culture respectively (**Figure 5**). This test indicates an increased proliferative rate of XT-I KO embryonic chondrocytes in absence of XT-I.

### **6. Decrease in proteoglycan synthesis in XT-I KO mice**

Histological analysis by Alcian Blue staining of XT-I KO and XT-I WT limb sections at different stages of embryonic development revealed a difference in staining intensity between XT-I KO and XT-I WT embryos (**Figure 6**). Indeed, we observed a strong reduction in Blue Alcian staining in XT-I KO embryos compared to XT-I WT embryos, thus indicating a lack of proteoglycan synthesis and a decrease in the synthesis of glycosaminoglycan chains caused by the invalidation of XT-I gene. We observed this decrease in the growth plate of the upper and lower limbs of embryos at different stages of embryonic development, suggesting a defect in MEC proteoglycan synthesis in XT-KO embryos growth plate.

### **7. Defect in proteoglycan processing in XT-I KO mice**

To test whether the deletion of *Xylt1* affect PGs processing, we analyzed sulfate incorporation in isolated costal chondrocytes as a measure of proteoglycan processing. We first digested the proteoglycan protein core with papain, then we precipitated and separated the proteoglycan samples with decreased concentration of CPC (5%, 1%, 0.5%) into low- density and high-density fractions. We showed a significant difference in the synthesis of glycosaminoglycan chains between XT-I KO and XT-I WT chondrocytes. The incorporation of sulfate occurred in low-density GAG chains fraction has been observed in XT-I WT chondrocytes even in the XT-I KO chondrocytes indicating that synthesis of short GAG chains was less affected by XT-I invalidation. However, we observed a strong decrease in sulfate incorporation occurred in the high-density GAG chains fraction in XT-I KO chondrocytes indicating an absence of high-density GAG chains synthesis in the XT-I KO chondrocytes, whereas it was important in the XT-I WT chondrocytes. These results indicate that XT-I invalidation induces a loss of anabolism of high-density GAG chains which may affect the function of PGs carrying long chains of GAG particularly those of the cartilage such as aggrecan the major proteoglycan of the cartilage matrix as well as all the signaling pathways in the growth plate in witch PGs are involved (**Figure 6**).

### **6. XT-I is less expressed in hypertrophic chondrocytes**

XT-I is mainly expressed in bone and nervous tissues (272,294). RNAscope analyses of *Xylt1* expression to verify the deletion of this gene in XT-I KO mice revealed that XT-I was not

expressed in XT-I mice KO growth plate and bones. However, XT-I was highly expressed in resting, proliferative and pre-hypertrophic zones but the expression was lesser in hypertrophic zone suggesting that hypertrophic chondrocyte don't express XT-I, and this later is probably implicated in chondrocytes differentiation (**Figure 7**).

#### **7. Sox9 expression is increased in XT-I KO mice and leads to increase ACAN and COL10A1 expression**

To understand the molecular mechanisms underlying defects in XT-I KO mice described above, we assessed the expression of Sox9 which is a key regulator transcription factor of early stage of chondrogenesis, it is expressed in resting, proliferative and prehypertrophic chondrocytes and required for the expression of MEC major constituents *Col2a1*, *ACAN* (29,33), and of the hypertrophic marker *Col10a1* expression (407). RNAscope analysis of *SOX9* expression in growth plate of E15.5 embryos showed an increased expression of *SOX9* in XT-I KO growth plate embryos (**Figure 8**) compared to their sibling WT. To test if *COL2A1*, *ACAN* and *COL10A1* expression were affected by the increased Sox9 expression, we analyzed the expression of these genes with RNAscope. Interestingly we showed an increased expression of *Col10a1* and *ACAN* in XT-I KO embryos compared to their littermates, however no significant difference in *Col2a1* expression (**Figure 8**). Sox9 is required for chondrocyte proliferation and survival and is necessary for chondrocyte hypertrophy<sup>36-38</sup>. The overexpression of Sox9 expression can be the cause of the increased proliferation showed above (**Figure 5**) in XT-KO embryos. The increased expression of *Col10a1* and the short hypertrophic zone showed before (**Figure 4**) indicate a premature maturation of chondrocyte in XT-KO embryos. These results indicate that XT-I is involved in different steps of chondrogenesis and can be a negative regulator of Sox9 transcription factor and genes regulated by Sox9 transcription factor.

#### **8. XT-I invalidation affect Ihh signaling**

Multiple signaling pathways regulates chondrogenesis and chondrocyte maturation in growth plate (310,400). *Ihh* a member of Hedgehog family is expressed in pre-hypertrophic chondrocytes and early hypertrophic chondrocytes (50), stimulates chondrocytes proliferation (62)and activates *Runx2* expression to initiate hypertrophy chondrocyte and osteoblasts differentiation (311). To test if XT-I invalidation alter *Ihh* signaling and chondrocyte maturation, we analyzed *Ihh* expression in growth plate at E15.5 and E18.5 embryonic stage development. We showed an increased expression of *Ihh* in XT-I KO growth plate embryos

compared to XT-I WT littermates (**Figure 9**). This overexpression of *Ihh* can be the origin of the increased proliferation showed before and can also accelerate chondrocyte maturation via *Runx2* expression stimulation. To check if overexpression in *Ihh* signaling could underlie the maturation defect in XT-I KO embryos via *Runx2* downstream signaling, we examined the expression of *Runx2* with RNAscope in situ Hybridization and we showed an increased expression of *Runx2* in XT-I KO growth plate embryos. XT-I KO invalidation leads to a defect in chondrocytes proliferation and maturation through *Ihh* overexpression and its downstream *Runx2* overactivation.

### **9. XT-I invalidation affect primary ossification center formation (POC)**

Alcian Blue humerus sections from XT-KO E14.5 embryos displayed a lengthening of hypertrophic region compared to XT-WT growth plate embryos (**Figure 2**), suggesting an earlier onset or accelerated progression of chondrocytes towards hypertrophy. At E18.5 a shortened hypertrophic zone in XT-I KO growth plate (**Figure 2**) indicating an accelerated differentiation of hypertrophic chondrocytes in osteoblast or an accelerated replacing of these matured chondrocytes by bone tissues, these results suggest an early formation of the primary ossification center in XT-I KO embryos. POC forms at E15.5 embryonic stage development, to test if the formation of POC in XT-I was premature, we stained E15.5 humerus sections with Alizarin Red (AR) which stain calcium deposits in mineralized tissues. No differences in AR staining were shown between XT-I KO and XT-I WT POC (**Figure 10**). However, when we stained humerus sections at E14.5 embryonic development, we showed a large mineralized region in XT-I KO embryos compared to their sibling XT-I WT embryos (**Figure 10**). In addition, RNAscope analysis of *SPP1* gene, which is expressed in late hypertrophic chondrocytes and in mineralized bone tissue, revealed an increased expression of this gene in XT-I KO embryos compared to their WT littermates (**Figure 10**). These findings suggest that XT-I invalidation affect POC mineralization and formation in mice.

### **10. XT-I gene deletion promotes secondary ossification center (SOC)**

While POCs of endochondral bones form at E15.5 during mouse embryonic development, SOC normally begin to form after birth around post-natal day 5–7. However, XT-I KO mice showed SOC formation during embryonic development. H&E staining of E18.5 fore limbs from XT-I KO embryos reveals enlarged cells within the epiphyseal cartilage regions, like hypertrophic chondrocytes found in the epiphyses during SOC formation in post-natal mice (**Figure 11**). At high power, the group of cells in the center of the epiphyses are distinct from

the round, resting chondrocytes surrounding them with their large cytoplasmic area (**Figure 11**). They also appear to be distinct from growth plate hypertrophic cells in that their nuclei are more condensed and total cell volume appears to be less; at high magnification, they resemble the hypertrophic chondrocytes in secondary ossification centers as shown by others in the literature (312,408). An important event in SOC formation is the appearance of cartilage canals, which bring vascularization to the epiphyseal region and, eventually, invading osteogenic cells. BA staining of E18.5 humerus sections displayed a cells group migrating from the perichondrium and invading the growth plate until reaching the SOC area indicating a formation of cartilage canals (**Figure 11**). These cells showed the same condensed nuclei of the cells in the center of the SOC, but they are different in the shape, in that are not enlarged like hypertrophic chondrocytes and interestingly they showed an increased BA staining suggesting an increased proteoglycan synthesis in these cells (**Figure 10**)

### **11. XT-I deletion affect FGF signaling trough MAPK and PKC**

FGF signaling plays a key role in regulating chondrocyte maturation. The most common achondroplasia in humans has been associated with an activating mutation at the FGFR3 receptor (82,327,328). We analyzed by RNAscope the expression of FGFR3 at the growth plate at different stages of embryonic development and we observed an overexpression of this receptor in XT-I KO embryos compared to XT-I WT embryos (**Figure 12A**). Then we examined the activation of the downstream signaling pathways by western blot and we found that overexpression of FGFR3 increased the phosphorylation of P-ERK, P-P38, P-AKT and P- PKC (**Figure 12B**). These results show that the defect in the expression of FGFR3 can be the cause of the early maturation of chondrocytes in XT-I KO mice through the P-ERK pathway which is involved in the terminal maturation of chondrocytes (79,136) and which is also involved in stimulating cell proliferation. The role of the PI3K-AKT pathway is to inhibit the activity of target molecules such as the forkhead box (FOXO1) class transcription factor, a pro-apoptotic effector, which is inactivated by AKT phosphorylation. AKT also activates the mTOR 1 complex stimulating cell growth and proliferation. This pathway may be responsible for increased proliferation in XT-I KO embryos in addition to the P-ERK pathway.

### **12. TGFβR2 signaling is impaired in XT-I KO mice**

The TGF $\beta$  superfamily is vitally important in all stages of embryonic chondrogenesis (310,409). Inhibiting TGF $\beta$  signaling during chondrogenesis by blocking TGF $\beta$ R2 expression alters chondrocyte differentiation and joint formation without affecting prior stages of chondrogenesis (16,190,313). We analyzed the expression of TGF $\beta$ R2 in E18.5 embryonic humerus sections with immunohistochemistry. We showed an overexpression of this receptor in XT-I KO embryos growth plate (**Figure13A**). When we assessed the activation of the downstream signaling of TGF $\beta$ R2 (smad2 and smad3) in cultured E18.5 chondrocytes with western blot, we found that overexpression of TGF $\beta$ R2 had affected the activation of smad2 and smad3, these two SmadR were over phosphorylated in XT-I KO chondrocytes compared to in XT-I WT chondrocytes (**Figure13B**). These results indicate that XT-I invalidation affect TGF $\beta$  signaling which can lead a defect in chondrogenesis described below in XT-I KO embryos.

## DISCUSSION

XT-I plays a key role in the biosynthesis of PGs. It catalyzes the initiation of the GAG chains synthesis by transferring xylose to serine residues of the protein core. Recently, several clinical studies have reported different mutations in XT-I gene which caused many skeleton development diseases in human.(304,305,402–406).

In 2013, Schreml et al (402) have reported a homozygous missense mutation in XT-I gene causing a short stature syndrome in two affecting siblings from a consanguineous Turkish family. The children displayed short stature, mild skeletal, distinctive facial features and moderate intellectual disability. In 2014, Bui et al (403) have identified *Xylt1* mutations in seven individuals from six families with Desbuquois dysplasia type II. All individuals presented severe pre-and postnatal short stature, flat face and prominent eyes, short extremities, dislocations with monkey wrench appearance of the femora, short long bones with metaphyseal widening, epiphyseal dysplasia and advanced carpal and tarsal ossification. In 2015, Koningsbruggen et al(404) have reported the first patient with compound heterozygous XYLT1 deletions, associated with a short limb skeletal dysplasia but without characteristic features of Desbuquois dysplasia type II. In 2016, three studies have associated mutations in *Xylt1* with Desbuquois dysplasia type II syndrome. Guo et al (406) have identified a novel and recurrent *Xylt1* mutation in two Turkish families. Jamsheer et al (405) have reported two novels heterozygous *Xylt1* mutations in a polish patient with growth hormone deficiency. Silvera et al (304) have showed another patient presenting a phenotype

compatible with DBQD-II in whom a homozygous mutation in *Xylt1* was identified. In 2017, Al-Jazawi et al (305) have identified a novel homozygous variant in *Xylt1* gene in an Emirati child of consanguineous parents.

The identification of *Xylt1* mutations in a several chondroplasias, supports a pivotal role of *Xylt1* during ossification and bone development process. In addition, the cellular and molecular mechanisms underlying disorders caused by the most of these mutations have not yet elucidated. In this study we investigated the role of XT-I in skeletal development by deletion of exon1 and a part of *Xylt1* promoter sequences in mice. XT-I invalidation lead to neonatal/ perinatal lethality and XT-I KO mice showed a pronounced dwarfism and a frontonasal hypoplasia. Skeletal analysis of embryos by Alcian Blue and Alizarin Red revealed a small rib cage, a severe decrease in limb length and short craniofacial phenotype in XT-I KO embryos. These results are compatibles with those demonstrated in pug mice described carrying a missense mutation in *Xylt1* (306).

Parturition, breathing, suckling and neonatal homeostasis are the major events that represent life-threatening challenges to the newborn during the first 24h after birth (309,314,315). Here, XT-I gene deletion leads to perinatal death of mice, due probably to breathing problems. Indeed, XT-I KO mice display a pronounced frontonasal hypoplasia which can be the primary defect who leads a several physiological problems like breathing defects. In this case we analyzed face sections of XT-I KO and XT-I WT to compare ethmoids and turbinates, two important structures of nose. No differences were found between XT-I KO and XT-I WT in these structures. XT-I KO showed also small rib cage compared to their littermates leading a compression of the lung cavity and causing probably the breathing defect (Results not shown). We should analyze XT-I KO lung sections to determine if breathing defects are caused by lung abnormalities development.

Dwarfism and a shortening limb in XT-I KO embryos reflect abnormalities in skeletal development du probably to a defect in endochondral ossification and chondrogenesis. Endochondral ossification is the process by which the most of bones of the body are formed. It begins with the condensation of mesenchymal stem cells, followed by the differentiation of these cells in chondrocytes which proliferate and become organized in four different zones, forming the growth plate. After vascular invasion of the cartilaginous element, the bone matrix is laid done and ossification centers are form (241,316). Histological analysis of limb growth plate in XT-I KO showed a shortened growth plate with reduced length of different zones and a higher cellular density in XT-I KO mice. These results indicate chondrogenesis defects in XT-KO mice. Indeed, when we assessed in vitro of the proliferation of XT-KO and

XT-I WT chondrocytes, we showed an increased proliferation of XT-I KO chondrocytes compared the XT-I WT chondrocytes. This result was confirmed by the increased activation of histone3 in XT-I KO chondrocytes assessed by western blot. The increased proliferation and the packed aspect of the chondrocytes in XT-KO embryos growth plate is due the lack of MEC contouring the chondrocytes caused by the XT-I invalidation.

The chondrocyte maturation was also affected in XT-I KO embryos. Indeed, the absence of XT-I is accompanied by dysregulation of several markers previously shown to be critical to the maturation process. Sox9 a general chondrogenesis marker, expressed in resting, proliferative, prehypertrophic chondrocytes (25,410). In contrary of the pug mice in which Sox9 was normally expressed (306), here we showed an increased expression of Sox9 in XT-I KO embryos compared to their WT littermates. Sox9 is a transcription factor of SRY related high mobility group box family of proteins, has essential role in successive steps of the chondrocyte differentiation (29,317). The increased expression of Sox9 in XT-I KO mice can affect all stages of chondrocytes differentiation. Indeed, Sox9 can induce the expression of *Col2a*, *ACAN* and *Col10a1* expression (29,32,33,407).

ACAN encodes chondrocyte specific matrix proteoglycan, it is expressed in the different zones of the growth plate. We assessed the expression of this gene by RNAscope and we showed an increased expression of this gene in XT-I KO embryos. However, we showed a decrease in *Col2a* expression, the specific chondrocyte collagen 2 which is expressed in resting, proliferative, pre-hypertrophic chondrocytes but not in hypertrophic chondrocytes. We showed also an increased expression of *Col10a1*, the marker of hypertrophic chondrocytes in XT-I KO mice. These results indicate that the XT-I KO invalidation affect chondrocytes maturation in all stages and suggest an early maturation of the hypertrophic chondrocytes. Also, strong expression of OPN, a marker of late hypertrophic and osteoblasts was observed in XT-I KO embryos, suggesting that acceleration of hypertrophy may induce an early bone development in XT-I KO mice.

Growth plate development is a tightly regulated process which involves several local and systemic molecules and divers signaling pathways(16,400). *Ihh* signaling plays a major role in chondrogenesis and chondrocyte maturation(49,411). The hypertrophic and pre-hypertrophic chondrocytes secrete *Ihh* which stimulates chondrocyte proliferation and *Runx2* synthesis in the perichondrium (62,311,412). *Runx2*, a runt domain transcription factor, plays a pivotal role in promoting chondrocyte hypertrophy, is initially expressed in chondrogenic mesenchyme after Sox9 expression(29,320), in the perichondral cells and in osteoblasts after cartilage anlage is formed and then expressed in the prehypertrophic chondrocytes. *Runx2*

initiates hypertrophic chondrocytes and loss of Runx2 leads to severely delayed chondrocyte maturation in developing bones(43,311,413). XT-I KO embryos showed an increased expression of Ihh and overexpression of RUNX2. This up regulation of Runx2 by Ihh in absence of XT-I lead to early chondrocyte hypertrophy described before in XT-I KO embryos. Runx2 expressed in the perichondrium is responsible of osteoblast differentiation, the increased expression of the Runx2 can lead also to an early ossification and POC formation. Indeed, at E14.5, XT-KO embryos showed an increased expression of SPP1 in contrary to the XT-WT embryos in which SPP1 expression was not detected indicating an early ossification in XT-I KO embryos. Mice missing Runx2 have no osteoblasts and a lack of hypertrophic chondrocytes. The hypertrophic chondrocytes that are present fail to mineralize their matrix and have decreased or absent expression of genes such as Osteopontin and MMP13 which are normally expressed by the late hypertrophic chondrocytes (38,414). Here XT-I KO embryos showed an increased expression of Osteopontin indicating an over mineralization of the matrix by the late hypertrophic chondrocytes which have undergo an early maturation caused by the overexpression of RUNX2.

In addition to IHH signaling, FGF signaling also regulates and controls growth plate development (327). An activating mutation at FGFR3 causes the most common achondroplasia in humans (328). FGFR3 is expressed in all growth plate chondrocytes except at the hypertrophic chondrocyte level with strong prehypertrophic chondrocyte expression, and activates several underlying signaling pathways, mainly STAT, MAPK, PI3K / AKT and PLC $\gamma$  / PKC (80,327). FGFR3 negatively regulates proliferation and differentiation, inhibits proliferation through STAT1 signaling (131) and activates terminal chondrocyte maturation through MAPK (79,132,136). XT-I KO embryos showed an increased expression of FGFR3 affecting the different downstream targets of this receptor. Mis et al 2013 (306) have reported also an increased expression of FGFR3 in pug carrying a missense mutation in XT-I gene but no changes in ERK activation have been shown in this mutant. In contrary of this study, XT-I KO embryos showed an increased activation and phosphorylation of ERK in costal chondrocytes due to the increased expression of FGFR3. Indeed, most short stature syndromes are caused by aberrant signaling via RAS/ERK pathway and four skeletal dysplasias associated with gain-of-function mutations in FGFR3, which activates the RAS/ERK pathway (102). According to this study, we supposed that the increased activation of P-ERK by the FGFR3 overexpression is the impaired signaling pathway leading to the dwarfism in XT-I KO embryos and causing several abnormalities skeletal development. Murakami et al 2000(329) showed that regulation of Sox9 gene by FGF is mediated by



MAPK proteins specifically by P-ERK1/2 signaling. XT-I KO embryos showed an increased Sox9 expression due probably to the up-activation of P-ERK in chondrocytes caused by the overexpression FGFR3. Constitutive activation of the MAP2K, MEK1, responsible for ERK activation caused persistence of proliferating chondrocytes and delayed hypertrophic maturation(132), whereas *in vitro* studies using pharmacological inhibition showed that ERK activation is required for chondrocyte hypertrophy (330). The increased activation of ERK via FGFR3 can be the impaired signaling pathway responsible of the defect maturation of chondrocytes showed before in XT-I KO embryos growth plate. Beier et al 1999 (331) demonstrated that c-Raf, MEK1/2, ERK1/2 are required for the normal expression of the collagen X which is marker for hypertrophic chondrocyte. According to this study, the increased Col10a1 in XT-I KO embryos is due probably to an Up-regulation by the increased activation of P-ERK.

Conversely to P-ERK up-regulation, P-P38 activation was reduced in XT-I KO embryos by the increased expression of FGFR3. Oh et al 1999 (415) showed that ERK1/2 and P38 have opposing role in the regulation of chondrogenesis.

We suggested that the increased FGFR3 expression in XT-I KO embryos is due to the alteration of FGF ligand binding and diffusion caused by the lack of PGs in the chondrocyte MEC. Indeed, XT-I KO limb embryos sections showed a decreased Alcian bleu staining indicating a lack of proteoglycans in XT-I KO growth plate and chondrocyte MEC. Two major classes of proteoglycans, HSPG and CSPG are highly expressed in chondrocyte MEC and have been shown to play a key role in regulating chondrocyte maturation (321,322). HSPGs are recognized to function as a potent cofactor for canonical FGF signaling pathways as well as a wide range of other signaling pathways including Ihh, Wnt and TGF $\beta$  signaling (416). Several studies showed that the signaling ability of all canonical FGFs require heparin or HSPGs as a cofactor. HSPGs induces the formation of ternary FGF-FGFR-HSPG complex, which activates the FGFR intracellular tyrosine kinase domain by phosphorylation of specific tyrosine residues. The activated receptor then initiates the intracellular signaling pathways (231,323–325). XT-I KO embryos showed a defect in proteoglycans processing. Indeed, we showed that XT-I invalidation have impaired the high-density GAG chains synthesis of the both HSPGs and CSPGs in chondrocyte. Then we conclude that the alteration in HSPGs synthesis caused a defect in the binding and the diffusion of the FGFs which caused the overexpression of the FGFR3 and altered the activation of their downstream targets in XT-I KO embryos.

XT-I KO embryos showed also an increased activation and phosphorylation of Akt caused by the defect in FGFR3 signaling. Prior et al 2006 (417) have reported that FGF does not activate Akt in chondrocyte and phosphorylation of Akt is downregulated after FGF treatment. Here we supposed that because of the lack of proteoglycans in XT-I KO chondrocytes, FGF fail to interact with FGFR3 and cause the increased activation of P-Akt. Kita et al 2008 (326) have reported that activation of Akt in embryonic chondrogenesis enhance chondrocytes proliferation and inhibit hypertrophic differentiation. The increased activation of P-Akt can contribute to the enhanced proliferation of chondrocytes in XT-I KO embryos. The inhibited hypertrophic differentiation by P-Akt demonstrated by (326) Kita et al 2008, was associated to a suppressed expression of Runx2. Whereas here, we showed an overexpression of Runx2 in XT-I KO embryos due to the overexpression of Ihh, then we supposed an interplay between these two pathways and presumably the Ihh signaling pathway is more important in hypertrophic differentiation process.

Another signaling pathway was affected in XT-I KO embryos due to the alteration in proteoglycan processing. Indeed, we showed an increased expression of TGF $\beta$ 2 in XT-I KO embryos growth plate leading to an increased activation of p-Smad2. Several studies showed that Betaglycan function as an accessory receptor for the TGF $\beta$ s and formally known as the type III TGF $\beta$  receptor (258,332). Bilandzic and Stenvers 2011 (418) described Betaglycan as a major determinant of cellular responsiveness to TGF $\beta$  superfamily members through its roles in ligand presentation and the regulation of signaling receptor trafficking. Betaglycan contains two types of GAG chains, HS and CS chains. In addition, proteoglycans such as decorin, biglycan, and fibromodulin regulate TGF- $\beta$  activity by sequestering TGF- $\beta$  in ECM (419). XT-I KO embryos showed a defect in the processing in the both types of GAG chains leading to a defect function in PGs carrying these chains like the Betaglycan leading to an increased expression of TGF $\beta$ 2 and up regulation of their downstream targets.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **1. Mouse strains and genotyping**

All animal experiments were approved by the ethical committee for animal research of Lorraine region and conducted based on the state guidelines from the ministry of higher education and research of France. During acclimatization and experiments, the animals were

kept in standard conditions of temperature ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and light controlled environment (12h light/12h dark cycle), with free access to water and food. XT-I KO mice were obtained from “Institut Clinique de la Souris”. This model was generated by deletion 10.5 kb (promoter and exon1) in *Xylt1* gene by homologous recombination. To obtain XT-I KO mice we have crossed XT-I heterozygote females and XT-I heterozygote males and embryos were collected at different developmental stages.

For genotyping of littermates, genomic DNA was extracted from the tail shippets using two solution of extraction buffer (solution 1: 25mM NaOH, 0,2mM  $\text{NA}_2\text{EDTA}$  ph12, solution 2: 40mM Tris-HCL ph5). Genotyping was performed according to “Institut Clinique de la Souris” protocol. Sequences of four primers used to specifically amplify *Xylt1* gene and Loxp sequences. Ef/Wr for the 5' part of target locus of the wild type allele (Ef: 5'ctcattccatggtgaacacggg 3', Wr: 3'gctcttcattcattcacatgtcctcatcacc 5'), Ef2/Lxr for Loxp specific sequences (Ef2:5'acagaatttcagcatatcaacatgatc 3', Lxr: 3'gaagtatactgagcggccggtcac 5'). The results were interpreted according of the size of the PCR product. XT-I KO (364 pb), XT-I WT (404 pb) and XT- I heterozygote (364 pb and 404 pb).

## **2. Skeletal staining**

Embryos were dissected and fixed overnight in 96% ethanol. Cartilage elements of skeletons were stained in 0.03% Alcian Blue dye (0.03g Alcian Blue (8GX, Sigma) dissolved in 80 ml 95% ethanol and 20 ml glacial acetic acid). Skeletons were washed twice with 95% ethanol and then placed in 1.5% KOH until the remaining soft tissues were dissolved. Bones/mineralized tissues were stained in 2% Alizarin Red (100 ml 1% KOH, 0,02% Alizarin Red (Sigma)) for 4h and cleared in 0,8% KOH in 20% glycerol solution for 24h, then 0.5% KOH glycerol solution for 48h. Finally, embryonic skeletons were stored in a 50% glycerol, 50% ethanol solution.

## **3. Histological analysis and staining**

XT-I KO embryos and their wild littermates were collected at different embryonic stages at E14.5, E16.5 and E18.5. Their limbs were dissected independently of each other and were fixed at room temperature for 24h in 10% formalin. Then, they were dehydrated with a series of ethanol baths (70%, 90%, 100%) and then passed through a toluene bath before they were embedded in paraffin. Sections of 5 $\mu\text{m}$  sections were cut using the Leica microtome and stained with Blue Alcian (Sigma), Hematoxylin (RAL), Alizarin Red (Sigma), Safranin-O (Sigma) and rouge Sirius.

#### **4. RNAscope**

The RNAscope assay was performed on 5 µm formalin-fixed, paraffin-embedded embryonic tissue sections using the 2.5 HD-Brown kit (Advanced Cell Diagnostics; ACD) according to the manufacturer's instructions. Briefly, embryonic sections were deparaffinized with xylene and 100% ethanol and were incubated with hydrogen peroxide and Target Retrieval reagents (ACD) for 10 min and 15 min, respectively. After incubation in Protease Plus reagent (ACD) for 15 min at 40°C, the slides were then hybridized with a specific probes (mM-Xylt1, mM-Xylt2, mM-Col2a1, mM-Col10a, mM-ACAN, mM-Sox9, mM-Runx2, Mm-Ihh, Mm-Pthrp, Mm-Gli1, Mm-FGFR3, Mm-TGFβR2), positive control probe PPIB and negative control probe DapB in the HybEZ oven (ACD) at 40 °C for 2 h. The PPIB probe for housekeeping gene PPIB was used as a control to ensure RNA quality. After hybridizations, slides were subjected to signal amplification using HD 2.5 detection Kit (ACD), and hybridization signal was detected using a mixture of DAB solutions A and B (1:1). After counterstaining with hematoxylin, slides were mounted with Pertex (Histolab) and analyzed using the DMD 108 microscope (Leica).

#### **5. Immunohistochemistry**

Immunohistochemistry reactions were performed with the Dako Envision kit. 5µm sections of XT-I KO embryonic Limbs and their littermates deparaffinized in tissue clear and in a series of ethanol (100%, 95%, 70% then they were incubated in citrate solution (10 mM, PH6) overnight. The sections were then blocked in BSA solution (2%) after incubation for 10 minutes with Dual Endogenous Enzyme Block (1 drop per section). After three washings with TBST (0.5 mol / l Tris HCl, 1.5 mol / l NaCl, 0.5% Tween 20), the sections were incubated with optimal dilutions of specific primary antibodies (FGFR3, TGFBR2, phospho-ERK) for 60 min at room temperature. and incubated for 30 min with the Labelled-polymer-HRP secondary antibody. Then the slides were revealed with DAB (for each 1ml of DAB Buffer substrate, a drop of chromogenic DAB). After counterstaining with hematoxylin, the slides are mounted and analyzed with Leica DMD 108 microscope.

#### **6. Primary chondrocytes culture**

The primary chondrocytes were prepared from embryonic ribs according to the method described by Gosset and colleagues in 2008 (307). Briefly, the embryos were collected at the embryonic stage E18.5, eviscerated and washed with sterile PBS (1X). Then the chest cages

were isolated and cleaned of all soft tissue and placed in a 6-well plate (one chest per well). After two washes with sterile PBS (1X), 2 ml of collagenase D solution (3 mg / ml) (Roche Diagnostic) was added to each well and incubated for 45 minutes at 37 ° C. Then they were transferred to a new 6-well plate and 2 ml of collagenase D (0.5 mg / ml) were added and the cages were incubated overnight at 37 ° C. were passed through a 10 ml pipette and then 5 ml to disperse the cell aggregates and suspend the isolated cells. After centrifugation at 0.4 g for 10 minutes, a wash with PBS (1X) was performed and the pellet was dissolved in 5 ml of DMEM medium (1 g/L of glucose) supplemented with 10% (v/v) FCS (heat-inactivated for 30 min at 56 °C), 2µm L-glutamine (Gibco), 100µg/ml penicillin, and 100 U/ml streptomycin, the chondrocytes were cultured in T75 at 37 ° C in and 5% Co2 and the medium was changed every three days.

## **7. Proliferation test**

The proliferation of XT-I WT and XT-I KO chondrocytes was assessed using the CyQUANT NF dye Cell proliferation kit (Invitogen). The chondrocytes were cultured in 96-well plates in triplicate of 1x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>4</sup> and 3x10<sup>4</sup> cells / well. The DNA intercalant, CyQUANT NF dye was first diluted 1 / 500<sup>th</sup> in HBSS buffer (1X) and then 100µl of the solution was added to each well. Then the chondrocytes were incubated for one hour at 37 ° C and the fluorescence intensity of each sample was measured using Varioskan Flash (Thermo Scientific) with excitation at 485 nm, and emission and detection at 530 nm.

## **8. Antibody and western blot analysis**

Embryonic costal chondrocytes were seeded in a 6-well culture plate and treated or not as indicated in the figure legends. Total protein was extracted using lysis buffer (reference: 9603, Cell signaling Technology) and concentration was determined by Bradford method (420). 20 µg of total protein was separated by SDS-PAGE and transferred onto the PVDF immobilon membrane (Millipore) then incubated overnight at 4°C with appropriate primary antibodies: anti-phospho-ERK and ERK (1:1000, Cell signaling Biotechnology), phospho-Smad2, phospho-Smad3 and Smad2/3 (1:1000, Cell Signaling Technology), phospho-P38 and p38 (1:1000, Sigma) and β-actin (1: 6000, Sigma-Aldrich) used as loading control. The protein bands were visualized by chemiluminescence using chemiluminescence luminol reagent (Bio-Rad).

## **9. RNA extraction and real time PCR**

Total RNAs were isolated from the chondrocytes using RNeasy plus mini kit® (Qiagen, Germany) according to manufacturer's instructions. 500 ng of total RNA were mixed with 4 µl of SuperMix (iScript™ Reverse transcription supermix for RT-QPCR (BIO-RAD)) and supplemented with water RNAses free for a final volume of 20 µl. The mixture is incubated at 25 ° C. for 5 min and then at 46 ° C. for 20 minutes. minutes and finally at 95 ° C for 1 min. The synthesized cDNAs are used directly for PCR or stored at -20 °C.

Real time PCR was performed by the Step One Plus (Applied Biosystems, France) technology using specific primers and iTAQ SYBRgreen master mix system (Biorad, France). All reagents used for RT-PCR were added at the concentrations recommended by the manufacturer (primer concentration was 500 nM each). Melting curve was performed to determine the melting temperature of the specific PCR products and the amplification were performed for maximum of 40 cycles. The mRNA levels of the gene of interest and of the *Ribosomal Protein 29 (RPS29)*, chosen as housekeeping gene were determined in parallel for each sample. Quantification was determined using the  $\Delta\Delta C_t$  method and the results were expressed as fold expression over the control.

## 10. Statistical analysis

Data were collected from at least three mice of each genotype (n=3) from independent litters and presented as average with standard error of the mean. Statistical analysis was performed using GraphPad PRISM and Student t test was used to determine the level of statistical significance.

## References

1. Muir, H. Proteoglycans of cartilage. **15**
2. Kjellen, L. Proteoglycans: Structures and Interactions. **33**
3. Couchman, J. R. Transmembrane Signaling Proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 89–114 (2010).
4. Iozzo, R. V. & Schaefer, L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* **42**, 11–55 (2015).
5. Prydz, K. & Dalen, K. T. Synthesis and sorting of proteoglycans. **13**
6. Knudson, C. B., Nofal, G. A., Pamintuan, L. & Aguiar, D. J. The chondrocyte pericellular matrix: a model for hyaluronan-mediated cell-matrix interactions. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 142–147 (1999).

7. Melrose, J., Shu, C., Whitelock, J. M. & Lord, M. S. The cartilage extracellular matrix as a transient developmental scaffold for growth plate maturation. *Matrix Biol.* **52–54**, 363–383 (2016).
8. Rojas, F. P. *et al.* Molecular Adhesion between Cartilage Extracellular Matrix Macromolecules. *Biomacromolecules* **15**, 772–780 (2014).
9. Sasisekharan, R., Shriver, Z., Venkataraman, G. & Narayanasami, U. Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 521–528 (2002).
10. Wight, T. N. & Merrilees, M. J. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ. Res.* **94**, 1158–1167 (2004).
11. van Horsen, J., Wesseling, P., van den Heuvel, L. P., de Waal, R. M. & Verbeek, M. M. Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer’s disease and amyloid-related disorders. *Lancet Neurol.* **2**, 482–492 (2003).
12. Hashimoto, S. *et al.* Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 3094–3099 (1998).
13. Schwartz, N. B. & Domowicz, M. Chondrodysplasias due to proteoglycan defects. *Glycobiology* **12**, 57R-68R (2002).
14. Hall, B. K. & Miyake, T. The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat. Embryol. (Berl.)* **186**, (1992).
15. Olsen, B. R., Reginato, A. M. & Wang, W. BONE DEVELOPMENT. 32 (2000).
16. Long, F. & Ornitz, D. M. Development of the Endochondral Skeleton. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a008334–a008334 (2013).
17. Kronenberg, H. M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332–336 (2003).
18. Goldring, M. B., Tsuchimochi, K. & Ijiri, K. The control of chondrogenesis. *J. Cell. Biochem.* **97**, 33–44 (2006).
19. Kozhemyakina, E., Lassar, A. B. & Zelzer, E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development* **142**, 817–831 (2015).
20. Eames, B. F. *et al.* Mutations in fam20b and xytl1 Reveal That Cartilage Matrix Controls Timing of Endochondral Ossification by Inhibiting Chondrocyte Maturation. *PLoS Genet.* **7**, e1002246 (2011).
21. schreml *et al.* The missing ‘link’: an autosomal recessive short stature syndrome caused by a hypofunctional XYLT1 mutation. *Hum. Genet.* **133**, 29–39 (2014).
22. Bui, C. *et al.* XYLT1 mutations in Desbuquois dysplasia type 2. *Am. J. Hum. Genet.* **94**, 405–414 (2014).

23. van Koningsbruggen, S. *et al.* Complete and partial XYLT1 deletion in a patient with neonatal short limb skeletal dysplasia. *Am. J. Med. Genet. A.* **170A**, 510–514 (2016).
24. Jamsheer, A. *et al.* Exome sequencing reveals two novel compound heterozygous XYLT1 mutations in a Polish patient with Desbuquois dysplasia type 2 and growth hormone deficiency. *J. Hum. Genet.* **61**, 577–583 (2015).
25. Silveira, C., Leal, G. F. & Cavalcanti, D. P. Desbuquois dysplasia type II in a patient with a homozygous mutation in *XYLT1* and new unusual findings. *Am. J. Med. Genet. A.* **170**, 3043–3047 (2016).
26. Guo, L. *et al.* Novel and recurrent XYLT1 mutations in two Turkish families with Desbuquois dysplasia, type 2. *J. Hum. Genet.* **62**, 447–451 (2017).
27. Al-Jezawi, N. K., Ali, B. R. & Al-Gazali, L. Endoplasmic reticulum retention of xylosyltransferase 1 (XYLT1) mutants underlying Desbuquois dysplasia type II. *Am. J. Med. Genet. A.* (2017). doi:10.1002/ajmg.a.38244
28. Turgeon, B. & Meloche, S. Interpreting Neonatal Lethal Phenotypes in Mouse Mutants: Insights Into Gene Function and Human Diseases. *Physiol. Rev.* **89**, 1–26 (2009).
29. Papaioannou, V. E. & Behringer, R. R. Early Embryonic Lethality in Genetically Engineered Mice: Diagnosis and Phenotypic Analysis. *Vet. Pathol.* **49**, 64–70 (2012).
30. Ward, J. M., Elmore, S. A. & Foley, J. F. Pathology Methods for the Evaluation of Embryonic and Perinatal Developmental Defects and Lethality in Genetically Engineered Mice. *Vet. Pathol.* **49**, 71–84 (2012).
31. Mis, E. K. *et al.* Forward genetics defines Xylt1 as a key, conserved regulator of early chondrocyte maturation and skeletal length. *Dev. Biol.* **385**, 67–82 (2014).
32. Götting, C., Kuhn, J., Zahn, R., Brinkmann, T. & Kleesiek, K. Molecular Cloning and Expression of Human UDP-d-Xylose: Proteoglycan Core Protein  $\beta$ -d-Xylosyltransferase and its First Isoform XT-II. *J. Mol. Biol.* **304**, 517–528 (2000).
33. Condac, E. *et al.* Polycystic disease caused by deficiency in xylosyltransferase 2, an initiating enzyme of glycosaminoglycan biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 9416–9421 (2007).
34. de Crombrughe, B., Lefebvre, V. & Nakashima, K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 721–728 (2001).
35. Akiyama, H. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* **16**, 2813–2828 (2002).
36. Dy, P. *et al.* Sox9 Directs Hypertrophic Maturation and Blocks Osteoblast Differentiation of Growth Plate Chondrocytes. *Dev. Cell* **22**, 597–609 (2012).
37. Green, J. D. *et al.* Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering. *Genes Dis.* **2**, 307–327 (2015).



38. Vortkamp, A. *et al.* Regulation of Rate of Cartilage Differentiation by Indian Hedgehog and PTH-Related Protein. *Science* **273**, 613–622 (1996).
39. Long et al. Direct requirement for Ihh signaling in chondrocyte proliferation. *10* (2001).
40. Kim, E.-J. *et al.* Ihh and Runx2/Runx3 Signaling Interact to Coordinate Early Chondrogenesis: A Mouse Model. *PLoS ONE* **8**, e55296 (2013).
41. Davoli, M. A. *et al.* Enzymes active in the areas undergoing cartilage resorption during the development of the secondary ossification center in the tibiae of rats aged 0-21 days. II. Two proteinases, gelatinase B and collagenase-3, are implicated in the lysis of collagen fibrils. *Dev. Dyn.* **222**, 71–88 (2001).
42. Lee, E. R. *et al.* Enzymes active in the areas undergoing cartilage resorption during the development of the secondary ossification center in the tibiae of rats ages 0-21 days: I. Two groups of proteinases cleave the core protein of aggrecan. *Dev. Dyn.* **222**, 52–70 (2001).
43. Ornitz, D. M. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 205–213 (2005).
44. Xie, Y., Zhou, S., Chen, H., Du, X. & Chen, L. RECENT RESEARCH ON THE GROWTH PLATE: Advances in fibroblast growth factor signaling in growth plate development and disorders. *J. Mol. Endocrinol.* **53**, T11–T34 (2014).
45. Rousseau, F. *et al.* Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* **371**, 252–254 (1994).
46. Minina, E., Kreschel, C., Naski, M. C., Ornitz, D. M. & Vortkamp, A. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP Signaling Integrates Chondrocyte Proliferation and Hypertrophic Differentiation. *Dev. Cell* **3**, 439–449 (2002).
47. Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A. & Basilico, C. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 233–247 (2005).
48. Cleary, M. A., van Osch, G. J. V. M., Brama, P. A., Hellingman, C. A. & Narcisi, R. FGF, TGF- $\beta$  and Wnt crosstalk: embryonic to in vitro cartilage development from mesenchymal stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **9**, 332–342 (2015).
49. Seo, H.-S. & Serra, R. Deletion of Tgfbr2 in Prx1-cre expressing mesenchyme results in defects in development of the long bones and joints. *Dev. Biol.* **310**, 304–316 (2007).
50. Spagnoli, A. *et al.* TGF- $\beta$  signaling is essential for joint morphogenesis. *J. Cell Biol.* **177**, 1105–1117 (2007).
51. Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. & de Crombrughe, B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* **22**, 85–89 (1999).
52. Hattori, T. *et al.* SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development* **137**, 901–911 (2010).

53. Akiyama, H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod. Rheumatol.* **18**, 213–219 (2008).
54. Bell, D. M. *et al.* SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat. Genet.* **16**, 174–178 (1997).
55. St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. & McMahon, A. P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* **13**, 2072–2086 (1999).
56. Kobayashi, T. PTHrP and Ihh in chondrocytes. 10
57. Long, F. Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* **131**, 1309–1318 (2004).
58. Akiyama, H. Interactions between Sox9 and -catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* **18**, 1072–1087 (2004).
59. Komori, T. *et al.* Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. *Cell* **89**, 755–764 (1997).
60. Yoshida, C. A. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev.* **18**, 952–963 (2004).
61. Otto, F. *et al.* Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell* **89**, 765–771 (1997).
62. Inada, M. *et al.* Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev. Dyn.* **214**, 279–290 (1999).
63. Ornitz, D. M. & Itoh, N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **4**, 215–266 (2015).
64. Li, C. A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 35–44 (1999).
65. Murakami, S. Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev.* **18**, 290–305 (2004).
66. Krejci, P. *et al.* Bisindolylmaleimide I Suppresses Fibroblast Growth Factor-mediated Activation of Erk MAP Kinase in Chondrocytes by Preventing Shp2 Association with the Frs2 and Gab1 Adaptor Proteins. *J. Biol. Chem.* **282**, 2929–2936 (2007).
67. Murakami, S., Kan, M., McKeehan, W. L. & Crombrughe, B. de. Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 1113–1118 (2000).

68. Provot, S. *et al.* A-Raf and B-Raf Are Dispensable for Normal Endochondral Bone Development, and Parathyroid Hormone-Related Peptide Suppresses Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation in Hypertrophic Chondrocytes. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 344–357 (2008).
69. Beier, F., Taylor, A. C. & LuValle, P. Raf signaling stimulates and represses the human collagen X promoter through distinguishable elements. *J. Cell. Biochem.* **72**, 549–557 (1999).
70. Oh, C.-D. *et al.* Opposing Role of Mitogen-activated Protein Kinase Subtypes, Erk-1/2 and p38, in the Regulation of Chondrogenesis of Mesenchymes. *J. Biol. Chem.* **275**, 5613–5619 (2000).
71. Cortes, M., Baria, A. T. & Schwartz, N. B. Sulfation of chondroitin sulfate proteoglycans is necessary for proper Indian hedgehog signaling in the developing growth plate. *Development* **136**, 1697–1706 (2009).
72. Koziel, L., Kunath, M., Kelly, O. G. & Vortkamp, A. Ext1-Dependent Heparan Sulfate Regulates the Range of Ihh Signaling during Endochondral Ossification. *Dev. Cell* **6**, 801–813 (2004).
73. Lin, X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* **131**, 6009–6021 (2004).
74. Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D., Leder, P. & Ornitz, D. M. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* **64**, 841–848 (1991).
75. Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G. & MacArthur, C. A. Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. *J. Biol. Chem.* **271**, 7 (1996).
76. Zhang, X. *et al.* Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family: THE COMPLETE MAMMALIAN FGF FAMILY. *J. Biol. Chem.* **281**, 15694–15700 (2006).
77. Ornitz, D. M. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *BioEssays* **22**, 108–112 (2000).
78. Priore, R., Dailey, L. & Basilico, C. Downregulation of Akt activity contributes to the growth arrest induced by FGF in chondrocytes. *J. Cell. Physiol.* **207**, 800–808 (2006).
79. Kita, K., Kimura, T., Nakamura, N., Yoshikawa, H. & Nakano, T. PI3K/Akt signaling as a key regulatory pathway for chondrocyte terminal differentiation. *Genes Cells* **13**, 839–850 (2008).
80. López-Casillas, F. *et al.* Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* **67**, 785–795 (1991).
81. Wang, X.-F. *et al.* Expression cloning and characterization of the TGF- $\beta$  type III receptor. *Cell* **67**, 797–805 (1991).

82. Bilandzic, M. *et al.* Loss of Betaglycan Contributes to the Malignant Properties of Human Granulosa Tumor Cells. *Mol. Endocrinol.* **23**, 539–548 (2009).
83. Hildebrand, A., Border, W. A. & Ruoslahti, E. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor. 8
84. Gosset, M., Berenbaum, F., Thirion, S. & Jacques, C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat. Protoc.* **3**, 1253–1260 (2008).
85. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. 7

### Figure legends:

**Figure 1:** *Xylt1* gene and XT-I KO mice generation. **A)** Genomic organization of the XT-I gene. Exons and introns structure of the *Xylt1* gene on chromosome 7. *Xylt1* gene is composed of 12 exons and 11 introns, Exons are denoted by boxes and black horizontal bar denote introns, the translation initiation codon ATG and the termination codon stop are marked by arrows. **B)** Locus target in XT-I gene invalidation. XT-I KO mice were generated by deletion of exon 1 and a part of sequence of *xylt1* promotor sequences resulting deletion of 18.5 kb of *Xylt1* gene sequences.

**Figure 2 :** XT-I/KO mice display dwarfism and frontonasal Dysplasia. **A)** XT-I KO embryos at different embryonic stages (E14.5, E16.5, E18.5) show an overall reduction in body size. **B)** Graphs showing relative body length of XT-I KO mice compared to their WT littermates at E14.5 and E18.5 stages, values are normalized such that control body length are set to 100%. At early embryonic stage E14.5, XT-KO embryos shows 11,09% reduction in whole body length. At late embryonic stage E18.5, embryos show 13,51% reduction in whole body length. **C)** E16.5 Embryos whole body; red= bone marked by alizarin red staining; blue= cartilage marked by Alcian bleu staining. E16.5 XT-I KO embryos show a frontonasal Dysplasia with flat midface (yellow circle) and skull dysplasia with narrow rib cage (red square).

**Figure 3: Reduced length of the humerus and of the hypertrophic zone in XT-I KO embryos.** **A)** Sections through humerus at E14.5 stage stained with Blue Alcian. Humerus and hypertrophic zone length are represented by black arrow. Graphs showing a decreased of

14 % in humerus length and an increase of 15% in hypertrophic zone in E14.5 XT-I KO embryos compared to their WT littermates . **B)** E18.5 humerus stained with Alizarin Red and Blue Alcian indicating a reduced humerus length in XT-I KO embryos (yellow arrow). E18.5 proximal humerus growth plate section stained with Alcian Blue showing a short hypertrophic zone in XT-I KO embryos (red arrow). Graphs indicating a diminished of 28,11% and 56,6% in humerus length and hypertrophic zone length respectively in E18.5 XT-I KO embryos.

**Figure 4: The growth plate is disturbed and shortened in XT-I KO.** HES stained sections of E15.5 humerus proximal growth plate, show a shortened growth plate in XT-I KO embryos (**B**) compared to their littermates wild-type (**A**) with smaller, disorganized and hypercellular zones, Resting zone (**A1,B1**), proliferative zone (**A2,B2**), hypertrophic zone (**A3,B3**). **C)** Graphs showing resting, proliferative, hypertrophic zone length of XT-I KO embryos compared to their WT littermates at E18.5. XT-I KO resting zone shows 24% reduction length, proliferative zone shows 60% reduction length, hypertrophic zone shows 57,6% reduction length

**Figure 5: Increased proliferation in XT-I KO embryos.** XT-I KO growth plate showed a high cellular density, graph **A** shows an increased resting chondrocytes number in XT-I KO embryos. Graph **B** represent the chondrocyte proliferation rate assessed with CyQUANT NF Cell Proliferation kit, XT-I KO embryos showed an increase of 84% in chondrocyte proliferation compared to their littermates XT-I WT after 24h of culture.

**Figure 6: Defect in proteoglycan synthesis in XT-I KO embryos.** **A)** Decreased proteoglycan synthesis in XT-I KO embryos. Sections of proximal humerus growth plate at stages indicated, stained with Blue Alcian which marks GAG chains. XT-I KO embryos showed a strong reduction of Blue Alcian staining compared to their WT littermates indicating a decreased GAG chains synthesis leading to a lack of chondrocyte MEC at several development stages. **B)** Gel electrophoresis of Radiolabeled proteoglycans and GAGs chains extracted from costal primary chondrocytes of XT-I KO embryos and controls. PGs with high molecular Weight are less in XT-I KO chondrocytes than in chondrocytes XT-I WT. **C)** Incorporation rate <sup>35</sup>S-sulfate into GAG chains in XT-I KO embryos was less than their WT littermates.

**Figure 7:** *Xylt1* expression assessed by RNAscope on sections of proximal humerus growth plate in XT-I KO and XT-I WT embryos at E18.5. No expression signal of *Xylt1* is detected in XT-KO growth plate. In XT-I WT embryos growth plate, XT-I gene is expressed in the all growth plate zones with a less expression in hypertrophic zone

**Figure 8:** Sections through humerus at the indicated stages, showing RNAscope in situ hybridization for probes as indicated and counterstained with hematoxylin. XT-I KO embryos showing an increase of Sox9 expression leading to an increased expression of Col10a1 a hypertrophic marker and of ACAN the major proteoglycans in growth plate. No significant decreased Col2a1 expression in XT-I KO embryos.

**Figure 9: Impaired Ihh signaling in XT-I KO embryos.** E15.5 humerus sections showing RNAscope in situ hybridization for Ihh and Runx2 probes. XT-I KO embryos displaying an increased expression of Ihh leading to an up-regulation of his short downstream signaling, Runx2.

**Figure 10: XT-I invalidation promotes POC formation in mice. A)** Paraffin-embedded Humerus sections at indicated stages, stained with Alizarin Red which marks mineralized tissues. At E14.5, XT-I KO embryos shows a larger mineralized region (Black bar) compared to XT-I WT embryos. At E15.5, XT-I KO embryos displays an increased Alizarin red staining in the POC region. **B)** E18.5 humerus sections showing RNAscope in situ hybridization for SPP1, a late hypertrophic chondrocyte and bone tissue marker. XT-I KO embryos display an increased expression of SPP1 compared their WT sibling.

**Figure 11: Early SOC formation in XT-I KO embryos.** Proximal Humerus growth plate sections of XT-I KO embryos at E18.5. Col2a1 RNAscope in situ hybridization shows a group of cells with a large cytoplasmic area in the center of the epiphyses, distinct from the round, resting chondrocytes surrounding them. H&E staining shows a larger cell with more condensed nuclei distinct from growth plate hypertrophic chondrocytes. Alcian Blue staining

displays a group of cells migrating from the perichondrium and invading the growth plate until reaching the SOC area indicating a formation of cartilage canals.

**Figure 12: XT-I invalidation affect FGF signaling through an increased FGFR3 expression .** **A)** Sections through humerus at the indicated stage showing RNAscope in situ hybridization for FGFR3 probe, counterstained with hematoxylin (grey-blue). FGFR3 expression is increased in XT-I KO embryos compared to their WT littermates, an increased expression maintained through embryonic development stages . **B)** Increased FGFR3 expression result in an impaired FGF signaling pathways. P-ERK, P-P38, P-AKT, P-PKC proteins levels in XT-I WT and XT-I KO costal chondrocytes were assessed by western blot. Actin was used as loading control. The blots were stripped and re-probed with regular antibodies to detect the total amount of the respective proteins. P-ERK and P-AKT are up-regulated by FGFR3 increased expression however P-P38 and P-PKC are down regulated

**Figure 13 : TGF $\beta$ 2 signaling is impaired in XT-I KO embryos.** **A)** E18.5 humerus section from XT-I KO and XT-I WT embryos showing immunohistochemical analysis of TGF $\beta$ 2 expression. TGF $\beta$ 2 is highly expressed in XT-I KO embryos compared to their WT littermates. **B)** Increased TGF $\beta$ 2 expression result in an increased TGF $\beta$  signaling pathways as evidenced by the increased proteins levels of P-Smad2 and P-Smad3 assessed by western blot in XT-I KO primary chondrocytes compared to XT-I WT primary chondrocytes. Actin was used as loading control. The blots were stripped and re-probed with regular antibodies to detect the total amount of the respective proteins.

Figure 1

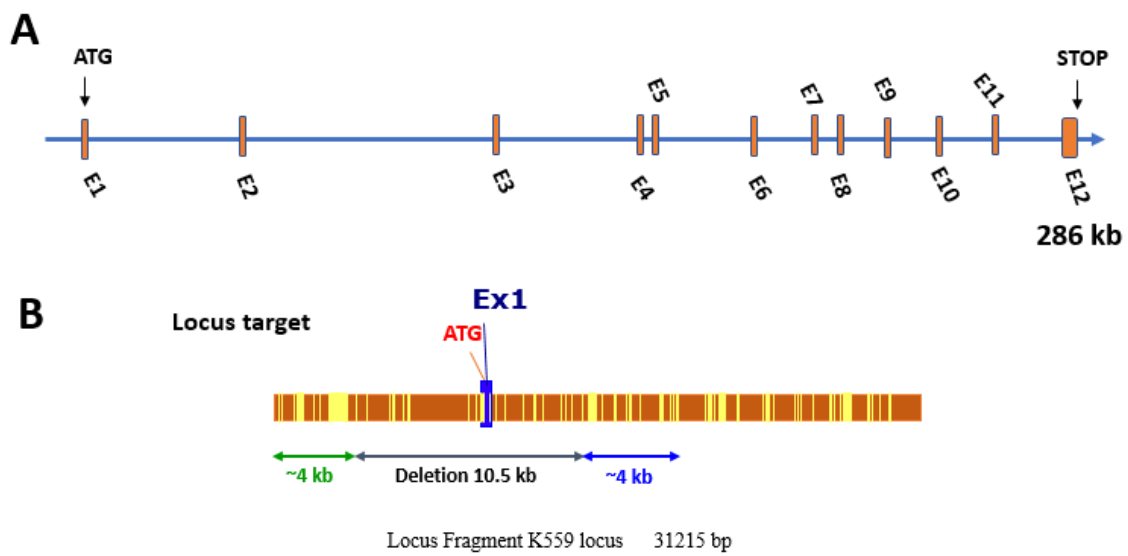




Figure 2

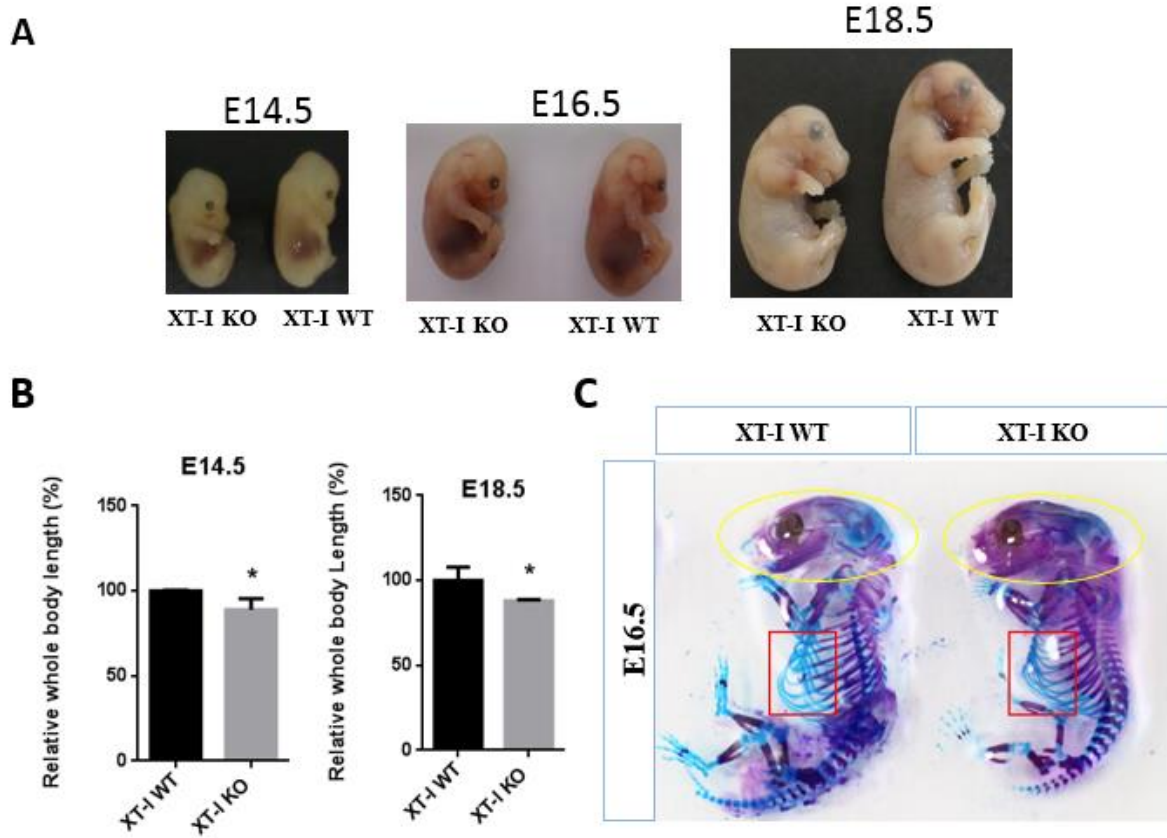


Figure 3

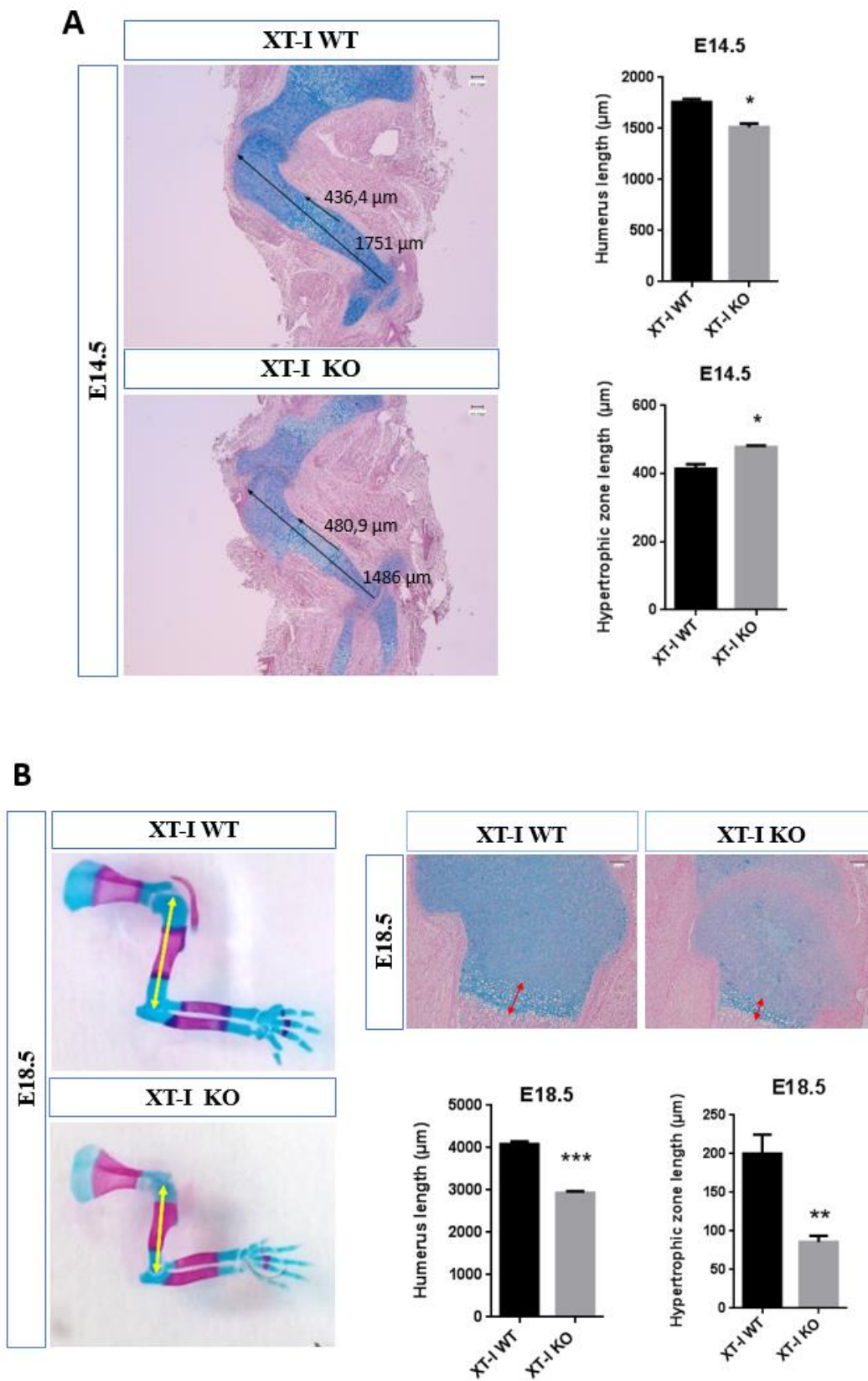


Figure 4

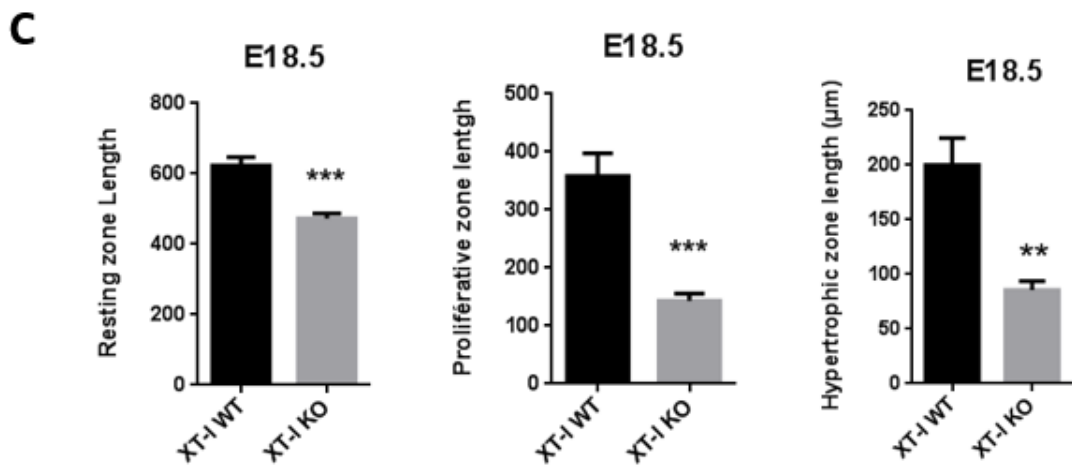
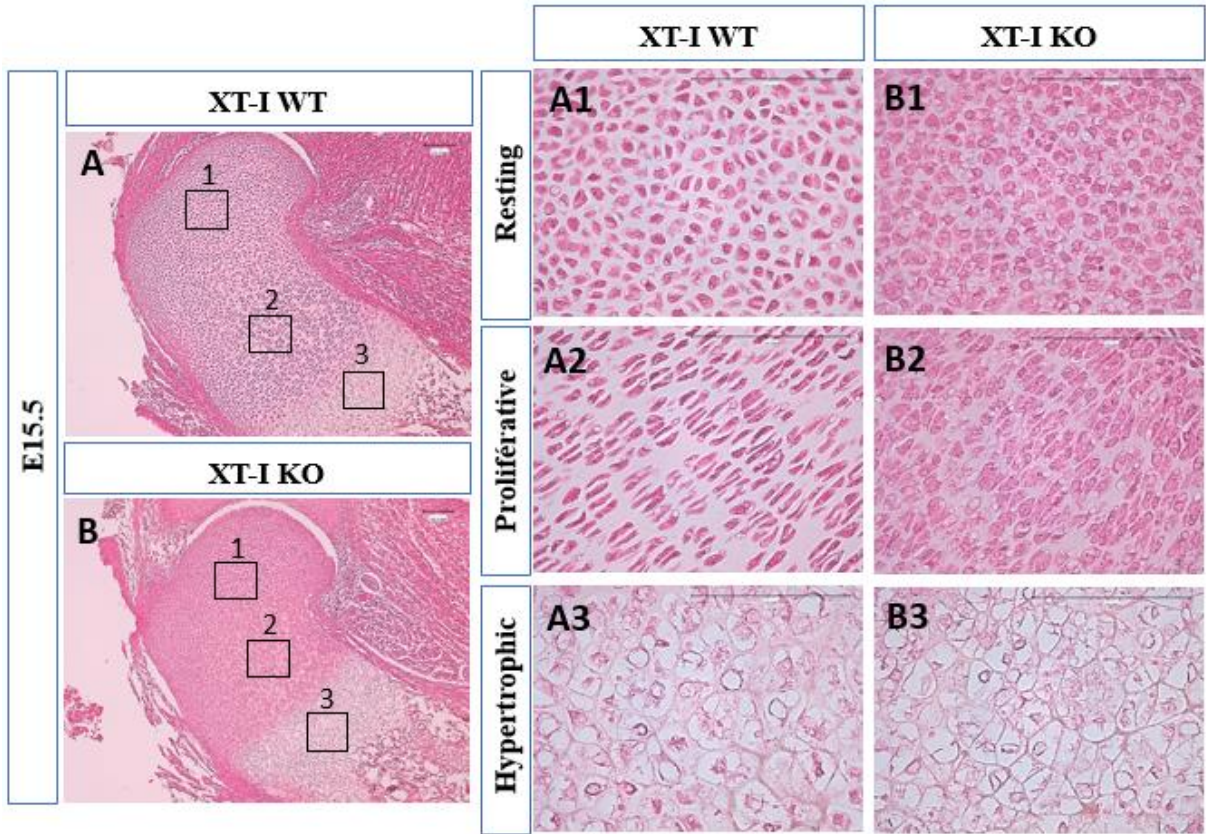


Figure 5

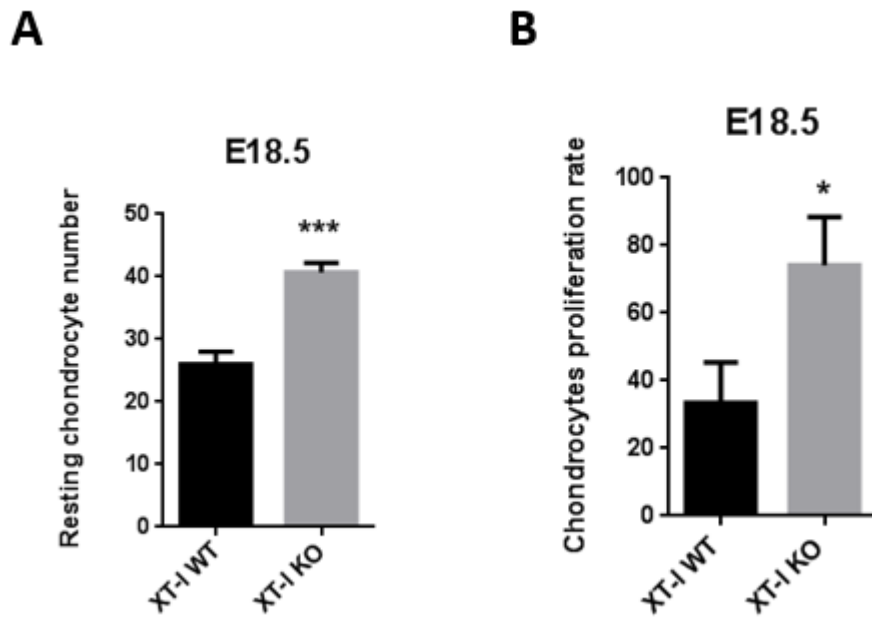
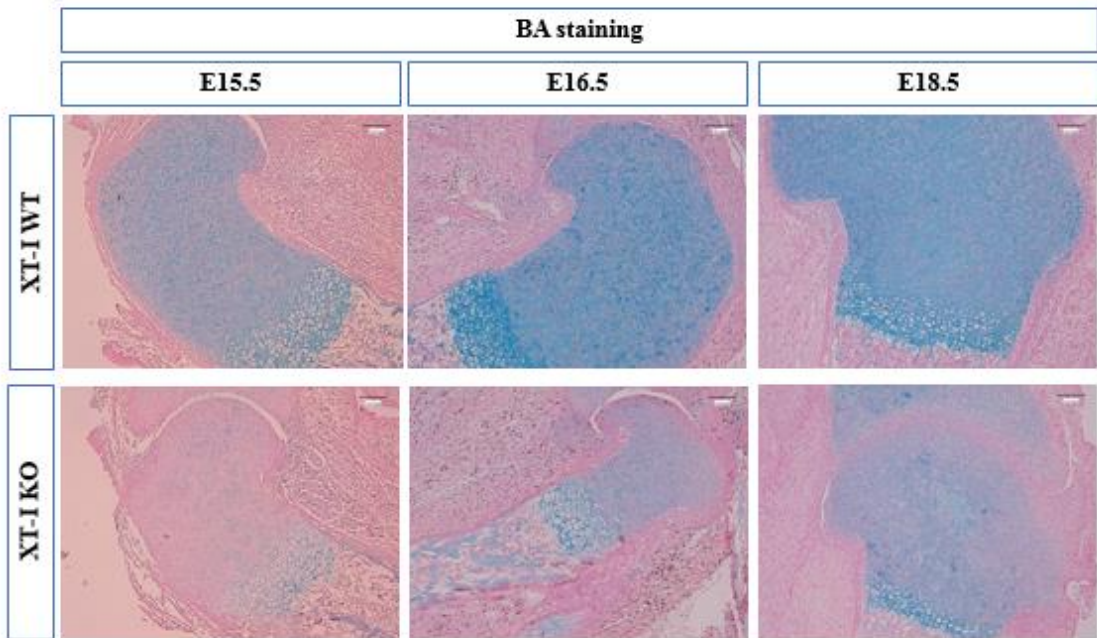
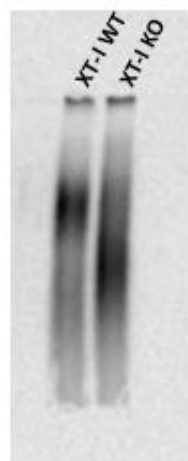


Figure 6

A



B



C

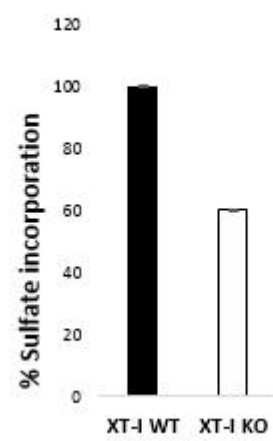


Figure 7

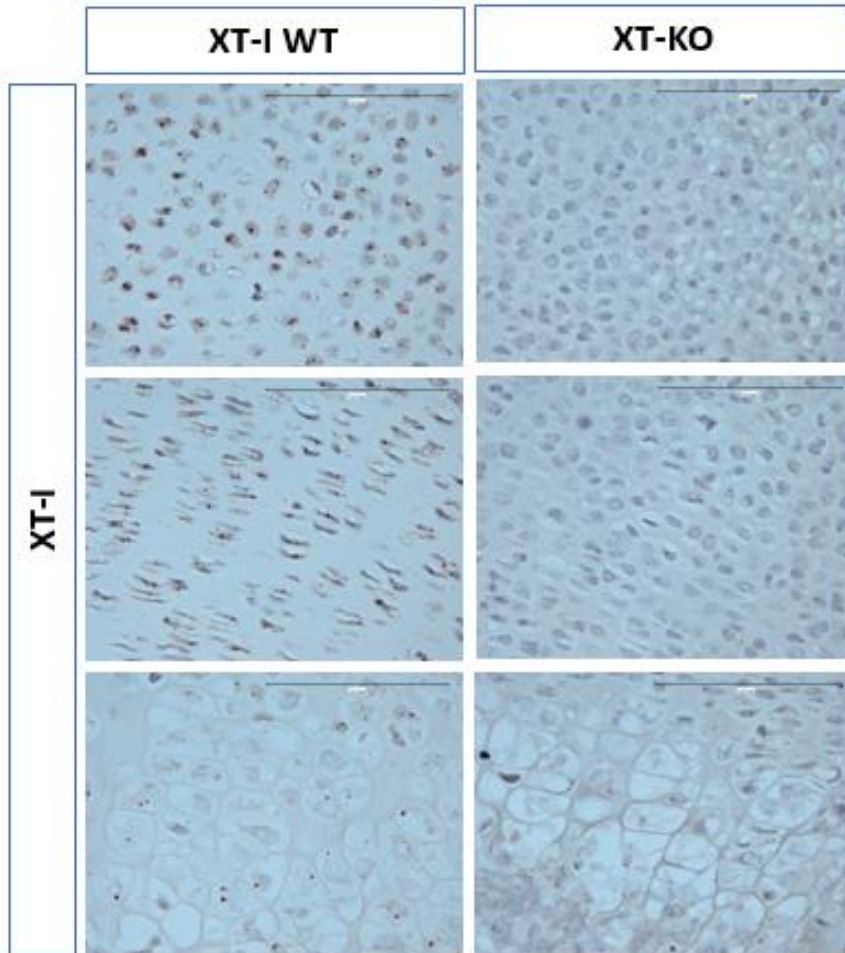
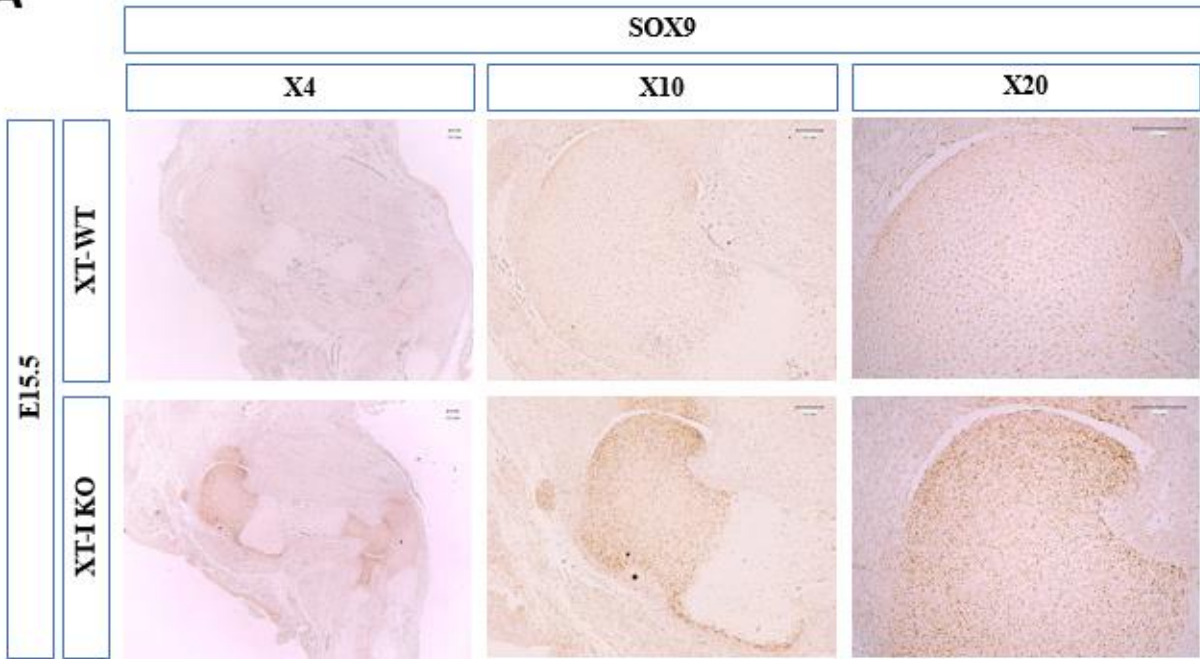
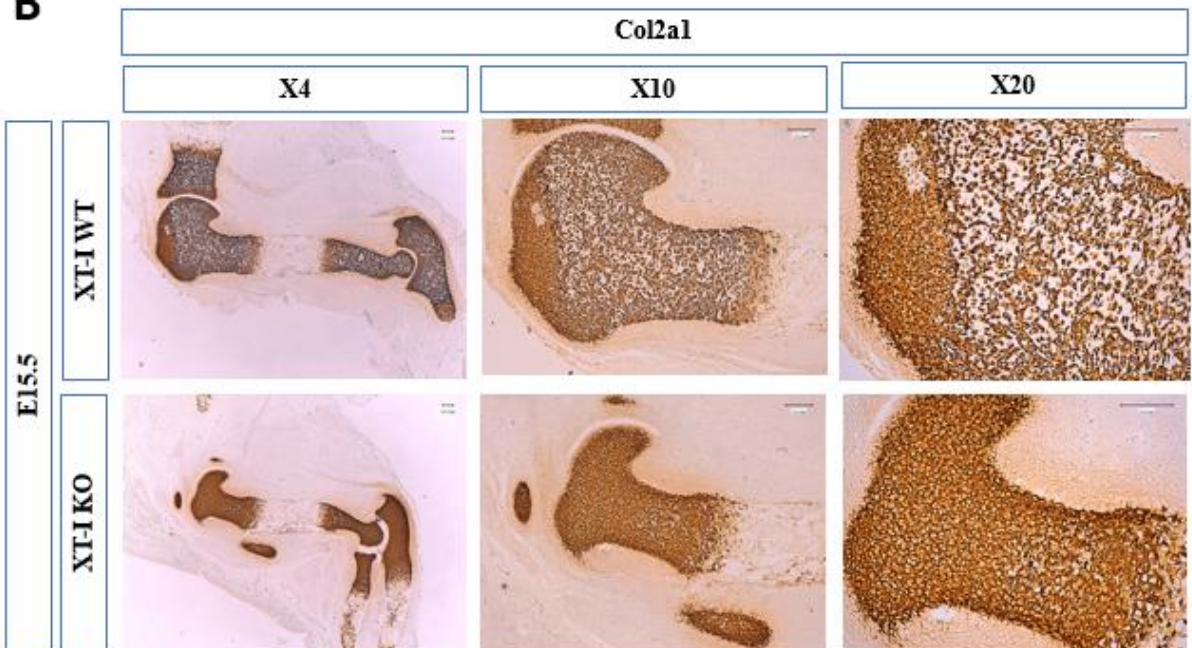


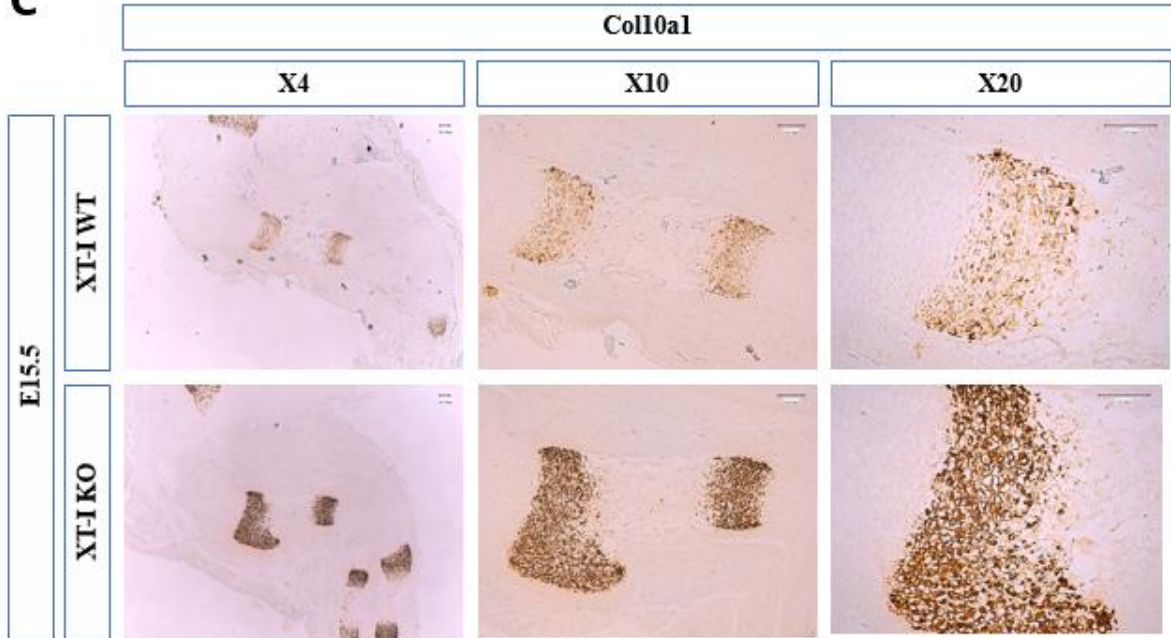
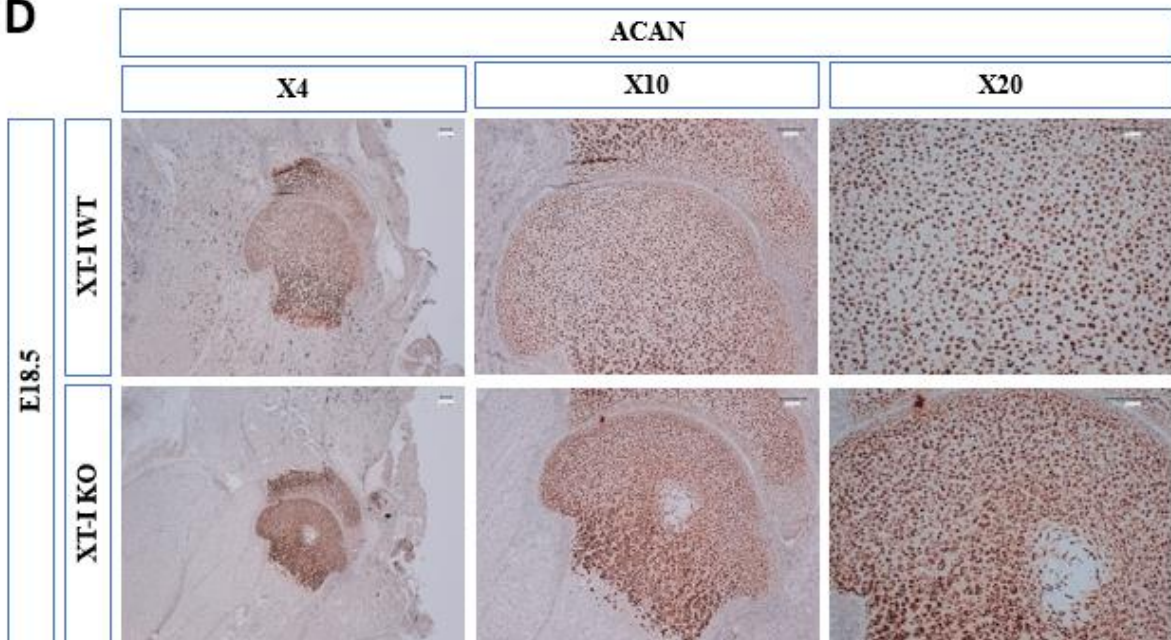
Figure 8

**A**



**B**



**C****D**



**Figure 9**

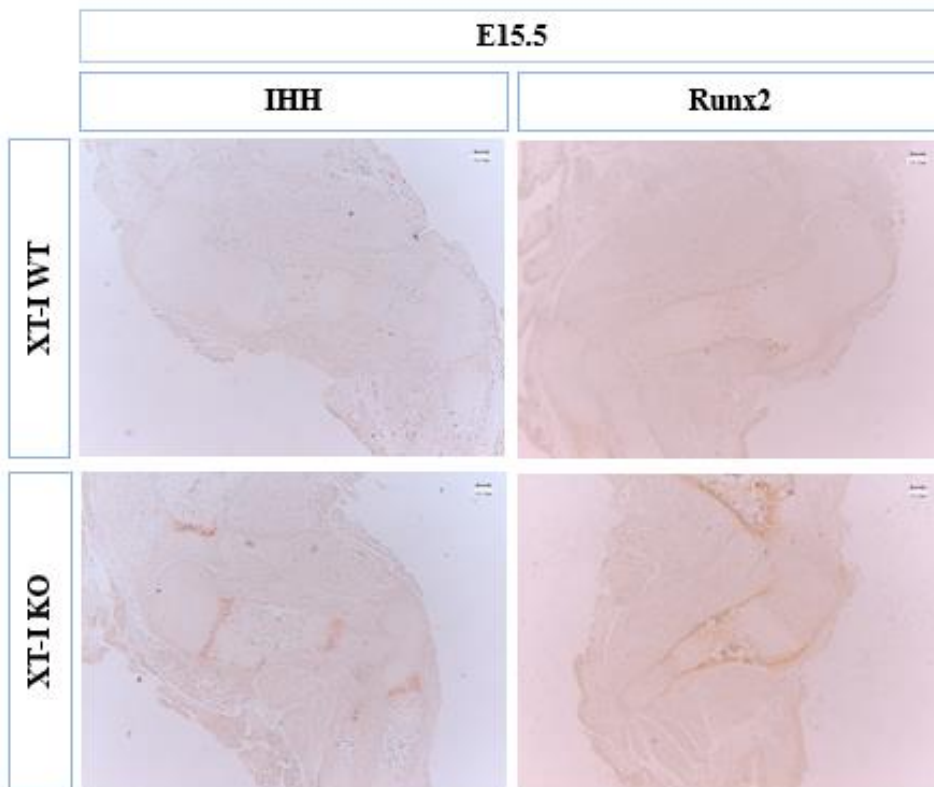


Figure 10

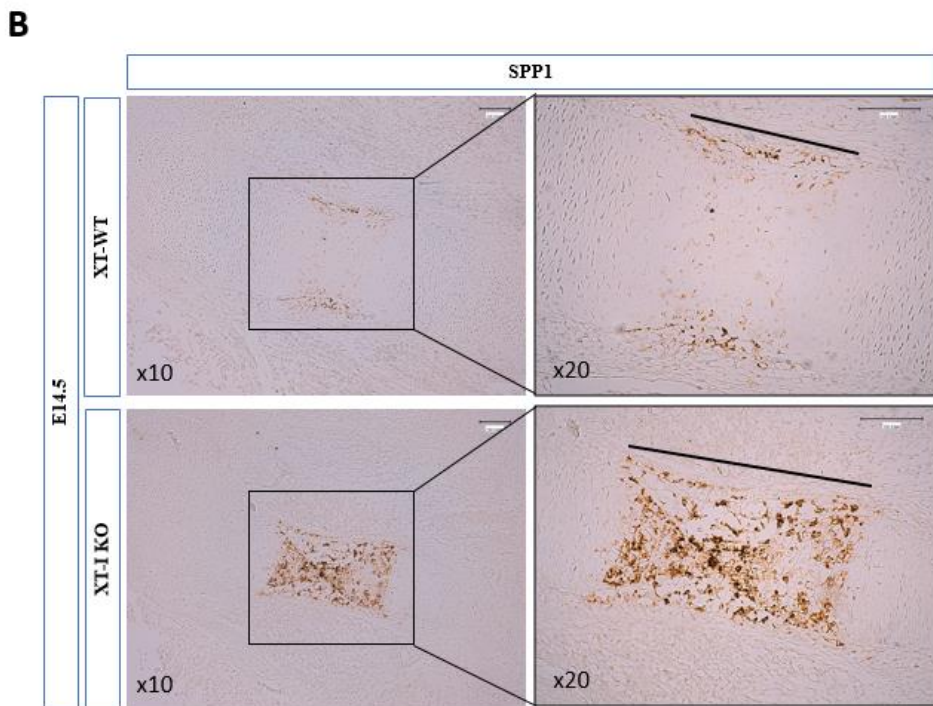
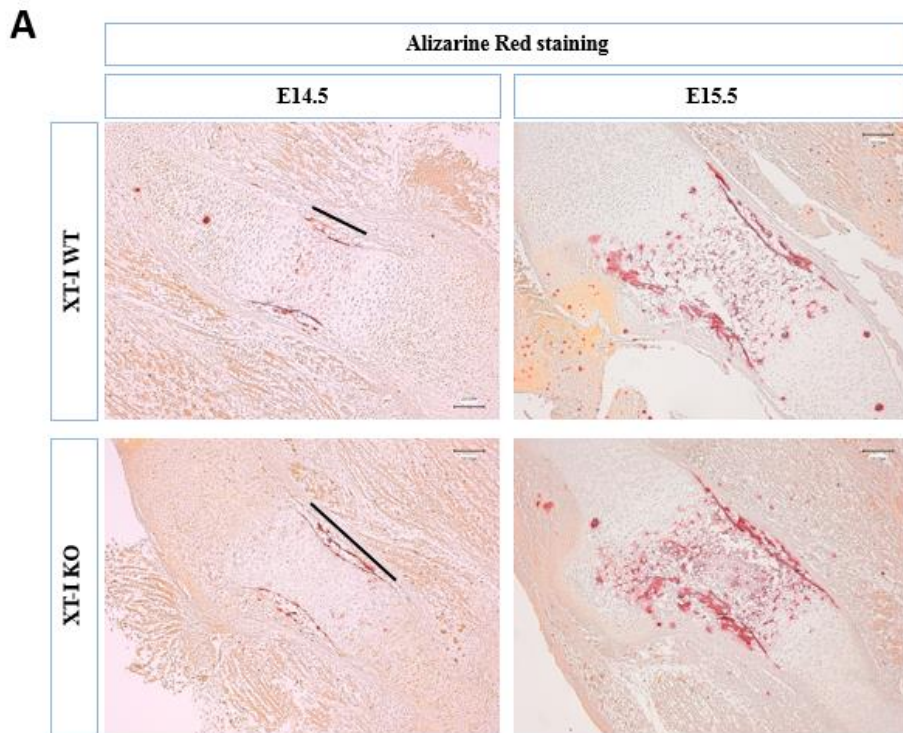


Figure 11

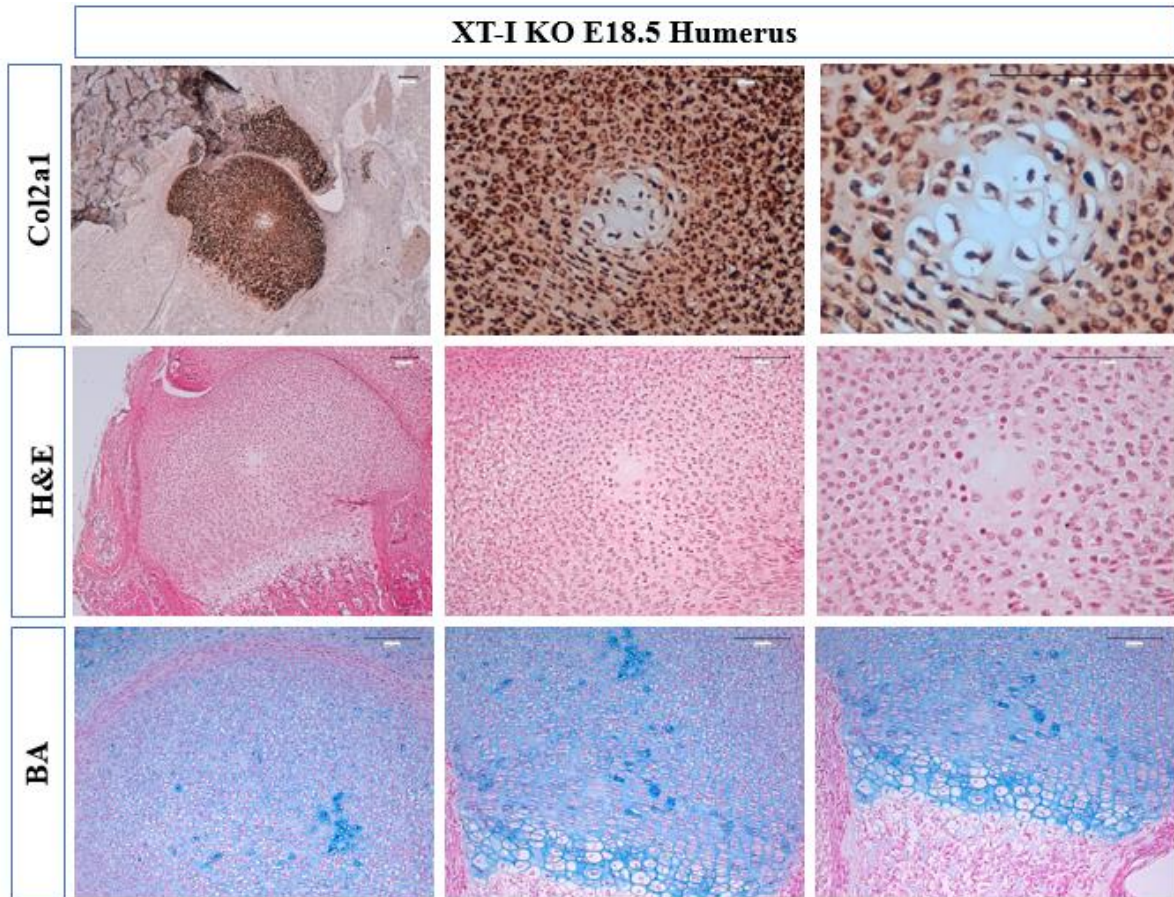


Figure 12

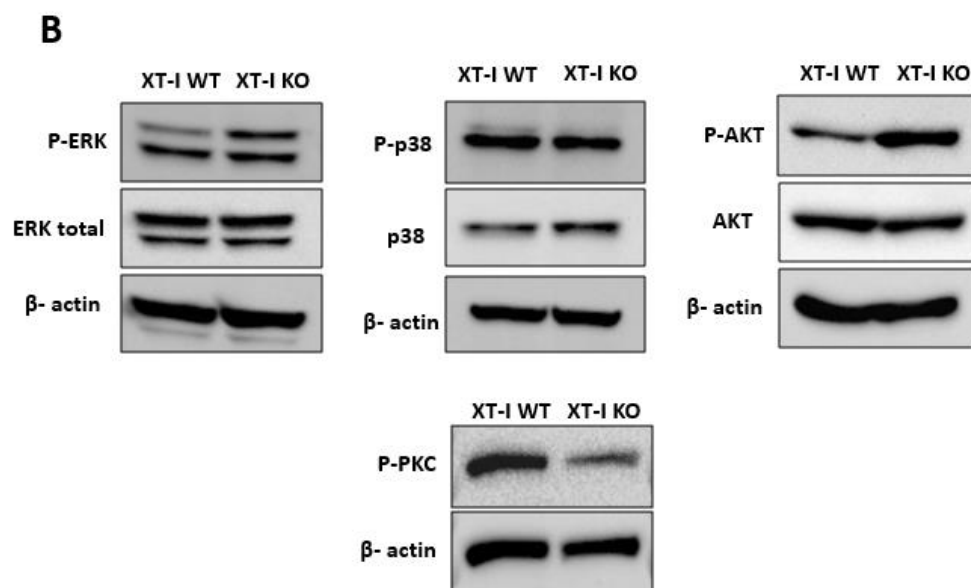
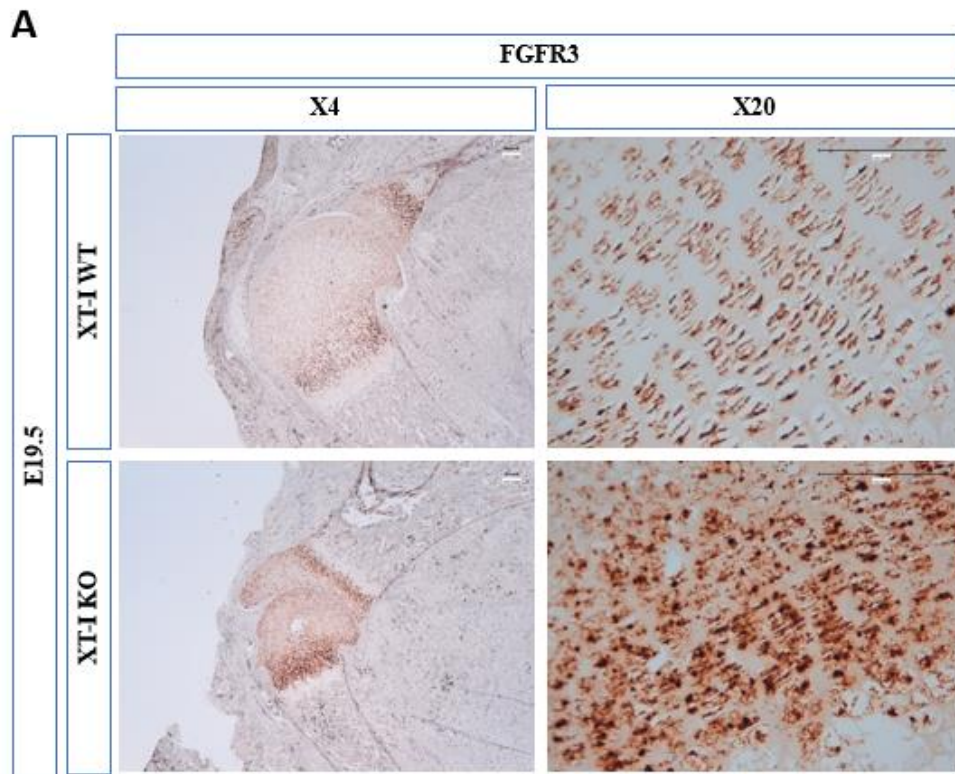
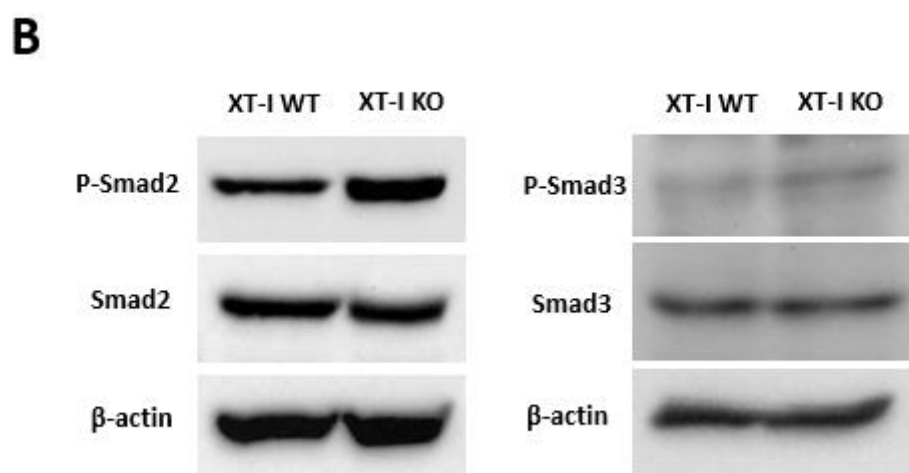
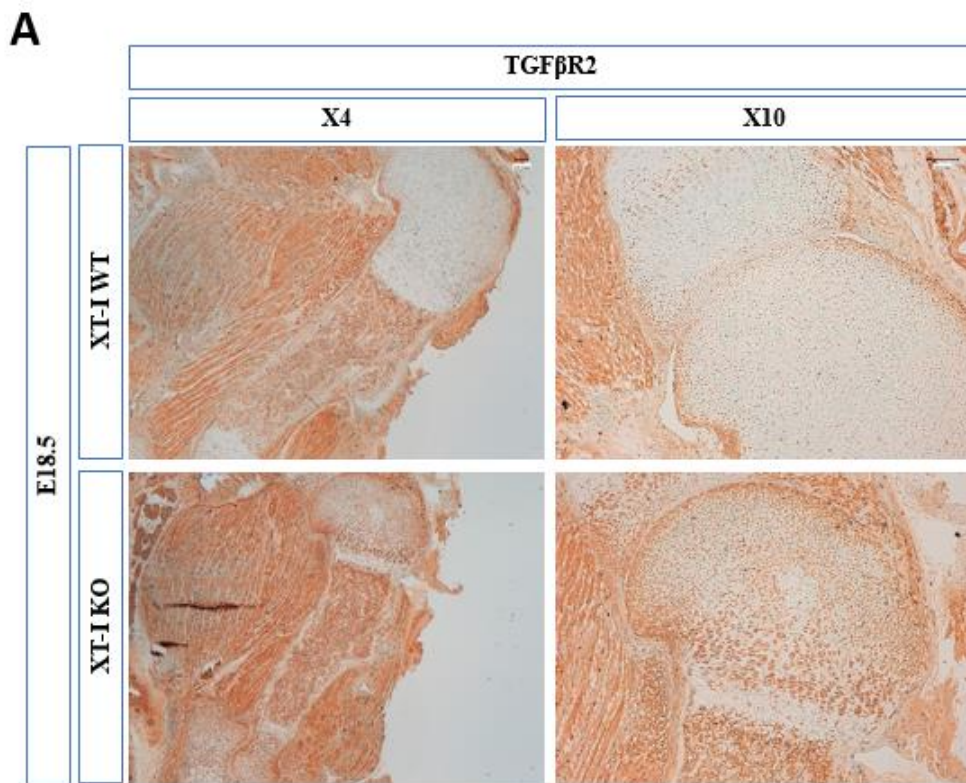


Figure 13



**Résumé :** Les protéoglycanes (PGs) jouent un rôle essentiel dans plusieurs processus physiologiques majeurs tels que la signalisation cellulaire, la prolifération et la migration ; ceci grâce aux interactions entre leurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs) avec des médiateurs solubles et leurs récepteurs. L'initiation de la synthèse des chaînes de GAGs des PGs est catalysée par la xylosyltransférase I (XT-I). Récemment plusieurs études ont montré différentes mutations au niveau du gène de la XT-I associées au syndrome Desbuquois de type II, caractérisée des anomalies ostéoarticulaires. Afin d'étudier le rôle de la XT-I dans le développement ostéoarticulaire, nous avons généré des souris invalidées pour le gène de la XT-I (XT-I KO). L'analyse morphologique des embryons montre que les souris XT-I KO présentent un nanisme prononcé et une hypoplasie frontonasale apparente, indiquant des anomalies du développement ostéoarticulaire. L'évaluation du contenu en PGs a révélé une forte diminution de la synthèse des PGs chez les souris XT-I KO. L'examen des différentes zones chondrocytaires au niveau de la plaque de croissance des os longs a révélé la perte de l'organisation en colonne des chondrocytes prolifératifs et une réduction importante de la zone hypertrophique. Afin d'identifier les mécanismes et les facteurs à l'origine des anomalies squelettiques chez les souris XT-I KO, l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le développement du squelette et dans la régulation de la chondrogenèse a été analysée par hybridation *in situ* à l'aide de la technique RNAscope. Les résultats ont montré une forte expression des marqueurs de l'hypertrophie chondrocytaires suggérant ainsi une maturation précoce des chondrocytes chez les souris XT-I KO. Les embryons XT-I KO montrent également une formation précoce du centre d'ossification secondaire, indiquant une ossification précoce qui participerait aux anomalies de croissance observées chez les souris XT-I KO. L'étude des voies de signalisation impliquées dans la différenciation et la maturation chondrocytaire a révélé une surexpression du récepteur FGFR3 et une activation importante de la signalisation sous-jacente, suggérant ainsi des perturbations de la signalisation du FGF. Compte tenu du rôle important du FGFR3 dans la régulation de la chondrogenèse et de l'ossification endochondrale, ces résultats suggèrent fortement l'implication de la voie de FGF dans le développement des anomalies squelettiques chez les souris XT-I KO et ouvrent la voie pour le développement de nouvelles thérapies pour le traitement des patients atteints du syndrome Desbuquois de type II.

**Mots clés :** Xylosyltransférase I, Protéoglycanes, Chondrocyte, plaque de croissance, signalisation cellulaire, pathologies ostéoarticulaires

**Abstract:** Proteoglycans (PGs) play an essential role in several major physiological processes such as cell signaling, proliferation and migration; this is mainly due to the interactions between their glycosaminoglycan chains (GAGs) with soluble mediators and their receptors. The initiation of the synthesis of GAG chains of PGs is catalyzed by Xylosyltransferase I (XT-I). Recently several studies have shown that mutations in XT-I gene are associated with Desbuquois syndrome type II which is characterized by skeletal abnormalities. To study the role of XT-I in skeletal development, we generated knockout mice for the XT-I gene (XT-I KO). XT-I KO mice show pronounced dwarfism and apparent frontonasal hypoplasia reflecting abnormalities in skeletal development. Evaluation of PG content revealed a strong decrease in PG synthesis in XT-I KO mice. Analysis of the different chondrocyte zones in the growth plate revealed a loss of columnar organization of proliferative chondrocyte and a significant reduction of the hypertrophic zone. To identify the mechanisms and factors underlying skeletal abnormalities in XT-I KO mice, the expression of several genes involved in skeletal development and in the regulation of chondrogenesis were analyzed by *in situ* hybridization using RNAscope technique. The results showed a strong expression of markers of chondrocyte hypertrophy thus suggesting early maturation of chondrocytes in XT-I KO mice. The XT-I KO embryos show also a premature formation of the secondary ossification center, indicating a precocious ossification which ultimately leads to the growth abnormalities showed in XT-I KO mice. The study of the signaling pathways involved in differentiation and chondrocyte maturation revealed an overexpression of the FGFR3 receptor and a significant activation of the downstream signaling pathways, thus suggesting disturbances of FGF signaling. Given the important role of FGFR3 in the regulation of chondrogenesis and endochondral ossification, these results strongly suggest the involvement of the FGF pathway in the development of skeletal abnormalities in XT-I KO mice and pave the way for the development of new therapeutics for the treatment of patients with Desbuquois syndrome type II.

**Keywords :** Xylosyltransferase I, Proteoglycans, chondrocyte, growth plate, Cell signaling, skeletal diseases.