



HAL
open science

Etude de la physiopathologie du syndrome de Crouzon avec acanthosis nigricans lié à FGFR3

Maxence Cornille

► **To cite this version:**

Maxence Cornille. Etude de la physiopathologie du syndrome de Crouzon avec acanthosis nigricans lié à FGFR3. Médecine humaine et pathologie. Université Paris sciences et lettres, 2019. Français. NNT : 2019PSLET051 . tel-03510241

HAL Id: tel-03510241

<https://theses.hal.science/tel-03510241>

Submitted on 4 Jan 2022

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.



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à Paris Sciences et Lettres
Institut Imagine

**Etude de la physiopathologie du syndrome de Crouzon
avec acanthosis nigricans lié à FGFR3.**

Soutenue par

Maxence CORNILLE

Le 20 Novembre 2019

Ecole doctorale n° 562

Bio Sorbonne Paris Cité

Spécialité

Génétique

Composition du jury :

Michel COHEN-TANNOUDJI Directeur de recherche, CNRS / Institut Pasteur	<i>Président</i>
Laurence COLLEAUX Directeur de recherche, Marseille Medical Genetics CNRS	<i>Rapporteur</i>
Agnès BLOCH-ZUPAN Professeur des universités praticien hospitalier, Faculté de Chirurgie Dentaire - Université de Strasbourg	<i>Rapporteur</i>
Jeanne AMIEL Professeur des universités praticien hospitalier, Institut Imagine - Inserm U1163	<i>Examineur</i>
Federico DI ROCCO Professeur des universités praticien hospitalier, Hôpital Femme Mère Enfant - Université Lyon 1	<i>Examineur</i>
Lionel LARUE Directeur de recherche, Institut Curie - CNRS	<i>Examineur</i>
Laurence LEGEAI-MALLET Directeur de recherche, Institut Imagine - Inserm U1163	<i>Directeur de thèse</i>

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury de thèse pour l'honneur qu'ils me font de présider en cet événement si important pour moi.

Je tiens à remercier Laurence Legeai-Mallet d'avoir été ma directrice de thèse. Laurence, je te remercie de m'avoir accueilli dans ta formidable équipe pendant ces presque cinq années. Je te remercie pour l'engagement dont tu as fait preuve et pour la confiance que tu m'as accordée. Je te remercie de m'avoir toujours poussé à aller de l'avant, poussé à m'améliorer, poussé à évaluer mes erreurs et à considérer mes réussites. Tu m'as appris à réfléchir et à oser, et je pense que sous ta direction, je me suis transformé.

Je remercie l'école doctorale BioSPC et l'Université Paris Science et Lettres de m'avoir accordé une bourse doctorale durant les trois premières années de cette thèse. Je remercie l'Institut Imagine et son comité de direction pour m'avoir accordé une bourse pour ma quatrième année.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe pour leur soutien mille fois répété.

Merci à toi Catherine pour ta gentillesse, ta bienveillance et ta bonne humeur. Je te remercie pour la patience dont tu as fait preuve avec moi depuis le début et pour tout ce que tu m'as montré. Tu manques déjà à tout le labo, et à moi beaucoup!

Merci à toi Nabil de m'avoir formé et aidé. Ça a été un plaisir de travailler avec toi et ta bonne humeur, et de partager avec toi toutes ces discussions, tantôt scientifiques, tantôt politiques.

Merci à toi Emilie pour tous ces moments de rires, à Paris, en Californie ou ailleurs. Tu m'as montré c'était qui le patron en fin de compte!

Merci à toi Ludo, mon prince, pour ta bonne humeur inébranlable, pour tes conseils et ton soutien.

Merci à toi Valentin pour m'avoir fait autant rire et pour avoir eus la capacité de comprendre la plus obscure de mes blagues.

Merci à toi Laure pour m'avoir soutenu, fait rire et m'avoir nourri pendant tout ce temps.

Merci à toi Hossein pour ta gentillesse, tes conseils, ton aide précieuse et pour m'avoir amené à la rencontre de tes patients.

Merci à toi Stéphanie pour ton aide inestimable durant ces longues expériences de comportement et ces péripéties loin de mon labo.

Merci à toi Léa pour ton soutien et ta gentillesse, merci d'avoir pris le relais de me nourrir avec toutes ces pâtisseries.

Merci à toi Davide pour ta bonne humeur, ton rire et ton gout pour les kebabs, tous les trois inaltérables.

Merci à vous Justine, Marine, Suzanne, Alessandra, Yvan, Zineb, Romane, Camille, Christelle, Camille, Cindy, Karine, Martin, Mathilde, Valérie, Subash, Johanne, Benoit, Céline pour m'avoir aidé, soutenu et pour avoir égaillé la vie au labo et ailleurs !

Merci à Meriem, Nicolas et la plateforme microscopie. Merci à Gabriella d'avoir pris soin de mes souris.

Merci à ma famille qui elle aussi me soutient depuis le début. Merci à Clémence, qui me supporte et me soutient, et qui a veillé à ce que mon moral ne vacille pas trop.

Merci à mes amis, Christophe, Arthur, Kenzo, Laura, Anastasia, Lauriane, Maxime, Juliette, Anne, Antoine, Ilan, Nico, Louise, Fanny, Clarisse pour m'avoir aussi montré que la thèse, ça n'est pas que ça.

Enfin, je remercie celui qui entreprend la lecture de ce manuscrit, par curiosité ou avec un but précis. J'espère que cette lecture lui sera compréhensible, agréable et utile, car j'y ai mis toute mon énergie.

Table des matières

Remerciements	2
Abréviations	7
Résumé	9
Abstract	10
Introduction.....	11
Fibroblast Growth Factor (FGF) et Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR)	12
Structure des Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFR)	12
Spécificité des sous-familles de Fibroblast Growth Factor	14
Processus d'activation des FGFR	18
Fibroblast Growth Factor Binding Protein.....	18
Interaction FGF-FGFR et activation	18
Voies de signalisations intracellulaires.....	18
FGF et FGFR nucléaires.....	22
Modèles animaux invalidés pour les gènes FGF et FGFR	22
Développement embryonnaire cérébral.....	26
Formation de la plaque neurale	26
Neurogenèse du tube neural	30
L'Hippocampe.....	31
Structure de l'hippocampe.....	31
Structure du gyrus denté (DG)	33
Perturbation de la neurogenèse	37
FGF dans les processus de neurogenèse.....	37
Développement craniofacial et squelettique.....	39
Développement du crâne.....	39
Ossification membranaire	40
Régulation de la différenciation ostéoblastique	42
La suture.....	47
Ossification endochondrale.....	50
Chondrogénèse	50
La plaque de croissance.....	51
L'ossification endochondrale à la Base du crâne	55
Les os longs du squelette : ossification endochondrale.....	56
Pathologies de l'ossification endochondrale.....	58
Ossification membranaire et endochondrale : mandibule et maxillaire	58

Ossification endochondrale dans les sutures.....	59
FGFR dans l'épiderme et cancers	60
Les craniosynostoses	62
Craniosynostoses et anomalies craniofaciales.....	62
Classification des craniosynostoses.....	62
Craniosynostoses et cerveau.....	65
La prise en charge chirurgicale des craniosténoses	65
Bases génétiques de craniosynostoses	67
Craniosynostoses syndromiques liées à des mutations dans les gènes FGFR	69
Syndrome de Crouzon avec Acanthosis Nigricans (CAN) (FGFR3).....	69
Syndrome de Muenke (FGFR3)	73
Le syndrome de Crouzon (FGFR2)	77
Syndrome d'Apert (FGFR2).....	79
Syndrome de Pfeiffer (FGFR2 et FGFR1)	82
Syndrome de Jackson-Weiss (FGFR2).....	83
Syndrome de Beare-Stevenson cutis gyrate (FGFR2).....	83
Autres Craniosynostoses syndromiques non liées aux gènes FGFRs	84
Syndrome de Saethre-Chotzen (Twist).....	84
Craniosynostose de type Boston (MSX2)	85
Syndrome de Bohring-Opitz (ALX1).....	85
Craniosynostose liée à TCF12 (Craniosynostosis-3)	85
Syndrome de Carpenter (RAB23)	85
La dysplasie cranio-fronto-nasale (EFNB-1)	85
Craniosynostose lié à RUNX2	86
Les chondrodysplasies.....	87
Achondroplasie.....	87
Génétique de l'achondroplasie	88
Traitement de l'achondroplasie	89
Modèles murins pour l'achondroplasie	89
Dysplasie thanatophore	91
Hypochondroplasie	92
Dysplasie osseuse avec incurvation des membres (Bent Bone Dysplasia)	92
Syndrome CATSHL	93
Approches pharmacologiques du traitement des craniosynostoses et chondrodysplasies	94
Traitement de l'achondroplasie	94
Inhibiteurs de tyrosine kinase	94

Approches indirectes pour le traitement	96
Traitement des craniosynostoses syndromiques.....	99
Traitement du syndrome de Crouzon (FGFR2).....	99
Traitement du syndrome d'Apert (FGFR2)	99
Objectifs	101
Résultats.....	102
Article: Memory deficit and cognitive impairment in FGFR3-related Crouzon syndrome mouse model.	103
Preliminary Data: In vivo evaluation of "TransCon CNP" in <i>Fgfr3</i> mouse model mimicking achondroplasia (<i>Fgfr3</i> ^{Y367C/+}).....	157
Discussion.....	168
Phénotype squelettique du CAN	169
Phénotype neurologique et cognitif du CAN.....	175
Effets sur la neurogenèse	175
Phénotype cognitif du modèle CAN	177
Etude de l'effet du TransCon-CNP sur les synchondroses de la base du crâne dans un modèle murin d'achondroplasia <i>Fgfr3</i> Y367C/+	181
Annexes	184
Références.....	193

Abréviations

AR	Acide Rétinoïque
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CA	Corne d'Amon
CAN	Crouzon avec Acanthosis Nigricans
CATSHL	camptodactyly, tall stature, and hearing loss
CBL	Casitas B-lineage Lymphoma
CNP	C-natriuretic peptide
DG	gyrus denté
DUSP6	Dual-Specificity Phosphatase 6
Eph	l'Erythropoietin-producing Hepatocellular
Erk	Extracellular signal-regulated kinases
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FRS2	FGF-Regulated Substrate 2
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
Grb2	Growth factor Receptor-Bound 2
HS	héparane sulfate
Ig	boucles pseudo Immunoglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
Ihh	Indian hedgehog
IOS	synchondroses intra-occipitales
ISS	synchondrose inter-sphénoïdale
KO	Knock-Out
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	matrice extracellulaire
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MMP13	Matrix Metalloproteinase 13
Msx	Msh homeobox
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NeuN	Neuronal Nuclei
NPR2	Natriuretic Peptide Receptor 2

NSC	cellules souches neuronales
Osx	Osterix
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKC	Protein Kinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ
PTHrP	Parathyroid Hormone-related Protein
Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RGL	Radial Glial-like
Runx2	Runt-related transcription factor 2

Résumé

Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) est un récepteur à activité tyrosine kinase. Sa fonction est de réguler la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire dans de nombreux tissus. Les mutations gain-de-fonction du gène codant FGFR3 sont responsables de deux types de maladies génétiques : les chondrodysplasies, caractérisées par des anomalies de la croissance des os longs, et les craniosynostoses, caractérisées par une fusion prématurée des sutures crâniennes. Les patients atteints de craniosynostoses liées à des mutations du gène FGFR3 présentent également des troubles comportementaux et cognitifs.

L'objectif de ma thèse fut de mieux comprendre la physiopathologie d'une forme particulière de craniosynostose, le syndrome de Crouzon avec Acanthosis Nigricans (CAN).

Le CAN est une forme rare de craniosynostose associée à une mutation FGFR3 spécifique (p.Ala391Glu). Il est caractérisé par une fusion prématurée des sutures coronales, une hypoplasie de l'étage moyen de la face et un acanthosis nigricans, une hyperpigmentation et un épaississement localisé de la peau. La prise en charge de ces patients est chirurgicale et nécessite des interventions séquentielles afin de permettre le bon développement du crâne et du cerveau.

Dans un premier temps, j'ai étudié l'effet de la mutation p.Ala391Glu responsable du CAN sur la phosphorylation de la protéine FGFR3. Les expériences de transfections dans des cultures cellulaires ont montré que la mutation p.Ala391Glu affecte sa maturation et entraîne une suractivation du récepteur en absence ou en présence de son ligand.

En parallèle, nous avons généré le premier modèle murin CAN en insérant la mutation gain-de-fonction p.Ala385Glu dans le gène *Fgfr3* de manière ubiquitaire (*Fgfr3*^{A385E/+}). L'analyse du phénotype squelettique à l'aide d'études radiologique, morphométrique (sur scanners μ CT) et histologique de ce modèle n'ont pas montré d'anomalies majeures au niveau du squelette et du crâne. En parallèle, nous nous sommes intéressés au cerveau de ces souris. Nos travaux ont permis de montrer que FGFR3 était exprimé et suractivé au niveau de l'hippocampe. Ils ont également permis d'observer des anomalies dans les processus de neurogenèse dans le gyrus denté de ces animaux. Afin d'étudier l'impact de la mutation p.Ala391Glu, nous avons réalisé des tests comportementaux. Nos expériences montrent que les souris *Fgfr3*^{A385E/+} présentaient des défauts cognitifs. Nous avons observé des défauts de mémoire importants tandis que l'anxiété était non affectée. Un effet antidépresseur a également été observé chez les mutants. Afin d'établir un lien entre ces anomalies cognitives et le récepteur FGFR3 activé, nous avons traité ces animaux mutants à l'aide d'injections intraventriculaires cérébrales avec un inhibiteur spécifique de FGFR3 (BGJ398). Ce traitement a permis de restaurer les défauts cognitifs et comportementaux observés précédemment.

L'ensemble de ces travaux ont permis de mettre en évidence pour la première fois des anomalies du comportement dans un modèle murin FGFR3 de craniosynostose. Ils permettent de mieux comprendre le rôle joué par FGFR3 à la fois dans le développement craniofacial et squelettique, mais également dans les processus de mémorisation et de réponses émotionnelles.

J'ai également participé au cours de ma thèse à l'étude préclinique mesurant les effets d'un analogue du CNP (TransCon-CNP) sur le phénotype du modèle murin *Fgfr3*^{Y367C/+} d'achondroplasie, la forme la plus fréquente de nanisme. J'ai étudié les effets de la molécule sur le phénotype craniofacial de ce modèle.

Abstract

Fibroblast Growth Factor 3 (FGFR3) is a receptor with tyrosine kinase activity. Its purpose is to regulate survival, proliferation and differentiation of cells in various tissues. Gain-of-function mutations in FGFR3 coding gene are responsible for two types of genetic diseases: chondrodysplasias, characterized by anomalies in long bones growth, and craniosynostoses, characterized by premature fusion of cranial sutures. Patients with craniosynostoses associated to *Fgfr3* mutations also present behavioral and cognitive disorders.

The aim of my thesis was to better understand the physiopathology of a particular form of craniosynostosis, Crouzon syndrome with Acanthosis Nigricans (CAN).

CAN is a rare form of craniosynostosis associated to an FGFR3 specific mutation (p.Ala391Glu). It is characterized by premature fusion of coronal sutures, midface hypoplasia and acanthosis nigricans, a hyperpigmentation and thickening of the skin. Management of these patients requires sequential interventions to allow proper development of the skull and brain.

First, I studied the effect of the CAN related p.Ala391Glu mutation on FGFR3 protein phosphorylation. Cell transfection experiments showed that the p.Ala391Glu mutation affect protein maturation and cause an overactivation of receptor in absence or in presence of ligand.

In parallel, we generated the first mouse model for CAN by inserting the gain-of-function p.Ala385Glu mutation in the *Fgfr3* murine gene in a ubiquitous manner (*Fgfr3*^{A385E/+}). Analysis of skeletal phenotype by radiography, morphometry (on μ CT scanners) and histology of this model did not show major anomalies of the skull and skeleton. In parallel, we were also interested in the brain of these mice. Our work showed that FGFR3 was expressed and overactivated at the level of the hippocampus. It also allowed to observe anomalies in neurogenesis processes in the dentate gyrus of these animals. In order to study the impact of the p.Ala391Glu mutation, we performed behavioral tests. Our experiments showed that the *Fgfr3*^{A385E/+} mice presented cognitive disorders. We observed important memory defects while anxiety remained unchanged. An antidepressant effect was also observed in mutants. To establish a link between these cognitive anomalies and the activated FGFR3 receptor, we treated the animals with cerebral intraventricular injection of a specific FGFR3 inhibitor (BGJ398). This treatment allowed to restore the behavioral and cognitive defects previously observed.

This work highlight for the first time behavior anomalies in a FGFR3 related craniosynostosis mouse model. It allow a better understanding of the role played by FGFR3 in craniofacial and skeletal development as well as in memorization and learning processes and emotional responses.

During my thesis, I also participated in the preclinical study of the effect of a CNP analog (TransCon-CNP) on the phenotype of the mouse model *Fgfr3*^{Y367C/+} for achondroplasia, the most frequent form of dwarfism. My work was to study the effect of the molecule on the craniofacial phenotype of this model.

Introduction

Fibroblast Growth Factor (FGF) et Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR)

Les Fibroblast Growth Factor (FGF) sont une large famille de facteurs de croissance présents chez les vertébrés (Homme, Souris) et invertébrés (Drosophile). Ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques essentiels au développement de l'organisme et aux fonctions cellulaires et tissulaires.

L'étude de l'effet mitogénique d'extraits de cerveaux et de glandes pituitaires bovines sur des cultures de fibroblastes 3T3 (Armelin, 1973) a permis d'identifier les FGF. Ces extraits furent par la suite purifiés, amenant à la découverte des FGF, donnant ainsi leur nom initial de « facteurs de croissance ».

Chez l'Homme et la Souris, on compte 22 FGF classés en sous-familles en fonction de leur similarité de séquence (Ornitz and Itoh, 2001). Cette similarité de séquence s'accompagne très souvent d'une similarité de fonction. On compte 7 sous familles : 5 familles de FGF paracrines, 1 famille de FGF intracellulaire et 1 famille de FGF endocrine (**Figures 1 et 2**). A l'exception des FGF intracellulaires, 18 FGF se lient sur leurs récepteurs spécifiques : les Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFR). L'interaction FGF-FGFR, souvent associée à un corécepteur, conduit à la dimérisation des FGFR, ayant pour but de transduire le signal extracellulaire en une réponse intracellulaire.

Structure des Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFR)

La famille des FGFR se compose de 4 récepteurs (FGFR1 à 4) possédant une activité tyrosine kinase. C'est en traitant des cellules 3T3 avec FGF1 (ou FGF acide) que Coughlin et al. observèrent la phosphorylation d'une protéine identifiée comme FGFR1 (Coughlin et al., 1988). Les trois autres récepteurs furent ensuite identifiés par homologie de séquence.

Les FGFR sont des récepteurs membranaires et possèdent tous les quatre la même organisation. Tout d'abord, le domaine extracellulaire est constitué de trois boucles pseudo Immunoglobulin (Ig). L'interaction entre le FGF et FGFR et leurs cofacteurs Heparan Sulfate ou Klotho a lieu au niveau des domaines IgII et IgIII (Beenken and Mohammadi, 2009) . Le domaine IgI et le domaine Acid Box, situé entre IgI et IgII, semblent jouer un rôle d'auto-

inhibition du récepteur (Beenken and Mohammadi, 2009; Kalinina et al., 2012). Le domaine transmembranaire est lui constitué en hélice alpha, qui assure l'ancrage à la membrane et

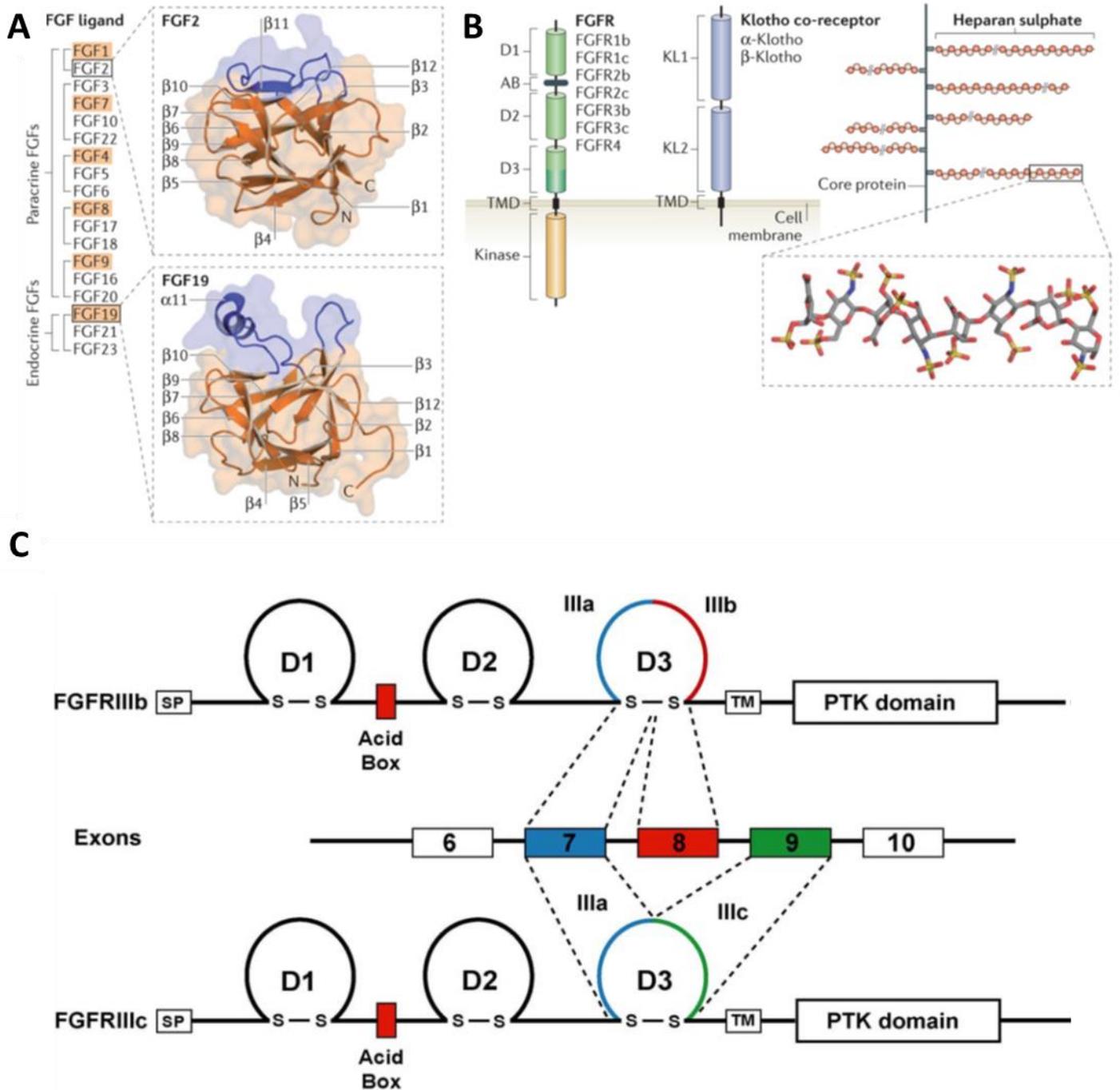


Figure 1 : (A) (d'après Goetz et Mohammadi, 2013) Liste des 18 FGF paracrines (canoniques) et endocrines. La structure quaternaire de FGF2 et FGF19, obtenue par cristallographie, est représentée et montre les différences structurales pouvant exister au sein des FGF. (B) Représentation schématique des différentes protéines FGFR et Klotho et des assemblages de l'héparane sulfate avec les autres protéines de la matrice extracellulaire. (C) (d'après Eswarakumar et al, 2005) Représentation des isoformes FGFRIIIb et FGFRIIIc obtenues par épissage alternatif. La deuxième partie du domaine IgIII est ainsi modifiée.

qui, avec le domaine IgII, permettra de stabiliser le dimère actif de FGFR (Beenken and Mohammadi, 2009; Sarabipour and Hristova, 2016). Le domaine intracellulaire quant à lui, se compose de deux domaines à activité tyrosine kinase (TK1 et TK2). Lors de la formation du dimère actif de FGFR, chaque récepteur va transphosphoryler son partenaire sur plusieurs résidus tyrosines. Ceci va permettre le recrutement des messagers secondaires et cofacteurs intracellulaires pour l'activation de plusieurs voies de signalisation.

Un cinquième membre, FGFR1 (aussi appelé FGFR5), ne possède pas de domaine à activité tyrosine kinase. Son rôle et son mode d'action sont encore mal compris, bien que le modèle souris KO pour FGFR1 soit létal à la naissance, suggérant un rôle essentiel dans plusieurs tissus, notamment l'os ou le système respiratoire (Baertschi et al., 2007). Il pourrait faire office de leurre afin de réguler les signaux des autres récepteurs, notamment de FGFR1 (AMANN and TRUEB, 2013).

Les différents FGFR possèdent des spécificités de liaison avec les différents FGF (**Figure 2**). Cette spécificité est accrue par un épissage alternatif concernant FGFR1 à 3 au niveau de la seconde moitié du domaine IgIII (Werner et al., 1992). Les isoformes ainsi créées, appelées alors IIIb ou IIIc ne reconnaissent pas les mêmes FGF et varient dans leurs profils d'expression tissulaire (**Figure 1**). Les formes IIIb sont ainsi majoritairement retrouvées dans les tissus épithéliaux, tandis que les formes IIIc, sont retrouvées dans les tissus mésenchymateux (des exceptions existent cependant) (Ornitz and Itoh, 2015).

A cet épissage alternatif, d'autres formes plus rares ont été identifiées. Il est ainsi retrouvé dans certains cancers des formes solubles de FGFR3, c'est-à-dire dont un épissage alternatif a enlevé le domaine transmembranaire permettant son ancrage (Tomlinson et al., 2005). Leur rôle est encore peu connu aujourd'hui mais il est possible que ces récepteurs solubles entrent en compétition avec les récepteurs membranaires en capturant le ligand (Ornitz and Itoh, 2015).

Spécificité des sous-familles de Fibroblast Growth Factor

L'affinité des différents FGF pour leurs récepteurs a tout d'abord été identifiée en traitant des cultures de cellules exprimant les différentes isoformes des FGFR et en mesurant l'effet des FGF sur la prolifération cellulaire (Ornitz et al., 1996).

Il a ainsi été montré que la spécificité pour les FGFR se trouve relativement conservée au sein des sous-familles de FGF. La liste précise des sous-familles et leurs affinités pour les FGFR sont présentées dans la **Figure 2**.

Les FGF sécrétés, hormis la sous-famille FGF15/19, possèdent tous un domaine de liaison à l'héparane sulfate (HS). Ce composé de la matrice extracellulaire (MEC) forme des assemblages avec les chaînes de protéoglycanes grâce à des liaisons covalentes. Ces assemblages, dont la structure et la densité peuvent être variables, participent activement à la régulation des signaux FGF (Goetz and Mohammadi, 2013; Matsuo and Kimura-Yoshida, 2014). Dans le cas d'une matrice dense, les FGF sont « capturés » par la MEC. Cela les rend alors moins disponibles au récepteur. A l'inverse dans le cas d'un assemblage d'HS moins dense, cela facilite l'accès du FGF au FGFR. L'HS joue ainsi un rôle dans la formation de gradient de FGF lorsque ceux-ci agissent de manière paracrine : l'HS empêchant la diffusion du FGF, leur concentration est forte à leur zone de synthèse et diminue graduellement lorsqu'on s'en éloigne. Certains FGFR ont également une affinité pour l'HS. En se liant au ligand et au récepteur, l'HS participe activement à la stabilisation du complexe et la formation du dimère de FGFR. On a alors un complexe 2:2:2 FGF-HS-FGFR actif (Yayon et al., 1991).

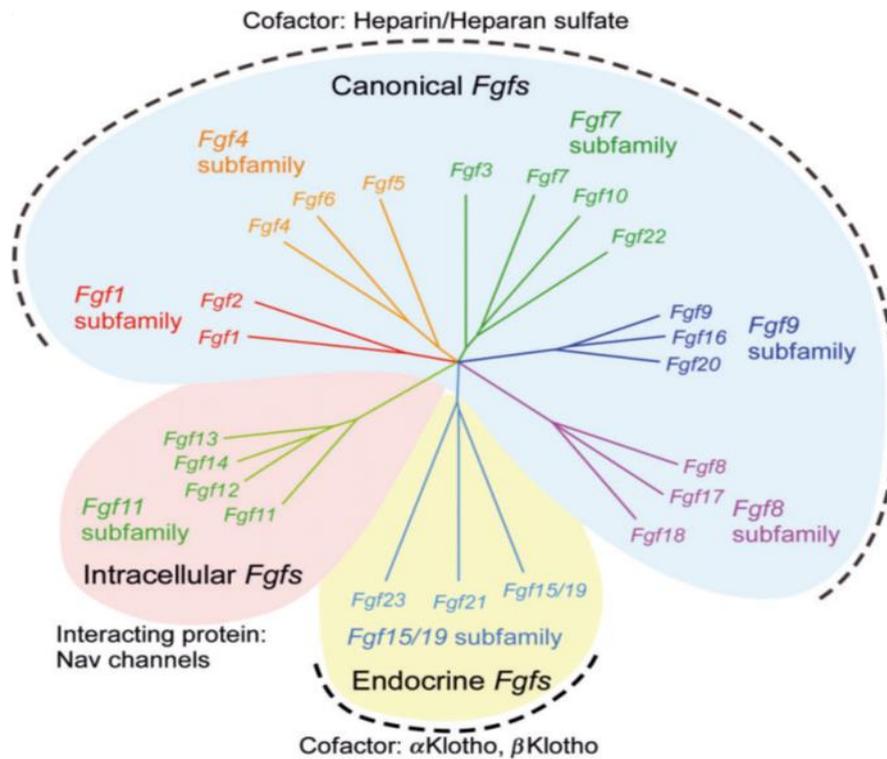
La sous-famille FGF1 est composée de FGF1 et FGF2. FGF1 est le FGF avec le plus petit poids moléculaire. C'est en revanche le seul à avoir une affinité pour tous les récepteurs. La sous-famille FGF1 ne possède pas de peptide signal d'excrétion mais est cependant retrouvé dans la matrice extracellulaire (Beenken and Mohammadi, 2009; Ornitz and Itoh, 2001). La sous-famille FGF4 (FGF4, FGF5 et FGF6) a pour particularité d'avoir une affinité pour les isoformes IIIc de FGFR1 à 3 ainsi que pour FGFR4. La sous-famille FGF7 (FGF3, FGF7, FGF10 et FGF22), à l'inverse, reconnaît les formes IIIb de FGFR1 et 2 (Ornitz and Itoh, 2015). La sous-famille FGF8 (FGF8, FGF17 et FGF18) se lie fortement avec les formes IIIc de FGFR1 à 3 et sur FGFR4. Enfin la sous-famille FGF9 (FGF9, FGF16 et FGF20) lie les formes IIIc de FGFR1 et 2, FGF3 et FGFR4.

Ces classifications sont encore matière à discussion. Certains auteurs préfèrent ainsi associer FGF5 dans la sous-famille FGF1, FGF3 dans la sous-famille FGF4, ou tout simplement dans une sous-famille ne contenant que FGF3 (Guillemot and Zimmer, 2011; Itoh and Ornitz, 2008). Ces autres classifications prennent en compte la relation phylogénique, mais également la localisation chromosomique de chaque gène FGF (Itoh and Ornitz, 2008).

La sous-famille FGF15/19 (le gène *Fgf15* de la Souris est l'orthologue du gène identifié comme *Fgf19* chez l'Homme, le groupe comprend FGF15/19, FGF21 et FGF23) fonctionne de manière endocrine. La sous-famille FGF15/19 possède une faible affinité pour l'HS. Ces FGF ne peuvent donc pas être piégés par la MEC et ont une grande capacité de diffusion. Ces FGF possèdent également une faible affinité de liaison aux FGFR. Leur interaction avec le récepteur est conduite par les cofacteurs de la famille Klotho. Cette famille de protéines transmembranaires, contenant α Klotho, β Klotho et γ Klotho, possède un domaine extracellulaire avec une forte affinité à la fois pour les FGFR et pour la sous-famille FGF15/19. Klotho assure dans ce cas la stabilité du complexe actif FGF-FGFR (Goetz and Mohammadi, 2013). α Klotho lie préférentiellement FGF23, conduisant le signal via les formes IIIc de FGFR1 et 3 et sur FGFR4. β Klotho interagit de préférence avec FGF15/19 et FGF21. FGF15/19 et FGF21 se lient aux formes IIIc de FGFR1 et 3, mais FGF15/19 se lie également à FGFR2c et FGFR4. γ Klotho se lierait à FGF15/19, sa fonction est encore mal comprise. Des études de cristallographie semblent montrer que la liaison à Klotho des formes IIIc de FGFR1 à 3 et FGFR4 entrerait en compétition avec la liaison des FGF paracrines. En effet, Klotho se lie au niveau de la boucle IgIII des FGFR et bloque alors le site de liaison de certaines autres sous-familles de FGF. Ceci ajouterait un niveau de régulation supplémentaire dans des tissus où plusieurs FGF sont exprimés. La faible affinité des FGF endocrines pour les FGFR en absence de Klotho constitue également un moyen de régulation : ceci empêche les interactions dans les tissus non ciblés, dans le cas où le ligand a un fort potentiel de diffusion dans l'organisme (Goetz and Mohammadi, 2013; Kurosu et al., 2006).

La dernière sous-famille de FGF est la sous famille FGF11, aussi appelés FGF intracellulaires (ou Fibroblast Homologous Factors). Bien que structurellement proches des FGF sécrétés, les FGF intracellulaires ne se lient pas aux FGFR et sont cytosoliques. Leur rôle semble, entre autre, d'interagir avec des canaux sodiques voltage-dépendants Nav afin de réguler leur localisation et d'assurer l'excitabilité dans les neurones (Goldfarb et al., 2007).

A



B

FGF subfamily	FGF	Cofactor	Receptor specificity
FGF1 subfamily	FGF1 FGF2	+ Heparin or Heparan sulfate	[All FGFRs [FGFR 1c, 3c > 2c, 1b, 4 Δ
FGF4 subfamily	FGF4 FGF5 FGF6		[FGFR 1c, 2c > 3c, 4 Δ
FGF7 subfamily	FGF3 FGF7 FGF10 FGF22		[FGFR 2b > 1b
FGF8 subfamily	FGF8 FGF17 FGF18		[FGFR 3c > 4 Δ > 2c > 1c >> 3b
FGF9 subfamily	FGF9 FGF16 FGF20		[FGFR 3c > 2c > 1c, 3b >> 4 Δ
FGF15/19 subfamily	FGF15/19 FGF21 FGF23	+ β Klotho + α Klotho	[FGFR 1c, 2c, 3c, 4 Δ [FGFR 1c, 3c [FGFR 1c, 3c, 4

Figure 2 : (d'après Ornitz et Itoh, 2015) (A) Arbre phylogénétique permettant de classer les 22 FGF en 7 sous-familles. Les sous-familles FGF1, FGF4, FGF7, FGF8 et FGF9 correspondent aux FGF paracrines (canoniques). La sous-famille FGF15/19 regroupe les FGF endocrines. La sous-famille FGF11 est celle des FGF intracellulaires. (B) Représentation des spécificités de cofacteurs (HS ou Klotho) et de récepteurs (et leurs isoformes) des différentes sous-familles de FGF.

Processus d'activation des FGFR

Fibroblast Growth Factor Binding Protein

Fibroblast Growth Factor Binding Protein (FGF-BP) est une protéine extracellulaire qui possède une forte affinité à l'HS et aux FGF, via deux domaines de liaison spécifique (Abuharbeid et al., 2006). FGF-BP joue lui aussi un rôle de médiateur du signal FGFR. L'interaction de FGF-BP avec le FGF réduit l'affinité de ce dernier pour l'HS. Le FGF est alors libéré de la MEC et est accessible au récepteur (Abuharbeid et al., 2006).

Interaction FGF-FGFR et activation

La fixation du FGF au niveau du récepteur se fait au niveau des domaines IgII et IgIII. Des ponts hydrogènes se forment entre les chaînes β formant le domaine IgIII et les chaînes β du FGF. La conformation des domaines IgII et IgIII est alors modifiée (Goetz and Mohammadi, 2013). Ce changement de conformation au moment de la dimérisation du récepteur va induire un changement de conformation des domaines transmembranaires et intracellulaires. On a alors un rapprochement des domaines kinases de part et d'autre du dimère, permettant alors leur transphosphorylation (Beenken and Mohammadi, 2009; Goetz and Mohammadi, 2013). Il est intéressant de noter que le changement conformationnel observé dans le domaine IgIII est différent en fonction des sous-familles de FGF. Ces FGF, présentant des structures quaternaires différentes, modifient l'orientation de IgIII et des domaines kinases. Ceci peut alors changer la nature, voire l'intensité du signal intracellulaire (Belov and Mohammadi, 2013; Goetz and Mohammadi, 2013; Olsen et al., 2006).

Les sites de phosphorylation ont été précisément identifiés dans le cas de FGFR1 (Furdui et al., 2006). En premier survient la phosphorylation en position Tyr653, qui va amplifier l'activité kinase, viennent ensuite les phosphorylations des positions Tyr583, Tyr463 et Tyr585 et enfin, Tyr654 est phosphorylé (Furdui et al., 2006).

Voies de signalisations intracellulaires

Le signal FGFR est conduit dans l'espace cytosolique par quatre voies de signalisation différentes : Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), Phosphoinositide 3-Kinase-Akt (PI3K-Akt), Phospholipase C γ (PLC γ) et Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT).

L'activation des voies MAPK et PI3K/Akt commence par l'activation de FGF-Regulated Substrate 2 (FRS2), famille regroupant les protéines FRS2 α et FRS2 β (Ornitz and Itoh, 2015).

La voie MAPK

L'activation des domaines kinases du FGFR entraîne la phosphorylation du cofacteur FRS2 α , lié de manière covalente au récepteur dans la zone juxtamembranaire (**Figure 3**). Cette phosphorylation est accrue par la présence de la protéine CRKL, qui se fixe au niveau de Tyr463 (Moon et al., 2006; Ornitz and Itoh, 2015). On a alors le recrutement des protéines Growth factor Receptor-Bound 2 (Grb2) et SHP2, une enzyme à activité tyrosine phosphatase (Brewer et al., 2016; Ornitz and Itoh, 2015). Grb2 recrute la protéine Son of Sevenless (Sos). La cascade de signalisation s'enclenche alors. Sos active Ras, une protéine à activité GTPase, qui active alors Raf, qui phosphoryle alors une protéine de la famille MEK. MEK va alors pouvoir phosphoryler plusieurs MAPK distinctes en fonction du contexte : JNK, p38, Erk1 et 2 (Ornitz and Marie, 2015; Tsang and Dawid, 2004). La protéine MAPK (Erk1/2) phosphorylée est alors transportée dans le noyau et interagit avec le facteur de transcription E26 transformation-specific (ETS) pour se lier à l'ADN et induire l'expression de gènes spécifiques (**Figure 3**) (Tsang and Dawid, 2004).

La voie PI3K-Akt

La voie PI3K-Akt, comme la voie MAPK, débute par l'activation de FRS2 et Grb2. Grb2 active la protéine médiatrice GAB1. Celle-ci va activer la kinase PI3K. PI3K va alors phosphoryler le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2), un composé lipidique membranaire, en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). Les protéines Akt et PDK1 se fixent sur le PIP3, ce qui active PDK1 activant lui-même Akt. Akt va alors phosphoryler différentes cibles spécifiques afin de moduler la prolifération ou la survie cellulaire (**Figure 3**) (Manning and Cantley, 2007; Ornitz and Marie, 2015).

Les voies MAPK et PI3K-Akt sont régulées à différents niveaux par différents cofacteurs. La famille des protéines Sprouty (SPRY), qui sont au nombre de 4 (SPRY1 à 4), peut interagir avec FRS2 et Grb2 afin de bloquer leur interaction commune. Il a également été montré que SPRY pouvait bloquer directement la phosphorylation de Raf en interagissant avec lui (Thisse and Thisse, 2005).

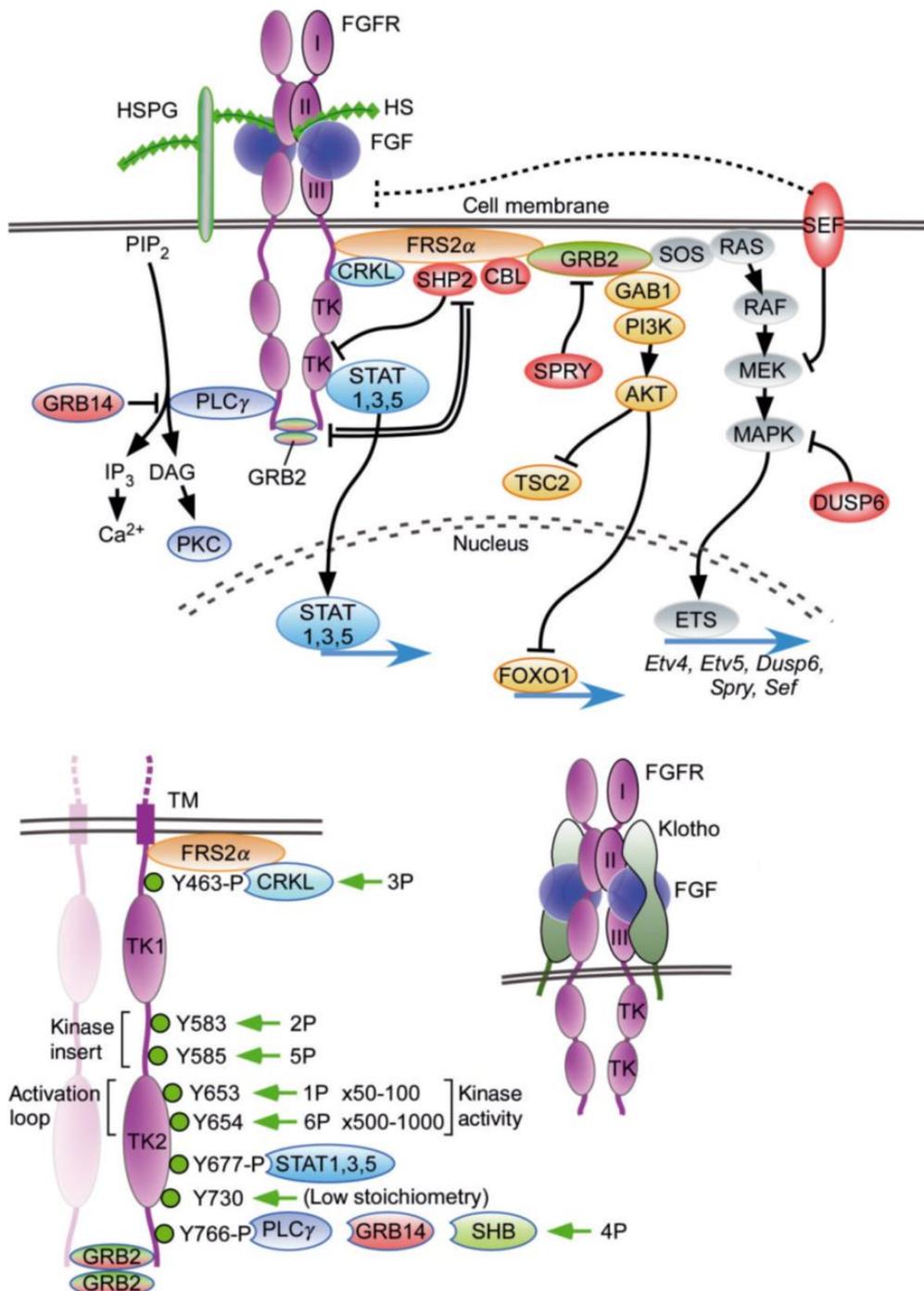


Figure 3 : (d'après Ornitz et Itoh, 2015) (A) Représentation du mécanisme d'activation du FGFR par le FGF. FGF forme un complexe avec l'HS et le FGFR, qui s'assemblent alors en dimère actif. Cette activation permet le recrutement de différents cofacteurs qui vont activer plusieurs voies de signalisations : MAPK, PI3K-Akt, STAT, PLC γ , afin de réguler l'expression de gènes cibles. (B) Schéma des différents sites de phosphorylation des domaines tyrosines kinases du FGFR. Certains de ces sites servent de point d'ancrage aux cofacteurs des différentes voies de signalisation. (C) Représentation du complexe actif formé par les FGF endocrines avec le FGFR et la protéine Klotho.

La protéine SEF est une protéine transmembranaire qui interagit avec MEK phosphorylé. Elle inhibe l'interaction entre MEK et MAPK (Erk) et empêche la translocation de ce dernier au noyau (Thisse and Thisse, 2005). Dual-Specificity Phosphatase 6 (DUSP6) est une autre phosphatase qui déphosphoryle spécifiquement MAPK. Son expression est contrôlée par le signal FGFR. Elle agit donc comme rétrocontrôle sur l'activation de la voie MAPK (Ornitz and Itoh, 2015).

CBL (Casitas B-lineage Lymphoma) est une ubiquitin ligase interagissant avec FRS2 et Grb2. Il en résulte l'ubiquitinylation du récepteur FGFR et sa dégradation dans le protéasome. CBL peut également interagir avec SPRY, régulant également l'inhibition de SPRY (Thisse and Thisse, 2005).

SHP2 est une protéine qui se fixe également à FRS2 afin de déphosphoryler Grb2 (Ornitz and Itoh, 2015).

La voie PLC γ

La voie PLC γ nécessite la phosphorylation additionnelle de la tyrosine Y766 du domaine kinase du FGFR. Ceci va permettre le recrutement sur ce site de PLC γ (aussi appelé FRS1) et sa phosphorylation par le FGFR actif. PLC γ phosphorylé va alors hydrolyser le PIP2 membranaire pour former de l'inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP3) et du diacylglycerol (DAG). IP3 va permettre la libération de calcium des réserves du réticulum endoplasmique, tandis que DAG va activer la Protein Kinase C (PKC) (Eswarakumar et al., 2005; Thisse and Thisse, 2005). PKC est une famille de Serine Thréonine kinase. Une fois activée, elle va phosphoryler plusieurs cibles intracellulaires (Brewer et al., 2016; Thisse and Thisse, 2005). L'une de ces cibles est Raf, qui est alors phosphorylé. Ceci permet une activation de MAPK (Erk) par une voie détournée de FRS2 (Brewer et al., 2016).

Lors de sa fixation sur Y766, PLC γ entre en compétition avec la protéine GRB14, qui a le même site de fixation au FGFR. GRB14 joue donc un rôle de régulateur négatif de la voie PLC γ (Brewer et al., 2016; Itoh and Ornitz, 2008).

La voie STAT

La voie STAT va nécessiter la phosphorylation supplémentaire du domaine kinase des FGFR à la position Y677, en particulier pour le recrutement de STAT3 (Dudka et al., 2010). L'activation

du complexe FGFR va entraîner le recrutement à cette position de la protéine STAT1, STAT3 ou STAT5 ainsi que ses partenaires de la famille des protéines Janus Kinase (JAK). Cette interaction active JAK qui va phosphoryler la protéine STAT. STAT actif s'assemble en dimère, qui va alors être transporté au noyau afin de réguler selon le contexte cellulaire la transcription de certains gènes cibles afin de réguler la survie, la migration ou la prolifération (Dudka et al., 2010; Ornitz and Itoh, 2015).

FGF et FGFR nucléaires

Il a été montré que les FGF paracrines pouvaient être localisés dans le noyau. Des études ont montré que FGF1 pouvait passer la membrane plasmique, traverser le cytosol et entrer dans le noyau indépendamment de sa liaison au récepteur (Coleman et al., 2014; Ornitz and Itoh, 2015). FGF2 quand à lui, possède des isoformes de haut poids moléculaire qui contiennent un motif de localisation nucléaire. Les différentes isoformes de FGF2, de faible et haut poids moléculaire, ont été observées dans le noyau, où elles régulent l'expression de certains gènes (Coleman et al., 2014).

De même que leurs ligands, les FGFR peuvent également être transportés au niveau du noyau. Leur action est alors indépendante de leur activité tyrosine kinase. FGFR1 et FGFR2 ont ainsi été observés localisés dans le noyau, respectivement dans les neurones ou les cellules de Sertoli dans le testis, ainsi que dans certains cancers. Le mécanisme de transport des FGFR au noyaux est cependant aujourd'hui inconnu et reste sujet à controverse (Coleman et al., 2014).

Il a par ailleurs été montré dans le cas de la dysplasie campomélique (Bent Bone Dysplasia), causée par la mutation M391R du gène de FGFR2, que la mutation diminue la quantité de récepteur présent à la membrane et sa disponibilité pour les ligands. Cela favorise par ailleurs la translocation de FGFR2 au noyau (Merrill et al., 2012).

Modèles animaux invalidés pour les gènes FGF et FGFR

De par leur présence dans de très nombreux tissus chez les mammifères et à de nombreux stades, du début du développement jusqu'aux stades tardifs, les FGF et FGFR ont un rôle pléiotrope. Ainsi, la modification du signal FGF-FGFR par mutation génétique ou par un agent extérieur va avoir des répercussions multiples sur l'organisme. Ceci se confirme lorsque l'on

observe la pluralité des phénotypes observés quand un gène codant un FGF ou FGFR est supprimé dans l'organisme.

À ce jour, les modèles souris Knock-Out (KO) ubiquitaires pour les différents FGF et FGFR ont tous été générés et caractérisés. Des modèles KO conditionnels ont également été générés et ont montré des spécificités tissulaires pour ces différents gènes (Ornitz and Itoh, 2015). La plupart d'entre eux sont listés dans la **Table 1**. Certains KO ubiquitaires de FGF présentent une létalité précoce. C'est le cas des KO pour FGF4, FGF8 et FGF15 qui ne dépassent pas le stade embryonnaire, ou FGF9, FGF10 et FGF18 qui meurent à la naissance. Ces KO présentent pour la plupart d'importantes anomalies de développement : défauts au niveau des poumons (FGF9 et FGF10), du cœur (FGF9, FGF10 et FGF15), du système nerveux central (FGF15 et FGF18), voire défauts de gastrulation (FGF8). D'autres sont viables, mais présentent des défauts métaboliques ou tissulaires variés : développement squelettique (FGF2, FGF3, FGF20), fonctionnement du système nerveux central (FGF2, FGF7, FGF13, FGF14, FGF17, FGF22) ou de la pilosité (FGF5, FGF7, FGF20). Il est intéressant de noter que le KO ubiquitaire pour FGF1 n'a pas montré de phénotype particulier, bien qu'une délétion conditionnelle a donné un défaut du métabolisme des lipides (Miller et al., 2000). Cela pourrait être expliqué par des phénomènes de compensation de l'absence de FGF1 par d'autres FGF.

Les KO ubiquitaires des FGFR présentent également des phénotypes variables, montrant les rôles essentiels de ces récepteurs. Les KO pour FGFR1 et FGFR2 sont tous deux létaux très tôt durant le développement embryonnaire, aux stades préimplantatoires (Arman et al., 1998; Brewer et al., 2016; Deng et al., 1994). Ceci reflète la grande contribution de ces deux gènes dans les premiers stades du développement. Le KO FGFR3 est en revanche viable. Il se caractérise par une croissance excessive du squelette, avec un allongement et une déformation des os des membres et de la colonne vertébrale (Colvin et al., 1996; Deng et al., 1996; Su et al., 2010). Le KO FGFR3 ne présente en revanche pas d'anomalie sévère du crâne. Cette croissance augmentée est en adéquation avec le rôle de régulateur négatif de la croissance osseuse de FGFR3 et le phénotype humain de syndrome CATSHL (camptodactyly, tall stature, and hearing loss) associé à une perte de fonction de FGFR3.

Le KO FGFR4 est lui aussi viable. Le phénotype associé est la présence d'une vésicule biliaire réduite et une augmentation du métabolisme de la bile. Dans le cas d'un régime accru en cholestérol, ces animaux développent une hépatomégalie (Weinstein et al., 1998; Yu et al.,

2000). Il est intéressant de noter que le double mutant pour FGFR3 et FGFR4 présente des défauts alvéolaires au niveau du poumon (Weinstein et al., 1998). Ce phénotype, n'apparaissant chez aucun des deux simples KO, met en évidence la coopération de FGFR3 et FGFR4 dans l'alvéogénèse.

Gene Name	Viability /Age at Death of Null Mutant	Null Phenotype (Organ, Structure, or Cell Type Affected)	Tissue-Specific (Conditional) Phenotypes, Redundant Phenotypes, Phenotypes Induced by Physiological Challenge
FGF			
Fgf1	Viable	No apparent phenotype	An aggressive diabetic phenotype with white adipocyte remodeling on high-fat diet
Fgf2	Viable	Cortical neuron, vascular smooth muscle, blood pressure, skeletal development, and wound healing	Decreased cardiac hypertrophy induced by ischemic injury and delayed wound healing; Increased bone mineralization in high molecular weight isoform knockout
Fgf3	Viable	Inner ear and skeletal development	Heart development (redundant with Fgf10)
Fgf4	E4-5	Blastocyst inner cell mass	Limb bud development (redundant with Fgf8)
Fgf5	Viable	Hair follicle development	
Fgf6	Viable	Muscle development	Muscle regeneration
Fgf7	Viable	Hair follicle and ureteric bud development and synaptogenesis	Thymus regeneration (radiation injury) and wound healing
Fgf8	E7	Gastrulation	Heart field, limb, somitogenesis, kidney, CNS, inner ear development, spermatogenesis
Fgf9	P0	Lung, heart, skeletal, gonad, inner ear, and intestine development	Migration of cerebellar granule neurons and kidney agenesis (redundant with Fgf20)
Fgf10	P0	Limb bud, lung bud, trachea, thymus, pancreas, pituitary, palate, tongue epithelium, cecum, kidney, submandibular, salivary, lacrimal, and mammary gland, heart, stomach, and white adipose tissue	Lung branching morphogenesis and inner ear development (redundant with Fgf3)
Fgf11	Viable	No identified phenotype	
Fgf12	Viable	No identified phenotype	Severe ataxia and motor weakness (redundant with Fgf14)
Fgf13	Viable	Neuronal migration, learning and memory deficits, and microtubule binding	
Fgf14	Viable	Ataxia, motor weakness, learning and memory deficits, and impaired neuronal excitability	Severe ataxia and motor weakness (redundant with Fgf12)
Fgf15	E13.5-P7	Cardiac outflow tract development, neurogenesis, and bile acid metabolism	Liver regeneration
Fgf16	Viable	Heart development	Promotes cardiac remodeling induced by angiotensin II
Fgf17	Viable	Cerebellum and frontal cortex development	
Fgf18	P0	CNS, skeletal, palate, and lung development	
Fgf20	Viable	Guards hair, teeth, cochlea, and kidney development	Kidney agenesis (redundant with Fgf9)
Fgf21	Viable	Energy/lipid metabolism	
Fgf22	Viable	Synaptogenesis	Decreased skin papillomas formation following carcinogenesis challenge
Fgf23	PW4-13	Phosphate and vitamin D homeostasis, deafness, middle ear development	
FGFR			
Fgfr1	E7.5-9.5	Gastrulation, Blastocyst inner cell mass	Hematopoietic cell engraftment Osteoblast maturation Limb bud development Hippocampal progenitor cell proliferation Inner ear sensory epithelium Deletion of Ig domain 1 (defect in node regression) Adipocyte metabolism Endothelial Tgfβ expression and endothelial-mesenchymal transition; Endothelial regulation of CXCR4 in liver regeneration and fibrosis Spermatogenesis
Fgfr2	E10-11	Placenta, no limb buds	Skeletal, lung, limb bud, CNS, GI tract, skin, and adrenal cortex development in Fgfr2b null mice
Fgfr1/2			Myelin sheath thickness in oligodendrocyte Kidney, metanephric mesenchyme, ureteric bud, ocular gland development Angiogenesis, vascular integrity Hepato-cytoprotective through regulation of cytochrome P450 enzymes
Fgfr3	Viable	Skeletal overgrowth, inner ear, brain, articular cartilage, oligodendrocyte differentiation, pancreatic growth, intestinal crypt cell growth arrest	Alveolar septation and elastogenesis (redundant with Fgfr4)
Fgfr4	Viable	Cholesterol metabolism and bile acid synthesis	Increased liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride Alveolar septation and elastogenesis (redundant with Fgfr3) Vitamin D homeostasis (redundant with Fgfr3) Phosphate homeostasis (redundant with Fgfr1)
Fgfr1	P0	Kidney, diaphragm, skeleton	

Table 1 : (d'après Ornitz et Itoh, 2015) Liste des phénotypes des KO ubiquitaires et conditionnels des différents FGF et FGFR chez la Souris.

Développement embryonnaire cérébral

Le développement du système nerveux central est un processus long et complexe qui prend place durant une majeure partie du développement embryonnaire. A cet égard, il met en jeu de nombreux facteurs morphogènes et différents signaux.

Durant la gastrulation se mettent en place les premières migrations cellulaires au sein de l'embryon. L'embryon passe d'une structure à un feuillet à une organisation en trois feuillets distincts : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. De ces trois feuillets, une spécialisation des aires et des cellules va permettre la morphogénèse des différents tissus.

Formation de la plaque neurale

Au cours de la gastrulation, l'ectoderme se subdivise en ectoderme neural ou ectoderme non-neural sous l'influence des signaux FGF, Bone Morphogenetic Protein (BMP) et Wnt (Wingless/Integration site). En partie médiane de l'embryon, l'expression des FGF et d'antagonistes des BMP et de Wnt va conduire à une différenciation de l'ectoderme en ectoderme neural (devenant ensuite neurectoderme) (**Figure 4**). Dans les zones latérales, à l'inverse, les signalisations Wnt et BMP vont inhiber les FGF et permettre une différenciation non-neurale de l'ectoderme (Guillemot and Zimmer, 2011; Lassiter et al., 2014; Singh and Groves, 2016). La différence entre ectoderme neural et ectoderme non neural va se prononcer. Une frontière du neurectoderme se met en place (Singh and Groves, 2016). Le neurectoderme va augmenter en épaisseur au niveau médian afin de devenir la plaque neurale.

Dans le même temps, la spécificité de l'axe antéro-postérieur du cerveau est induite par l'Acide Rétinoïque (AR). L'AR est produit par la partie postérieure de l'ectoderme et diffuse en gradient vers la partie antérieure. Il a été montré que l'AR agit en coopération avec les FGF pour contrôler la formation de cet axe antéro-postérieur. Ceci se traduit par une expression différentielle des gènes HOX et une spécialisation des différentes régions le long de l'axe antéro-postérieur (Shiotsugu et al., 2004; Singh and Groves, 2016).

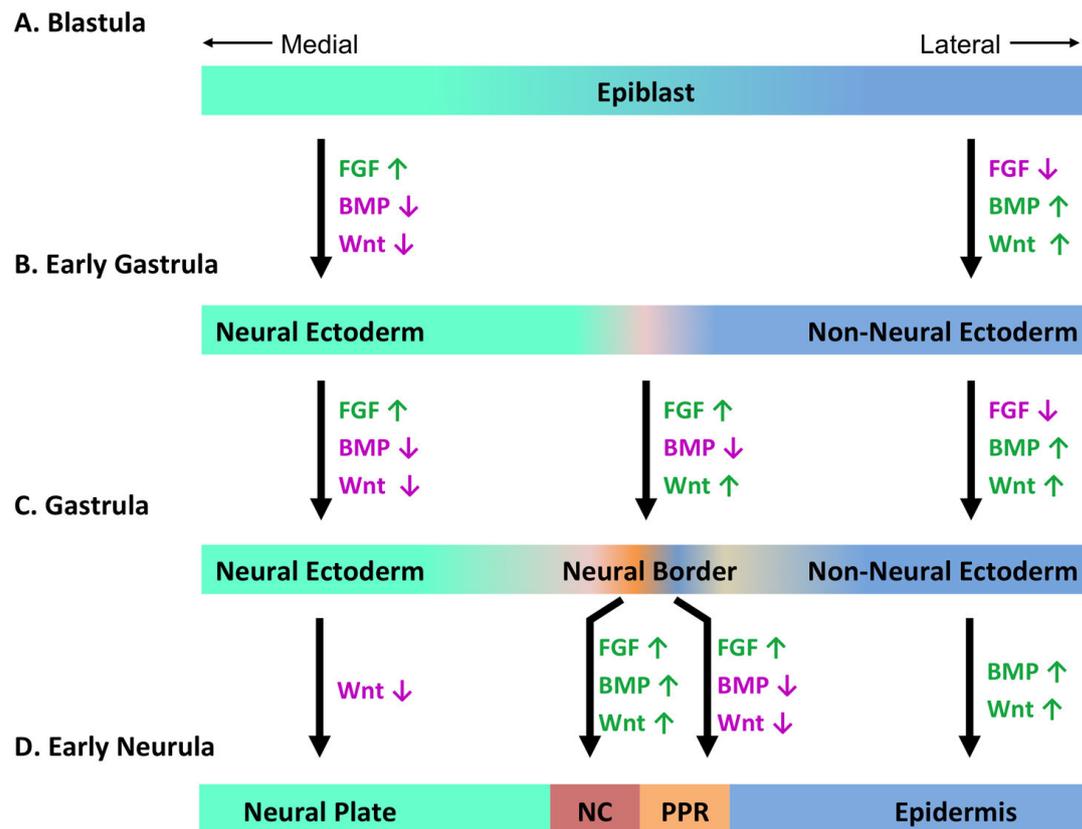


Figure 4 : (d'après Singh et Groves, 2016) Spécification du tissu neural embryonnaire. (A) Pendant la gastrulation, le signal FGF va induire la formation du neurectoderme, tandis que les signaux BMP et Wnt induisent la formation de l'ectoderme non-neural dans les zones latérales. (B) Une zone de frontière du neurectoderme se forme sous l'impulsion des signaux FGF et Wnt, réprimant les signaux BMP. La frontière du neurectoderme se subdivise ensuite pour former les crêtes neurales (NC) et les régions pré-placodales (PPR), tandis que la plaque neurale initie son invagination pour former le tube neural.

La plaque neurale va subir une invagination le long de l'axe antéro-postérieur. Cette invagination du tissu va lui faire adopter une forme de gouttière, la gouttière neurale, dont les parois vont ensuite augmenter en épaisseur, se rejoindre et fusionner à leur extrémité supérieure, formant ainsi le tube neural (**Figure 5A**). Dans le centre de la plaque neurale, on trouve une cavité, le canal neural, précurseur des futurs ventricules cérébraux. L'ectoderme non neural va lui aussi croître et venir recouvrir le tube neural. La zone de fermeture du tube neural (préalablement frontière de la plaque neurale), forme différents territoires : les crêtes neurales et les régions pré-placodales (Adameyko and Fried, 2016; de Lahunta et al., 2016; Schlosser, 2014).

Les crêtes neurales et les régions pré-placodales sont constituées de cellules épithéliales. Par transition épithélio-mésenchymateuse, les cellules vont migrer et se différencier afin de participer à la formation du crâne et de la face, des organes sensoriels, du système nerveux périphérique et de certaines glandes sécrétrices (Lassiter et al., 2014; Singh and Groves, 2016). Les régions pré-placodales formeront les placodes. Elles constituent des aires dont le devenir et la fonction future ont été identifiés de manière précise, comme la placode olfactive qui générera l'épithélium olfactif de la cavité nasale, ou la placode otique qui donnera naissance aux structures de l'oreille interne.

Le territoire de la crête neurale va être induit par une activation conjointe des trois signaux FGF, BMP et Wnt. Les régions pré-placodales vont quant à elles être induites par une activation de la voie des FGF et une répression des voies BMP et Wnt (**Figure 4**).

La fermeture du tube neurale débute en position médiane et va se poursuivre en direction rostrale et caudale. En partie rostrale, le tube neural va se développer pour former trois vésicules : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale (**Figure 5B**) (de Lahunta et al., 2016).

La partie postérieure du prosencéphale va former le diencephale. À ce niveau se forment les vésicules optiques (issues des placodes optiques) qui formeront la rétine. Au niveau antérieur du prosencéphale, deux vésicules se forment en positions latérales : les vésicules télencéphaliques. Ces vésicules vont ensuite croître et se développer pour former le télencéphale. Du télencéphale découleront les structures des hémisphères cérébraux, des noyaux basaux et des ventricules latéraux. Le diencephale va donner naissance à plusieurs structures parmi lesquelles le thalamus, l'hypothalamus, la neurohypophyse et le troisième ventricule (de Lahunta et al., 2016). Le mésencéphale va former la partie supérieure du tronc cérébral. Le rhombencéphale quant à lui va se subdiviser pour former le métencéphale et le myelencéphale. Le métencéphale va se développer en position dorsale pour former le cervelet et en position ventrale le pont. Le myelencéphale va former le bulbe rachidien (**Figure 5B**).

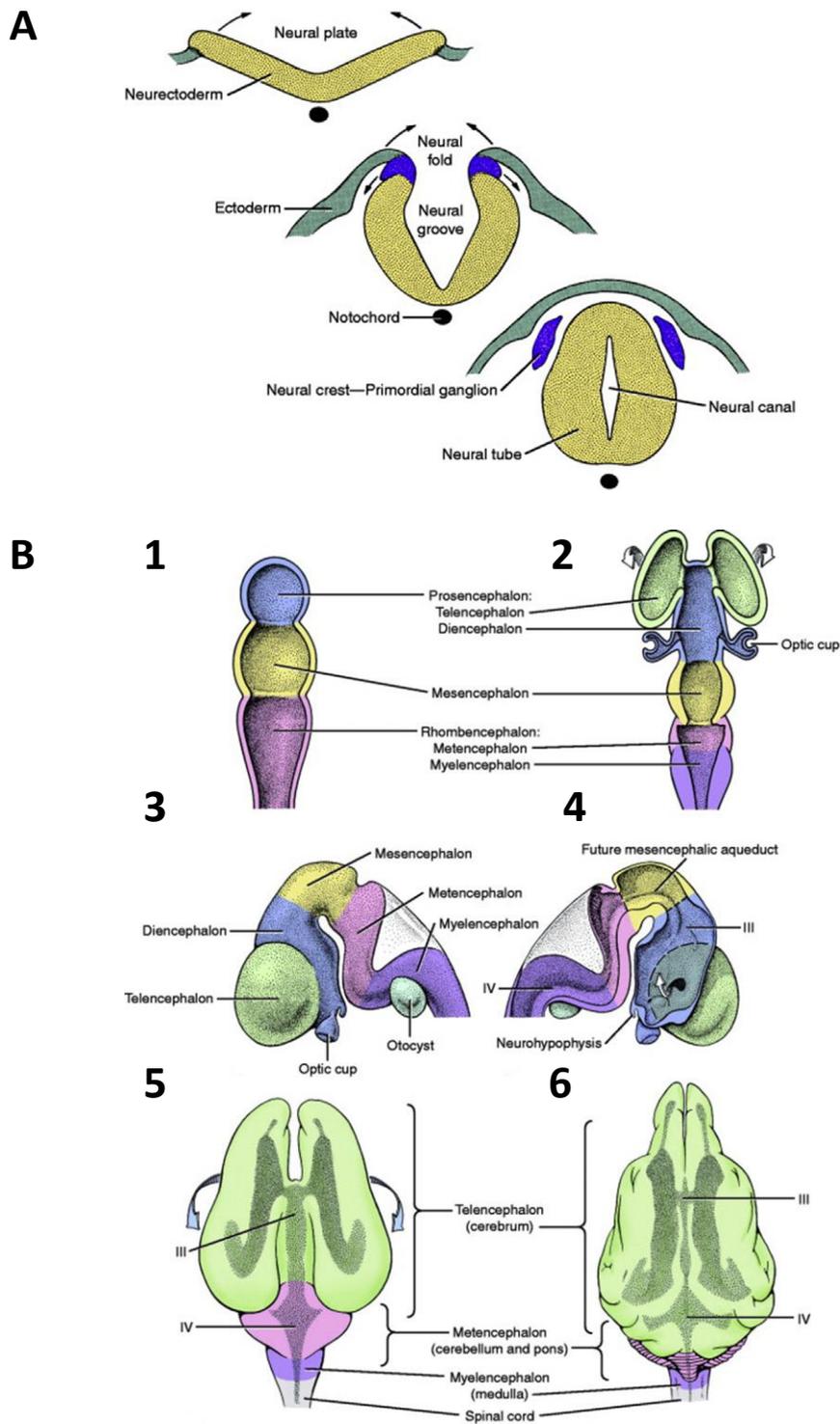


Figure 5 : (d'après de Lahunta et al, 2016) Développement embryonnaire du système nerveux central. (A) Fermeture du tube neural et formation des crêtes neurales. (B) Formation des vésicules du tube neural. Le prosencéphale (bleu) va donner le télencéphale (vert), qui donnera les hémisphères et le diencephale (bleu). Le mésencéphale (jaune) et le rhombencéphale (violet) participeront à la formation du tronc cérébral et du cervelet.

Les FGF participent à cette régionalisation du tissu neural. Au niveau de l'organisateur isthmique, région de délimitation entre le mésencéphale et le métencéphale, l'expression de FGF8, FGF17 et FGF18 va réguler séparément le développement des deux zones. L'isoforme FGF8a avec FGF17 et FGF18 va induire le développement du mésencéphale, tandis que FGF8b va participer à l'induction du développement du cervelet à partir du métencéphale (Guillemot and Zimmer, 2011; Liu et al., 2003). Dans le diencephale, FGF8 va également induire la formation du territoire présomptif du thalamus. Dans le télencéphale, FGF8 va induire la survie des progéniteurs neuronaux et participer à la formation du cortex cérébral antérieur (Paek et al., 2009). FGF17 et FGF15, vont participer à la formation de la partie postérieure du cortex (Borello et al., 2008; Guillemot and Zimmer, 2011). FGFR3 a été montré comme un régulateur de la croissance du cortex, notamment du cortex caudal et occipito-temporal en y stimulant la prolifération cellulaire. Au cours du développement, l'expression de FGFR3 est diffuse selon un gradient rostro-caudal sur l'ensemble du télencéphale, chevauchant l'expression de FGFR1 et FGFR2 exprimés eux aussi dans l'ensemble du cortex (Iwata and Hevner, 2009). Le modèle murin KO pour FGFR3 montre ainsi une importante réduction de la taille du télencéphale, avec une réduction de la taille de l'hippocampe, de l'amygdale et de l'épaisseur corticale (Moldrich et al., 2011). À l'inverse, le modèle murin exprimant spécifiquement dans le système nerveux central la mutation gain de fonction *Fgfr3*^{K644E/+} qui est associée à la dysplasie thanatophore, présente une augmentation du volume du télencéphale. Cette augmentation est due à une augmentation du taux de prolifération des progéniteurs au cours du développement embryonnaire, sans pour autant augmenter la différenciation neuronale. L'apoptose est également augmentée et associée chez le mutant à une suractivation de la voie MAPK (Inglis-Broadgate et al., 2005; Thomson et al., 2009, 2007).

Neurogenèse du tube neural

Le tube neural est constitué de cellules encore indifférenciées, les cellules du neurectoderme. Ces cellules ont une organisation pseudostratifiée et prolifèrent activement pour permettre la croissance du tissu. Au cours du cycle cellulaire, leur position relative dans le tissu varie. En interphase et pendant la phase S, le noyau cellulaire se trouve dans la partie externe du tube. Au cours de la mitose, le noyau et le cytoplasme migrent vers le canal neural pour se diviser de manière symétrique. Les cellules migrent alors vers la partie externe afin d'initier leur différenciation (de Lahunta et al., 2016). Cette différenciation se fait de deux manières.

Certaines cellules vont donner des neurones immatures (aussi appelées neuroblastes), qui vont au cours de leur différenciation étendre leur projections cytoplasmiques afin de former les futures corps axonaux. D'autres cellules, donneront des spongioblastes. Les spongioblastes sont les progéniteurs des oligodendrocytes qui formeront la gaine de myéline protégeant les axones et des astrocytes responsables de la barrière hématoencéphalique (Götz and Huttner, 2005).

Le tube neural gagnant en complexité, une couche de cellules différenciées se forme à l'extérieur et certaines cellules migrent pour rejoindre d'autres régions. Les cellules neuroépithéliales non différenciées donnent naissance à une lignée de progéniteurs neuronaux, les cellules gliales radiales qui les remplaceront dans les stades plus tardifs (Götz and Huttner, 2005). Il a été montré que FGF2 et FGF8 participaient au maintien de l'état indifférencié des cellules neuroépithéliales, tandis que FGF10 favorisait leur passage en cellules gliales radiales (Sahara and O'Leary, 2009).

L'Hippocampe

Structure de l'hippocampe

Le cortex cérébral formé par le télencéphale se divise en trois régions. Le néocortex forme les zones de la surface externe du cortex, marqué par des circonvolutions. Le néocortex est constitué de six couches de neurones et joue un rôle dans les perceptions sensorielles, la conscience ou les fonctions motrices volontaires. Le paléocortex comporte les bulbes olfactifs et le cortex piriforme. Enfin, l'archicortex va constituer l'hippocampe (de Lahunta et al., 2016).

L'hippocampe est localisé sous la surface corticale (situé dans le lobe temporal médian chez l'Homme). Il adopte une forme repliée sur elle-même, rappelant la silhouette de l'animal marin du même nom. Il est ainsi composé de deux parties distinctes : la Corne d'Amon (CA, du nom du dieu égyptien à cornes de bélier), divisé en trois sous-régions (CA1, CA2, CA3) et le gyrus denté (DG) (**Figure 6A**).

L'hippocampe est une structure fortement associée à plusieurs processus cognitifs. Il est impliqué dans les processus de mémoire, mais également à la réponse émotionnelle et la réponse au stress. Ces processus sont régulés par des facteurs endogènes, mais également

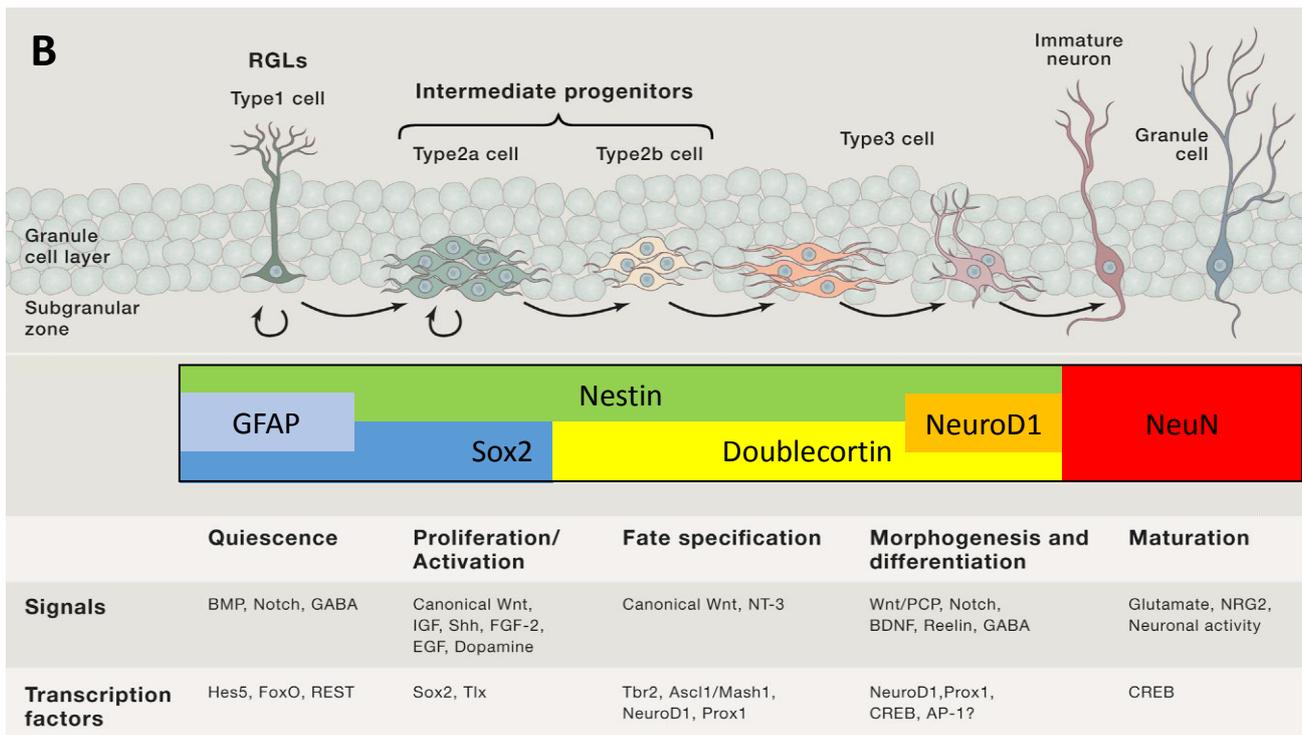
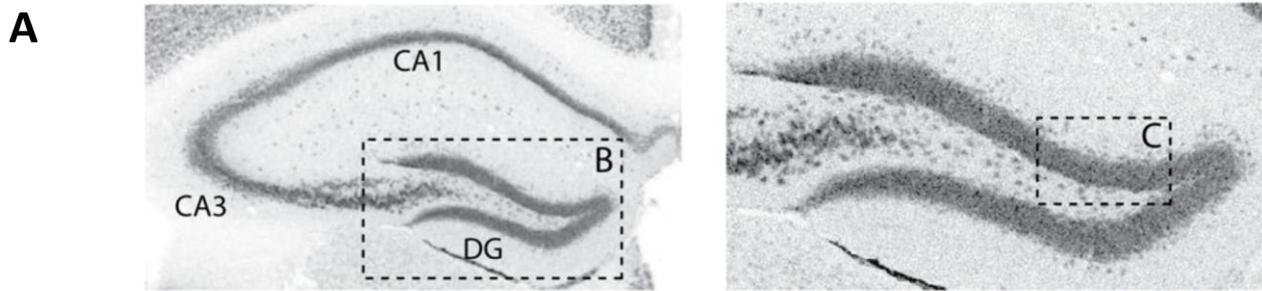


Figure 6: (A) (d'après Urbán et Guillemot, 2014) Coupe histologique montrant la structure de l'hippocampe. La zone granulaire est montrée marquée par immunohistochimie (marqueur neuronal NeuN). (B) (adapté de Gonçalves et al, 2016) Schéma représentatif du processus de différenciation des NSC en neurones. À chaque type de cellules sont indiqués les marqueurs spécifiques, les voies de signalisation et les facteurs de transcription impliqués.

par des facteurs externes comme l'exercice physique ou l'environnement enrichi (Ekstrand et al., 2008). L'hippocampe est également impliqué dans des pathologies où ces processus cognitifs sont altérés comme le syndrome d'Alzheimer, les troubles dépressifs ou l'anxiété (Hayashi et al., 2018; Pino et al., 2017).

Structure du gyrus denté (DG)

Dans le DG, une région dense en corps cellulaires peut être distinguée : la zone granulaire, qui renferme une population hétérogène de cellules. Le DG se différencie au stade E14.5 en se formant à partir du neuroépithélium denté, dans la zone ventriculaire du télencéphale. Il est ensuite colonisé à la fin de la gestation par d'autres progéniteurs non différenciés issus du neuroépithélium denté, qui vont former la zone granulaire en proliférant. Après la naissance, la prolifération est restreinte à la seule zone sub-granulaire (Urbán and Guillemot, 2014). Dans la période périnatale, le DG est à nouveau colonisé par une population de cellules sensibles à Sonic Hedgehog (Shh) provenant de l'amygdale (Li et al., 2013; Urbán and Guillemot, 2014). Certaines cellules resteront non différenciées même au stade adulte : le DG constituera alors une niche de cellules souches neuronales quiescentes (NSC). La transition d'une prolifération de progéniteurs embryonnaires vers une prolifération plus lente de NSC se fait aux alentours du 14^e jour postnatal chez la souris.

Neurogenèse du DG

Au sein du DG, plusieurs types de ces progéniteurs sont présents. Les NSC quiescentes, aussi appelées cellules Radial Glial-like (RGL, de par leur similarité avec les cellules radiales gliales) ou cellules de type 1, expriment le facteur de transcription Sox2, qui contrôle la multipotence et la capacité de prolifération de ces cellules, et les marqueurs GFAP et Nestin, composants du cytosquelette de ces cellules (Bernal and Arranz, 2018; Yang and Wang, 2015). Les RGL peuvent générer des progéniteurs intermédiaires de type 2 qui ont une prolifération active (cellules de type 2a). Les cellules de type 2a expriment elles aussi Sox2 et Nestin, mais cessent d'exprimer GFAP. Ces cellules de type 2a vont s'engager en différenciation et devenir des cellules de type 2b, exprimant les marqueurs Nestin et Doublecortin. Doublecortin constitue également un composant du cytosquelette et un marqueur des progéniteurs en migration (Walker et al., 2007). Les cellules de type 2b donnent ensuite des cellules de type 3, les neuroblastes. Ces cellules expriment entre autres le facteur de transcription NeuroD1, qui va stimuler leur survie et leur maturation, et aussi toujours les marqueurs Nestin et Doublecortin (Gao et al., 2009; Patten et al., 2015). Les neuroblastes vont ensuite continuer leur différenciation pour donner des neurones matures, exprimant notamment la protéine nucléaire NeuN. Ce processus de différenciation est long : un nouveau neurone mettra

environ un mois avant d'atteindre sa maturation et d'être intégré au circuit synaptique de l'hippocampe (**Figure 6B**).

Le DG est l'une des deux seules régions où des processus de neurogenèse sont observés dans le cerveau adulte. L'autre région est la zone sub-ventriculaire (SVZ). La SVZ va produire de nouveaux progéniteurs neuronaux qui vont migrer jusqu'au bulbe olfactif, et seront intégrés pour l'encodage et le traitement de l'information lié à l'olfaction (Pino et al., 2017). Des processus de différenciation neuronale, se faisant à partir de neuroblastes déjà partiellement engagés en différenciation, ont également été observés dans le cortex cérébral ou le cervelet (Pino et al., 2017).

Le mécanisme de différenciation de ces NSC au sein du DG reste encore mal compris. Néanmoins, plusieurs voies de signalisation (Shh, BMP, Notch, Wnt, IGF, FGF) et facteurs de transcriptions (ISox2, NeuroD1, CREB) ont montré un rôle dans la régulation de ce processus de neurogenèse.

La signalisation Shh joue un rôle dans la prolifération des progéniteurs embryonnaires. Shh est également suspecté de jouer un rôle mitogénique dans les NSC adultes, bien que son effet ne soit pas clairement identifié (Urbán and Guillemot, 2014). Les Insulin Growth Factors (IGF), jouent également un rôle dans la stimulation de la neurogenèse chez l'adulte, via la voie de signalisation PI3K-Akt. L'impact positif de l'exercice physique sur la neurogenèse se fait via la signalisation IGF. Les différents membres des BMP semblent avoir des effets à la fois au niveau de la quiescence et de la différenciation des progéniteurs embryonnaires et adultes (Gonçalves et al., 2016). La voie Wnt a le même effet dans la neurogenèse embryonnaire et adulte et semble jouer un rôle dans la différenciation des cellules de type 2 et type 3 pour leur maturation en neurones. Elle agit également au niveau de la prolifération des NSC (Urbán and Guillemot, 2014). La voie de signalisation Notch permet le maintien de la multipotence des NSC chez l'embryon et semble avoir un effet similaire dans le DG adulte (Gonçalves et al., 2016; Urbán and Guillemot, 2014).

Fonctions du DG

Dans les processus de mémoire épisodique (c'est-à-dire lié à un contexte ou un événement) et de navigation spatiale, l'hippocampe a un rôle intégrateur de différents signaux provenant d'aires spécialisées de l'ensemble du cerveau. Il intègre entre autre des signaux des aires

sensorimotrices, des aires sensorielles (visuelle, auditive, etc) et des aires liées à la conscience via le cortex entorhinal, qui constitue le point d'entrée synaptique vers l'hippocampe. Il se compose d'un circuit trisynaptique (trois connections successives) entre le DG et les régions du CA3 puis du CA1. Les neurones du DG reçoivent des afférences neuronales provenant du cortex entorhinal, qui lui-même reçoit des afférences provenant d'autres régions du cerveau. Les axones du DG projettent ensuite vers la région CA3 où ils innervent les neurones pyramidaux qui s'y trouvent (possédant un soma, ou corps neuronal, à la forme caractéristique). Ces neurones projettent eux-mêmes vers le CA2 puis le CA1. Les neurones pyramidaux du CA1 projettent à nouveau vers le cortex entorhinal. Par ailleurs, autour du circuit trisynaptique, le DG reçoit également différentes afférences provenant de l'hippocampe controlatéral (dans l'autre hémisphère) ainsi que du CA3 en rétrocontrôle. De même, plusieurs projections directes sont également présentes entre le cortex entorhinal et les régions du CA (**Figure 7A**) (Knierim, 2015; Terranova et al., 2019).

Le DG contient un nombre de neurones beaucoup plus important que les régions avec lesquelles il est connecté en amont et en aval. Les neurones ont par ailleurs une faible probabilité de s'activer en réponse à ces afférences : environ 2% s'activent. Des études associent cette disparité d'activation du DG à un système d'encodage des informations, afin de discriminer des signaux proches mais différents. Seule une petite partie des cellules sera donc activée par un signal (un événement précis), tandis qu'un autre événement en activera d'autres. Cette disparité d'activation est définie sous le terme « engramme », c'est-à-dire une représentation biologique de la mémoire. Elle est définie comme cruciale pour empêcher des réponses coïncidentes à des expériences différentes, qu'elles soient passées ou présentes (**Figure 7B**). Ceci permet une discrimination des souvenirs passés entre eux, mais aussi une discrimination entre les expériences passées et les expériences présentes. La disparité d'activation est due entre autres à des connections inhibitrices au sein du DG (Gonçalves et al., 2016; Terranova et al., 2019).

Le rôle de la neurogenèse dans ce processus de mémorisation est encore flou. Néanmoins, il a été émis l'hypothèse que l'intégration des nouveaux neurones adultes pourrait jouer un rôle dans l'intégration des informations temporelles de la mémoire, la prévention d'interférences ou la flexibilité d'apprentissage en fonction de leurs connectivités (Gonçalves et al., 2016).

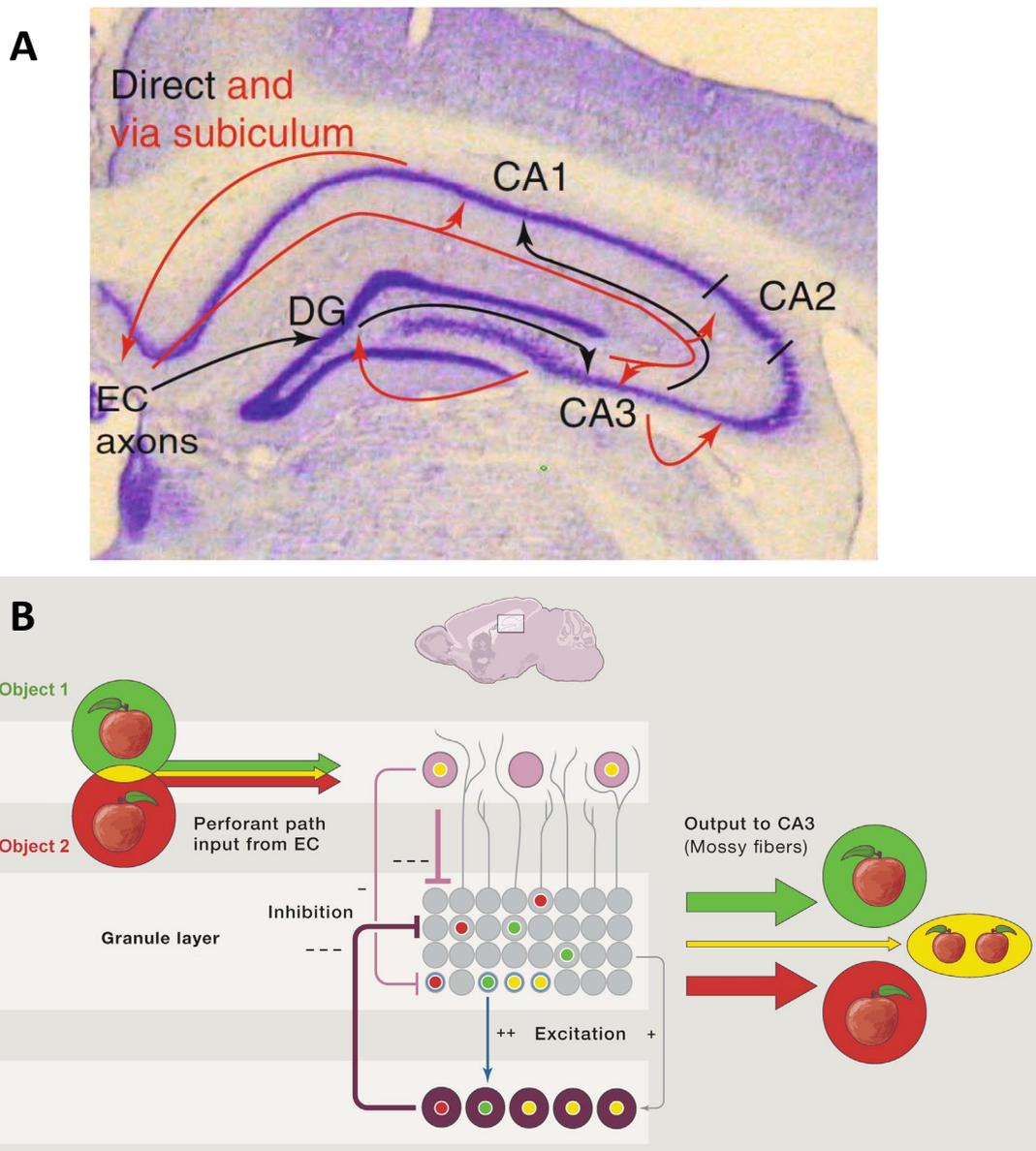


Figure 7 : (A) (d'après Knierim, 2015) : Représentation du circuit neuronal trisynaptique (flèches noires) entre l'hippocampe et le cortex entorhinal (EC). En rouge sont représentées les autres projections directes. (B) (d'après Gonçalves et al, 2016) Représentation schématique du processus d'encodage associé à la disparité des activations des neurones du DG. Les signaux de deux objets très similaires (Objet 1 vert, Objet 2 rouge) vont activer différemment une petite partie des neurones de la zone granulaire. Ceci passe par plusieurs projections inhibitrices au sein du DG, empêchant les autres neurones de répondre au signal. Certains neurones vont en outre être activés par les deux signaux (jaune). Les trois types d'activation (vert, rouge, jaune), permettent de distinguer les deux informations malgré leur similitude lors de la projection vers CA3.

Perturbation de la neurogenèse

La neurogenèse adulte diminue en intensité avec l'âge. Ceci a été observé à la fois chez l'homme mais également différentes espèces animales (singe, souris). Cette diminution est corrélée avec une diminution des performances d'apprentissage et de mémorisation avec le temps.

La neurogenèse est par ailleurs trouvée perturbée dans plusieurs situations pathologiques. Elle est par exemple activée dans le cas d'ischémie cérébrale ou de trauma, ce qui entraîne une augmentation de la prolifération et le recrutement de nouveaux progéniteurs. Dans le cas de maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, elle semble être trouvée diminuée (Pino et al., 2017).

La structure de l'hippocampe peut être influencée par les mécanismes de stress. La réponse au stress de l'organisme est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Un stimulus de stress reçu par l'organisme va conduire à l'activation de cet axe et à la production d'hormones glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes par les glandes surrénales. Dans le système nerveux central ces molécules vont agir à plusieurs niveaux, notamment au niveau de l'amygdale, du cortex préfrontal et de l'hippocampe, en se fixant sur leurs récepteurs respectifs qui y sont exprimés. Ils vont réguler l'expression génique dans ces trois régions, ce qui a pour conséquence d'influencer la formation d'épines dendritiques des neurones. Au niveau de l'hippocampe, ils influencent également la neurogenèse. Un niveau de stress faible et peu fréquent aura un effet bénéfique sur la neurogenèse et la transmission synaptique. Cela se traduit par une augmentation des capacités de mémoire. À l'inverse, un stress intense et chronique aura un effet délétère sur la neurogenèse, entre autre au niveau du DG. C'est le cas par exemple dans les troubles de l'humeur, les troubles d'anxiété ou les syndromes post-traumatiques. On a dans ces cas une forte diminution de la prolifération des progéniteurs. Ce schéma cognitif n'est cependant pas aussi clair : il a été montré que des souris placées dans un test de défaite sociale (Social defeat, situation de stress intense) présentaient une neurogenèse augmentée (Lagace et al., 2010; Pino et al., 2017).

FGF dans les processus de neurogenèse

Bien que le rôle des FGF dans la neurogenèse hippocampique soit encore mal compris, plusieurs études mettent en évidence leur importance dans ce processus. Kang et Hébert ont

ainsi montré que FGFR1, 2 et 3 étaient nécessaires pour le renouvellement des NSC. Au niveau des progéniteurs, ces trois récepteurs ne sont pas nécessaires au maintien du nombre de cellules, mais sont suffisants pour promouvoir leur prolifération et leur différenciation. La suppression d'un des trois récepteurs va ainsi diminuer le nombre de NSC et donc le nombre de neurones en différenciation. Elle n'influe cependant pas sur le nombre de progéniteurs en prolifération. Une activation excessive de FGFR3 (mutation *Fgfr3*^{TDIIK650E}) aura l'effet inverse, augmentant à la fois le taux de renouvellement des cellules et leur différenciation. Cette suractivation de FGFR3 semble avoir un effet protecteur pour la neurogenèse lorsqu'elle est exprimée chez une souris âgée (Kang and Hébert, 2015).

Il a également été observé qu'une suppression de *Fgfr2* au stade embryonnaire a un effet sévère sur la morphologie de l'hippocampe. Ceci est accompagné d'une diminution de la prolifération et de la différenciation du DG et de la mémoire spatiale. La même délétion chez l'adulte n'aura pas d'effet sur la morphologie de l'hippocampe et un effet réduit sur la prolifération, avec une mémoire spatiale à court terme réduite et une mémoire à long terme inchangée (Stevens et al., 2012). Par ailleurs, un modèle invalidé pour *Fgfr1* sous un promoteur GFAP présente un phénotype d'hyperactivité sans modification significative des capacités d'apprentissage (Müller Smith et al., 2008).

Les FGF, notamment FGF2, semblent stimuler la prolifération des NSC et leur maturation. Un effet des FGF a également été montré sur la synaptogenèse. Des études ont montré le rôle différentiel de FGF7 et FGF22 dans la formation de synapses activatrices ou inhibitrices dans le CA3 (Dabrowski et al., 2015; Terauchi et al., 2010).

Les FGF ont également été montrés comme agissant dans les troubles de l'humeur. FGF2 a ainsi été montré comme ayant un rôle antidépresseur (Elsayed et al., 2012; Wang et al., 2018). Il a par ailleurs été montré comme ayant un effet anxiolytique, en régulant positivement l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe (Salmaso et al., 2016). A l'inverse, FGF9 a, quant à lui, montré un effet dépresseur et anxiogène (Aurbach et al., 2015).

Développement craniofacial et squelettique

Développement du crâne

Au cours de l'embryogenèse, au moment de la fermeture du tube neural, les cellules de la jonction entre le tube neural et l'ectoderme forment une structure parallèle : la crête neurale. En position plus ventrale se forme un autre domaine, le mésoderme paraxial (Ishii et al., 2015).

La crête neurale entoure le tube neural sur toute sa longueur. Elle va participer à la formation de différents tissus en fonction de sa position sur cet axe. Les cellules de la crête neurale vont, au cours du développement embryonnaire, suivre une transition épithélio-mésenchymateuse et migrer vers des zones bien spécifiques pour suivre leur différenciation. Les cellules de la crête neurale au niveau du tronc vont ainsi migrer et former les neurones sensoriels et les neurones du système nerveux autonome, tandis que les cellules de la crête neurale cardiaque vont participer à la formation du cœur. Les cellules de la partie rostrale des crêtes neurales vont participer à la formation des parties osseuses et cartilagineuses du crâne ainsi qu'au tissu conjonctif (Bhatt et al., 2013).

La formation des os du crâne va nécessiter la participation conjointe des cellules des crêtes neurale et du mésoderme paraxial (**Figure 8A**). Ces deux ensembles seront responsables de la formation respective des différentes parties du crâne adulte : la face et la mandibule forment le viscérocranium, la voûte crânienne (ou calvaria) et la base du crâne constituent le neurocranium. À partir des cellules de la crête neurale vont émerger les structures antérieures : les os nasaux et frontaux, maxillaire et prémaxillaire, la mandibule, ainsi que les os présphénoïde et basisphénoïde au niveau de la base du crâne (**Figure 8B**). Le mésoderme paraxial va quant à lui former les structures postérieures : les os pariétaux, interpariétaux au niveau de la voûte et l'os occipital et basioccipital au niveau de la base (Richtsmeier and Flaherty, 2013). Chez l'homme et la souris, la frontière entre les deux territoires se forme au niveau de la suture coronale sur la voûte et de la synchondrose sphéno-occipitale à la base du crâne.

La formation du tissu osseux débute par la condensation de cellules mésenchymateuses, des cellules dispersées vont s'agréger, proliférer et initier une différenciation. Au cours de leur différenciation, les cellules vont synthétiser une MEC minéralisée formant le début de la

formation de l'os. L'os prend d'abord l'apparence d'un maillage, formé de trabécules et de spicules, séparés entre elles par des travées. Ce maillage va progressivement s'épaissir, s'élargir et se remodeler. Les travées sont comblées ou changent de forme et l'os gagne ainsi en taille.

Au niveau de la voûte et de la face, les os en croissance vont venir se rejoindre. La suture se met alors en place à la frontière entre deux os et une zone non différenciée, qui va se maintenir dans cet état au cours du développement (**Figure 8B**). Cette suture joue plusieurs rôles : elle constitue une réserve de progéniteurs qui pourra intervenir dans l'ossification du crâne ultérieurement, elle assure la souplesse et l'articulation de l'ensemble du massif crânien nécessaire notamment à la naissance. Enfin, elle va permettre d'absorber les forces mécaniques provenant de la croissance du cerveau ou des mouvements comme la mastication (Rice, 2008). Les os du crâne sont séparés du système nerveux central par la dure-mère, membrane fibreuse présente entre les méninges et les os du crâne.

Dans le squelette et en particulier au niveau du crâne, l'ossification se fait selon deux processus : l'ossification membranaire et l'ossification enchondrale (**Figure 8B**) (Richtsmeier and Flaherty, 2013).

Ossification membranaire

L'ossification membranaire va consister en la formation d'une matrice osseuse directement à partir de la condensation des cellules mésenchymateuses. Des cellules dispersées vont s'agréger, proliférer et initier une différenciation ostéoblastique. Cette ossification a lieu majoritairement au niveau des os de la face et de la voûte crânienne. On la retrouve également au niveau des clavicules.

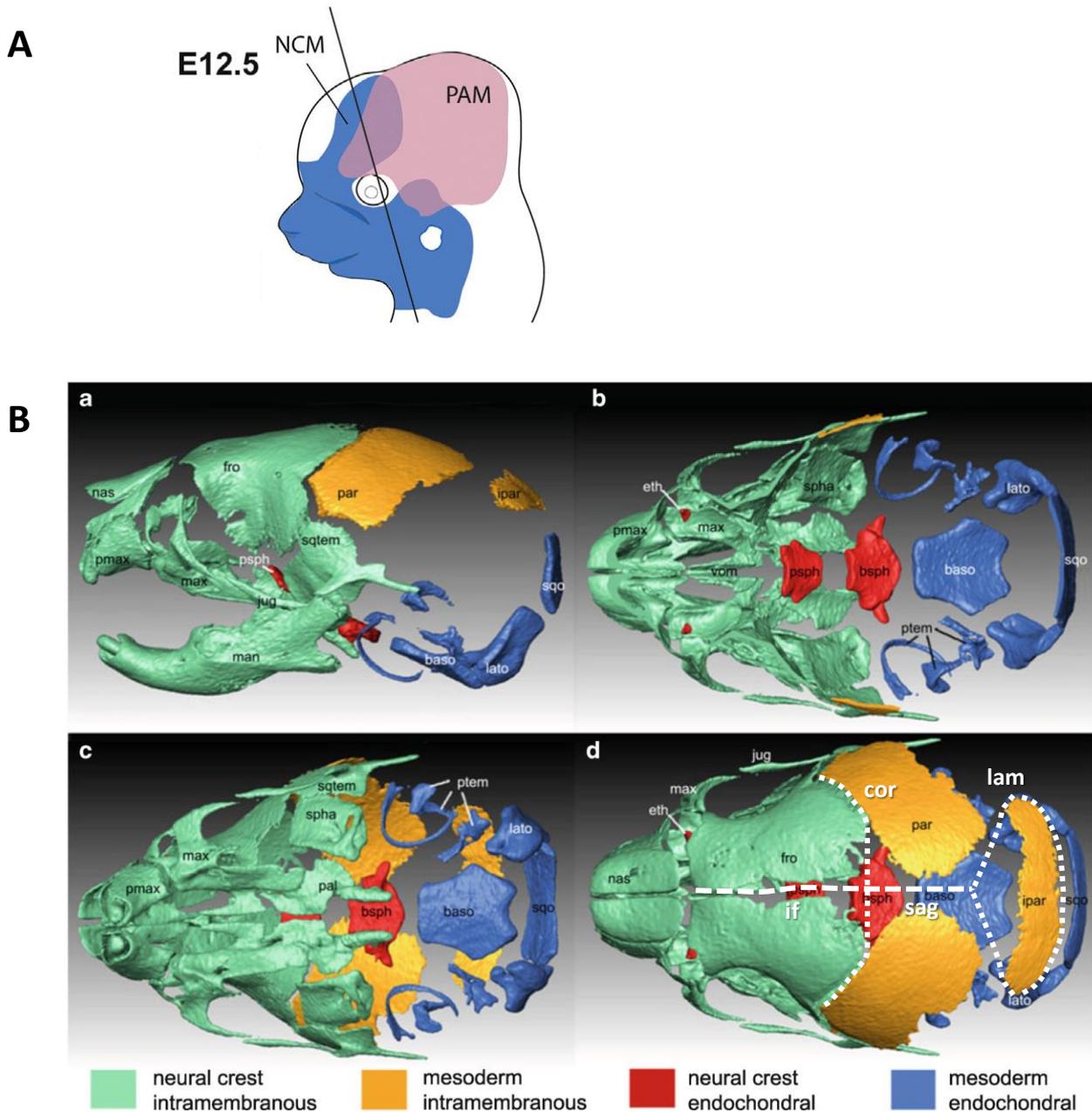


Figure 8: (A) (d'après Ishii et al., 2015) Le développement de la face et du crâne met à contribution les cellules de la crête neurale (NCM) et du mésoderme paraxial (PAM). (B) (adapté de Richtsmeier et Flaherty, 2013) Représentation de la contribution des cellules de la crête neurale et du mésoderme paraxial aux processus d'ossification membranaire et endochondrale au cours du développement du crâne de la souris (P0). Le crâne est vu de profil et du dessus en (a) et (d). (b) correspond à une vue du dessus du crâne sans la calvaria, permettant d'apercevoir les os de la base du crâne. (c) correspond à une vue du dessous sans la mandibule.

Abréviations des os de la face et de la voûte : *max* maxillaire, *nas* nasal, *man* mandibule, *fro* frontal, *par* pariétal, *ipar* interpariétal.

Abréviations des os de la base du crâne : *lato* occipital latéral, *squo* occipital squameux, *baso* basi-occipital, *psph* pré-sphénoïde, *bsph* basi-spénoïde, *eth* ethmoïde.

Abréviations des sutures (pointillés blancs): *cor* coronale, *sag* sagittale, *lam* lambdoïde, *if* interfrontale.

La condensation des cellules mésenchymateuses s'initie en réponse à des signaux locaux (Shh, BMP, Wnt, N-Cadherin). L'initiation de la condensation est notamment régulée par Shh, régulant positivement l'expression de Sox9 au niveau de la crête neurale. Les cellules vont alors proliférer et générer une MEC dense. On y retrouve des protéines comme Neural Cadherin (N-Cadherin), Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM), les Syndecans ou l'HS qui vont jouer un rôle dans le maintien des cellules en condensation et éviter leur dispersion avec la prolifération. Les zones de condensation et de prolifération sont limitées à une zone précise. Les signaux de l'Erythropoietin-producing Hepatocellular receptors (Eph receptor) et leurs ligands Ephrin vont alors délimiter les cellules en condensation des cellules mésenchymateuses alentours (Passos-Bueno et al., 2008; Rice and Rice, 2008). Les voies BMP, FGF et Wnt ont également été montrées comme jouant un rôle primordial dans l'adhésion cellulaire nécessaire à la condensation (Rice and Rice, 2008). Les facteurs de transcription TWIST ont un rôle de maintien de la zone de condensation précoce. Ils régulent l'expression d'Eph Receptor mais répriment également la poursuite de la différenciation en réprimant l'expression des gènes ostéoblastiques comme Runt-related transcription factor 2 (Runx2, aussi appelé Cbfa1) (**Figure 9**).

Les cellules mésenchymateuses peuvent également servir de progéniteurs aux adipocytes. Cet engagement vers la différenciation adipocytaire est contrôlé par le gène Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ (PPAR γ). PPAR γ inhibe l'expression des gènes de différenciation ostéoblastique comme Runx2 et favorise l'expression du programme de différenciation en adipocyte. L'expression de PPAR γ est inhibée par la voie Wnt (Long, 2012; Marie, 2008).

Régulation de la différenciation ostéoblastique

La zone de condensation augmente en taille avec la prolifération des cellules mésenchymateuses. Celles situées au centre de la zone vont se différencier en progéniteurs ostéoblastiques puis en ostéoblastes.

Les ostéoblastes ont pour activité majeure la production de MEC. Ils vont ainsi produire du Collagène de type I, qui va former un maillage dense et constituer un des principaux composants de la matrice. À ce stade, la matrice, appelée ostéoïde, n'est pas encore minéralisée. Les ostéoblastes sont situés à la périphérie de l'ostéoïde. Ils vont alors minéraliser

la MEC en formant des cristaux d'hydroxyapatite à partir de calcium et phosphate, qui va constituer 90% de la matrice osseuse. Cette minéralisation se fait grâce à l'Alcaline Phosphatase, qui va permettre la libération de phosphate dans l'espace extracellulaire. Les cristaux vont s'accumuler le long des fibres de collagène, créant alors une matrice osseuse minéralisée (Blair et al., 2011).

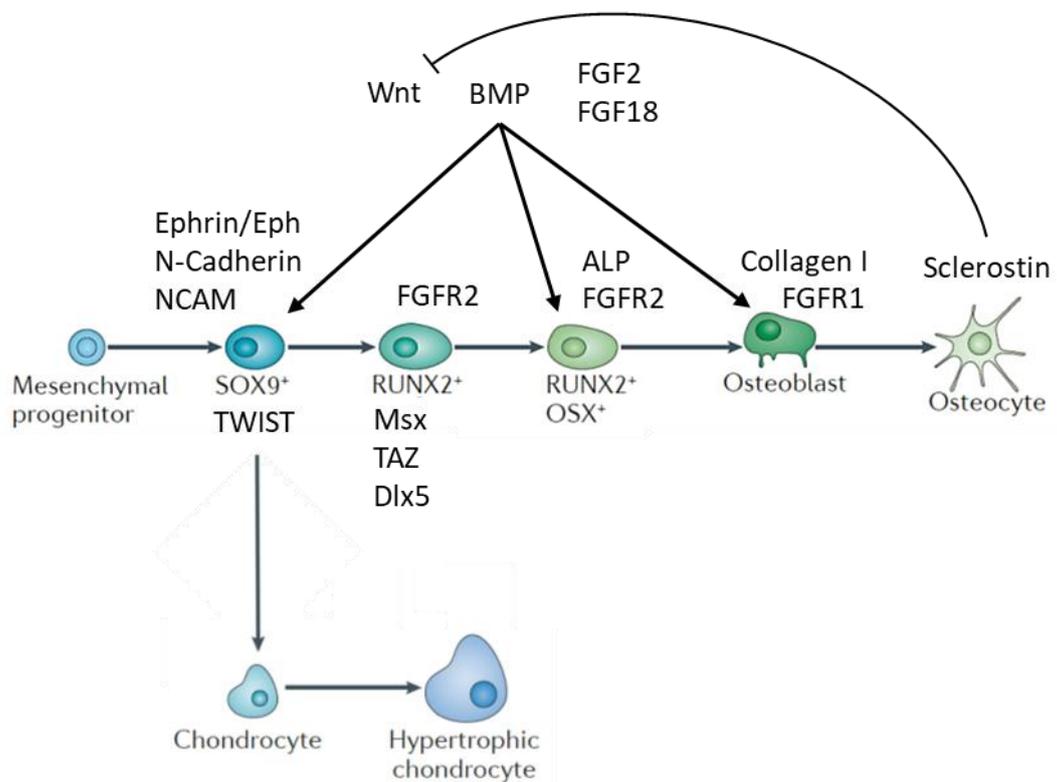


Figure 9 : (adapté de Long, 2012) Signaux et gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique. Les cellules mésenchymateuses exprimant Sox9 se condensent afin d'initier la différenciation des ostéoblastes. Cette différenciation est contrôlée par le gène Runx2 qui va interagir avec plusieurs facteurs nucléaires. Les ostéoblastes en différenciation vont exprimer du collagène de type I et ALP afin de générer une matrice minéralisée. Les voies FGF, BMP et Wnt induisent la prolifération et la différenciation des progéniteurs ostéoblastiques. Les ostéoblastes matures vont ensuite se différencier en ostéocytes, exprimant Sclerostin, exerçant un rétrocontrôle négatif sur la voie Wnt. Dans le cas de l'ossification endochondrale, les cellules mésenchymateuses peuvent également se différencier en chondrocytes.

La transcription des gènes de la différenciation ostéoblastique a pour régulateur essentiel Runx2. Ce dernier va interagir avec différents facteurs nucléaires et facteurs de transcription : Msx1 et 2, Dlx5, TAZ, Gli2 ou CBF β 1. Ceux-ci vont réguler l'action de Runx2 en agissant sur son expression ou son activation. Il en résulte l'activation de l'expression des gènes ostéoblastiques : Osterix (Osx), Osteocalcin (OC), BMP (Long, 2012; Marie, 2008). La voie BMP agit comme régulateur positif de la prolifération et de la différenciation des cellules mésenchymateuses puis ostéoblastiques. Osx (aussi appelé Sp7) est un facteur de transcription essentiel qui va contrôler la différenciation tardive des ostéoblastes (**Figure 9**). OC (aussi appelé BGLAP) est une protéine de la matrice osseuse liant le calcium, elle a également une fonction endocrine, avec une action sur la régulation du glucose, la fertilité masculine ou le développement cérébral (Moser and van der Eerden, 2019).

La voie des FGF joue un rôle de régulateur positif de l'ostéogenèse. FGF2, FGF4, FGF9 et FGF18 sont exprimés dans la calvaria en développement et ont un effet mitogénique sur les ostéoblastes de la calvaria (Britto et al., 2001; Rice et al., 2000). FGF2 en particulier, est produit par la dure-mère mais également par les ostéoblastes eux-mêmes. FGF2 et FGF18 ont au niveau de la calvaria un effet stimulateur sur la condensation par la production de N-Cadherin et sur la différenciation (Kyono et al., 2012; Lemonnier et al., 2001). Il a également été montré que l'activation de la voie PKC stimulait le transport du phosphate. FGFR1 est exprimé au niveau des cellules mésenchymateuses puis dans les ostéoblastes. FGFR2 est quant à lui retrouvé au niveau du front d'ossification, dans les ostéoblastes en différenciation. FGFR2 semble être un régulateur majeur de l'ossification craniofaciale (Eswarakumar et al., 2002; Miraoui et al., 2009). FGFR3 est exprimé dans le front ostéogénique au niveau de la suture (Delezoide et al., 1998; Ornitz and Marie, 2015; Rice et al., 2000). *In vitro*, FGFR3 et FGFR4 sont également exprimés dans des ostéoblastes tardifs (Haupt et al., 2009). L'expression des FGFR est positivement régulée par TWIST, et eux-mêmes régulent l'expression d'autres gènes ostéogéniques comme Msx2 ou le Collagène de type I (Connerney et al., 2008; Rice et al., 2000). La voie Erk1/2 a un effet mitogénique sur les progéniteurs ostéoblastiques. Dans les ostéoblastes plus tardifs, les voies Erk1/2 et PLC γ favorisent l'expression de Runx2 et la différenciation ostéoblastique (Miraoui et al., 2009). La voie PI3K-Akt a un effet anti-apoptotique sur les progéniteurs ostéoblastiques (**Figure 14A**) (Ornitz and Marie, 2015).

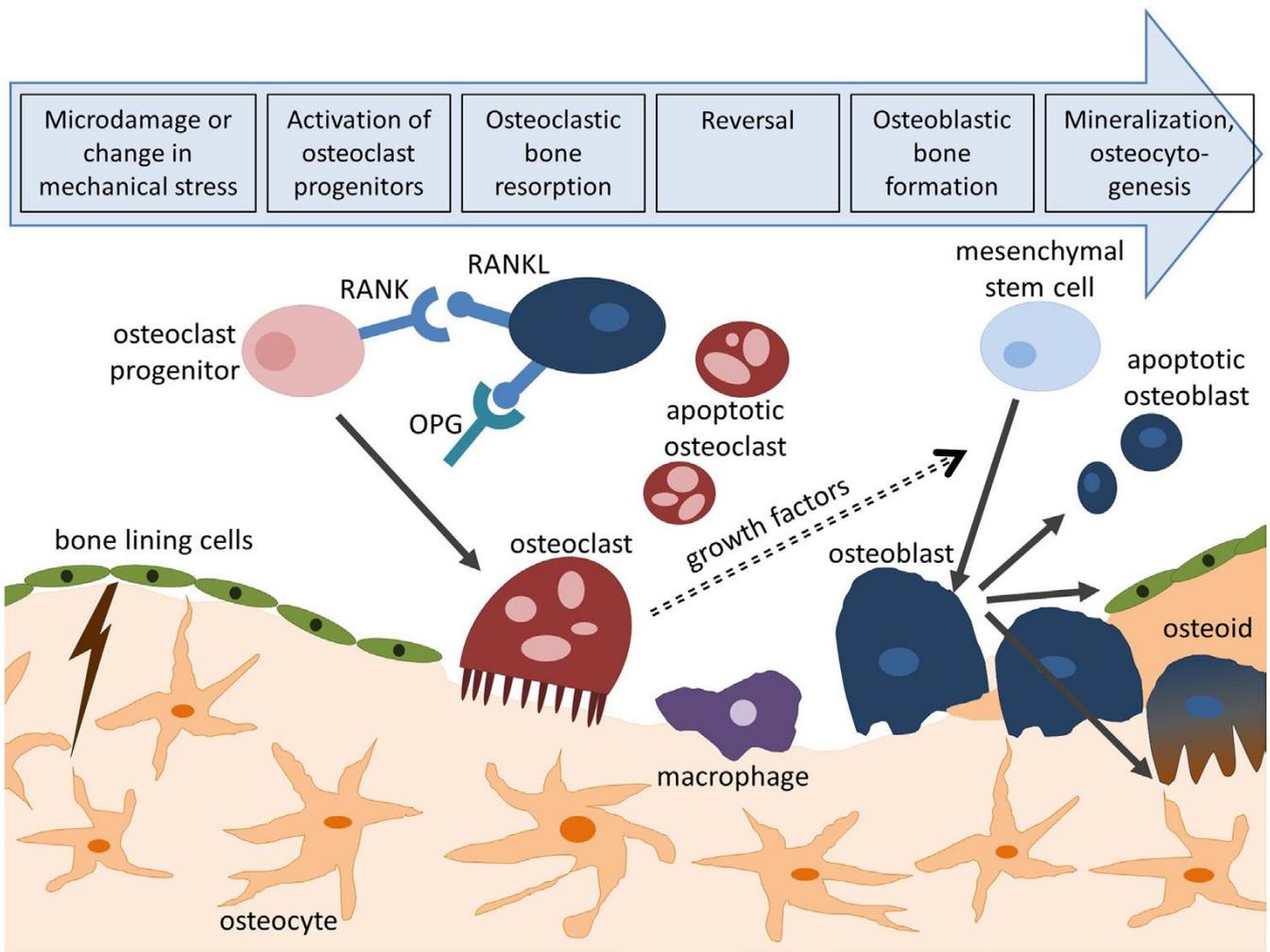


Figure 10 : (d'après Wittkowske et al., 2016) Types cellulaires de l'homéostasie osseuse. Pour garantir la structure de l'os pouvant subir des dommages dans l'organisme adulte, les ostéoblastes vont résorber la matrice minéralisée. Leur différenciation est régulée entre autres par les ostéoblastes via les signaux RANK/RANKL. Une fois la matrice résorbée et nettoyée par des macrophages, les ostéoblastes vont synthétiser de l'ostéoïde, matrice primordiale osseuse, qu'ils vont ensuite minéraliser. Les ostéoblastes vont ensuite se différencier en ostéocytes puis entrer en quiescence et tapisser la matrice ou bien entrer en apoptose.

La voie Wnt, via son effecteur intracellulaire β -catenin (β cat), va également jouer un rôle essentiel dans la différenciation ostéoblastique. Runx2, Wnt et Osx vont engager la différenciation vers un progéniteur ostéoblastique tardif puis vers un ostéoblaste (**Figure 9**) (Rice and Rice, 2008).

La matrice osseuse se développe et gagne en volume à l'ajout de nouvelles fibres et nouveaux minéraux par les ostéoblastes. Certains ostéoblastes vont alors être entourés de matrice minéralisée et se différencier en ostéocytes, tandis que d'autres vont entrer en apoptose ou en quiescence (bone lining cells). Les ostéocytes ont une durée de vie longue et jouent le rôle notamment de mécanosenseurs du tissu (Temiya et al., 2010). Ces cellules possèdent de long filopodes qu'elles projettent et étendent dans des canalicules formées dans la matrice osseuse. Ceci va permettre une communication entre les ostéocytes et la périphérie de la matrice osseuse afin de capter les nutriments, mais aussi de communiquer avec les ostéoblastes (**Figure 10**) (Wittkowski et al., 2016). En effet, les ostéocytes vont produire la protéine Sclérostine, qui va inhiber la voie Wnt au niveau des ostéoblastes et inhiber leur différenciation (**Figure 9**). En réponse à des niveaux de phosphates élevés dans le sérum, les ostéocytes vont également produire du FGF23, agissant au niveau du rein pour réduire la réabsorption de phosphate. Par ces signaux (Sclérostine, FGF23), les ostéocytes jouent le rôle de régulateurs de la formation osseuse (Long, 2012).

Le remodelage de la matrice osseuse met aussi en jeu les ostéoclastes. Ces cellules volumineuses et multi-nucléées sont issues de la différenciation de macrophages, issus de cellules souches hématopoïétiques, et vont résorber la matrice minéralisée (**Figure 10**). Cette résorption est finement régulée avec l'activité ostéoblastique afin de garantir l'homéostasie du tissu : les protéines RANKL et M-CSF produites par les ostéoblastes vont se fixer sur leurs récepteurs respectifs (RANK et c-Fms) à la membrane des ostéoclastes afin de stimuler la prolifération et la différenciation de ces-derniers (Xu and Teitelbaum, 2013). Il a été montré par ailleurs que FGF2 et FGF18 stimulaient la différenciation des ostéoclastes via FGFR1 (Ornitz and Marie, 2002).

Au cours de la croissance du crâne, l'ostéogénèse prend place au niveau du front d'ossification des os crâniens, mais également au niveau du périoste. Le périoste constitue une couche fibreuse contenant des progéniteurs ostéoblastiques le long de l'os formé. L'ostéogénèse du périoste assure une croissance de l'os dans son épaisseur. L'activité des ostéoblastes et

ostéoclastes est régulée de concert. Cela permet un remodelage des os de la calvaria afin qu'ils gagnent en épaisseur et permettent l'accroissement du cerveau.

La suture

La suture constitue la frontière entre les différents os au niveau de la face (os lacrymal, zygomatique, maxillaire, palatin, nasal) et la calvaria (os frontal, pariétal, occipital, temporal). La suture qui est au départ ouverte chez l'embryon et l'enfant va, au cours de la croissance crânienne, progressivement se fermer et s'ossifier. Les fontanelles, points de rencontre en trois sutures sur la voûte, vont se fermer, scellant ainsi la boîte crânienne. La suture passe d'une simple ligne de démarcation à un ensemble d'interdigitations connectant les deux os et consolidant l'ensemble du massif crânien chez l'adulte (**Figure 11A**).

Formation de la suture

Les sutures interfrontale (entre les os frontaux), sagittale (entre les os pariétaux) et lambdoïde (entre les os pariétaux et occipitaux) sont formées tardivement au cours du développement embryonnaire, lorsque les fronts d'ossifications se rejoignent. Les sutures coronales (entre les os frontaux et pariétaux) apparaissent beaucoup plus tôt, les centres d'ossifications des os frontaux et pariétaux se formant spatialement proches les uns des autres et se rejoignant donc rapidement dans le développement. Les sutures coronales constituent ainsi le point de rencontre des os originaires des cellules de la crête neurale et les os issus du mésoderme paraxial. Cette frontière peut être visible dès le stade embryonnaire E9.5 chez la souris. La compréhension de ces mécanismes a été possible grâce aux expériences utilisant des promoteurs de gènes spécifiques des cellules de la crête neurale (Wnt1) ou du mésoderme paraxial (Mesp1) permettant ainsi un traçage cellulaire de ces deux tissus (Yoshida et al., 2008). Les cellules au sein de la suture sont elles-mêmes issues du mésoderme paraxial (**Figure 11B**). La dure-mère sous-jacente est originaire des crêtes neurales.

A partir du stade E9.5-E10.5, des cellules sensibles à des signaux Shh, issues du mésoderme paraxial et situées dans la région supraorbitale vont migrer selon un axe apical, dessinant ainsi le tracé de la future suture coronale (**Figure 11A**) (Deckelbaum et al., 2012; Twigg and Wilkie, 2015). Peu après (E12.5), les centres d'ossification des os pariétaux et frontaux se forment par condensation des progéniteurs mésenchymateux. Les fronts d'ossifications progressent, se

rejoignent en position inférieure latérale puis progressent vers le plan médian, formant ainsi la suture coronale. Cette suture prend une forme en biseau, l'os pariétal chevauchant l'os frontal (Rice, 2008).

Régulation et maintien de la suture

Après sa formation, la suture va se maintenir dans un état non ossifié jusqu'à la période post-natale. Elle abrite une population de cellules souches mésenchymateuses qui participeront à l'ossification progressive des os qui l'entourent. Plusieurs gènes cités précédemment (Ephrin-Eph, Twist, FGF, Wnt et BMP) vont intervenir pour ce maintien.

Les signaux Ephrin-Eph receptors, impliqués dans le maintien de la zone de différenciation, jouent ici un rôle pour la délimitation des bordures de la suture. Les gènes Twist sont également impliqués dans le maintien de la multipotence des cellules mésenchymateuses au cœur de la suture, notamment en inhibant l'expression de Runx2. TWIST a également été montré comme agissant en aval des FGFR qui ont un effet ostéogénique. Les voies FGF, Wnt et BMP semblent être finement régulées dans la suture afin de garantir son maintien. La voie Wnt contrôle la prolifération et la différenciation des cellules dans la suture notamment en stimulant l'expression de FGF18 (Maruyama et al., 2010; Ornitz and Marie, 2015). FGFR2 exprimé au niveau des ostéoprogéniteurs de la suture, stimule leur différenciation. FGFR3 semble être également exprimé dans les ostéoprogéniteurs en prolifération. L'expression de FGF2, provenant de la dure-mère, va participer à la différenciation ostéoblastique, coïncidant avec une perte d'expression de FGFR2 et FGFR3 et une augmentation de FGFR1 au cours de leur maturation (**Figure 11C**) (Teven et al., 2014; Twigg and Wilkie, 2015).

Pathologies de la suture

Le développement ou le maintien de la suture sont retrouvés altérés dans certaines pathologies congénitales : la suture peut être fusionnée précocement dans le cas d'une craniosynostose. À l'inverse, un retard d'ossification provoquera une fermeture tardive. Ces maladies génétiques sont liées à des mutations des gènes régulateurs de la mise en place et du maintien de la suture (Twist, Runx2, FGFR, Msx). Par exemple, des mutations pertes de fonction de Runx2 sont associées par ailleurs à la Dysostose cléido-crânienne (MIM # 119600) dans laquelle un retard d'ossification des sutures et fontanelles est observé (RESERVES, n.d.).

Les craniosynostoses syndromiques, notamment liées aux gènes FGFR, seront traitées plus amplement par les chapitres suivants.

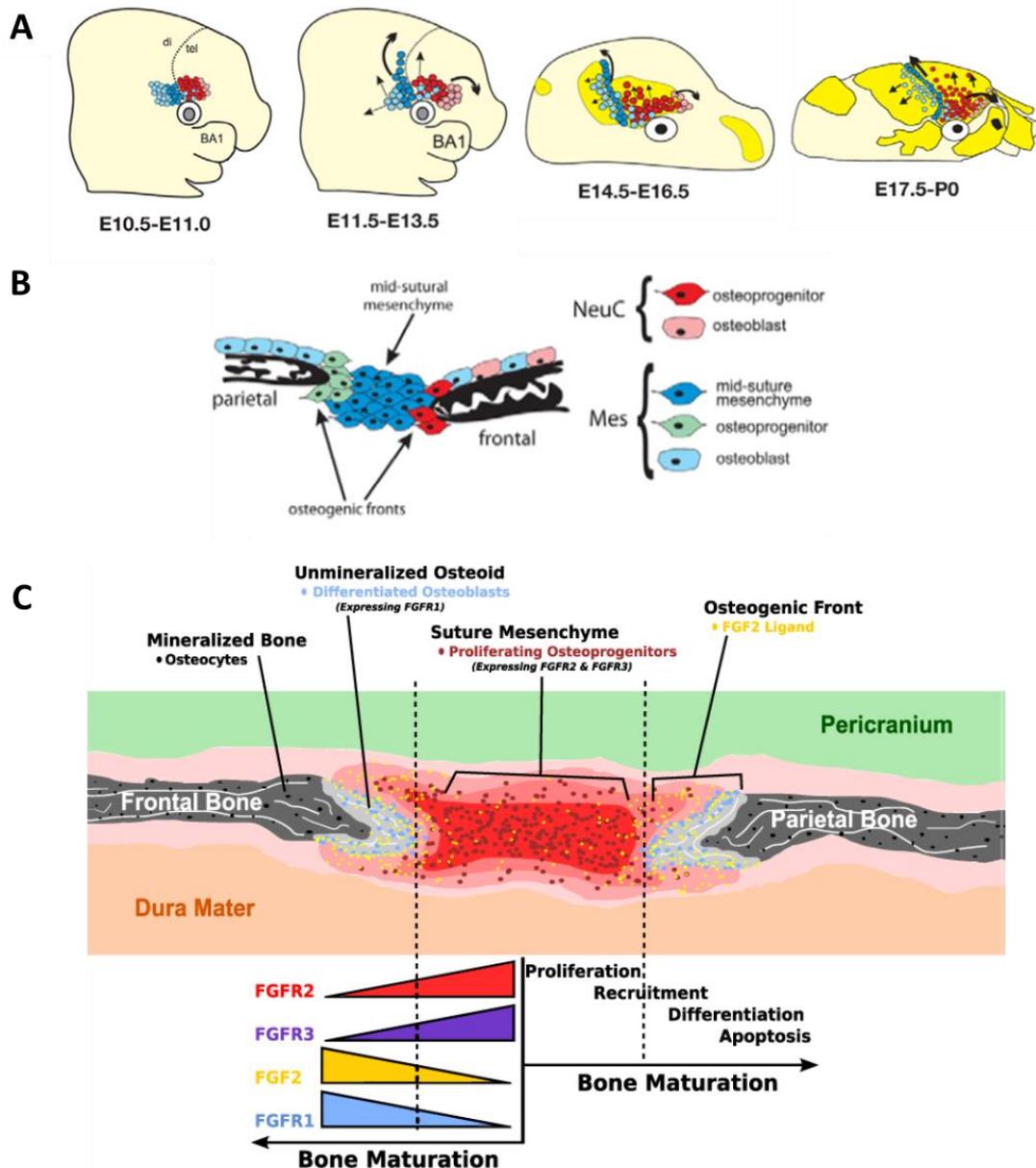


Figure 11 : (A) (d'après Deckelbaum et al., 2012) Formation de la suture coronale à partir de la zone supra-orbitale pendant le développement embryonnaire. Les cellules mésenchymateuses formant la suture coronale (bleu) vont migrer apicalement le long de son futur tracé. Les autres cellules de la zone supra-orbitale originaires du mésoderme (bleu clair) et de la crête neurale (rouge et rose) vont s'étendre et se différencier pour former respectivement les os pariétaux et frontaux. (B) (d'après Deckelbaum et al., 2012) Les cellules mésenchymateuses au sein de la suture coronale originaires du mésoderme paraxial vont participer à la différenciation ostéogénique de part et d'autre de la suture. (C) (d'après Teven et al., 2014) Différenciation ostéoblastique dans la suture et participation des FGFR. Les progéniteurs ostéoblastiques prolifèrent au sein de la suture et expriment FGFR2 et FGFR3. En présence de concentration plus importante de FGF2, provenant entre autre de la dure-mère, les progéniteurs se différencient en ostéoblastes et commencent à exprimer FGFR1.

Enfin, les sutures et fontanelles peuvent présenter des centres d'ossification ectopique. Ces os, appelé os wormiens, se développent *de novo* et à distance des os de la calvaria, au sein du mésenchyme. Ils peuvent être observés de manière physiologique dans la suture lambdoïde ou dans le contexte de certaines pathologies (Rice, 2008).

Ossification endochondrale

Chondrogénèse

L'ossification endochondrale est le deuxième type d'ossification responsable de la formation du squelette et du crâne. Elle passe par une différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes, formant un cartilage intermédiaire avant ossification finale du tissu. Elle est retrouvée dans l'ensemble des os du squelette hormis les clavicules et la calvaria.

La condensation des cellules mésenchymateuses s'effectue de la même façon que pour l'ossification membranaire. Les progéniteurs mésenchymateux condensés se différencient en chondrocytes prolifératifs formant un cartilage primordial (ou primordium). Autour, les cellules mésenchymateuses vont former des cellules péri-chondriales (péri-chondrium), qui constituent des progéniteurs ostéoblastiques. Les chondrocytes, contenus dans une MEC contenant du collagène de type II, vont ensuite gagner en volume et se différencier en chondrocytes hypertrophiques, exprimant le collagène de type X. Le cartilage va alors devenir fortement vascularisé, sa matrice va être remaniée. Les chondrocytes sont alors remplacés par des ostéoblastes qui formeront un point d'ossification primaire. Ces ostéoblastes proviennent du péri-chondrium, mais il a été montré qu'ils sont issus également d'une transdifférenciation des chondrocytes hypertrophiques en ostéoblastes (Long, 2012; Ono et al., 2014). La différenciation chondrocytaire se poursuit linéairement autour du point d'ossification. Cette différenciation chondrocytaire s'oriente linéairement selon une architecture particulière, la plaque de croissance. Cela va permettre la croissance longitudinale de l'os. Le cartilage sert ici de tuteur, intermédiaire pour la croissance du tissu avant son ossification. Au cours de la croissance des os longs, la partie ossifiée va progresser et la plaque de croissance va disparaître progressivement (Long, 2012).

La plaque de croissance

La plaque de croissance a une organisation orientée suivant les étapes de la différenciation des chondrocytes. Trois couches cellulaires forment la plaque de croissance : la zone de réserve (ZR), la zone proliférative (ZP) et la zone hypertrophique (ZH). Au-delà de la ZH, on trouve l'os nouvellement formé. Dans la base du crâne, la synchondrose est constituée en réalité de deux plaques de croissance disposées en miroir, permettant la croissance dans les deux directions opposées et la formation d'os de part et d'autre (**Figure 14C**). Dans les os longs, ce centre d'ossification primaire se forme dans la partie médiane, la diaphyse. Une plaque de croissance se forme alors de part et d'autre. L'ossification progresse vers les épiphyses proximales et distales, permettant la croissance de l'os et du membre (**Figure 15**).

Facteurs régulant la formation de la plaque de croissance

La plaque de croissance est régulée par le gène Sox9, facteur de transcription de la famille « SRY-related high mobility group box », c'est un régulateur essentiel de la chondrogenèse précoce. Il est exprimé à la fois par les progéniteurs mésenchymateux et par les chondrocytes. Sox9 va induire l'expression des protéines spécifiques de la matrice cartilagineuse comme le collagène de type II et l'aggrecan. En proliférant, les chondrocytes vont adopter une organisation en colonne, dites en « pile d'assiette », permettant la croissance linéaire de la structure (Long and Ornitz, 2013). La prolifération chondrocytaire est régulée par de nombreux facteurs. Parathyroid Hormone-related Protein (PTHrP) est exprimé par les cellules de la ZR et de la ZP dans la synchondrose. PTHrP, agissant via son récepteur PTH1R, a un effet mitogène sur les chondrocytes. Il régule en revanche négativement le passage en hypertrophie. Les chondrocytes éloignés de la zone d'expression de PTHrP ne prolifèrent plus et commencent à se différencier pour devenir hypertrophiques (Wei et al., 2016). À cette étape, les chondrocytes, dits pré-hypertrophiques, quittent le cycle cellulaire. Ils vont exprimer Indian hedgehog (Ihh, membre de la famille Hedgehog), ainsi que Runx2 et Runx3, dont l'expression était auparavant réprimée par PTHrP. Ihh va avoir un effet positif sur l'expression de PTHrP dans la ZR en amont, stimulant la prolifération. Ihh va également promouvoir la différenciation ostéoblastique dans le perichondrium en y induisant l'expression de Runx2 et en activant β cat (**Figure 12**) (Long and Ornitz, 2013).

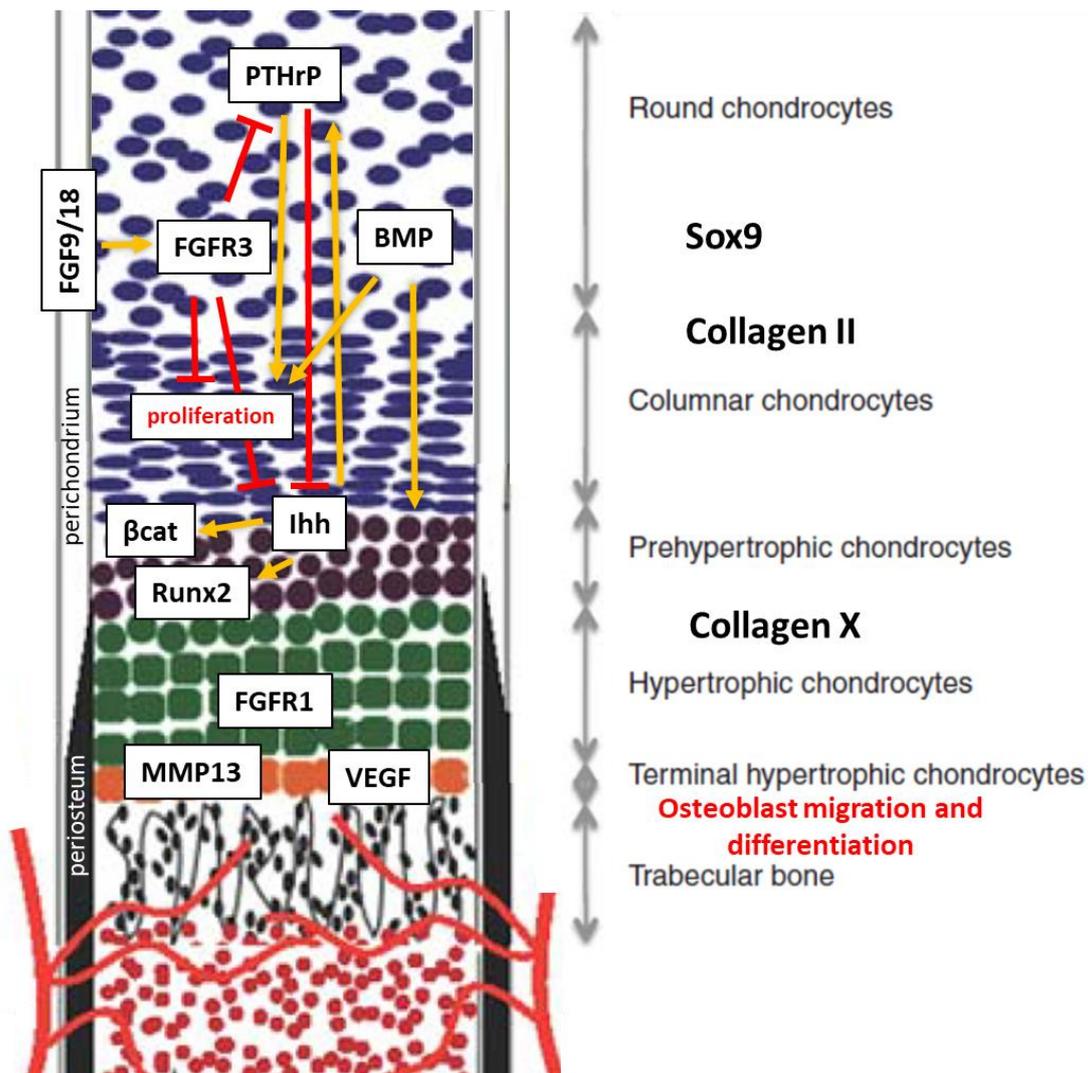


Figure 12 : (adapté de Long et Ornitz, 2013) Signaux impliqués dans la régulation de la différenciation chondrocytaire dans la plaque de croissance. Ihh et PTHrP stimulent la prolifération cellulaire. PTHrP inhibe la différenciation en chondrocyte préhypertrophique et l'expression d'Ihh. FGF9 et 18 sécrétés par le péricondrium vont activer FGFR3 dans les chondrocytes prolifératifs. FGFR3 va réguler négativement la prolifération et la différenciation chondrocytaire, en inhibant entre autres les signaux de PTHrP et Ihh. A contrario, la voie BMP va réguler positivement ces deux processus. Les chondrocytes prolifératifs vont ensuite se différencier en chondrocytes préhypertrophiques en exprimant Ihh et Runx2 puis en chondrocytes hypertrophiques. Ces-derniers vont finalement exprimer des métalloprotéinases dont MMP13 ainsi que du VEGF. Cela va conduire à la vascularisation du tissu et à la migration de préostéoblastes qui vont se différencier et former la matrice osseuse, les chondrocytes entrant alors en apoptose.

Les FGFR dans la plaque de croissance

La voie FGF joue un rôle essentiel dans la régulation de la chondrogenèse. Lors de la différenciation des cellules mésenchymateuses, celles-ci expriment FGFR3 sous l'induction de Sox9, tandis que les cellules alentours formant le perichondrium expriment FGFR1 et 2 (Delezoide et al., 1998; Ornitz and Marie, 2015). FGFR3 va promouvoir la prolifération et la différenciation chondrocytaire. À l'inverse, dans la croissance post-natale, FGFR3 va agir comme régulateur négatif majeur de la prolifération chondrogénique (Narayana and Horton, 2015; Ornitz and Marie, 2015). Dans la plaque de croissance, FGFR3 est exprimé dans les chondrocytes prolifératifs et préhypertrophiques. Cette expression est entre autres régulée positivement par PTHrP. FGFR1 est lui exprimé dans les chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques et FGFR2 est exprimé faiblement dans la ZR (Delezoide et al., 1998). FGFR3 agit négativement sur la prolifération des chondrocytes en activant la voie STAT en aval et en diminuant l'activité de la voie Akt (Murakami et al., 2004). Ceci a pour conséquence de diminuer l'expression de PTHrP, Ihh et des gènes BMP. FGFR3 agit également négativement sur le passage des chondrocytes en hypertrophie via l'activation des MAP kinases Erk1/2 et p38 (**Figure 13B**) (Long and Ornitz, 2013; Ornitz and Legeai-Mallet, 2017). Les signaux de FGFR3 vont antagoniser la voie Wnt/ β catenin et induire l'expression de Sox9 afin de réprimer la différenciation en chondrocytes hypertrophiques (Krejci et al., 2012). La voie MAPK est principalement régulée par le signal du C-natriuretic peptide (CNP). CNP, exprimé dans les chondrocytes prolifératifs et pré-hypertrophiques, va se fixer au niveau de son récepteur membranaire Natriuretic Peptide Receptor 2 (NPR2) dans ces mêmes cellules. Cela va conduire à l'inhibition de la voie MAPK de FGFR3 au niveau de la protéine RAF (**Figure 13B**) (Ornitz and Legeai-Mallet, 2017).

Dans la synchondrose, FGFR3 stimule par ailleurs également la différenciation ostéoblastique via la voie des MAP kinases (Matsushita et al., 2009). FGFR2, exprimé par les progéniteurs ostéoblastiques autour de la synchondrose, semble également stimuler le processus d'ossification endochondrale (Eswarakumar et al., 2002). FGFR1, dans la ZH, semble promouvoir la différenciation et l'ossification (Ornitz and Marie, 2015).

L'activation des FGFR dans la plaque de croissance s'effectue par FGF9 et 18 sécrétés par le perichondrium et par FGF2 sécrété par les chondrocytes eux-mêmes (Ornitz and Marie, 2015).

Les voies BMP et Wnt dans la plaque de croissance

La voie BMP stimule le processus de condensation des progéniteurs mésenchymateux. Dans les chondrocytes, elle a un effet positif sur la prolifération et la différenciation. Elle antagonise par ailleurs la voie FGF, régulant négativement son activation (Ornitz and Marie, 2015).

La voie Wnt agit comme inhibiteur de la différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes. Par la suite, elle est nécessaire pour la prolifération et la différenciation des chondrocytes. Son action semble néanmoins être dose dépendante car une suractivation de la voie inhibe la différenciation en chondrocytes hypertrophiques (Long and Ornitz, 2013; Wei et al., 2016).

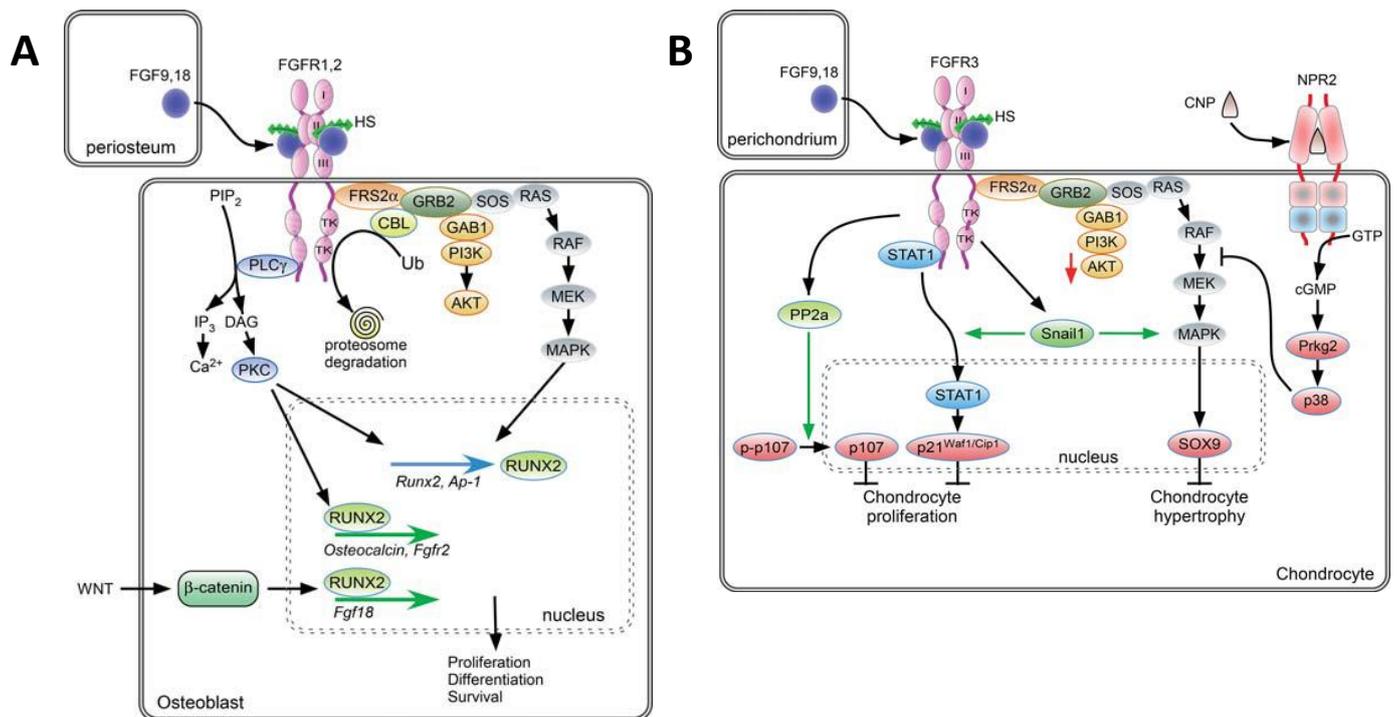


Figure 13 : (d'après Ornitz et Marie, 2015) (A) Signalisation FGFR dans les ostéoblastes. FGFR2 puis FGFR1 sont les récepteurs principaux régulant l'ostéogénèse. L'activation des voies MAPK et PLC β vont promouvoir la prolifération des précurseurs ostéoblastiques et leur différenciation en induisant l'expression de Runx2. La voie Pi3K-Akt va promouvoir la survie cellulaire. (B) Dans les chondrocytes prolifératifs, où FGFR3 est exprimé, l'activation de la voie MAPK va réguler négativement la différenciation en chondrocytes hypertrophiques. La voie STAT va inhiber la prolifération chondrocytaire.

Chondrocytes hypertrophiques et ossification

La ZH est caractérisée par un changement au niveau de la matrice cartilagineuse, avec une perte d'expression du Collagène de type II et une apparition du Collagène de type X. Les chondrocytes hypertrophiques terminaux vont exprimer différentes protéines comme la Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13), enzyme dégradant la MEC cartilagineuse, ainsi que les facteurs Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Ceci va stimuler l'angiogenèse et la vascularisation au niveau de la plaque de croissance. Cette vascularisation va permettre l'acheminement de molécules de la circulation sanguine vers la plaque de croissance. Par ailleurs, cela va permettre la migration des progéniteurs ostéoblastiques provenant du périoste et du perichondrium vers la ZP (**Figure 12**). La différenciation ostéoblastique est alors initiée afin de remplacer le tissu cartilagineux par de l'os trabéculaire, l'os spongieux primaire. Les chondrocytes hypertrophiques vont alors entrer en apoptose, bien qu'une minorité se transdifférencie en ostéoblastes (Long and Ornitz, 2013; Ornitz and Marie, 2015).

L'ossification endochondrale à la Base du crâne

Au niveau du crâne, uniquement la base est formée par ossification endochondrale. Au cours du développement, la base du crâne sert de soutien au système nerveux central. Elle va servir également de point de connexion entre le crâne et les cervicales au niveau du foramen magnum (trou occipital) dans lesquels passe le tronc cérébral. De plus, située en position postérieur de la face, le développement de la base du crâne influe largement sur la structure de la boîte crânienne.

La base du crane débute son développement par la formation de différentes plaques cartilagineuses (cartilage préchondrale, cartilage hypophysaire et cartilage parachondrale) fusionnant entre elles pour former un long continuum de cartilage allant de la jonction intra-orbitaire au foramen magnum. Différents points d'ossification primaire vont ensuite apparaître dans ce cartilage, formant différents os : l'ethmoïde, l'os présphénoïde, l'os basisphénoïde et l'os occipital. Entre ces os, des segments cartilagineux, les synchondroses, vont persister pour permettre la croissance progressive de l'ensemble : la synchondrose sphéno-ethmoïdale (SES) entre l'ethmoïde et le présphénoïde, la synchondrose intersphénoïdale (ISS) entre le présphénoïde et le basisphénoïde, la synchondrose sphéno-occipitale (SOS) entre le sphénoïde et l'os occipital et enfin les synchondroses intra-occipitales

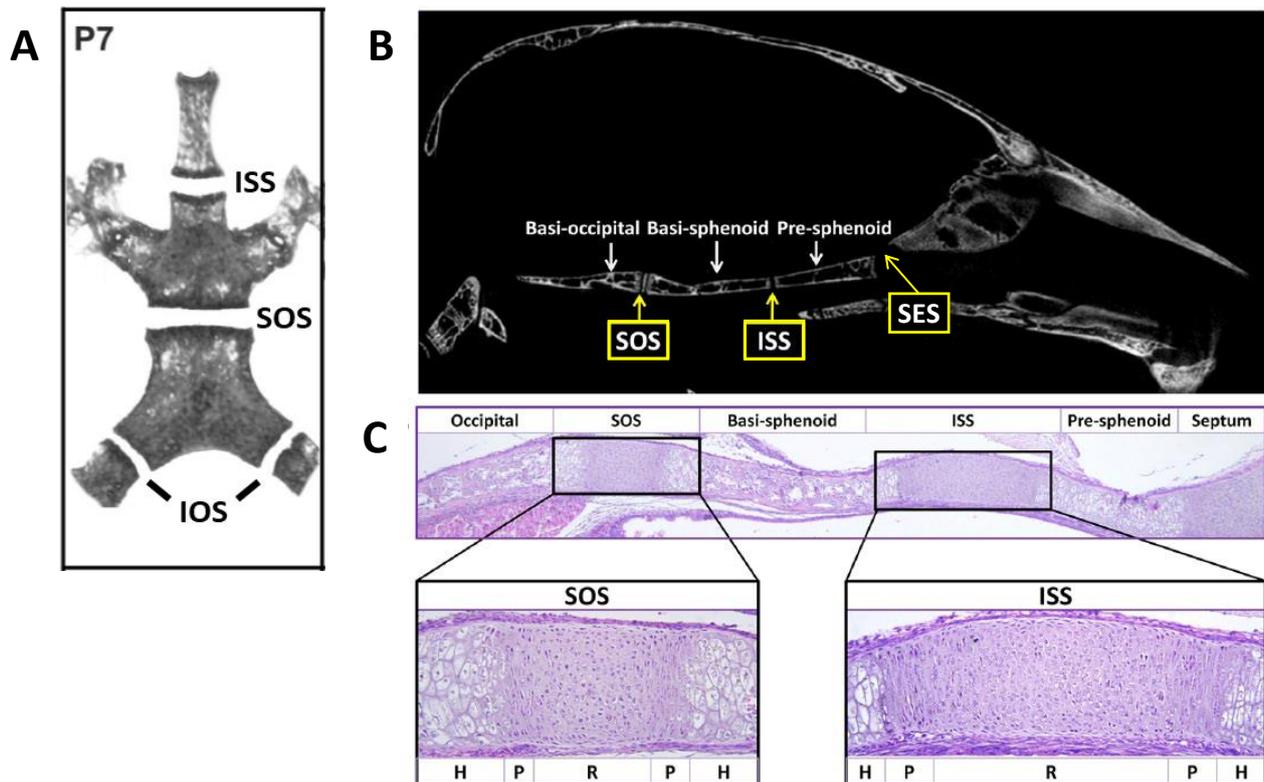


Figure 14 : (d'après Vora et al., 2016 et Wei et al., 2016) (A-B) Organisation de la base du crâne vue du dessus (A) et de profil (B) et des différentes synchondroses : synchondrose sphéno-ethmoïdale (SES), synchondrose inter-sphénoïdale (ISS), synchondrose sphéno-occipitale (SOS) et synchondrose intra-occipitale (IOS). (C) Structure histologique des ISS et SOS. La synchondrose est organisée par deux plaques de croissance en miroir, connectées par une même zone de réserve (R) et entourées par deux zones prolifératives (P) et hypertrophiques (H), puis au-delà deux fronts d'ossification. Au fur et à mesure de la croissance osseuse, les synchondroses vont se réduire et s'ossifier.

(IOS) antérieures et postérieures entre les différentes parties de l'os occipital (basi-, supra- et exo-occipitaux) (**Figure 14A-B**). Les synchondroses vont finalement s'ossifier et fusionner dans le crâne adulte (Wei et al., 2016). Chez l'homme, l'ISS fusionne aux alentours de 2-3 ans, l'IOS vers 7-10 ans, la SES vers 9-15 ans et la SOS vers 16-18 ans (Madeline and Elster, 1995; Wei et al., 2016). Chez la souris, la fermeture des sutures diffère, l'IOS se fermant à P21, la SOS vers P50 et l'ISS vers P80 (Vora et al., 2016).

Les os longs du squelette : ossification endochondrale

Le développement des membres est initié par la formation du bourgeon de membre. Celui-ci consiste en un gonflement du mésoderme et de l'ectoderme, symétriquement et en position latérale de l'embryon aux alentours du stade E9.5 chez la souris. Progressivement, ce

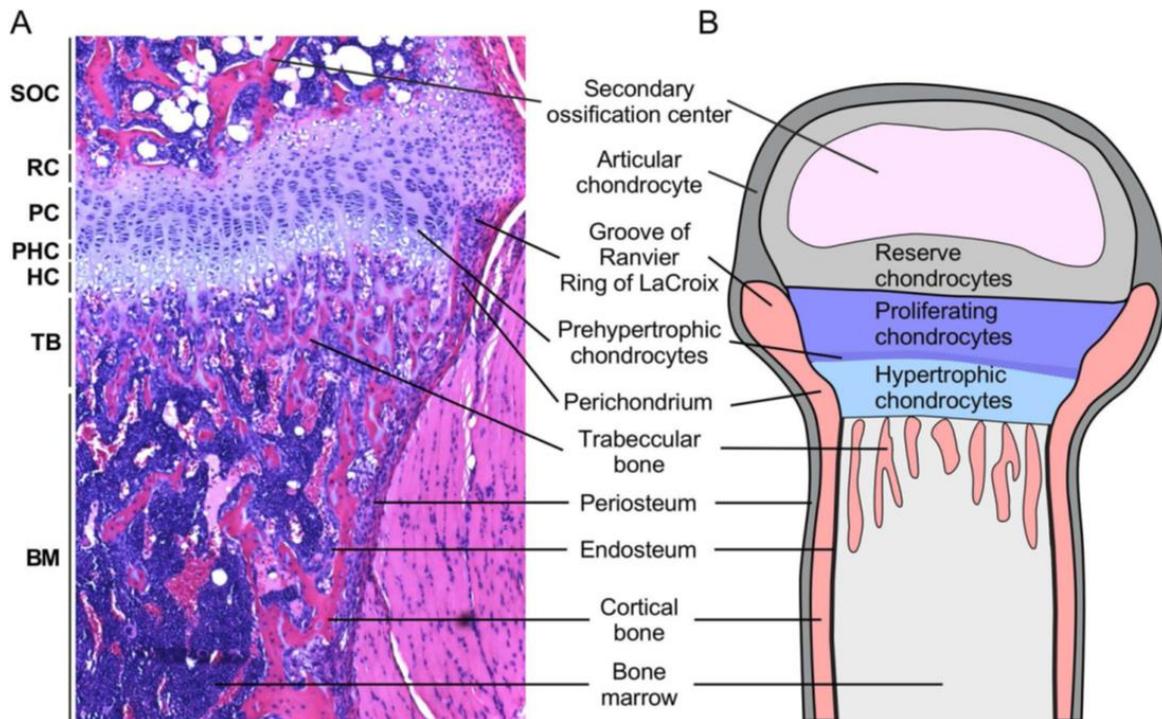


Figure 15 : (d'après Ornitz et Legeai-Mallet, 2017) Organisation de la plaque de croissance dans l'os long en développement.

bourgeon va s'orienter dans les axes dorso-ventral et rostro-caudal en réponse à divers signaux. Il va gagner en taille et se développer afin de former les différentes parties des membres antérieurs et postérieurs ainsi que les os qui les composent : stylopode (humérus ou fémur), zeugopode (ulna et radius ou tibia et péroné), autopode (os de la main et pied) (Zeller et al., 2009).

Rapidement, la condensation de cellules mésenchymateuses prend place dans le bourgeon de membre, conduisant à une différenciation chondrocytaire, puis à la formation d'un centre d'ossification primaire. La plaque de croissance joue un rôle majeur dans la croissance des membres : la croissance est déterminée par la cadence à laquelle les chondrocytes prolifèrent et se différencient.

Dans les os longs, les progéniteurs du péricondrium sont organisés en un groupe dense de cellules, l'encoche de Ranvier, et plus à l'extérieur en l'anneau de Lacroix. Au niveau des extrémités (épiphyes), dans la continuité du péricondrium se forme un cartilage articulaire, impliqué dans l'articulation des os entre eux qui va se maintenir tout au long de la vie. Comme mentionné précédemment, les progéniteurs du péricondrium sont recrutés par les

chondrocytes hypertrophiques afin d'initier l'ossification du tissu. Les ostéoblastes vont alors former un os spongieux formé de trabécules et entouré par un os cortical, remplaçant le périchondrium et constituant la paroi de la diaphyse. Les trabécules sont ensuite remaniées et résorbées. L'os cortical est seul présent dans la partie médiane de l'os long, renfermant la moelle osseuse. Le remodelage de l'os cortical a lieu sur sa surface externe, le périoste, et interne, l'endoste. L'ostéogenèse de l'os cortical se fait par ossification membranaire (Long, 2012) (**Figure 15**).

Au cours de la croissance post-natale, se forme au niveau de l'épiphyse un second centre d'ossification par ossification endochondrale. La plaque de croissance finit par disparaître dans l'os adulte.

Pathologies de l'ossification endochondrale

Une perturbation de l'expression ou de l'activité des gènes (Ihh, PTHrP, FGFR, BMP) régulant la chondrogenèse sont associées à des chondrodysplasies, des syndromes congénitaux marqués par un défaut de croissance des os. Les chondrodysplasies peuvent également présenter un défaut de croissance dans la base du crâne, soulignant la similarité des mécanismes (Ornitz and Legeai-Mallet, 2017). Les chondrodysplasies associées aux FGFR seront traitées plus amplement dans un chapitre ultérieur.

Ossification membranaire et endochondrale : mandibule et maxillaire

La mandibule et l'os maxillaire, comme le reste de la face, sont issus des cellules de la crête neurale. Les cellules de la crête neurale migrent en position ventrale de l'embryon de E8 à E10 afin de former l'arc branchial (ou arc pharyngé), formant ensuite l'arc mandibulaire et le processus maxillaire (Bhatt et al., 2013; Miletich and Sharpe, 2004).

Le processus maxillaire va d'abord se développer latéralement. Deux centres d'ossification latéraux se forment alors par ossification membranaire. Les processus maxillaires vont en parallèle s'étendre en position dorsale et se rejoindre afin de former le processus palatin. Les os maxillaires forment alors en se rejoignant la suture palatine suivant l'axe sagittal (Miletich and Sharpe, 2004).

Le développement de la mandibule met en jeu une ossification à la fois membranaire et endochondrale. La mandibule se forme à partir de l'arc mandibulaire, formé par des cellules de la crête neurale. Les cellules mésenchymateuses au sein de l'arc mandibulaire entrent en condensation pour former le cartilage de Meckel. Il va s'étendre sur toute la longueur de la mandibule et va servir de tuteur pour sa croissance. Ce cartilage va ensuite décroître et se résorber dans la mandibule adulte. Les extrémités proximales et distales de la mandibule vont se développer par ossification endochondrale, tandis que la zone intermédiaire sera formée par ossification membranaire (Parada and Chai, 2015).

Ossification endochondrale dans les sutures

Il est intéressant de noter que certaines sutures de la face et calvaria présentent une zone cartilagineuse au cours de leur développement. Ceci a ainsi été observé dans la suture postérieure-frontale (située entre les deux os frontaux en partie postérieure) de manière physiologique (Behr et al., 2010). La présence de cartilage dans les sutures a autrement été détectée dans le cas de certaines mutations. Les souris portant une délétion du gène Twist (*Twist^{+/-}*) présentent ainsi un cartilage ectopique dans la suture coronale avant fusion de celle-ci. Ce phénotype peut être expliqué par l'importance de Twist dans le contrôle de la différenciation, son absence changeant l'orientation des cellules vers une différenciation chondrocytaire plutôt qu'une différenciation ostéoblastique (Behr et al., 2011; Twigg and Wilkie, 2015).

FGFR dans l'épiderme et cancers

Les FGFR jouent également un rôle essentiel dans la prolifération et la différenciation cellulaire dans d'autres tissus de l'organisme. Au niveau de l'épiderme, FGFR1 et FGFR2 sont tous deux fortement exprimés dans les kératinocytes. Dans ce tissu épithélial, ce sont les isoformes IIIb de ces gènes qui sont exprimés. Chez la souris, FGFR1 et 2 vont promouvoir la migration et la différenciation des kératinocytes en réponse aux FGF de la sous-famille FGF7 (spécifique des isoformes IIIb). FGF7 et 10 sont sécrétés par les fibroblastes sous-jacents, tandis que FGF22 est sécrété de manière autocrine par les kératinocytes. Ils vont alors promouvoir la prolifération, la survie et la différenciation des kératinocytes. Ce processus est également retrouvé dans la réparation du tissu au niveau de lésions cutanées. Les signaux FGF vont alors recruter les kératinocytes vers la zone endommagée (Maddaluno et al., 2017; Steiling and Werner, 2003).

Le rôle de FGFR3 dans l'épiderme est encore mal identifié. Des mutations somatiques activatrices de FGFR3 sont cependant associées à divers désordres cutanés. Elles sont ainsi retrouvées dans le nævus mélanocytaire (communément appelé grain de beauté) ou la kératose séborrhéique, tous deux associés à une hyperprolifération bénigne ou maligne, respectivement de mélanocytes ou de kératinocytes (Hafner et al., 2006; Krejci, 2014). Ces mutations sont aussi présentes dans l'acanthosis nigricans, un désordre bénin cutané caractérisé par un épaissement et une hyperpigmentation régionalisée de l'épiderme. L'acanthosis nigricans se caractérise au niveau histologique par une hyperkératose, due à une activité anormale des kératinocytes (Arnaud-López et al., 2007; Schwartz, 1994; Sedano and Gorlin, 1987; Smid et al., 2018).

L'acanthosis nigricans est retrouvé associé à des ostéochondrodysplasies liées à FGFR3, ainsi que dans des cas d'insulino-résistance et d'affection maligne interne comme l'adénocarcinome de l'estomac.

Il est intéressant de noter que les mutations somatiques causant ces anomalies cutanées touchent les mêmes acides aminés que celles retrouvées dans les pathologies squelettiques congénitales, laissant supposer que ces sites fonctionnent comme « hotspot » de mutations.

Les mutations somatiques FGF et FGFR ont été retrouvées dans de nombreux types de cancers. Ces cancers touchent un grand nombre de tissus, dont les plus fréquents sont le

cancer de la vessie (mutation FGFR3), le cancer du poumon (mutation FGFR1) et le cancer des voies utérines (FGFR2). FGFR3 est également muté dans des cas de myélome multiple. L'utilisation d'anticorps spécifique de FGFR3 a par ailleurs montré un effet anti-tumoral dans ce dernier cas (ODonnell et al., 2012; Tanner and Grose, 2016).

Les mutations vont modifier l'intensité ou la nature du signal FGF/FGFR. La suractivation peut passer par une production excessive autocrine de ligand FGF ou par une augmentation de la propension à se dimériser du FGFR, avec ou sans ligand. L'inhibition passe par un défaut d'expression du gène ou de production de protéine fonctionnelle. La mutation peut également causer un changement dans l'épissage et l'isoforme exprimé. Des translocations chromosomiques peuvent entre autres amener à la fusion des FGFR avec un autre gène. La fusion FGFR3-TACC3 est ainsi l'une des plus fréquemment rencontrée, ajoutant une partie du gène TACC3 au domaine intracellulaire de FGFR3, ce qui conduit à une localisation cellulaire aberrante de FGFR3 et impacte la ségrégation chromosomique lors de la mitose (Tanner and Grose, 2016).

De même qu'au niveau de l'épiderme, de nombreuses mutations ponctuelles des FGFR associés à des ostéochondrodysplasies sont également retrouvées dans les cancers.

Les craniosynostoses

Les craniosynostoses sont des ostéochondrodysplasies caractérisées par une fusion prématurée des sutures crâniennes. Ces fusions sont visibles au cours de la période postnatale, bien qu'elles puissent être observées au cours de la grossesse par échographie dans les formes sévères. Il existe des craniosynostoses non syndromiques et syndromiques. La prévalence des craniosynostoses est d'environ 1 naissance sur 2500 (Lajeunie et al., 1995; Wilkie et al., 2017).

Les craniosynostoses non syndromiques représentent environ 80% des cas, elles ne sont pas associées à une mutation dans un gène particulier. Ces formes peuvent être dues à d'autres facteurs, comme par exemple la constriction du fœtus (naissance multiple ou mère nullipare), une naissance prématurée ou la consommation de médicaments par la mère (par exemple l'acide valproïque, molécule antiépileptique). Ces facteurs peuvent causer une craniosynostose chez l'enfant (Wilkie et al., 2010, 2017; Roscioli et al., 2013). (Sanchez-Lara et al., 2010).

Craniosynostoses et anomalies craniofaciales

Classification des craniosynostoses

Les analyses du phénotype des craniosynostoses a permis de les classer en différentes catégories (**Figure 16B**) (Kajdic et al., 2018).

Les travaux de Rudolf Virchow en 1851 ont décrit la fusion prématurée des sutures. La loi de Virchow définit ce phénomène : lorsque la suture est fermée, le crâne ne peut croître perpendiculairement à celle-ci. Il en résulte une déformation dans l'axe parallèle à la suture (Delashaw et al., 1989). Si la craniosynostose est déjà présente en période anténatale, la déformation du crâne peut être observée par échographie ou pendant la première année de vie. Si la craniosynostose n'est pas traitée, elle peut provoquer une aggravation des déformations craniofaciales. Rudolf Virchow a ainsi défini le terme « craniosténose », c'est-à-dire la compression du crâne qui résulte de la craniosynostose. La croissance du cerveau en développement provoque une poussée sur les autres sutures, amenant à une déformation de toute la voûte.

Parmi les déformations du crâne, plusieurs types de craniosynostoses ont été décrits :

- Brachycéphalie : caractérisée par un allongement du crâne dans le plan transversal et un rétrécissement dans l'axe antéro-postérieur. La fontanelle antérieure est alors parfois ouverte. Cette déformation est due à une fusion bilatérale des sutures coronales et est fréquemment retrouvée dans les craniosynostoses syndromiques.
- Scaphocéphalie (ou dolichocéphalie) : caractérisée par un allongement du crâne dans le sens antéro-postérieur, avec le front et l'occiput bombés. Elle est due à une fusion de la suture sagittale. C'est la craniosynostose la plus courante.
- Plagiocéphalie : caractérisée par un aplatissement asymétrique d'un côté du crâne. Elle se différencie de la plagiocéphalie positionnelle qui est due à un positionnement du nouveau-né préférentiellement d'un côté de la tête et qui n'est nullement liée à une fusion des sutures. Il existe deux types de plagiocéphalie associées à des craniosynostoses :
 - La plagiocéphalie antérieure : causée par une fusion unilatérale de la suture coronale. Cette fusion provoque un aplatissement ipsilatéral du front, une élévation de l'aile du basisphénoïde et du toit de l'orbite ainsi qu'une déviation de la fosse nasale, causant ce que l'on désigne un œil d'Arlequin (rappelant la forme du masque) et une asymétrie entière de la face.
 - La plagiocéphalie postérieure : causée par une fusion unilatérale de la suture lambdoïde. La fusion provoque un aplatissement ipsilatéral de l'os occipital, un déplacement postérieur de l'oreille et du front, donnant un crâne trapézoïdal. Cette déformation est extrêmement rare.
- Trigonocéphalie : caractérisée par un front étroit et pointu. Il en résulte un crâne de forme triangulaire et parfois un hypotélorisme. Elle est causée par une fusion prématurée de la suture métopique.
- Oxycéphalie : caractérisée par un crâne pointu ou conique. Elle est due à une fusion des sutures coronales et d'une autre suture, comme la suture lambdoïde.
- Pansynostosis : caractérisée par la fusion de plus de trois sutures. Il peut en résulter dans certains cas une microcéphalie. Le crâne prend une forme de trèfle (« Kleeblattschädel »), c'est-à-dire avec trois lobes, dans le cas d'une fusion des sutures coronales, postérieures sagittales et lambdoïdes (**figure 16C**). Ceci peut être

fréquemment retrouvé dans le syndrome de Pfeiffer ou dans la Dysplasie Thanatophore et de manière plus rare dans d'autres syndromes (Blount et al., 2007; Chen et al., 2006; Rousseau et al., 1996).

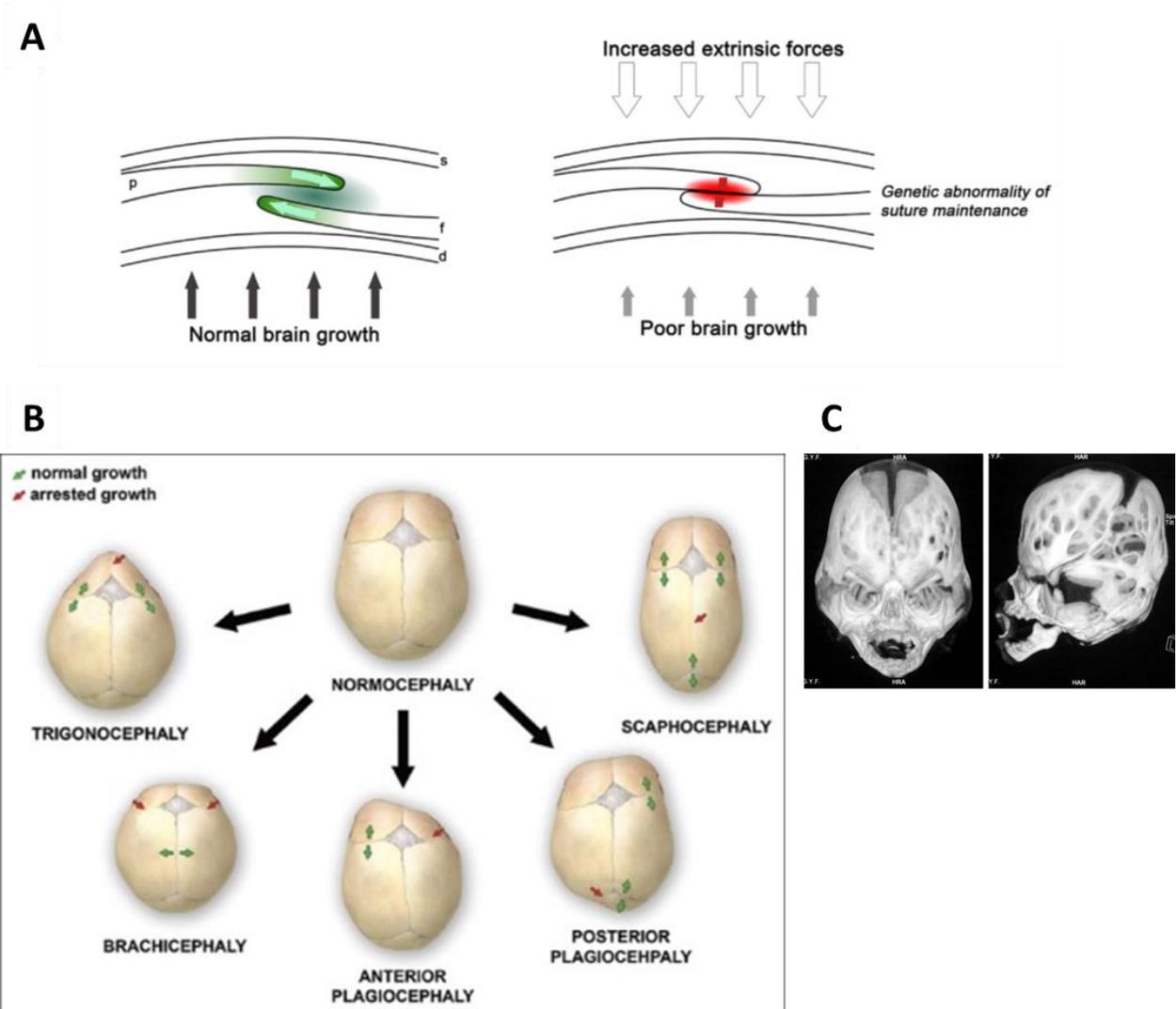


Figure 16 : (A) (d'après Twigg et Wilkie, 2015) Dans la situation non pathologique (vert), la suture ouverte permet de suivre la croissance du cerveau et du crâne. La craniosynostose (rouge) peut être causée par des facteurs génétiques ou environnementaux. Le cerveau est alors comprimé. (B) (d'après Kajdic et al, 2018) Représentation des différentes déformations du crâne observables lors de la fusion d'une suture. Les flèches rouges montrent les zones où la suture est fusionnée. Les flèches vertes indiquent les zones où la croissance est augmentée en compensation. (C) (d'après Chen et al, 2006) Scanner par microtomographie d'un patient pour le syndrome de Crouzon présentant un crâne en feuille de trèfle.

Craniosynostoses et cerveau

La fermeture de la voûte crânienne faisant résistance à la croissance du cerveau, on a une augmentation de la pression intracrânienne : d'une part une augmentation de la pression intraveineuse du crâne et d'autre part une hydrocéphalie causée par une obstruction des ventricules causant une mauvaise circulation du liquide céphalorachidien (Martinez-Perez et al., 1996; Wilkie et al., 2017). Certains patients présentent ainsi un crâne en cuivre martelé (« copper beaten skull » dans la littérature), la pression intracrânienne élevée causant une impression des gyrus sur la surface interne de la voûte. La pression intracrânienne peut être évaluée de manière non invasive grâce à plusieurs symptômes (nausées et migraines), par palpation de la fontanelle ou par mesure de la circonférence orbitofrontale (Governale, 2015; Kajdic et al., 2018).

Les patients présentent dans la plupart des cas des anomalies de la face comme par exemple une exophtalmie ainsi qu'une réduction de l'étage moyen de la face due à une fusion de la base du crâne. Il peut en résulter des problèmes ophtalmologiques et une difficulté respiratoire. On note également des problèmes d'audition. Un retard mental et des troubles du comportement sont également notés. Ces traits phénotypiques sont variables selon les différents syndromes et sont détaillés plus amplement par la suite (syndrome de CAN, syndrome de Muenke, syndrome d'Apert). Certains syndromes associent également à la craniosynostose des anomalies du squelette et des membres.

La prise en charge chirurgicale des craniosténoses

Les complications, notamment neurologiques, apparaissant avec la fusion des sutures du crâne, nécessitent une intervention chirurgicale précoce afin de créer de l'espace dans la boîte crânienne et de donner une forme adéquate au crâne. Plusieurs procédures chirurgicales existent (Da Costa et al., 2013; Governale, 2015). La première méthode est le remodelage et le repositionnement de la calvaria. Dans le cas d'une fusion des sutures coronales, on procède à un avancement fronto-orbitaire (**Figure 17A**) : la partie antérieure de la voûte est découpée de la suture coronale jusqu'à la cavité de l'orbite puis repositionnée en position antérieure. Ceci permet de libérer de l'espace et de diminuer la pression intracrânienne. Il s'agit d'une intervention chirurgicale longue pouvant amener à des complications (hémorragie, œdème périorbital). La deuxième méthode, moins invasive, consiste en l'incision de la suture

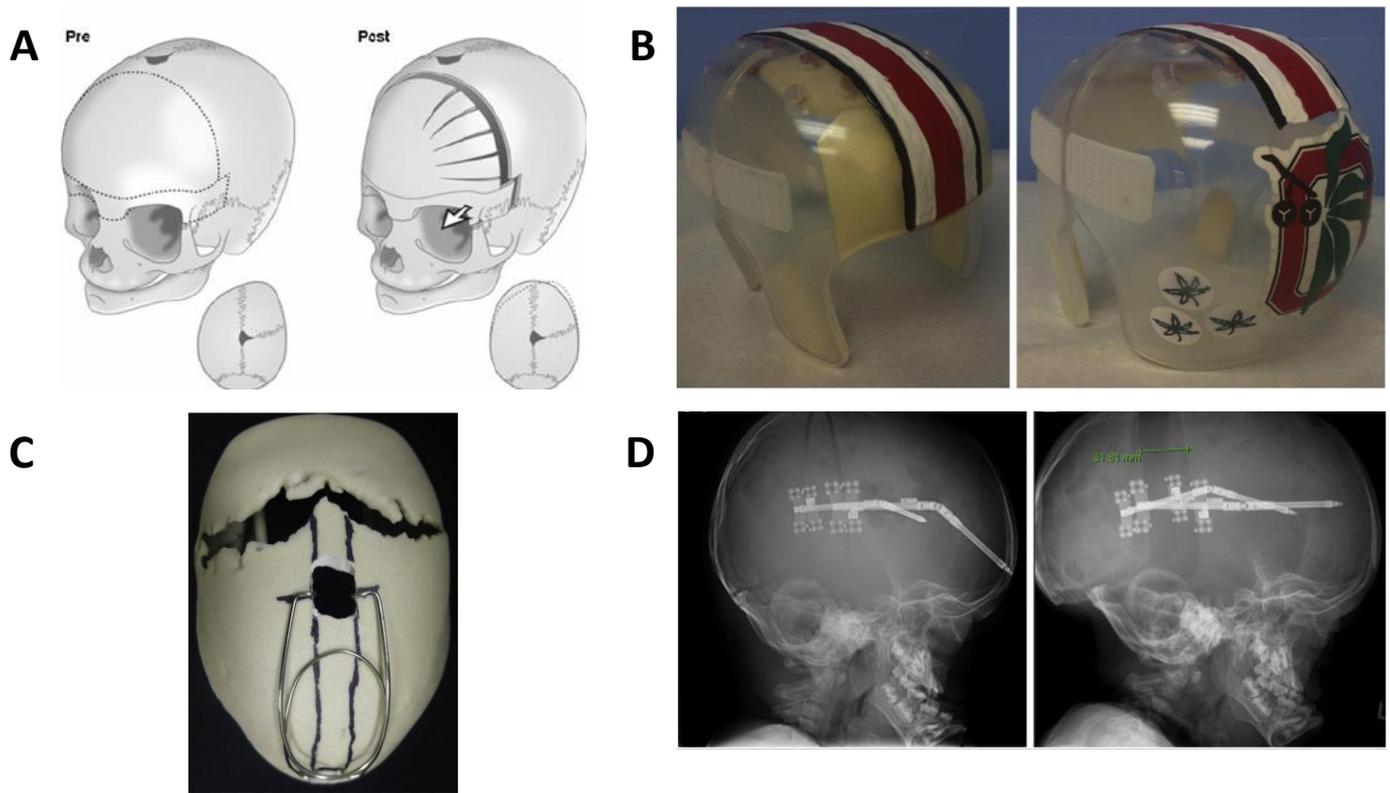


Figure 17 : (A) (d'après Da Costa et al, 2013) Avancement fronto-orbitaire dans le cas d'une fusion unicoronale. (B) (d'après Governale et al, 2015) Casque correcteur utilisé pour le remodelage du crâne du patient. (C) Ressort extenseur positionné dans la suture sagittale après incision. (D) Radiographie montrant un distracteur interne avant et après procédure.

fusionnée et le remodelage du crâne grâce à des ressorts extenseurs dans la suture ou par un casque de remodelage (aussi appelé orthèse crânienne) placés pendant plusieurs semaines (**Figure 17B-C**). Le ressort va permettre d'écarter les os de part et d'autre de la suture. Les parties ouvertes et fermées du casque vont permettre de réduire ou d'agrandir les régions du crâne pour qu'il regagne une forme normale. La troisième méthode est l'implantation de distracteurs internes ou externes, fixés à chaque côté des os du crâne (**Figure 17D**). Une vis permet, à raison d'un millimètre par jour, d'augmenter la distance entre les deux parties du distracteur et ainsi d'espacer les os pendant plusieurs semaines. Le distracteur est ensuite retiré.

Les interventions chirurgicales pour le remodelage du crâne et l'amélioration de l'aspect de la face sont aujourd'hui la base du traitement des craniosynostoses, à la fois pour réduire les symptômes mais également pour diminuer l'impact psycho-social pour les patients. Aucun traitement pharmacologique n'est aujourd'hui valide pour le traitement de ces pathologies,

bien que l'utilisation des modèles murins spécifiques des cas syndromiques ait montré des pistes intéressantes.

Bases génétiques de craniosynostoses

Environ 20% de ces craniosynostoses sont dues à des anomalies chromosomiques et des mutations monogéniques. L'essor de la génétique humaine au début des années 1990 a permis d'identifier les bases moléculaires de nombreuses craniosynostoses syndromiques. En 2015, Twigg et Wilkie dénombrèrent 57 gènes associés à des craniosynostoses syndromiques (Twigg and Wilkie, 2015). Les craniosynostoses syndromiques les plus fréquentes sont causées par des mutations des gènes *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* et *Twist1*. Les signes cliniques de ces patients sont aujourd'hui bien décrits et la plupart des gènes associés ont été identifiés (Bonaventure and El Ghouzzi, 2003; Dicus Brookes et al., 2014; Governale, 2015; Johnson and Wilkie, 2011; Muenke et al., 2011; Robin et al., 1993; Twigg and Wilkie, 2015; Wilkie et al., 2017) (**Figure 16A**). Il a été montré que, dans le cas de ces syndromes, l'âge du père était corrélé à la susceptibilité d'apparition de la pathologie. Cette susceptibilité accrue s'explique en partie par un principe de « Selfish Spermatogonial Selection » : la mutation du gène *FGFR* a un effet mitogénique sur les spermatogonies, augmentant la proportion des cellules portant l'allèle mutant dans la population totale des gamètes (Glaser et al., 2000; Goriely and Wilkie, 2012).

Parmi les gènes identifiés, les mutations de certains d'entre eux sont associées à une craniosynostose dans plus de 50% des cas étudiés, ceux-ci sont listés dans le **tableau 2**. Des fusions prématurées des sutures sont également parfois retrouvées dans certains cas d'hypophosphatasie ou d'ostéosclérose, les gènes responsables sont davantage impliqués dans l'homéostasie osseuse (*ALP*, *LRP5*) et non dans le développement et le maintien de la suture en soi.

Gene (MIM#)	Inheritance Pattern	Clinical Disorder (MIM#)	Typical Suture Fusion	Major Phenotypic Features
ASXL1 (612990)	AD (n)	Bohring-Opitz syndrome (605039)	metopic	forehead nevus flammeus, ulnar deviation and flexion of wrists and metacarpalophalangeal joints, severe intellectual disability
CDC45 (603465)	AR	–	coronal	thin eyebrows, small ears, variable short stature
COLEC11 (612502)	AR	3MC syndrome 2 (265050)	metopic	hypertelorism, blepharoptosis, arched eyebrows, cleft lip/palate, hearing loss, radio-ulnar synostosis, genital and vesicorenal anomalies
EFNB1 (300035)	XLD (male sparing)	craniofrontonasal syndrome (304110)	coronal	hypertelorism, notched nasal tip, chest anomalies, longitudinal splitting of nails; heterozygous females more severely affected than hemizygous males
ERF (611888)	AD	ERF-related craniosynostosis (600775)	multisuture	exorbitism, midface hypoplasia, Chiari type I malformation, postnatal onset of craniosynostosis
FGFR1 (136350)	AD	Pfeiffer syndrome (101600)	coronal	mild craniofacial features, broad medially deviated thumbs and halluces, cutaneous syndactyly, specific amino acid substitution p.Pro252Arg
FGFR1	AD (n)	osteoglyphonic dysplasia (166250)	multisuture	prominent brow ridges, depressed nasal bridge, rhizomelic dwarfism, localized lytic lesions of metaphyses
FGFR2 (176943)	AD (n)	Apert syndrome (101200)	coronal, multisuture	midface hypoplasia, dilated cerebral ventricles, complex syndactyly of the hands and feet
FGFR2	AD (n)	Beare-Stevenson syndrome (123790)	multisuture	choanal atresia, prominent umbilical stump, furrowed scalp/neck skin, acanthosis nigricans in survivors
FGFR2	AD	Crouzon syndrome (123500)	multisuture, coronal, sagittal	exorbitism, midface hypoplasia, beaked nose ("crouzonoid" facies), clinically normal hands and feet
FGFR2	AD (n)	Pfeiffer syndrome (101600)	multisuture	broad thumbs and halluces; in severe cases, cloverleaf skull, brain anomalies, tracheal sleeve, fused elbows
FGFR2	AD (n)	bent bone dysplasia (614592)	coronal	osteopenia, reduced mineralization of the calvaria, bent long bones; perinatal lethal
FGFR3 (134934)	AD	Muenke syndrome (602849)	coronal	defined by specific amino acid substitution p.Pro250Arg; may include sensorineural hearing loss, mild brachydactyly, cone-shaped epiphyses
	AD (n)	Crouzon/acanthosis nigricans (612247)	multisuture	crouzonoid facies, choanal stenosis, hydrocephalus, acanthosis nigricans; specific amino acid substitution p.Ala391Glu
	AD (n)	thanatophoric dysplasia II (187601)	multisuture	lethal skeletal dysplasia, micromelic limb shortening, straight femora; specific amino acid substitution p.Lys650Glu
IHH (600726)	AD	Philadelphia craniosynostosis (185900)	sagittal	cutaneous and osseous syndactyly
IL11RA (600939)	AR	craniosynostosis and dental anomalies (614188)	multisuture	maxillary hypoplasia, delayed tooth eruption, supernumerary teeth, minor digit abnormalities, conductive hearing loss
MEGF8 (604267)	AR	Carpenter syndrome 2 (614796)	metopic	hypertelorism, arched eyebrows, lateralization defects, brachydactyly, syndactyly, preaxial polydactyly
MSX2 (123101)	AD	Boston craniosynostosis (604757)	sagittal, coronal, multisuture	none diagnostic; syndrome defined by specific amino acid substitutions p.Pro148His, p.Pro148Leu
POR (124015)	AR	Antley-Bixler syndrome (201750)	bicoronal, multisuture	choanal stenosis, radio-humeral synostosis, bowed femora, multiple joint contractures, genital abnormalities; abnormal steroidogenesis
RAB23 (606144)	AR	Carpenter syndrome 1 (201000)	multisuture	obesity, cardiac defects, polysyndactyly, brachydactyly, genu valgum, hypogenitalism, umbilical hernia, learning disability
RUNX2 (600211)	AD (n)	–	multisuture	none diagnostic; syndrome defined by specific gene duplication
SKI (164780)	AD (n)	Shprintzen-Goldberg syndrome (182212)	sagittal, multisuture	hypertelorism, micrognathia, high arched palate, arachnodactyly, joint contractures, pectus deformity, aortic root aneurysm, mitral valve prolapse, learning disability
TCF12 (600480)	AD	TCF12-related craniosynostosis (615314)	coronal	resembles mild Saethre-Chotzen syndrome; diagnosis defined by presence of mutations in the gene, ~50% non-penetrance
TWIST1 (601622)	AD	Saethre-Chotzen syndrome (101400)	coronal	low frontal hairline, hypertelorism, eyelid ptosis, downslanting palpebral fissures, blocked tear ducts, small ears with prominent crus helicis
WDR35 (613602)	AR	cranioectodermal dysplasia 2 (613610)	sagittal	facial dysmorphism, narrow thorax, short long bones, brachydactyly, sparse hair, hypoplastic teeth, cystic kidneys, hepatic fibrosis
ZIC1 (600470)	AD (n)	ZIC1- craniosynostosis	coronal	severe learning disability

Table 2 : (d'après Twigg et Wilkie, 2015) Liste des gènes pour lesquels une mutation est associée à un syndrome présentant une craniosynostose dans plus de 50% des cas observés. La transmission peut être autosomique dominante (AD), autosomique récessive (AR), dominante liée à l'X (XLD), mutations trouvées de novo (n).

Craniosynostoses syndromiques liées à des mutations dans les gènes FGFR

Syndrome de Crouzon avec Acanthosis Nigricans (CAN) (FGFR3)

Le syndrome de Crouzon avec Acanthosis Nigricans (CAN) est caractérisé par une fusion bilatérale des sutures coronales. Les patients présentent un faciès crouzonoïde : un front plat, une exophtalmie, un hypertélorisme, un nez en bec et une hypoplasie de l'étage moyen de la face (Di Rocco et al., 2011; Gines et al., 1996; Gürbüz et al., 2016; Herman et al., 2014; Jeftha et al., 2004; Lagaude et al., 2014; Martinez-Perez et al., 1996; Mir A et al., 2013; Nagase et al., 2000; Nørgaard et al., 2012; Rymer et al., n.d.; Schweitzer et al., 2001; Vidal Sanahuja et al., 2012; Wilkes et al., 1996; Xu et al., 2018).

Le CAN est phénotypiquement proche du syndrome de Crouzon lié à une mutation dans le gène FGFR2. Le syndrome est parfois désigné dans la littérature sous l'appellation « Crouzodermoskeletal syndrome », comme suggéré par Cohen en 1999 (Cohen, 1999), afin de le différencier du syndrome de Crouzon lié à FGFR2. Dans la suite de ce texte, nous le désignerons plus simplement sous l'appellation CAN.

Le CAN a été identifié en 1995 (Meyers et al., 1995) par l'étude de quatre patients (deux cas sporadiques ainsi qu'une mère et sa fille) présentant un syndrome de Crouzon avec un acanthosis nigricans. Les auteurs identifièrent une substitution C→A au nucléotide 1172 du gène FGFR3, résultant sur la mutation dominante p.Ala391Glu chez tous ces patients. Avant cela, plusieurs études avait observé une co-occurrence du syndrome de Crouzon avec un acanthosis nigricans (Breitbart et al., 1989; Koizumi et al., 1992; Reddy et al., 1985; Suslak et al., 1985)

Le syndrome CAN est extrêmement rare. Il couvre 1% des craniosynostoses syndromiques (Di Rocco et al., 2011). Le nombre de cas identifiés jusqu'en 2007 est de 31 cas (22 femmes, 9 hommes) et on peut estimer que ce nombre ne dépasse pas 70 aujourd'hui (Arnaud-López et al., 2007). Il y a une prépondérance féminine du CAN, bien que les deux sexes soient atteints avec la même sévérité.

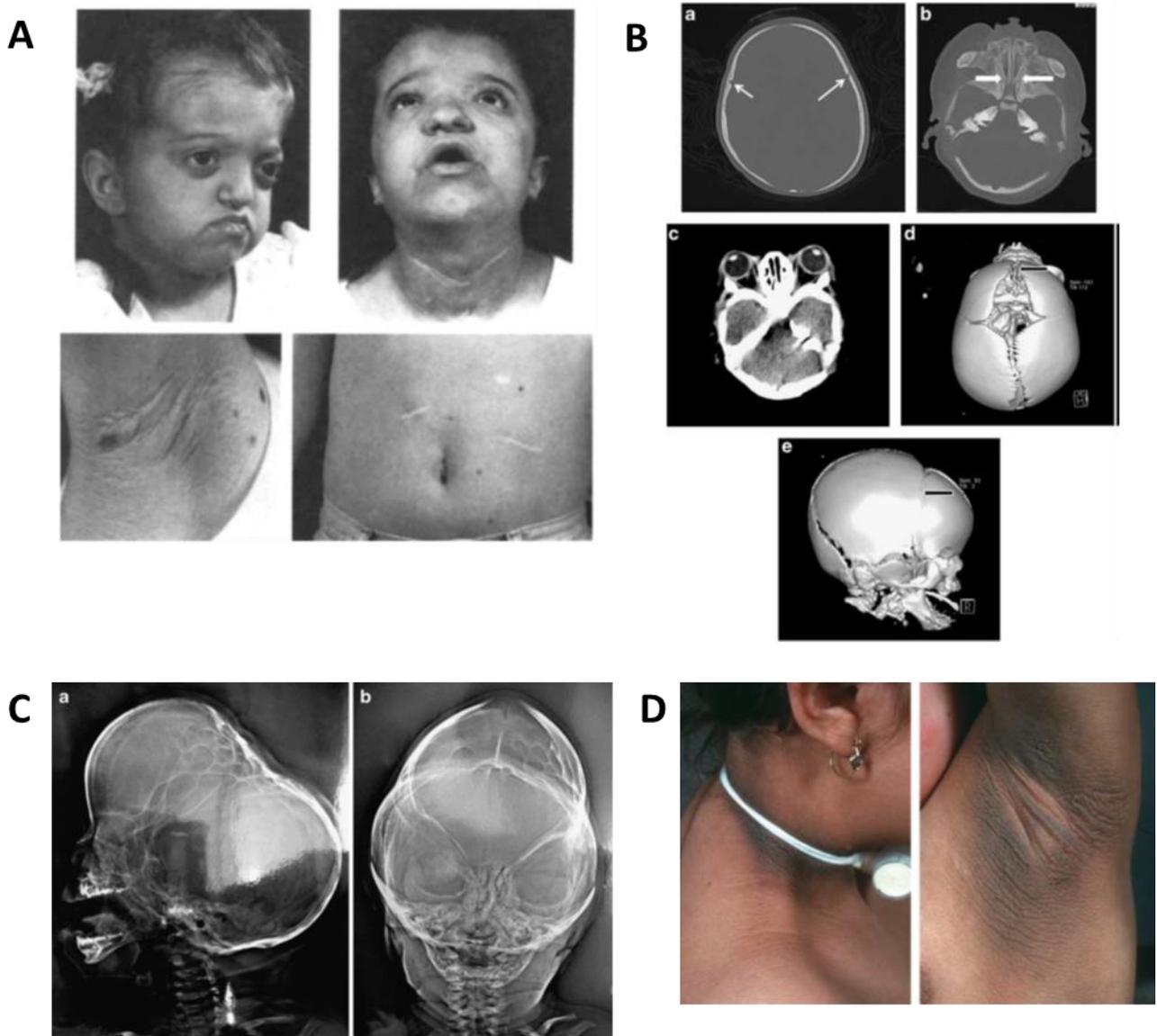


Figure 18 : (A) (d'après Meyers et al., 1995) Patients CAN présentant une exophtalmose et une hypoplasie maxillaire. L'acanthosis nigricans est visible au niveau du cou et des aisselles. (B) (d'après Herman et al., 2014) Scanner par microtomographie d'un patient CAN. Les flèches en (a) et (e) montrent la fusion des sutures coronales et en (b) l'atrésie de la choane. (c) montre l'exophtalmose. (C) (d'après Di Rocco et al., 2010) Radiographie d'un patient CAN présentant un crâne en feuille de trèfle (D) (d'après Mir et al., 2013) Acanthosis nigricans présent au niveau du cou et de l'aisselle.

Le phénotype craniofacial, comme le syndrome de Crouzon lié à FGFR2, est variable (**Figure 18**). Une fusion des sutures coronales est généralement retrouvée mais peut s'accompagner de la fusion d'autres sutures (crâne en trèfle retrouvé dans certains cas (Schweitzer et al., 2001)). L'hypoplasie de l'étage moyen de la face s'explique par la fusion prématurée des synchondroses de la base du crâne. Cette hypoplasie s'accompagne fréquemment d'une atrésie de la choane, qui rend la respiration plus difficile pour le patient (apnée du sommeil, nécessitant dans certains cas une trachéotomie pour dégager les voies aériennes). Une réduction de la taille du foramen magnum est fréquemment décrite. Certains patients présentent des problèmes ou une perte d'audition.

Au niveau du système nerveux central, beaucoup de cas présentent une malformation de Chiari et de l'hydrocéphalie (Di Rocco et al., 2011; Schweitzer et al., 2001). Il a été rapporté dans un cas une hypoplasie du corps calleux (Gürbüz et al., 2016). En dehors de cela, le syndrome CAN n'a pas été montré comme présentant des anomalies de structure sévère des différentes aires cérébrales. Quelques patients ont été diagnostiqués avec un retard mental ou un retard d'acquisition de la parole, mais ce retard est à pondérer sur les problèmes d'auditions apparaissant tôt et sur la sévérité du phénotype craniofacial (Di Rocco et al., 2011).

D'autres anomalies du squelette sont trouvées de manière plus rare chez certains patients. Il a été décrit dans certains cas une réduction de la largeur et de l'épaisseur des vertèbres (Schweitzer et al., 2001). Certains patients sont décrits comme ayant un léger retard staturo-pondéral, bien que ce trait ne soit pas clairement caractérisé pour ce syndrome à l'inverse des chondrodysplasies liées à FGFR3 (Lagaude et al., 2014). Il est noté dans certains cas d'autres anomalies maxillo-faciales, avec la présence de dents surnuméraires, d'uvule bifide ou de cémentome (Arnaud-López et al., 2007; Di Rocco et al., 2011).

L'acanthosis nigricans constitue la manifestation cutanée du CAN. Il apparaît tardivement dans certains cas, ce qui peut compliquer le diagnostic. Il touche certaines zones du corps comme le cou, l'aisselle ou le pourtour de l'œil. La peau est sèche et duveteuse. L'AN est également retrouvée dans certaines chondrodysplasies liées à FGFR3 (Dysplasie Thanatophore, SADDAN, Hypochondroplasie (Blomberg et al., 2010; Kumar et al., 2011)) ainsi que dans le syndrome de Beare-Stevenson lié à FGFR2.

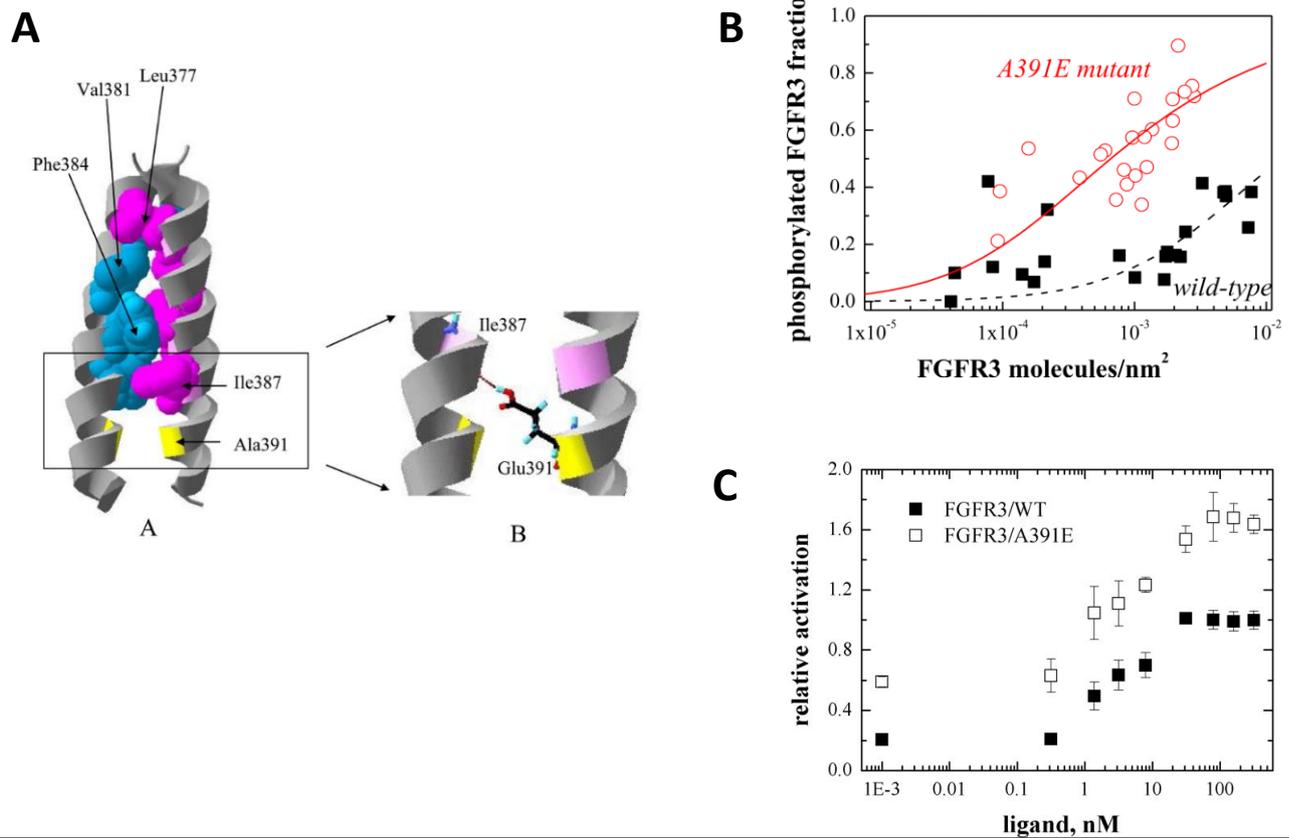


Figure 19 : (A) (d'après Li et al, 2006) Modèle moléculaire du domaine transmembranaire de Fgfr3. La position p.Ala391Glu est montrée en jaune. La substitution de l'Alanine en position 391 par une Glutamine crée une liaison hydrogène avec l'hélice opposée. (B) (d'après Chen et al, 2011) Fraction active du récepteur FGFR3 mature après transfection à des concentrations variables dans des cellules HEK 293T en absence de ligand. L'activation du récepteur muté est supérieure à celle du récepteur sauvage. (C) (d'après Chen et al, 2013) Activation relative de FGFR3 en fonction de la concentration de ligand dans des HEK 293T transfectées. En présence de ligand, même à des doses très faibles ou très fortes, l'activation du récepteur muté p.Ala391Glu est supérieure à celle du récepteur sauvage.

L'effet moléculaire de la mutation p.Ala391Glu, localisée dans la partie transmembranaire (TM), organisé en hélice alpha, de la protéine FGFR3 a été étudié de manière approfondie par Hristova et al. Il a ainsi été montré, dans le cas du domaine TM seul, que la présence de la mutation n'entraîne pas de perturbation de la structure de l'hélice TM. Cela permet de former un dimère TM symétrique plus stable que le dimère sauvage. L'angle du domaine TM muté en dimère dans la membrane est modifié (Tamagaki et al., 2014; Volynsky et al., 2013). La présence d'une Glutamine à la place d'une Alanine en position 391 sur une hélice, forme ainsi un lien hydrogène avec l'hélice en face (Li et al., 2006; Merzlyakov et al., 2006; Peng et al., 2009) (**Figure 19A**). Il a été montré par des techniques de FRET (Fluorescence Resonance

Energy Transfer) et de transfection transitoire, que cette stabilité était retrouvée en présence d'un domaine extra-cellulaire (Sarabipour and Hristova, 2013). Dans le cas de la protéine FGFR3 entière, des expériences de cross-linking ont montré que la mutation augmente la propension du récepteur à se dimériser en l'absence de son ligand FGF1 (**figure 19B**). En présence de ce-dernier à des doses différentes, la quantité de dimère est augmentée et supérieure au récepteur sauvage. Cette augmentation de dimérisation s'accompagne d'une augmentation de phosphorylation du domaine intra-cellulaire (Chen et al., 2013, 2011) et donc d'une augmentation de l'activation du récepteur (figure C).

Une récente étude de Hristova et ses collègues a également montré la formation d'hétérodimères entre FGFR1, FGFR2 et FGFR3. Ils montrent ainsi par des études de FRET que les mutations p.Ala391Glu et p.Gly380Arg (retrouvées dans l'achondroplasie) augmentent la stabilité du dimère FGFR3-FGFR3, mais aussi des hétérodimères FGFR3-FGFR2 et FGFR3-FGFR1 (Piccolo et al., 2017). L'étude des hétérodimères manque aujourd'hui de données pour définir précisément leur rôle biologique et leur implication dans les craniosynostoses.

[Syndrome de Muenke \(FGFR3\)](#)

Le syndrome de Muenke est caractérisé par une fusion prématurée de la suture coronale, de manière unilatérale ou bilatérale (Bonaventure and El Ghouzzi, 2003; Kruszka et al., 2016, 1993; Ornitz and Marie, 2015; Robin et al., 1993; Vajo et al., 2000). Le syndrome est dû à la mutation dominante c.749C>G dans le gène FGFR3, donnant la substitution p.Pro250Arg dans la protéine. Le syndrome est nommé d'après le Dr Maximilian Muenke, qui en a identifié la mutation en 1997 (Bellus et al., 1996; Muenke et al., 1997).

Sa prévalence est estimée à 1:30 000 (Vajo et al., 2000). Il s'agit d'une des craniosynostoses syndromiques les plus fréquentes : le syndrome de Muenke compte d'après certaines études pour 25 à 30% des craniosynostoses syndromiques (Kruszka et al., 2016, 1993; Moloney et al., 1997; Morriss-Kay and Wilkie, 2005).

Chez les patients, la fusion unilatérale ou bilatérale de la suture coronale s'accompagne parfois d'une fusion d'autres sutures (lambdoïde, métopique, sagittale) ainsi que d'une asymétrie de la face (Kruszka et al., 2016; Renier et al., 2000). Au niveau de la base du crâne, les synchondroses sont fusionnées précocement et le diamètre du foramen magnum est réduit (Rijken et al., 2015). Le syndrome de Muenke présente une forte variabilité

phénotypique (Aravidis et al., 2014; Kruszka et al., 1993). Tandis que certains patients présentent une pansynostose ou un crâne en trèfle nécessitant une intervention chirurgicale rapide, d'autres portant la mutation p.Pro250Arg peuvent ne pas présenter de craniosynostose, voire même une absence de signes cliniques (Kruszka et al., 2016). D'après différentes études, entre 12 et 15% des patients porteurs de la mutation p.Pro250Arg ne présentent pas de craniosynostose (Kruszka et al., 2016, 1993). Ces cas sont souvent identifiés lorsqu'un patient atteint possède un parent lui-même porteur de la mutation mais ne présentant pas de symptôme. Une étude rapporte en outre une famille de sept enfants tous porteurs de la mutation, dont seulement cinq présentent une craniosynostose (Moko and Blandin de Chalain, 2001).

D'autres anomalies de la face comme une déviation des fosses nasales, une malocclusion dentaire ou une rétrognathie ont été observés. Au niveau ophtalmologique, les patients peuvent présenter un ptosis, un strabisme et dans quelques cas un nystagmus (de Jong et al., 2010; Kruszka et al., 2016). Ils présentent également des complications auditives. Environ un tiers des patients montrent une perte d'audition et des otites récurrentes (Agochukwu et al., 2014). Il est intéressant de noter que ces complications auditives ne sont pas liées à la craniosynostose, apparaissant également chez des patients sans fusion de suture (Hollway et al., 1998).

Des anomalies subtiles des membres sont également observables par examen radiographique (Agochukwu et al., 2013; Muenke et al., 1997). L'aspect extérieur des membres est normal, sans problème articulaire. De nombreuses études montrent une fusion de la carpe au niveau des mains et du tarse au niveau des chevilles (Agochukwu et al., 2013; Muenke et al., 1997). Les patients peuvent présenter également des phalanges trapues et des épiphyses en cônes (Muenke et al., 1997).

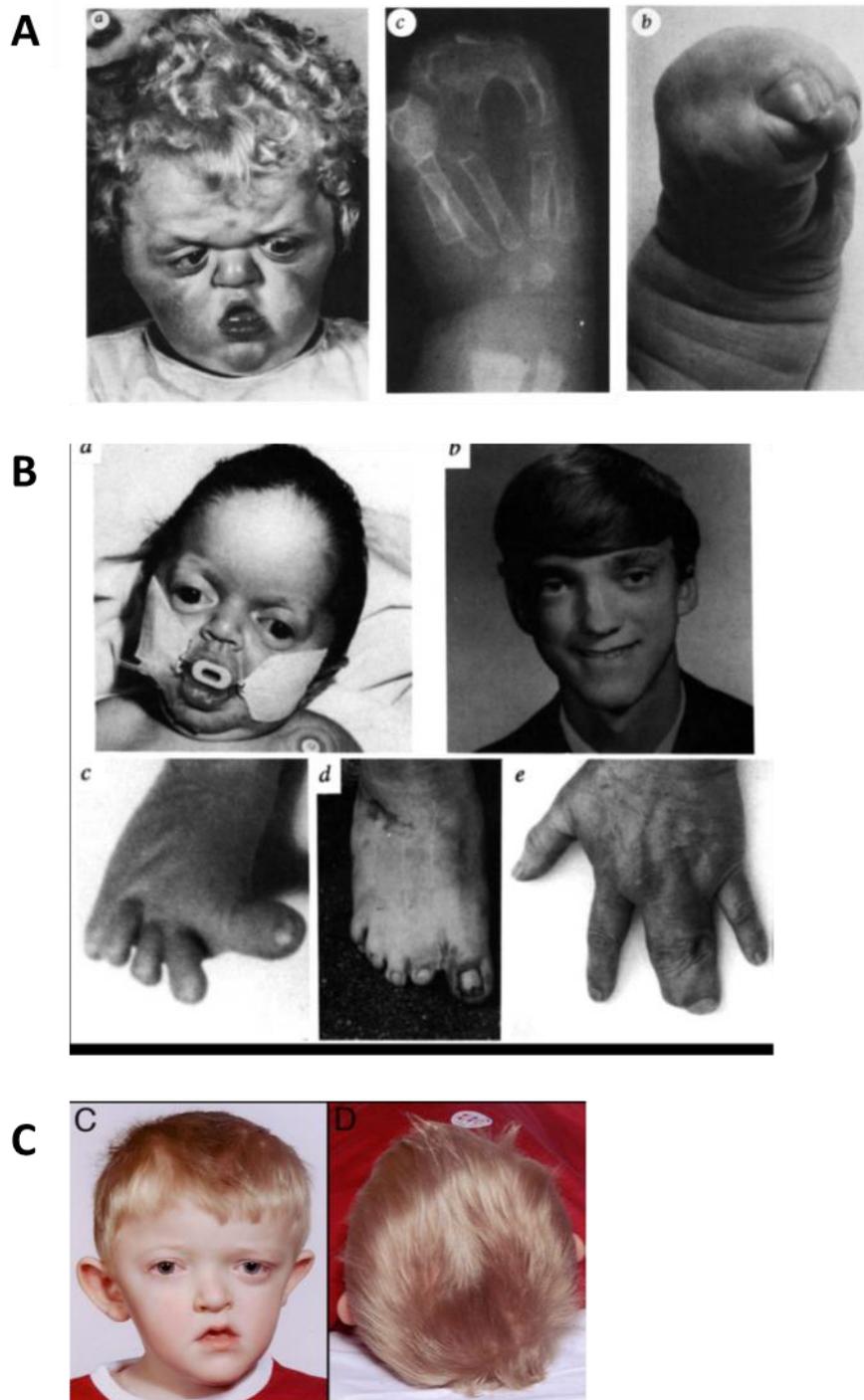


Figure 20 : (d'après Wilkie et al., 1995) Aspect clinique du syndrome d'Apert. Le crâne présente une brachycéphalie et une hypoplasie de l'étage moyen de la face. Le patient présente une syndactylie. (B) (d'après Jabs et al., 1994) Présentation clinique du syndrome de Jackson-Weiss. Le patient de gauche présente un crâne en trèfle (post-opération). Le patient de droite présente un hypertélorisme léger. Les extrémités peuvent présenter une déviation du gros orteil ou une syndactylie. (C) (d'après Twigg et al., 2008) Présentation clinique du syndrome de Muenke. La fusion unilatérale de la suture coronale droite conduit à une déformation asymétrique du crâne et à une proéminence du front du côté gauche en compensation.

Plusieurs études montrent que le syndrome de Muenke se caractérise également par une atteinte neurologique. La présence d'une craniosynostose peut mener chez certains patients à une hydrocéphalie et une augmentation de la pression intracrânienne (de Jong et al., 2010). Une étude de cas décrit un patient présentant des défauts des lobes temporaux et de l'hippocampe (Grosso et al., 2003). Enfin, il faut noter qu'environ 20% des patients présentent des épisodes d'épilepsie (Agochukwu et al., 2012; Kruszka et al., 2016).

Un retard de développement peut être observé chez un tiers des patients (bien que ce pourcentage soit plus élevé dans certaines études) (Arnaud et al., 2002; Kruszka et al., 2016). Ce retard est souvent marqué par un retard de la parole. Certains patients peuvent présenter une déficience intellectuelle (QI > 70). En outre, plusieurs études menées sur de larges cohortes de patients ont pu montrer un défaut comportemental chez les patients Muenke (de Jong et al., 2012; Maliepaard et al., 2014; Yarnell et al., 2015). Ces patients présentent un trouble d'hyperactivité avec déficit d'attention et une capacité de mémoire de travail réduite. Ils montrent aussi des troubles du contrôle des émotions et des interactions sociales. Il est intéressant de noter que ces troubles observés ne sont pas toujours liés à la présence de fusion des sutures ou au trouble de l'audition. Ces études mettent ainsi en avant un rôle de la mutation directement sur le fonctionnement du système nerveux central.

Modèle murin de Muenke (FGFR3)

Un modèle murin a été développé. Ce modèle a été généré en exprimant la mutation P244R, équivalente à la mutation humaine p.Pro250Arg de manière ubiquitaire (Twigg et al., 2008). Les souris hétérozygotes *Fgfr3*^{P244R/+} et homozygotes *Fgfr3*^{P244R/P244R} présentent un phénotype craniofacial montrant un léger arrondissement de la tête, une légère réduction de la taille du crâne et une malocclusion des incisives avec déviation du museau (**Figure 21B**). Ce phénotype a une pénétrance incomplète et variable entre mâles et femelles. Chez les mâles, la pénétrance est d'environ 10% chez les hétérozygotes et 100% chez les homozygotes. Chez les femelles, elle est de 0% chez les hétérozygotes et d'environ 30% chez les homozygotes. Seuls deux individus hétérozygotes analysés ont montré des signes de synostose au niveau de la suture coronale. Un parallèle peut être fait entre la forte variabilité phénotypique de ce modèle et celle observée chez les patients. Au niveau du fémur, les auteurs montrent une réduction significative de la densité osseuse au niveau de la tête fémorale et une réduction de

l'épaisseur de l'os cortical chez les hétérozygotes *Fgfr3*^{P244R/+} et homozygotes *Fgfr3*^{P244R/P244R}. Ces points n'ont jusqu'alors pas été observés chez les patients et rappellent l'effet de FGFR3 sur le développement du squelette appendiculaire.

D'autres études menées par la suite sur ce modèle ont également mis en lumière des défauts du développement de la jonction temporo-mandibulaire et des défauts d'ossification au niveau des synchondroses inter-sphénoïdale et sphéno-occipitale, avec la formation de pont osseux chez les hétérozygotes et homozygotes (Laurita et al., 2011; Yasuda et al., 2012).

Au niveau de l'audition, Mansour et al. ont montré également dans ce modèle une perte d'audition plus sévère que celle observée chez les patients (Mansour et al., 2013, 2009). Cette perte d'audition est corrélée à des défauts de différenciation cellulaire (cellules de Dieters et cellules piliers) et à des cellules surnuméraires le long de la cochlée. Ce phénotype auditif a par la suite pu être restauré par croisement avec un mutant hétérozygote pour *Fgf10*^{-/+}. Ce sauvetage a montré que la mutation *Fgfr3*^{P244R} modifie l'affinité du ligand pour son récepteur, FGF10 étant naturellement davantage affin pour FGFR1 et 2.

[Le syndrome de Crouzon \(FGFR2\)](#)

Le syndrome de Crouzon a été identifié par le neurologue Octave Crouzon en 1912 sous l'appellation « dysostoses craniofaciales » (Crouzon, 1935). C'est une des craniosynostoses syndromiques les plus fréquentes après le syndrome de Muenke et syndrome de Saethre-Chotzen. Sa prévalence est estimée à 1/60 000. Le syndrome de Crouzon est caractérisé par une fusion bilatérale des sutures coronales (Conrady and Patel, 2018; Ornitz and Marie, 2015; Robin et al., 1993).

Le syndrome de Crouzon est dû à une mutation dominante localisée dans le gène FGFR2. Son mode de transmission est autosomique dominant (Robin et al., 1993). En 1994, les études de cartographie génétique ont identifié le locus 10q25-q26 et FGFR2 comme gène candidat (Preston et al., 1994), et par la suite l'équipe du Dr Jabs a identifié trois mutations gain de fonction différentes dans trois familles de Crouzon (p.Tyr340His, Ser354Cys et Cys342Tyr) (Jabs et al., 1994; Reardon et al., 1994). Plus d'une trentaine de mutations sur le gène FGFR2 sont aujourd'hui identifiées. Les cas sporadiques comptent pour environ 30 à 60% des cas observés (al-Qattan and Phillips, 1997). La majorité des mutations touchent les exons 8 et 10, formant les domaines IgIIIa et IgIIIc de la protéine, bien que certaines mutations situées dans

les domaines extracellulaires et intracellulaires aient été décrites. Des études menées sur plusieurs patients au sein d'une même famille ont montré une variabilité dans la sévérité du phénotype (Shiller, 1959). Les patients peuvent parfois présenter des cas graves comme des pan-synostoses et des crânes en trèfle.

La fermeture prématurée des sutures crâniennes provoque chez les patients Crouzon une augmentation de la pression intracrânienne, pouvant mener à des complications neurologiques. Une étude a ainsi observé la présence d'hernie tonsillaire chez 72,7% des patients (Cinalli et al., 1995).

L'exophtalmie est due à une réduction de la taille des orbites. Les patients présentent un risque accru de développer des conjonctivites. Ils peuvent aussi présenter des problèmes visuels. Cela est dû en partie à un déséquilibre des muscles extra-oculaires mais également à une compression du nerf optique dans les cas de pression intracrânienne élevée.

L'hypoplasie de l'étage moyen de la face provoque une déformation de la fosse nasale. Les synchondroses sont fusionnées de manière précoce, provoquant une réduction de la taille du foramen magnum (Coll et al., 2018). Cela provoque également chez ces patients des problèmes respiratoires, avec une apnée du sommeil. À cela s'ajoute dans certains cas graves un épaissement du cartilage de la trachée. Les problèmes respiratoires sont parmi les premières causes d'intervention chirurgicale. Une trachéotomie peut être pratiquée chez le nouveau-né en cas de problème respiratoire sévère. Dans le syndrome de Crouzon, les membres ne présentent pas d'anomalies.

*Modèle murin de Crouzon *Fgfr2**

Le premier modèle murin, publié en 2004, exprime la mutation p.Cys342Tyr de manière ubiquitaire (recombinase PGK-Cre exprimée durant l'ovogénèse maternelle) (Eswarakumar et al., 2004; Khominsky et al., 2018). Le phénotype est comparable à la pathologie humaine à l'état hétérozygote *Fgfr2*^{C342Y/+} : un crâne court et arrondi, un raccourcissement du maxillaire, une fusion des sutures coronales et lambdoïdes. Les squelettes axial et appendiculaire ne montrent pas d'anomalie. La fusion des sutures et la modification du crâne n'apparaissent qu'après deux semaines de croissance et aucun signe morphologique n'est visible avant (Perlyn et al., 2006). A l'état homozygote *Fgfr2*^{C342Y/C342Y}, les effets de la mutation sont exacerbés et les auteurs remarquent un phénotype squelettique plus prononcé, avec une

ossification ectopique : présence d'une fente palatine, fusion et épaissement des os de la calvaria, fusion des os du genou, des cervicales et du thorax. Ces anomalies de la cage thoracique s'accompagnent d'ailleurs d'un sous-développement des poumons, rendant le mutant homozygote non viable. La mise en évidence d'une augmentation de la prolifération des ostéoprogéniteurs, à la fois au niveau de la calvaria et au niveau de la moelle des os longs explique ce phénotype. Un défaut de la condensation mésenchymateuse, avec une diminution de l'expression de Sox9, conduisant à des défauts à la fois de la chondrogenèse et de l'ostéogenèse a également été observé (Peskett et al., 2017).

Un deuxième modèle de Crouzon, présentant la mutation p.Trp290Arg, a été développé par criblage de mutagenèse en utilisant du N-nitroso-N-éthylurée (ENU) (**Figure 21A**). Contrairement à la mutation p.Cys342Tyr située uniquement dans la forme IIIc de FGFR2, p.Trp290Arg touche les isoformes IIIb et IIIc. Les animaux hétérozygotes présentent une fusion des sutures coronales et lambdoïde, avec un crâne bombé et un museau raccourci. À l'état homozygote, le phénotype augmente là aussi en sévérité, avec un retard de l'ossification crânienne, une agénésie des poumons et du tractus intestinal. L'ossification endochondrale est également perturbée, avec une fusion des vertèbres et une malformation du sternum (Mai et al., 2010).

Syndrome d'Apert (FGFR2)

Le syndrome d'Apert se caractérise par une craniosynostose bicoronale, une acrocéphalie, une hypoplasie du maxillaire, une fusion des synchondroses, un nez en bec et un exorbitisme (Robin et al., 1993). Il a été identifié en 1906 par le Dr Eugène Apert (Lee and Chung, 2010). Les patients présentent une syndactylie (fusion de plusieurs extrémités) de degrés variables des doigts et des orteils (**Figure 20**). Le système nerveux est également sévèrement touché dans ce syndrome. Les patients présentent plusieurs anomalies comme une mégacéphalie, ventriculomégalie, hydrocéphalie, agénésie du corps calleux et des anomalies de structure des lobes temporaux. Les patients présentent une déficience mentale sévère. La syndactylie est aussi traitée par intervention chirurgicale de reconstruction de la main, variable en fonction du degré de syndactylie (Das and Munshi, 2018; Pettitt et al., 2017). La prévalence de ce syndrome est estimée à 1/65 000 naissances (Tolarova et al., 1997).

Le syndrome d'Apert est associé à une mutation dominante du gène *FGFR2*. Les mutations les plus courantes pour ce syndrome sont des mutations faux sens situées dans le linker entre les IgGII et IgGIII à la position Ser252 et Pro253 (Ser252Trp and Pro253Arg).

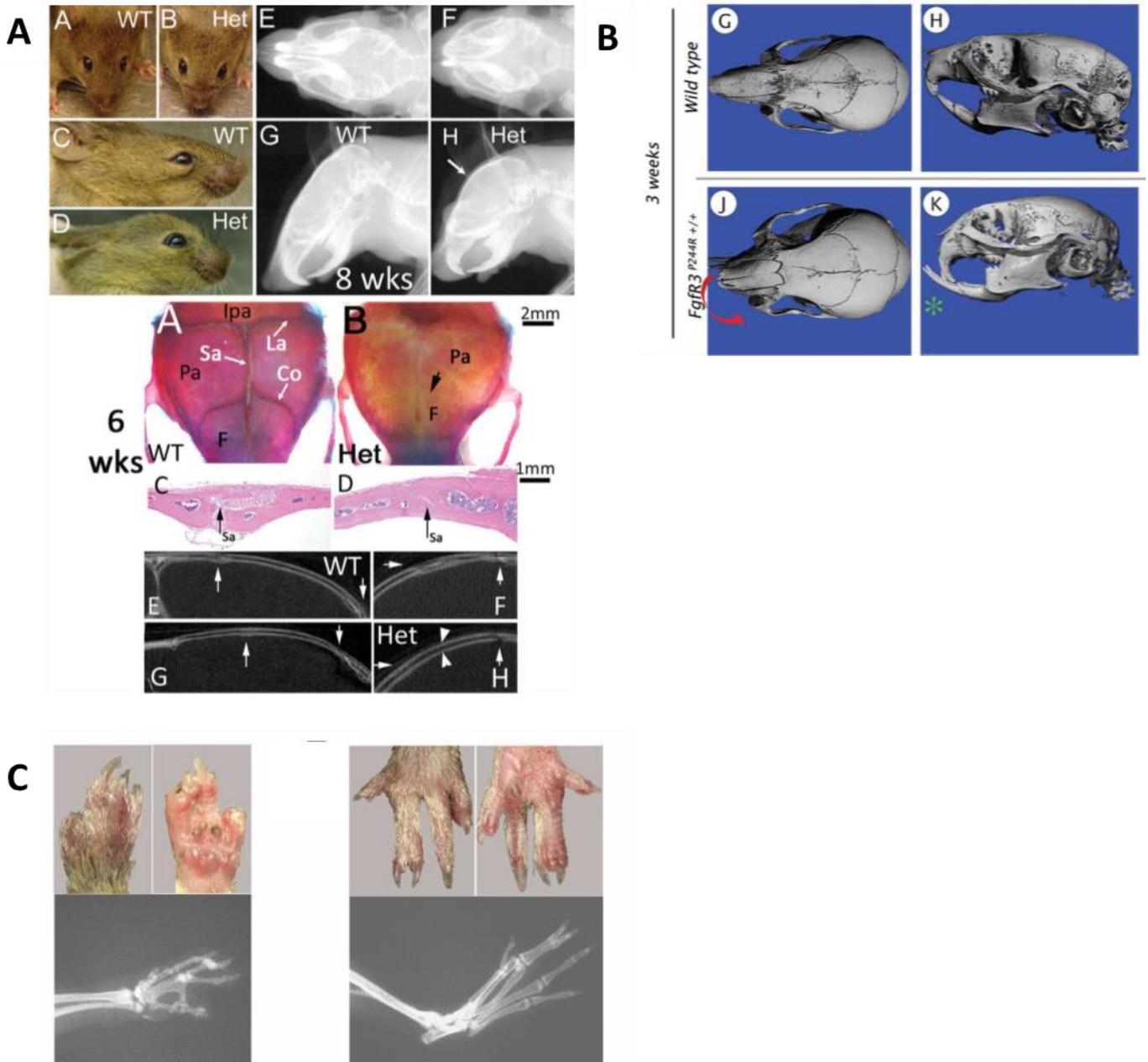


Figure 21 : (A) (d'après Mai et al., 2010) Phénotype de la souris *Fgfr2*^{W290R/+}, modèle pour le syndrome de Crouzon. Ce modèle présente un crâne réduit et bombé et un museau court. La suture coronale est fusionnée. (B) (d'après Laurita et al., 2011) Phénotype de la souris *Fgfr3*^{P244R/P244R}, modèle pour le syndrome de Muenke, présentant une déviation du museau sans fusion des sutures crâniennes. (C) (d'après Yin et al., 2008) Phénotype squelettique du modèle *Fgfr2*^{+/P253R} pour le syndrome d'Apert, présentant une syndactylie.

Modèle murin d'Apert

Le premier modèle murin a été généré en insérant la mutation p.Ser250Trp correspondant à la mutation p.Ser252Trp de manière ubiquitaire. Ce modèle *Fgfr2*^{S250W/+} présente un phénotype sévère, touchant le squelette axial, le crâne et les membres. Ces animaux présentent une réduction drastique de la taille du crâne et un arrondissement, causé par la fusion des sutures coronales. Les ostéoblastes au niveau de la suture présentent une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose. Ces deux phénomènes induisent une réduction de l'épaisseur de la calvaria et une fusion prématurée des sutures. Une malocclusion est également observée. La base du crâne n'est quant à elle pas affectée. Au niveau du squelette, les animaux présentent une petite taille, avec une réduction de la plaque de croissance. Les extrémités ne présentent cependant pas d'anomalies comme observées chez le patient. Le phénotype est variable, avec des animaux au phénotype peu sévère viable, tandis que les phénotypes les plus sévères causent la mort à 20 jours (Chen et al., 2003).

Le deuxième modèle murin exprime la mutation p.Ser252Trp. Les animaux *Fgfr2*^{+/S252W} présentent un phénotype sévère avec une craniosynostose, une réduction de la taille squelettique et une affection d'autres organes comme le thymus, le cœur et les intestins. Les ostéoblastes présentent chez ce modèle une augmentation de la prolifération, des anomalies de différenciation au niveau des sutures au stade embryonnaire et une diminution de la différenciation (Wang et al., 2005).

Le troisième modèle a été généré par expression ubiquitaire de la deuxième mutation la plus récurrente, p.Pro253Arg, dans le gène murin *Fgfr2*. Le modèle *Fgfr2*^{P253R/+} présente lui aussi un phénotype sévère, avec un crâne de taille réduite et arrondi, causé par une fusion des sutures coronales. Les mutants présentent également une taille réduite du squelette et une syndactylie au niveau des pattes avant et arrière contrairement au premier modèle. Ce modèle présente au niveau des sutures une ossification accélérée et une augmentation de la différenciation ostéoblastique. Il présente également une fusion prématurée des synchondroses de la base du crâne, conduisant au phénotype crânien sévère observé. Au niveau des os longs, ce modèle présente une réduction de la prolifération et de la différenciation des chondrocytes, corrélée à la croissance réduite des membres (**Figure 21C**) (Yin et al., 2008).

L'analyse du phénotype lié au système nerveux central a également été permise par ces modèles. Une étude combinant l'analyse par microscopie à résonnance magnétique des cerveaux des deux modèles *Fgfr2^{+/S252W}* et *Fgfr2^{P253R/+}* montre la présence d'anomalies du système nerveux central similaires, comme une asymétrie des lobes, une agénésie du corps calleux et une ventriculomegalie. L'étude ne montre pas de corrélation entre la sévérité du phénotype crânien et la sévérité du phénotype cérébral, suggérant que les deux tissus sont touchés de manière directe par la mutation et que le second n'est pas une conséquence du premier (Aldridge et al., 2010). Des études ultérieures ont, par le biais de promoteurs spécifiques des ostéoblastes (Ostéocalcin), chondrocytes (Collagène type II) et de progéniteurs neuronaux (Nestin), permis de souligner que les anomalies craniofaciales associées à Pro253Arg étaient dues à des défauts de croissance spécifiques de la calvaria, de la base du crâne et du cerveau (Luo et al., 2017).

Syndrome de Pfeiffer (FGFR2 et FGFR1)

Le syndrome de Pfeiffer est caractérisé par une craniosynostose pouvant être associée à des anomalies des extrémités. Les patients présentent ainsi un élargissement et une déviation du pouce et gros orteil accompagnés d'une brachydactylie. La prévalence du syndrome de Pfeiffer est estimée à 1/100 000 naissances (Robin et al., 1993).

On le divise en trois types selon leur gravité. Le type I, le moins sévère, présente une brachycéphalie, une hypoplasie de l'étage moyen de la face et une proptose légère. Il peut également présenter une hydrocéphalie et des problèmes d'audition dans certains cas. Le Pfeiffer de type I présente un développement intellectuel normal.

Les syndromes de Pfeiffer de type II et type III sont en revanche plus sévères et peuvent présenter un crâne en trèfle (exclusif au type II), une forte proptose et une atrésie de la choane. Ils peuvent également présenter des ankyloses et des synostoses au niveau des coudes. Ces cas n'ont été observés que sporadiquement et leur pronostic peut être défavorable en raison des complications neurologiques et respiratoires (Ko, 2016; Vogels and Fryns, 2006).

Le syndrome de Pfeiffer est associé à des mutations dominantes des gènes FGFR1 et FGFR2. Le type I est associé aux mutations des deux gènes, tandis que les types II et III sont associés seulement à des mutations de FGFR2. Le diagnostic peut être complexe à établir du fait du

chevauchement du phénotype pouvant exister notamment avec le syndrome de Crouzon. Par ailleurs, environ 20% des patients présentant un phénotype de syndrome de Pfeiffer ne présentent pas de mutation ni dans FGFR1 ni dans FGFR2. Pour FGFR1, le syndrome est notamment associé à la mutation p.Pro252Arg, équivalente aux mutations p.Pro253Arg de FGFR2 dans le syndrome d'Apert et p.Pro250Arg de FGFR3 dans le syndrome de Muenke (Lajeunie et al., 2006; Robin et al., 1993; Vogels and Fryns, 2006).

Modèle murin de Pfeiffer (FGFR1)

Un modèle murin a été développé pour le syndrome de Pfeiffer, portant la mutation *Fgfr1*^{P250R}. Les animaux hétérozygotes *Fgfr1*^{P250R/+} et homozygotes *Fgfr1*^{P250R/P250R} pour cette mutation présentent une fusion des sutures coronales, frontale et sagittale, avec un crâne bombé, un hypertélorisme et une hypoplasie de l'étage moyen de la face. La base du crâne n'est cependant pas affectée. Il a été montré une augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation et de la minéralisation dans ce modèle (Zhou et al., 2000).

Syndrome de Jackson-Weiss (FGFR2)

Le syndrome Jackson-Weiss est caractérisé par une craniosynostose de sévérité variable, associée à une brachycéphalie, un strabisme et un hypertélorisme. Il présente également des anomalies des extrémités : déviation du gros orteil, fusion du tarse et métatarse, syndactylie (**Figure 20**) (Jabs et al., 1994).

Ce syndrome est dû à des mutations dominantes dans le gène FGFR2 (Jabs et al., 1994). Certaines des positions de ces mutations sont partagées avec les syndromes de Crouzon et de Pfeiffer, avec une différence dans le changement de l'acide aminé (Lajeunie et al., 2006). Le syndrome de Jackson-Weiss est cependant plus rare.

Le phénotype du syndrome de Jackson-Weiss se rapproche de celui du syndrome d'Apert. Contrairement à celui-ci, les patients pour le syndrome de Jackson-Weiss ne présentent pas de problème de développement intellectuel (Robin et al., 1993).

Syndrome de Beare-Stevenson cutis gyrata (FGFR2)

Le syndrome de Beare-Stevenson présente une craniosynostose sévère accompagnée de plusieurs anomalies de la forme des oreilles ou de la zone ano-génitale. Les patients

présentent au niveau cutané un acanthosis nigricans et un cutis gyrata ainsi qu'un épaissement de la peau au niveau du cuir chevelu, du cou ou des pieds, formant des replis et sillons de peau (Robin et al., 1993).

Le syndrome est extrêmement rare : seuls six cas ont été identifiés. Il est causé par des mutations dominantes du gène FGFR2 touchant les positions Tyr375Cys et Ser372Cys (Azoury et al., 2017).

Un modèle mutin a été développé pour ce syndrome, portant la mutation p.Tyr394Cys (équivalente à la mutation humaine Tyr375Cys). Il présente un phénotype sévère (létalité au bout de deux semaines après la naissance) avec une fusion des sutures coronales zygomatiques et squamosales, un crâne brachycéphalique avec une hypoplasie de l'étage moyen de la face. À cela s'ajoute une fusion du sternum et un cutis gyrata au niveau cutané. Les auteurs ont identifié que la mutation induisait une suractivation de p38 dans la voie MAPK au niveau des ostéoblastes. Un traitement *in utero* de ces animaux avec un inhibiteur spécifique de p38 a permis d'améliorer le phénotype cutané, tandis que le phénotype craniofacial présentait une amélioration dans une minorité des animaux (Wang et al., 2012).

Autres Craniosynostoses syndromiques non liées aux gènes FGFRs

Syndrome de Saethre-Chotzen (Twist)

Le syndrome de Saethre-Chotzen se caractérise par une fusion unilatérale ou bilatérale des sutures coronales avec une ptose, une asymétrie faciale et une proéminence particulière de la partie supérieure de l'oreille externe. Cela peut s'accompagner d'autres traits phénotypiques comme une hypoplasie du maxillaire et une fusion des synchondroses ou une petite stature dans des cas rares.

Le syndrome de Saethre-Chotzen est dû à une mutation dominante du gène TWIST1, acteur essentiel dans l'ossification et dans le maintien de la suture, causant une haploinsuffisance. Ceci peut être dû à une mutation ponctuelle ou à une délétion du gène. Sa prévalence est estimée entre 1:25 000 et 1:50 000, en faisant l'une des craniosynostoses syndromiques les plus fréquentes avec le syndrome de Muenke (Gallagher et al., 1993).

Craniosynostose de type Boston (MSX2)

Ce syndrome présente un phénotype variable présentant un front proéminent, une brachycéphalie ou un crâne en trèfle. Les patients présentent également une fente palatine, des dents surnuméraires et une syndactylie. Ce syndrome est dû à une mutation dominante du gène MSX2. C'est un syndrome extrêmement rare (Jabs et al., 1993; Janssen et al., 2013).

Syndrome de Bohring-Opitz (ALX1)

Ce syndrome est caractérisé par un phénotype comprenant une fusion de la suture métopique, un retard de croissance anténatale, une exophtalmie, une fente labio-palatine, une campodactylie et un hypertélorisme. Ce syndrome compte moins de vingt cas identifiés et est associé à une mutation dominante du gène ASXL1 (RESERVES, n.d.; Twigg and Wilkie, 2015).

Craniosynostose liée à TCF12 (Craniosynostosis-3)

Cette craniosynostose est caractérisée par une fusion unilatérale ou bilatérale des sutures coronales, une syndactylie. Ce syndrome est dû à une mutation du gène Tcf12. Tcf12 étant un facteur nucléaire partenaire de Twist, le phénotype se rapproche chez certains patients de celui du syndrome de Saethre-Chotzen (Sharma et al., 2013).

Syndrome de Carpenter (RAB23)

Ce syndrome est caractérisé par la fusion de plusieurs sutures, une acrocéphalie, une brachycéphalie et une syndactylie. À cela s'ajoute des problèmes cardiaques congénitaux et une hypodontie. Les patients adultes présentent un retard mental, une obésité et un hypogonadisme. Il est dû à une mutation dominante du gène RAB23, codant pour une protéine du transport vésiculaire et régulateur négatif de la voie Hedgehog (Jenkins et al., 2007).

La dysplasie cranio-fronto-nasale (EFNB-1)

Cette dysplasie se caractérise au niveau craniofacial par une brachycéphalie avec fusion des sutures coronales, un hypertélorisme et un nez plat avec une rainure. Au niveau squelettique, les patients présentent des anomalies diverses comme une dysplasie des clavicules et au

niveau des extrémités une syndactylie, campodactylie ou polydactylie. Ce syndrome est dû à une mutation du gène codant l'Ephrine-B1 (EFNB-1) localisé sur le chromosome X. De ce fait, la transmission est liée à l'X et les patients féminins présentent un phénotype plus sévère que les garçons (RESERVES, n.d.; Twigg and Wilkie, 2015; van den Elzen et al., 2014).

Craniosynostose liée à RUNX2

Cette craniosynostose est caractérisée par une fusion de la suture métopique. Elle a une transmission autosomique dominante et est associée à une duplication du gène Runx2 (Mefford et al., 2010). Par ailleurs, une quadruplication de Runx2 a également été reportée avec une aggravation du phénotype montrant une pansynostose (Greives et al., 2013).

Les chondrodysplasies

Les chondrodysplasies sont une large famille de pathologies associées à des anomalies touchant la taille et la forme des membres, du tronc et du crâne. Il s'agit d'un groupe hétérogène, comptant plus de 450 syndromes distincts (Rimoin et al., 2014). Parmi ce nombre, les mutations dominantes gain-de-fonction du gène FGFR3 sont responsables de quatre chondrodysplasies présentant un nanisme plus ou moins sévère (achondroplasie, hypochondroplasie, dysplasie thanatophore, SADDAN). Dans ce chapitre, nous aborderons également le syndrome CATSHL, présentant une croissance excessive des membres et associée à une haploinsuffisance de FGFR3.

Achondroplasie

L'achondroplasie est la forme de nanisme la plus fréquente rencontrée chez l'homme. Elle se caractérise par des membres courts et disproportionnés, la partie proximale du membre (humérus et fémur) étant davantage raccourcie que la partie distale. Les tibias peuvent présenter une incurvation (**Figure 22A**). Les patients atteignent une taille comprise entre 120 et 125 cm à l'âge adulte.

Les patients peuvent présenter une hypotonie musculaire durant l'enfance précoce (Baujat et al., 2008; Horton et al., 2007).

Au niveau du crâne, les patients présentent une macrocéphalie et un front bombé. À la base du crâne, une fusion prématurée des synchondroses et une diminution de la taille du foramen magnum sont observés. Les patients présentent une hypoplasie de l'étage moyen de la face, un prognathisme (**Figure 22B**). Il a par ailleurs été observé une fusion partielle précoce des sutures coronales et sagittales chez certains patients. Au niveau des vertèbres, les patients présentent une réduction de la distance interpédiculaire des lombaires. Les patients peuvent présenter une cyphose durant l'enfance, bien que cela puisse se corriger par la suite par amélioration du tonus musculaire. Les patients adultes peuvent en revanche développer une lordose lombaire, réduisant le volume de la cage thoracique. Les patients peuvent également présenter des problèmes ou une perte d'audition. (Baujat et al., 2008; Di Rocco et al., 2014; Ornitz and Legeai-Mallet, 2017). Le phénotype de l'achondroplasie est le fruit d'une forte perturbation des processus d'ossification endochondrale.

Les anomalies touchant la colonne vertébrale peuvent causer une sténose du canal lombaire, provoquant chez le patient une paresthésie, une faiblesse des réflexes des tendons et une claudication chez l'adulte. La réduction de la taille du foramen magnum induit chez les patients une compression cervico-médullaire du tronc cérébral (**Figure 22B**). Ceci a pour conséquence une hypotonie sévère de la partie supérieure du corps, un clonus ainsi qu'une apnée centrale.

Au niveau cérébral, les patients peuvent présenter de l'hydrocéphalie due à un rétrécissement du foramen jugulaire. Ils peuvent présenter une hypoplasie du corps calleux et un élargissement des ventricules.

Les patients présentent un développement intellectuel normal. Certaines études ont cependant montré une diminution du QI verbal, ainsi que des fonctions exécutives significativement diminuées, parmi lesquelles on trouve la capacité d'attention, l'arithmétique (mémoire de travail) ou les capacités de construction visuo-spatiales. Le phénotype entraîne de lourdes difficultés psychologiques pouvant amener à des défauts neuro-développementaux (Thompson et al., 1999; Wigg et al., 2016).

Génétique de l'achondroplasie

Le gène de l'achondroplasie a été identifié en 1994 (Rousseau et al., 1994; Shiang et al., 1994). Une mutation récurrente hétérozygote p.Gly380Arg est responsable de la majorité des cas d'achondroplasie, retrouvée chez près de 97% des patients. Une minorité de patients porte d'autres mutations, p.Ser217Cys, Ser279Cys, p.Ser344Cys et p.Gly375Cys. Environ 80% des cas d'achondroplasie identifiées sont sporadiques. Comme pour les craniosynostoses, il a été montré que l'apparition de ces mutations FGFR3 était corrélée à un âge paternel avancé. Des études ont montré qu'il existait un mécanisme d'avantage sélectif des gamètes mutés (Ornitz and Legeai-Mallet, 2017; Wilkin et al., 1998).

Il a été montré que le récepteur FGFR3 est suractivé en présence et en absence de ses ligands (He et al., 2011; Naski et al., 1996) et qu'il active de nombreuses voies de signalisation en aval. La suractivation de FGFR3 perturbe son internalisation, permettant alors au récepteur muté de persister plus longtemps à la membrane (Monsonigo-Ornan et al., 2000).

Traitement de l'achondroplasie

Une approche courante pour améliorer ce phénotype consiste en un allongement chirurgical des membres, appelé procédure Ilizarov. Dans cette procédure, une ostéotomie de l'os cortical va permettre de graduellement déplacer et écarter, à l'aide de fixateurs externes, les os longs afin de leur faire gagner en taille (**Figure 22A**). Cette douloureuse procédure, durant plusieurs mois, est associée avec différents risques comme l'infection ou la fragilité osseuse post-opératoire.

Les compressions du canal lombaire et de la zone cervico-médullaire peuvent nécessiter une intervention chirurgicale afin de décompresser le tissu nerveux et d'empêcher l'aggravation des symptômes. Environ 30% des patients subissent une intervention chirurgicale de la colonne, tandis que 5 à 10% d'entre eux requièrent une décompression médullaire cervicale (Baujat et al., 2008).

Modèles murins pour l'achondroplasie

Plusieurs modèles murins ont été développés afin d'étudier l'achondroplasie (Chen et al., 1999; Naski et al., 1998; Pannier et al., 2009; Wang et al., 1999). Un premier modèle a été généré en insérant la mutation p.Gly380Arg sous expression du promoteur du collagène de type II, spécifique de la lignée chondrocytaire. Les animaux mutants présentent un nanisme proportionné. Au niveau de la plaque de croissance, une réduction des zones prolifératives et hypertrophiques est observée. Cette réduction est accompagnée d'une baisse d'expression d'Ihh, PTHrP et BMP (Naski et al., 1998). Le modèle proposé ici montre que l'activation de FGFR3 inhibe l'expression d'Ihh. La baisse d'expression d'Ihh induit à son tour une baisse d'expression de PTHrP et BMP, régulateurs positifs respectivement de la prolifération et de la différenciation chondrocytaire, conduisant à la réduction de la plaque de croissance.

Un deuxième modèle exprimant la mutation p.Gly369Cys, correspondant à la mutation humaine p.Gly375Cys, de manière ubiquitaire, présente un nanisme. La base du crâne montre une fusion prématurée des synchondroses. Ce modèle présente une plaque de croissance réduite avec réduction de taille des zones prolifératives et hypertrophiques. Il a été montré dans ce modèle que l'activation de la voie STAT en aval de FGFR3 dans la zone proliférative induisait une diminution du taux de prolifération des chondrocytes due à une augmentation de l'expression des protéines, P16 et P19, inhibitrices du cycle cellulaire (Chen et al., 1999).

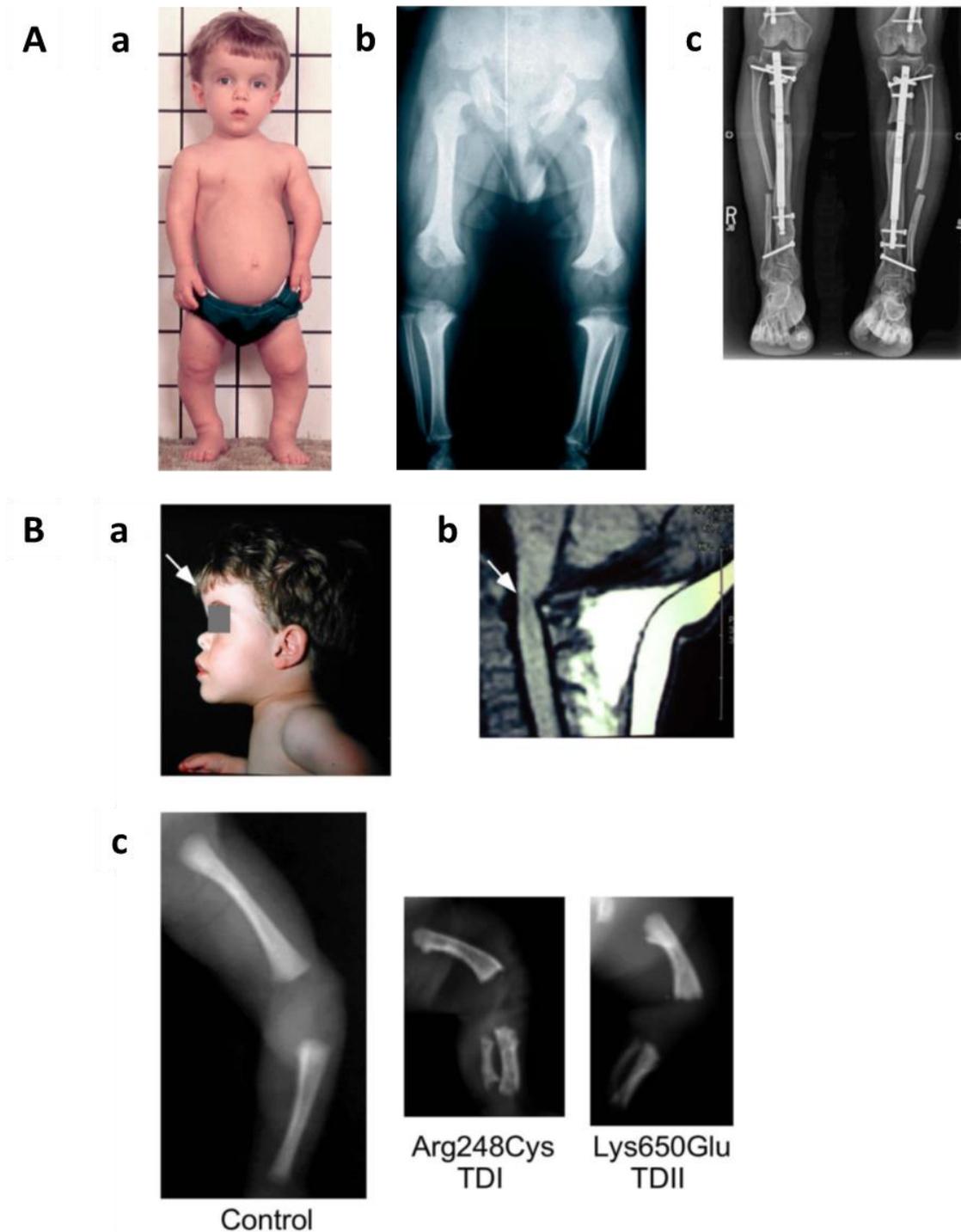


Figure 22 : (A) (d'après Horton et al., 2007) (a) Patient atteint d'achondroplasie âgé de 3 ans présentant une proéminence frontale, une hypoplasie de l'étage moyen de la face, une rhizomélie des membres et une cage thoracique réduite. (b) Radiographie d'un patient présentant un raccourcissement des os longs. (c) (d'après Ornitz et Legeai-Mallet, 2017) Radiographie montrant la procédure chirurgicale d'allongement de membre, l'os sectionné étant maintenu par des stabilisateurs. (B) (d'après Ornitz et Legeai-Mallet, 2017) (a) Vue de profil d'un patient montrant la proéminence frontale. (b) Compression cervico-médullaire au niveau du foramen magnum (flèche). (c) Radiographie d'un fœtus contrôle, TDI et TDII à 24 semaines de gestation, montrant la réduction de taille et l'incurvation des os longs.

Un troisième modèle a été développé par Legeai-Mallet et al. Bien qu'exprimant la mutation p.Tyr367Cys, correspondant à la mutation p.Tyr373Cys humaine associée à la dysplasie thanatophore, ce modèle présente un phénotype se rapprochant du phénotype humain de l'achondroplasie. Ce modèle *Fgfr3*^{Y367C/+} présente un nanisme rhizomélique sévère, avec une réduction de la cage thoracique. Au niveau du crâne, il présente une hypoplasie du maxillaire et de la mandibule, avec un sévère prognathisme. La base du crâne est fusionnée précocement et le diamètre du foramen magnum est réduit. Ce modèle montre une perte d'audition en raison d'un défaut de développement de la cochlée. Au niveau de la plaque de croissance, la prolifération, la différenciation puis la vascularisation sont diminuées. Le centre d'ossification secondaire présente également un retard de formation. Les souris *Fgfr3*^{Y367C/+} présentent une cyphose, une lordose et une réduction de la distance interpédiculaire (**Figure 24**) (Biosse Duplan et al., 2016; Di Rocco et al., 2014; Komla-Ebri et al., 2016; Martin et al., 2018; Mugniery et al., 2012; Pannier et al., 2009).

Dysplasie thanatophore

La dysplasie thanatophore (TD) est une forme sporadique de nanisme. Il s'agit d'une chondrodysplasie extrêmement sévère, généralement létale avant ou à la naissance (Maroteaux et al., 1967). Elle se caractérise par des membres courts et une réduction de la taille de la cage thoracique (**Figure 22B**). Elle présente également une macrocéphalie et une hypoplasie maxillaire, accompagnées parfois d'une fusion précoce des sutures coronales ou d'un crâne en trèfle. Le cerveau présente des malformations importantes des lobes temporaux (Itoh et al., 2013).

On distingue deux formes de TD (TDI et TDII). TDI se distingue par la présence de fémurs incurvés, tandis qu'ils sont droits chez la TDII. Les deux types sont associés à des mutations hétérozygotes localisées dans des domaines différents de la protéine FGFR3. TDI est associée aux mutations p.Arg248Cys, p.Ser249Cys, p.Tyr373Cys et p.Gly370Cys, touchant les domaines extracellulaire et transmembranaire dans environ 75% des cas (Rousseau et al., 1996). D'autres mutations plus rares, p.X807Ser, X807Arg et X807Cys, vont abolir le codon stop final et allonger la protéine de 141 acides aminés dans sa partie intracellulaire (Tavormina et al., 1995). TDII est associée à la mutation p.Lys650Glu située dans le domaine à activité tyrosine kinase de FGFR3. Il a été montré que ces mutations provoquent une suractivation intense de

FGFR3 indépendamment de ses ligands, activant les voies MAPK et STAT (Krejci et al., 2008; Legeai-Mallet et al., 2004). Il a également été montré que la mutation TDII inhibe la maturation complète de la protéine et son activation ectopique dans le Golgi (Gibbs and Legeai-Mallet, 2007). Plusieurs modèles murins exprimant les mutations associées au TD ont été développés. Le phénotype est cependant moins sévère que chez l'homme, la plupart des modèles étant viables (Iwata et al., 2001; Li et al., 1999; Pannier et al., 2009).

Une autre forme de nanisme sévère, « Severe Achondroplasia with Developmental Delay and Acanthosis Nigricans » (SADDAN), associant un phénotype similaire à la TD accompagné d'un acanthosis nigricans au niveau cutané a été décrit. Le SADDAN est dû à la mutation FGFR3 dominante p.Lys650Met, induisant également une suractivation du récepteur (Kumar et al., 2011).

Hypochondroplasie

L'hypochondroplasie est un nanisme rhizomélisque modéré. Bien que moins sévère, le phénotype comprend des similarités avec celui de l'achondroplasie comme l'hypoplasie de l'étage moyen de la face. Le défaut de croissance ne se détecte qu'après la naissance vers 3-4 ans. L'hypochondroplasie est due à des mutations FGFR3 dominantes, la mutation p.Asn540Lys est retrouvée dans environ 60% des cas d'hypochondroplasie (Bellus et al., 1995; Ornitz and Legeai-Mallet, 2017). Dans des cas très rares d'hypochondroplasie, une fusion unilatérale de la suture coronale ou un acanthosis nigricans ont été observés (González-Del Angel et al., 2017; Hirai et al., 2017).

Dysplasie osseuse avec incurvation des membres (Bent Bone Dysplasia)

Cette dysplasie létale est caractérisée par une sévère dysmorphie faciale avec un hypertélorisme, une hypoplasie du maxillaire, une malformation des oreilles externes et une macrognathie. La calvaria montre une craniosynostose et un retard d'ossification. Les os longs sont incurvés, notamment le fémur. Les mutations dominantes p.Tyr381Asp et p.Met391Arg dans le gène FGFR2 sont responsables de cette dysplasie. Il a été montré que ces mutations induisent une augmentation de la localisation du récepteur FGFR2 au niveau du noyau, au

niveau du promoteur du gène de l'ARN ribosomique afin de réguler son expression pendant l'ostéogenèse (Merrill et al., 2012; Neben et al., 2014).

Syndrome CATSHL

Le syndrome CATSHL (camptodactyly, tall stature, and hearing loss) présente un phénotype contraire à celui de l'achondroplasie. Les patients présentent une grande taille avec une scoliose. Au niveau du crâne, ils présentent une microcéphalie et des os wormiens. Une camptodactylie est observée au niveau des extrémités. Le syndrome CATSHL est associé aux mutations dominantes p.Arg621His et p.Thr546Lys de FGFR3, induisant une perte de fonction du gène (Makrythanasis et al., 2014; Toydemir et al., 2006). Le phénotype du syndrome CATSHL est similaire au phénotype observé dans les souris invalidées pour FGFR3, les souris mutantes présentant elles aussi une augmentation de la taille des os longs.

Approches pharmacologiques du traitement des craniosynostoses et chondrodysplasies

Traitement de l'achondroplasie

L'approche chirurgicale pour le traitement du phénotype squelettique de l'achondroplasie est la procédure Ilizarov ou allongement chirurgical des membres. Cette procédure est douloureuse et présente de nombreux risques pour le patient. Des alternatives pharmacologiques ont donc été envisagées afin de réduire voire remplacer cette prise en charge chirurgicale. Deux options se présentent pour ces stratégies : la première est de cibler directement le récepteur FGFR3 afin de réduire son activation, la seconde consiste à court-circuiter le récepteur par une autre voie.

Inhibiteurs de tyrosine kinase

Les inhibiteurs de tyrosine kinase ont pour objectif d'empêcher la phosphorylation de FGFR3 nécessaire à son activation. Jonquoy et al. ont testé l'effet de l'inhibiteur A31 sur des cultures de chondrocytes et de fémurs *ex-vivo* du modèle murin *Fgfr3*^{Y367C/+}. A31 a été conçu pour se fixer spécifiquement sur le site de liaison de l'ATP dans le domaine kinase de FGFR3. Le traitement permet de réduire l'expression de FGFR3 muté, de réduire la taille de la plaque de croissance et d'y diminuer la prolifération chondrocytaire (**Figure 23**) (Jonquoy et al., 2012).

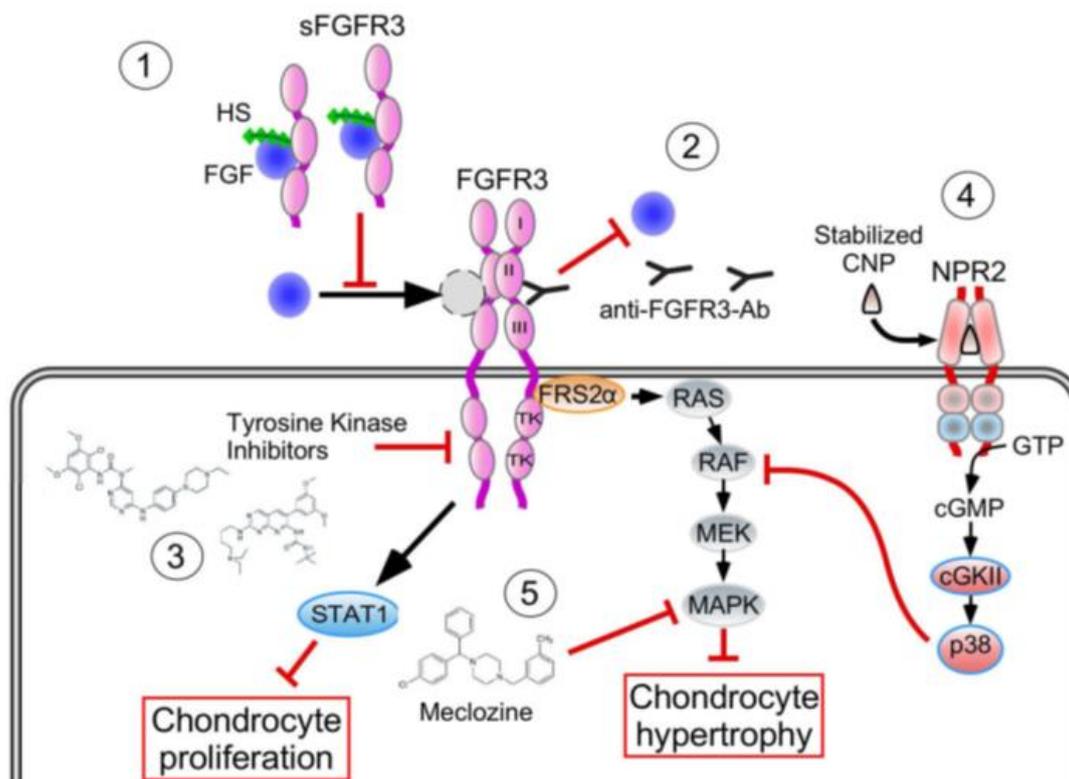


Figure 23 : (d'après Ornitz et Legeai-Mallet, 2017) Représentation schématique des approches thérapeutiques pour l'achondroplasie. Des stratégies utilisant des récepteurs solubles et des anticorps spécifiques de FGFR3 visent à bloquer respectivement l'accès aux ligands FGF et la capacité d'activation (1 et 2). L'utilisation d'inhibiteur de tyrosine kinase va empêcher l'activation des domaines kinases de FGFR3 pour bloquer la transduction du signal (3). Les analogues du CNP vont cibler indirectement l'activation de FGFR3 via l'activation du récepteur NPR2 et le blocage de la voie MAPK (4). Le traitement par la méclozine cible lui aussi indirectement FGFR3 en bloquant la voie MAPK.

Plusieurs inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase ont été développés dans le cas des mutations activatrices de FGFR3 dans des cancers (Helsten et al., 2015). Ces inhibiteurs présentent cependant une spécificité variable pour FGFR3. BGJ398 (Infigratinib) est un inhibiteur développé en 2011 possédant une affinité pour FGFR3 supérieure à celle pour les autres FGFR (l'ordre d'affinité correspond à $FGFR3 > FGFR4 > FGFR1 = FGFR2$ ("BGJ-398 (CHEBI:63451)," n.d.; Gudernova et al., 2015)). Le traitement par BGJ398 a montré une diminution de la progression tumorale dans le cas d'une tumeur maligne rhabdoïde (Wöhrlé et al., 2013). Dans le cas de l'achondroplasie, le traitement par BGJ398 de la souris *Fgfr3*^{Y367C/+} a montré un effet significatif sur l'amélioration du phénotype d'achondroplasie. BGJ398 a pour effet de diminuer l'activation du récepteur muté ainsi que des voies de signalisations en aval. Les souris *Fgfr3*^{Y367C/+} traitées présentent un allongement des os longs et des vertèbres. Au niveau de la

plaque de croissance, la prolifération et la différenciation des chondrocytes sont augmentées et l'ossification secondaire est activée. Au niveau du crâne, les souris traitées présentent une diminution du retard de fermeture de la fontanelle ainsi qu'une diminution de la fusion des synchondroses ISS, SOS et IOS, corrélée avec une augmentation du diamètre du foramen et un allongement du crâne. La morphologie et la taille de la mandibule sont également améliorées après traitement (**Figure 23, Figure 24B**) (Biosse Duplan et al., 2016; Komla-Ebri et al., 2016).

Une autre approche repose sur l'utilisation d'une copie soluble du récepteur afin de bloquer l'accès aux ligands FGF9 et FGF18 dans la plaque de croissance. L'injection d'un récepteur soluble (dont la structure comprend les domaines extracellulaire et intracellulaire sans le domaine transmembranaire) au modèle *Fgfr3*^{G380R/+} montre une augmentation de la taille des os longs et de la plaque de croissance et améliore la fusion prématurée des synchondroses (**Figure 23**) (Garcia et al., 2013; Ornitz and Legeai-Mallet, 2017).

Enfin, des anticorps spécifiques de FGFR3 ont été développés pour le traitement de cancer où ils inhibent son activation. L'utilisation de ces anticorps pourrait s'avérer prometteuse dans le cas de l'achondroplasie (Ornitz and Legeai-Mallet, 2017).

Approches indirectes pour le traitement

Méclozine

Des approches indirectes ont également été mises au point afin d'antagoniser la signalisation en aval de FGFR3 et de promouvoir la chondrogenèse.

Des études ont par exemple montré un effet positif de la méclozine. Cette molécule, ordinairement utilisée comme antihistaminique et antinausée (dans le cas du mal des transports), a montré un effet promoteur sur la croissance osseuse du modèle murin d'achondroplasie *Fgfr3*^{G380R/+}. Des expériences *ex vivo* et *in vivo* montrent une amélioration du phénotype de ces souris au niveau des os longs lors d'un traitement à la naissance pendant deux semaines (Matsushita et al., 2015). Un traitement au cours de la phase embryonnaire à partir de E14.5 a par ailleurs montré une augmentation du diamètre du foramen magnum chez les souris mutantes ainsi qu'un retard de fusion des synchondroses ISS et SOS (Matsushita et

al., 2016). Les auteurs suggèrent que le traitement par la méclozine inhibe la voie Erk1/2 en aval de FGFR3 (**Figure 23**) (Matsushita et al., 2013).

Statine

Une autre étude utilisant la statine, utilisée ordinairement pour le traitement des problèmes cardiovasculaires et de l'hypercholestérolémie, a montré un effet positif sur la chondrogenèse dans le modèle murins *Fgfr3*^{G380R/+}. L'injection de statine semble induire une augmentation de la taille des os longs et de la base du crâne en régulant positivement la prolifération chondrocytaire (Yamashita et al., 2014). Les effets de la statine sur le cartilage ne sont cependant pas encore clairs et ces résultats restent très controversés (Fafilek et al., 2017).

Voie du CNP

Une autre approche développée est l'utilisation du CNP. Le CNP, se liant sur son récepteur NPR2, bloque la voie Erk1/2 de FGFR3 en inhibant l'activation de l'intermédiaire RAF (**Figure 23**). Le temps de demi-vie du CNP étant très court (2 et 3 minutes), un peptide analogue du CNP plus stable, BMN111 (Vosoritide), a été généré par la compagnie BioMarin. Les injections sous-cutanées du BMN111 aux souris *Fgfr3*^{Y367C/+} ont montré un effet significatif sur le phénotype squelettique. Les animaux traités pendant dix ou vingt jours à partir du stade P7 présentent une augmentation de la longueur des os longs et des pattes accompagnée d'un allongement des zones prolifératives et hypertrophiques de la plaque de croissance. L'expression de FGFR3 ainsi que l'activation de la voie Erk1/2 sont diminuées au sein de cette plaque de croissance. Le crâne des souris traitées présente également une forme plus allongée. Ces effets sont particulièrement notables après vingt jours de traitement (**Figure 24A**) (Lorget et al., 2012). Des résultats similaires ont été observés par traitement du modèle murin d'achondroplasie *Fgfr3*^{G380R/+} (Wendt et al., 2015). L'ensemble de ces données précliniques ont permis à la compagnie BioMarin de mettre en place un essai clinique de phase 1 puis de phase 2 chez l'homme. Le traitement quotidien d'une cohorte de patients atteints d'achondroplasie montre des résultats prometteurs sur leur croissance (Savarirayan et al., 2019). Un autre analogue du CNP, le TransCon-CNP, a été développé en parallèle. La propriété du TransCON-CNP est d'augmenter la durée de vie de la molécule, ce qui permettra une injection hebdomadaire aux patients et non plus quotidienne (Breinholt et al., 2019).

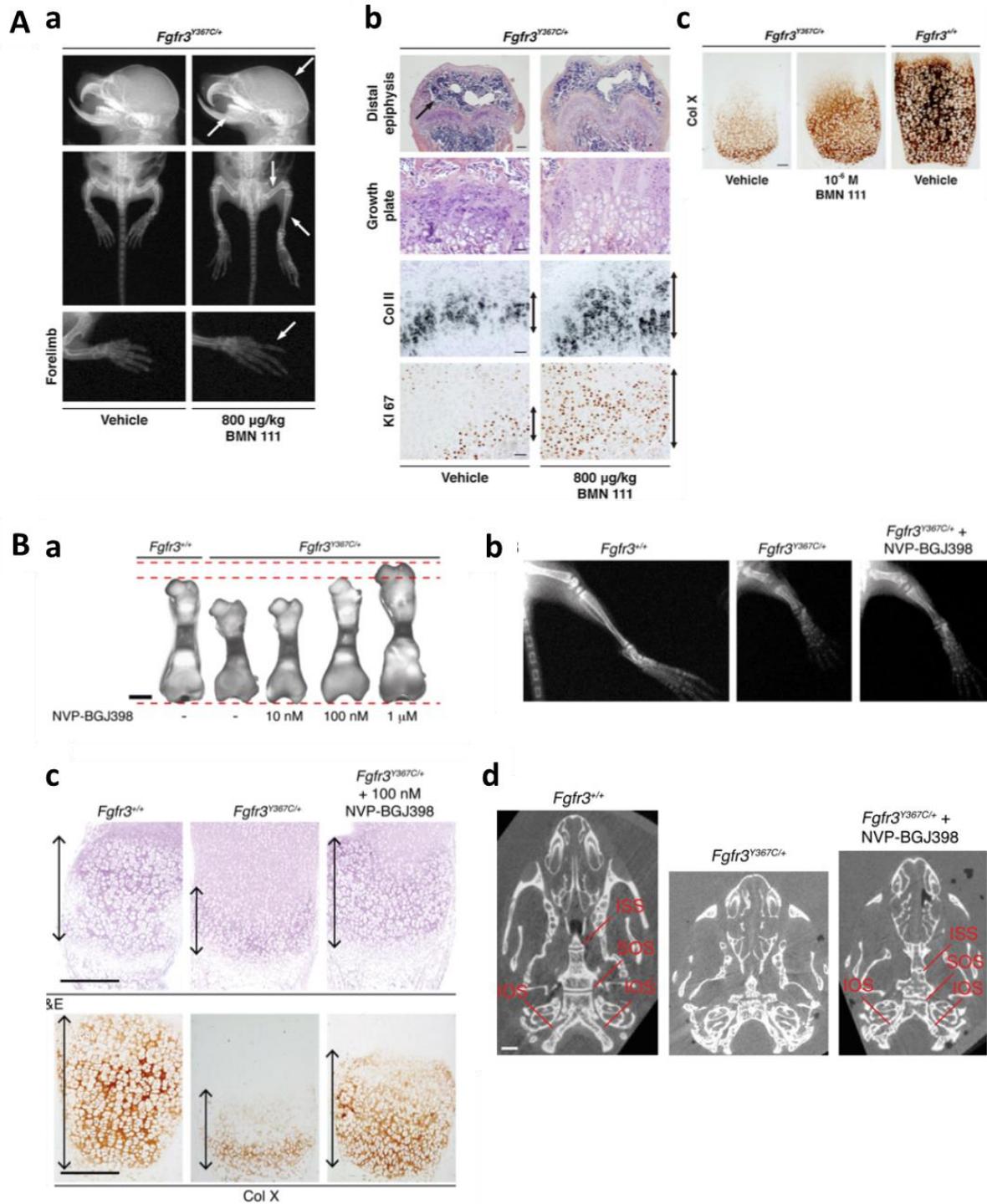


Figure 24 : (A) (d'après Lorget et al., 2012) Effet du traitement par BMN111 sur le phénotype du modèle murin d'achondroplasie *Fgfr3^{Y367C/+}*. Le phénotype achondroplasie est amélioré par le traitement. Les mutants traités présentent un allongement des membres et du crâne (a). Au niveau de la plaque de croissance, les zones prolifératives (b) et hypertrophiques (c) sont toutes deux augmentées. (B) (d'après Komla-Ebri et al., 2016) Effet du traitement par BGI398 des souris *Fgfr3^{Y367C/+}*. Le traitement entraîne un allongement des os longs *ex vivo* (a) et *in vivo* (b). La plaque de croissance est également augmentée en taille, avec une augmentation de l'aire de la zone hypertrophique (c). Au niveau de la base du crâne, BGI398 retarde la fusion prématurée des synchondroses des souris mutantes (d).

Traitement des craniosynostoses syndromiques

Traitement du syndrome de Crouzon (FGFR2)

L'utilisation d'inhibiteur de tyrosine kinase a été étudiée dans le cas du traitement du syndrome de Crouzon. Une étude a ainsi testé l'effet de l'inhibiteur des tyrosines kinases PD173074 dans le contexte du modèle murin *Fgfr2*^{C342Y/+}. Le traitement *ex vivo* de la calvaria des animaux mutants *Fgfr2*^{C342Y/+} avec PD173074 empêche la fusion des sutures avant 2 semaines (Perlyn et al., 2006). PD173074 possède une forte affinité pour FGFR1 et FGFR3 (Miyake et al., 2010; Mohammadi et al., 1998) mais pas pour FGFR2. Les auteurs ciblent ici FGFR1 et son rôle ostéogénique afin de bloquer l'effet de la mutation sur l'ossification.

Une deuxième étude parue en 2018 a testé les effets de BMN111, l'analogue du CNP, sur le phénotype du modèle *Fgfr2*^{C342Y/+} (Holmes et al., 2018). Néanmoins, l'injection de BMN111 pendant 28 jours n'a pas montré de modification majeure du phénotype : les sutures coronales sont fusionnées chez les animaux traités, seule une légère amélioration de la morphologie de la base du crâne est observée.

Traitement du syndrome d'Apert (FGFR2)

Différentes approches ont été étudiées afin de restaurer le phénotype du syndrome d'Apert. Une première étude a ainsi testé l'effet d'un shRNA (small hairpin RNA) ciblant spécifiquement l'allèle muté du modèle murin d'apert *Fgfr2*^{S252W/+}. Les souris issues du croisement entre les souris exprimant la mutation *Fgfr2*^{S252W/+} et des souris exprimant le shRNA présentent un phénotype moins sévère. Les sutures coronales restent visibles et la taille globale du squelette de ces souris est augmentée. Il a ainsi été montré que le shRNA diminuait l'activation de la voie Erk en aval de FGFR2, et qu'une restauration similaire pouvait être obtenue par traitement par l'inhibiteur de MEK, U0126, pendant les périodes anténatales et postnatales (Shukla et al., 2007).

Des études ont également étudié l'effet d'un traitement par une copie soluble du récepteur FGFR2 dans le cas de l'Apert. Une étude a d'abord montré que le traitement de cultures d'ostéoblastes de patients Apert par ce récepteur soluble permettait une restauration de la différenciation ostéoblastique normale (Tanimoto et al., 2004). Il a ensuite été montré, dans le cas du modèle *Fgfr2*^{S252W/+}, que le croisement de ces souris avec une lignée exprimant le

récepteur soluble permet d'empêcher la fusion prématurée des sutures et une restauration du phénotype squelettique dans la descendance (Morita et al., 2014).

Objectifs

FGFR3 est un récepteur à activité tyrosine kinase. Dans l'os, le cartilage et le système nerveux central, son activité régule la prolifération et la différenciation cellulaire dans plusieurs tissus. Des mutations gain-de-fonction de *FGFR3* sont associées à des craniosynostoses et des chondrodysplasies, deux pathologies dans lesquelles l'ossification membranaire et endochondrale sont perturbées. Le syndrome de Crouzon avec acanthosis nigricans (CAN) est une craniosynostose rare associée à la mutation spécifique p.Ala391Glu dans le gène *FGFR3*. Cette craniosynostose est associée à une fusion prématurée des sutures coronales, une hypoplasie du maxillaire, une fusion des synchondroses et un acanthosis nigricans. Il a par ailleurs été montré que les patients atteints de craniosynostoses associée à *FGFR3* présentaient des troubles cognitifs.

Dans une première partie, nous étudierons la pathophysiologie du syndrome de CAN. L'étude *in vitro* de la mutation *FGFR3*^{A391E} permet d'évaluer l'effet sur l'activation et la modification post-traductionnelle du récepteur *FGFR3*. Nous analyserons ensuite le phénotype craniofacial et squelettique du modèle murin pour le syndrome de CAN, *Fgfr3*^{A385E/+}. Puis, nous décrirons l'effet de la mutation sur la neurogenèse hippocampique et sur les capacités d'apprentissage et de réponse au stress de ce modèle. Enfin, nous étudierons les effets d'un traitement par l'inhibiteur de tyrosine kinase spécifique de *FGFR3*, BGJ398, sur la restauration du phénotype cognitif observé chez le modèle CAN. Ces résultats sont présentés dans un article en cours de soumission titré : « Memory deficit and cognitive impairment in *FGFR3*-related Crouzon syndrome mouse model. ».

Dans une seconde partie, nous évaluerons les effets du traitement par le TransCon-CNP, un peptide analogue du CNP sur le phénotype du modèle murin d'achondroplasie *Fgfr3*^{Y367C/+}. La voie de signalisation du CNP a montré des effets significatifs sur l'amélioration du phénotype de l'achondroplasie dans le cas de modèles murins et dans un essai clinique de phase 2 chez l'Homme. Nous nous intéresserons ici à l'effet du TransCon-CNP sur le phénotype craniofacial du modèle *Fgfr3*^{Y367C/+}. Ces résultats constituent des données préliminaires présentées dans la partie titrée : « *In vivo* evaluation of "TransCon CNP" in *Fgfr3* mouse model mimicking achondroplasia (*Fgfr3*^{Y367C/+}). ».

Résultats

Article: Memory deficit and cognitive impairment in FGFR3-related Crouzon syndrome mouse model.

Memory deficit and cognitive impairment in FGFR3-related Crouzon syndrome mouse model.

Maxence Cornille(1), Stéphanie Moriceau(2), Roman Hossein Khonsari(3), Yann Heuzé(4), Eric Arnaud (5), Corinne Collet(6), Morad Bensidhoum(7), Theresa Rauschendorfer(8), Sabine Werner(8), Nathalie Boddaert (9), Federico Di Rocco(9), Franck Oury (2), Laurence Legeai-Mallet (1)

1. INSERM U1163, Institut Imagine, Hôpital Necker Enfants-Malades; Université de Paris, Paris, France
2. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1151, Institut Necker Enfants Malades (INEM), Depart: Cell growth and signaling, Team 14, Université de Paris, Paris, France.
3. AP-HP, Service de chirurgie maxillo-faciale et plastique, Hôpital Necker Enfants-Malades; Université de Paris, Paris, France
4. University of Bordeaux, UMR 5199 PACEA, Bordeaux Archaeological Sciences Cluster of Excellence, Université de Bordeaux, Pessac, France.
5. AP-HP, Service de neurochirurgie, Hôpital Necker Enfants-Malades; Université de Paris, Paris, France
6. Service de biochimie et biologie moléculaire - Pôle B2P, CHU Paris-GH St-Louis Lariboisière F.Widal - Hôpital Lariboisière, Paris, France.
7. Laboratoire B2OA, UMR CNRS 7052, Université de Paris, Paris, France
8. Institute of Molecular Health Sciences, ETH Zurich, Zurich, Switzerland.
9. AP-HP, Service d'imagerie Pédiatrique, Hôpital Necker Enfants-Malades; Université de Paris, Paris, France
10. Hôpital femme Mère Enfant Hospices Civils de Lyon et Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

ABSTRACT

Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) gain-of-function mutations (p.Ala391Glu) is responsible for a rare form of craniosynostosis: Crouzon syndrome with Acanthosis Nigricans (CAN). The patients with CAN are characterized by premature fusion of coronal sutures of the skull, midface hypoplasia, acanthosis nigricans and neurological impairment. *FGFR3* is defined as a negative regulator of long bone growth. However, the role of the p.Ala391Glu CAN mutation in sutural growth biology of the skull remains unexplored. In this study, we observed that the CAN mutation induced an overactivation of receptor independently of ligand and disturbed the protein maturation. We generated the first CAN mouse model (*Fgfr3*^{A385E/+}) expressing the dominant p.Ala385Glu mutation. The *Fgfr3*^{A385E/+} mice showed an absence of craniosynostosis and normal craniocerebral proportion. However, analyzing adult hippocampus of these mice, we showed that FGFR3 overactivation was associated to decreased dentate gyrus progenitor proliferation and neurogenesis. Consequently, behavioral tests were performed in *Fgfr3*^{A385E/+} mice and hippocampal-dependent memory impairment and abnormal coping strategy were observed. Lastly, using a specific FGFR3 inhibitor (BGJ398), we inhibited the FGFR3 overactivation in the brain of *Fgfr3*^{A385E/+} mice thus restoring the behavioral and cognitive defects. This work highlights for the first-time behavior anomalies associated to *Fgfr3* overactivation in the brain. It allows a better understanding of the role played by FGFR3 in learning processes and emotional responses in craniosynostoses.

INTRODUCTION

The Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) family plays an important role in bone development and skeletal diseases. *FGFR1*, *FGFR2* and *FGFR3* missense mutations are responsible for a spectrum of syndromic craniosynostoses characterized by premature fusion of cranial sutures (Robin et al., 1993; Twigg and Wilkie, 2015). Two specific *FGFR3* dominant mutations account for Crouzon syndrome with acanthosis nigricans (CAN [MIM 612247]), a rare syndromic craniosynostosis, and Muenke syndrome (MS [MIM 602849]), the most common syndromic craniosynostosis (Wilkie et al., 2010). CAN patients present *acanthosis nigricans* but otherwise resemble to *FGFR2*-related Crouzon syndrome patients: they are characterized by the premature fusion of the coronal sutures of the skull, brachycephaly, midfacial hypoplasia and cranio-vertebral junction anomalies, and acanthosis nigricans (Arnaud-López et al., 2007; Di Rocco et al., 2011; Meyers et al., 1995; Mir A et al., 2013). CAN genotype is defined by a single point mutation (p.Ala391Glu) localized in transmembrane domain of *FGFR3* (Li et al., 2006; Meyers et al., 1995). The potential consequences of abnormal skull vault, skull base and facial growth include increased intracranial pressure, hearing and vision impairments, impaired brain blood flow, hindbrain malformation, syringomyelia, sleep apnea and multifactorial developmental delay. Several studies have reported cognitive deficit in *FGFR3*-related craniosynostoses characterized by impairment of memory capacity, attention, anxiety, and emotional control (Kruszka et al., 1993; Maliepaard et al., 2014; Yarnell et al., 2015). *FGFR3* is widely recognized as an important regulator of the endochondral ossification. However, its role in sutural growth biology and membranous ossification are less known. The role of the p.Ala391Glu CAN mutation remains unexplored. In this study, we generated the first CAN mouse model (*Fgfr3*^{A385E/+}) expressing a dominant p.Ala385Glu mutation. The *Fgfr3*^{A385E/+} mice did not reproduce the CAN phenotype, coronal sutures were still patent. In the central nervous system, *fgfr3* is highly expressed in the hippocampus, brain structure essential for cognition mechanisms. We hypothesized that p.Ala385Glu mutation could affect adult neurogenesis and cognitive capacity. To test this hypothesis and to define the impact of *FGFR3* gain-of-function mutation in behavior, we examined the neurogenesis in hippocampus and showed decreased proliferation associated with decreased size of granular layer in the dentate gyrus of *Fgfr3*^{A385E/+} mice. Moreover, *Fgfr3*^{A385E/+} mice showed

hippocampal-dependent memory impairments and abnormal coping strategy to an inescapable stress. To provide evidence that the constitutive activation of FGFR3 is responsible for these behavior anomalies, we treated the *Fgfr3*^{A385E/+} mice with a tyrosine kinase inhibitor (BGJ398) using intraventricular injection of BGJ398 for seven days. The treatment rescues the anomalies in short-term learning and in coping strategy. Here, we provide strong evidence that FGFR3 gain-of-function mutation expressed in the brain induces cognitive and behavior deficit independently of skull anomalies.

RESULTS

Clinical features of Crouzon syndrome with *acanthosis nigricans*

CAN syndrome, associated to a FGFR3 mutation, exhibits a skeletal phenotype similar to Crouzon syndrome [MIM 123500] due to FGFR2 mutations (Coll et al., 2018, 2016; Di Rocco et al., 2011): oculo-orbital disproportion, prognathism, midfacial hypoplasia (fig 1A), and brachycephaly secondary to a premature fusion of the coronal and sagittal sutures (at various degrees) (fig 1B). The premature fusion of the intraoccipital synchondroses is associated with a smaller foramen magnum in CAN patients (fig 1B). Skull base anomalies in Crouzon syndrome patients, both FGFR2 and FGFR3-related, contribute anteriorly to midface hypoplasia and posteriorly to cranio-vertebral junction anomalies. Skull vault anomalies exert mechanical pressure on the brain and increase the risk for elevated intracranial pressure (Al-Namnam et al., 2019) (fig 1C). Cutaneous examination revealed acanthosis nigricans refers to hyperpigmentation and thickening of the epidermis of the neck and axillar regions (fig 1A). Histological examination of CAN skin sample showed severe hyperkeratosis and dilatation of the hair follicles compared to control sample (fig 1D).

Ala391Glu mutation affects FGFR3 protein maturation and phosphorylation.

CAN is associated with the specific p.Ala391Glu mutation (Meyers et al., 1995). This mutation affects the transmembrane domain of the FGFR3 protein and is located 11 amino acids away from the p.Gly380Arg mutation associated with achondroplasia (ACH), the most frequent form of dwarfism (Rousseau et al., 1994). CAN differs from Muenke syndrome (MS), another *FGFR3*-related craniosynostosis, associated to p.Pro250Arg mutations (Kruszka et al., 1993; Muenke et al., 1997). First, we compared the effects of CAN mutation (*FGFR3*^{A391E}), ACH

mutation (*FGFR3^{G380R}*), and MS mutation (*FGFR3^{P250R}*) on *FGFR3* activation *in vitro* using transient transfection in HEK293 cells.

A higher significant phosphorylation level was found in *FGFR3^{A391E}* and *FGFR3^{G380R}* in presence or absence of FGF2 ligand compared to control and *FGFR3^{P250R}* suggesting that both mutations increased *FGFR3* activation (fig 2A-B). These data are in agreement with previous studies showing increased phosphorylation level and increased of the dimer stability for *FGFR3^{A391E}* (Chen et al., 2013; Li et al., 2006). *FGFR3* mutations altered the glycosylation levels of the protein namely 105KDa unglycosylated *FGFR3*, 115KDa partially glycosylated, 130KDa fully glycosylated (Gibbs and Legeai-Mallet, 2007). Interestingly, we noted that CAN and MS showed increased percentage of 115KDa *FGFR3* form and decreased percentage of 105KDa forms compared to control (fig 2C, supp table 1). ACH did not show significant change in percentage of *FGFR3* glycosylation (fig 2C, supp table 1). In addition, CAN and ACH showed increased phosphorylation of mature 130KDa form and decreased phosphorylation of 115KDa form compared to control (fig 2D). Altogether, these data suggested that CAN mutation induced a higher *FGFR3* phosphorylation than MS mutation. Indeed, this CAN mutation promoted both maturation and phosphorylation of the receptor.

To assess *FGFR3* downstream signaling pathway in CAN, ACH and MS mutants, we evaluated Erk1/2 in ligand dependent and independent conditions. A higher basal activation of Erk1/2 was observed for the three mutants in absence of ligand compared to control. These data confirmed the presence of gain-of-function of the CAN mutation (fig 2E-F).

Skeletal phenotype is mildly affected in CAN mouse model *Fgfr3^{A385E/+}*

To evaluate the effect of CAN mutation on the skeleton, we generated a mouse model expressing a ubiquitous p.Ala385Glu missense mutation corresponding to the p.Ala391Glu human mutation (fig 3A). The *FGFR3* p.Ala385Glu transcripts were detected in fibroblasts and calvarial osteoblasts (fig 3B). Similarly to the human disease, no obvious limb shortening phenotype was observed in *Fgfr3^{A385E/+}* mice from antenatal and newborn stages (data not shown) to adult stage (fig 3C). Body weight, nasal-anal and femurs and tibias lengths were similar in *Fgfr3^{A385E/+}* and *Fgfr3^{+/+}* mice (fig 3D-E). Normal femur growth was confirmed by cartilage assessment in *Fgfr3^{A385E/+}* showing well organized growth plate without anomaly of the hypertrophic zone revealed with collagen type X staining (supp 4). To confirm the absence

of abnormal phenotype, bone structure parameters were assessed. Micro CT images of 3 months old femurs revealed a normal structure of the trabecular and cortical bone in *Fgfr3*^{A385E/+} mice (fig 3D, supp 4-5).

The craniofacial phenotype was assessed using micro CT skull acquisition. The *Fgfr3*^{A385E/+} mice showed normal craniofacial features (fig 3F, supp 1); the coronal sutures and skull base synchondroses were patent at post-natal day 21 similarly to control mice (fig 3F). Landmark-based geometric morphometrics (Heuzé et al., 2010) of *Fgfr3*^{A385E/+} mice and *Fgfr3*^{+/+} mice did not show any difference in skull shape ($d = 0.0148$; $p = 0.0940$). However, the shape of the mandible was significantly different between the two groups of mice ($d=0.0159$; $P<0.01$) (fig 3G, supp Table 3). To further explore the skull phenotype, mice expressing homozygous p.Ala385Glu mutations were generated. The skull shape of the *Fgfr3*^{A385E/A385E} mice was significantly different from that of controls ($d = 0.0141$; $p = 0.0171$) and *Fgfr3*^{A385E/+} mice ($d = 0.0153$; $p = 0.0165$). This difference did not persist at 90 and 180 days of age. No premature fusion of the frontoparietal suture (equivalent of the human coronal suture) was however observed in the *Fgfr3*^{A385E/A385E} mice (supp 2). In order to confirm the absence of premature closure of the frontoparietal suture, we assessed *in vitro* function of calvarial *Fgfr3*^{A385E/+} osteoblasts. No significant differences in mineralization capacity, proliferation and Mitogen-activated protein kinases (MAPK) activation were observed in the osteoblasts of *Fgfr3*^{A385E/+} mice compared to controls (supp 3). All these data allowed us to conclude that p.Ala385Glu mutation expressed in osteoblasts was not active and consequently did not affect craniofacial development (supp 3). These data explain the absence of craniosynostosis phenotype in *Fgfr3*^{A385E/+} mice. Regarding the skin, no signs of hyperkeratosis nor modification in thickness and pigmentation of the epidermis was detected in *Fgfr3*^{A385E/+} mice (supp 6).

***Fgfr3*^{A385E/+} mouse model show dentate gyrus decreased neurogenesis**

Structural brain anomalies have been described in CAN (Gürbüz et al., 2016) (fig 1A) and in Muenke patients (Abdel-Salam et al., 2011; Grosso et al., 2003; Okubo et al., 2017) . These anomalies include abnormal morphology of hippocampus and temporal lobes. It is well known that the premature fusion of cranial sutures modifies the shape of the skull and impair the normal brain growth, causing functional issues such as increased intracranial pressure, visual impairment, deafness and cognitive impairment (Di Rocco et al., 2011). Previous studies showed that patients with MS presented deficits in adaptive and executive functions. This

behavior phenotype included working memory deficits, attention-deficit hyperactivity disorder, emotional control and anxiety (Yarnell et al., 2015). These neurological impairments suggest an impact of FGFR3 in hippocampal-associated mechanisms. Here, we performed magnetic resonance imaging (MRI) in *Fgfr3*^{A385E/+} mice at four months of age and measured the hippocampus and cortex volumes. No modifications in these two volumes nor any brain compression were observed in *Fgfr3*^{A385E/+} mice suggesting normal embryonic brain development (fig 4A, supp 10). In hippocampal tissue of the *Fgfr3*^{A385E/+} mice, we confirmed the presence of the heterozygous *Fgfr3*^{A385E} mutation (fig 4B). FGF and FGFR are known to be involved in proliferation and differentiation of neural stem cells and neural progenitors in the central nervous system (Huang et al., 2017; Kang and Hébert, 2015, Moldrich et al., 2011; Ohkubo et al., 2004; Stevens et al., 2012). We hypothesized that the *Fgfr3*^{A385E} mutation expressed in the brain of *Fgfr3*^{A385E/+} mice could impact adult neurogenesis. Indeed, the absence of craniofacial anomalies is a good opportunity to assess neurogenesis specifically during adult period. Here, we observed a similar expression of FGFR3 in hippocampus of *Fgfr3*^{A385E/+} and *Fgfr3*^{+/+} mice by immunofluorescence (fig. 4C) and western blotting (fig. 4D). The canonical MAPK pathway activated by FGFR3 is found activated in both *Fgfr3* knock in mouse model (Komla-Ebri et al., 2016) and *Fgfr3* knock out mouse model (Zhou et al., 2015). Here, we observed a significant increased expression of phosphorylated Erk1/2 in adult hippocampi lysates (fig 4E) thus confirming that the *Fgfr3*^{A385E} mutation in the brain activated the MAPK pathway. FGFR3 play a key role in progenitor cell proliferation and neuronal differentiation in dentate gyrus (Inglis-Broadgate et al., 2005; Kang and Hébert, 2015; Moldrich et al., 2011; Thomson et al., 2009). In 4 months old *Fgfr3*^{A385E} hippocampi, using NeuN marker, we showed that mature neuron area of dentate gyrus granular layer is significantly decreased compared to control (fig 4F). We assessed whether this decreased neuronal population was caused by decreased progenitor proliferation. The positive cell number for the cell cycle Ki67 marker was significantly reduced in the dentate gyrus subgranular zone in *Fgfr3*^{A385E/+} mice (fig 4G). In the granular zone, the neuronal differentiation rate revealed by doublecortin (DCX) immunolabelling seems to be slightly decreased (fig 4H). Altogether these data suggested that the *Fgfr3* gain-of-function mutation affects predominantly proliferation thus impacting neuronal mature differentiation in dentate gyrus.

***Fgfr3*^{A385E/+} mouse model shows decreased learning capacity and antidepressant effect**

Reduced size of hippocampal structures and reduced proliferation were showed to be associated with learning and mood alteration in human and mouse (Kitamura and Inokuchi, 2014). Therefore, we subjected 4-month-old *Fgfr3*^{A385E/+} mice and their control littermates to a series of behavioral tests, that is thought to reflect behavioral functions related to hippocampus, measuring associative (one-trial contextual fear conditioning, CFC) and episodic (novel object recognition test, NOR), and spatial (Morris Water Maze, MWM) learning and memory (Figure 5, supp 7 and 8). In CFC, mutant mice exhibited no differences in baseline freezing time. However, *Fgfr3* gain-of-function mutation resulted in decreased context-elicited freezing time during the testing phase compared to their control littermates, indicating that contextual fear memory is impaired in the mutant mice (Figure 5B). Next, we used a modified version of the NOR paradigm (Denny et al., 2012; Ennaceur and Delacour, 1988) that measures the rodent's ability to recognize a novel object in the environment. Wild type mice are capable of differentiating novel objects from familiar ones and tend to explore novel ones for longer time. As shown in (Figure 5A), 4-month-old *Fgfr3*^{A385E/+} mice explored significantly less the novel object than controls. However, no impairments were observed when memory was analyzed through the MWM task (assessing spatial learning and memory in rodents). Of note, *Fgfr3*^{A385E/+} mice and control had comparable performance in the open field test (OFT) and Light/Dark paradigm (L/DT) (Supp 9), indicating that their locomotion and anxious state were intact.

Next, we evaluated the coping strategy to an inescapable stress using the Forced Swim Test (FST) and the Tail suspension test (TST). As shown in (Figure 5C), 4-month-old *Fgfr3*^{A385E/+} mice spend significantly less time immobile than control mice during the FST. The same impairments were observed during the TST. Indeed, mutant mice spend significantly less time immobile than control littermates (Figure 5D).

Taken together, these data demonstrate that *Fgfr3* gain-of-function mutation significantly influences hippocampal-dependent episodic memory and associative fear memory acquisition and affects the coping strategy to an inescapable stress.

BGJ398 intraventricular injection rescue the cognitive impairments of *Fgfr3*^{A385E/+} mice

To confirm that cognitive impairments in *Fgfr3*^{A385E/+} mice were due to increased phosphorylation of the receptor, we decided to treat the mice with a specific FGFR tyrosine kinase inhibitor BGJ398 (Gudernova et al., 2015; Komla-Ebri et al., 2016). 4-month-old

Fgfr3^{A385E/+} mice and their control littermates received intracerebroventricular injection for 7 days with BGJ398 or vehicle solution and were submitted to two behavioral tests (NOR and FST; fig 6A-6C). Injections of BGJ398 reversed the memory deficits observed in the NOR paradigm for the *Fgfr3*^{A385E/+} mice (fig 6B) and reestablished the coping strategy to an inescapable stress observed in the FST compared to the control littermates (fig 6D). The absence of craniocerebral disproportion, and thus the lack of potentially increased intracranial hypertension in *Fgfr3*^{A385E/+} mice allow us to conclude that the reported behavioral anomalies observed were due to the direct impact of *Fgfr3*^{A385E} mutation on the brain. The rescue of these behavioral anomalies with the *Fgfr3* inhibitor BGJ398 confirmed our hypotheses and supported the fact that *FGFR3* overactivation was involved in the cognitive phenotype of patients with *FGFR3*-related craniosynostoses.

DISCUSSION

CAN syndrome is a very rare syndromic craniosynostosis associated to the specific p.Ala391Glu gain-of-function mutation in *FGFR3* (Meyers et al., 1995). The effect of the p.Ala391Glu mutation was previously described as causing overactivation of *FGFR3* (Chen et al., 2013, 2011; Li et al., 2006). Interestingly, we highlighted the pleiotropic effect of *FGFR3* mutations localized in the transmembrane domain of the protein responsible for achondroplasia (p.Gly380Arg) and CAN (p.Ala391Glu) respectively. The *FGFR3* overactivation for CAN mutation compared to achondroplasia did not explain these two skeletal phenotypes and further molecular studies are needed to be performed. The partially increased of the *FGFR3* glycosylated form and the decreased *FGFR3* unglycosylated form in p.Ala391Glu and p.Pro250Arg mutants suggest a distinct maturation process in craniosynostosis (CAN, MS) and chondrodysplasias (ACH) related to *FGFR3* gain-of-function mutations. We have previously showed that the p.Lys650Glu mutation affecting *FGFR3* tyrosine kinase domain, associated with thanatophoric dysplasia [MIM 187600], induced a reduction of fully-matured form of overactivated *FGFR3* protein in the Golgi (Gibbs and Legeai-Mallet, 2007). Furthermore, previous studies of mutations affecting *FGFR2* transmembrane domain, p.Tyr381Asp and p.Met391Arg, and associated to Bent Bone Dysplasia syndrome [MIM 614592] showed an increased relocation of the *FGFR2* mutated receptor to the cell nucleus. This relocation of *FGFR2* was associated with an increased transcription of ribosomal RNA gene (Merrill et al.,

2012; Neben et al., 2017, 2014). We can hypothesize that p.Ala391Glu mutation affecting FGFR3 glycosylation levels could disturb the receptor localization in either cytosolic or membranous compartments.

Mouse *Fgfr3*^{A385E/+} CAN model showed an absence of major craniofacial skeletal phenotype. Interestingly, the phenotype of *Fgfr3*^{A385E/+} was comparable to the one observed in *Fgfr3*^{P244R/P244R} mice, a mouse model for Muenke syndrome. Suture and synchondroses were found to be mildly affected in Muenke *Fgfr3*^{P244R/P244R} mutants, with coronal suture fused in a minority of individuals (Laurita et al., 2011; Twigg et al., 2008). Here, we report that homozygous *Fgfr3*^{A385E/A385E} animals showed minor craniofacial phenotype without suture/synchondrosis fusion. Furthermore, we have previously reported that *Fgfr3*^{Y367C/+} mouse model for achondroplasia showed partial fusion of coronal suture in some mice (Di Rocco et al., 2014), while *Fgfr3*^{-/-} do not show signs of abnormal craniofacial phenotype (Colvin et al., 1996; Deng et al., 1996; Su et al., 2010). These mouse models emphasize the different roles played by FGFR3 in human and mouse's craniofacial development processes. The function of FGFR3 in intramembranous ossification processes seems less prominent in mouse than in human.

The skull vault and the brain develop and grow in coordination before birth (Richtsmeier and Flaherty, 2013). In CAN and Muenke, premature fusion of skull vault sutures combined with premature fusion of skull base synchondroses associated to narrowing of foramen magnum lead to increased intracranial pressure in patients (Di Rocco et al., 2011). Premature fusion of the skull vault is also associated with brain structures anomalies, including abnormal hippocampus development (Grosso et al., 2003; Gürbüz et al., 2016; Okubo et al., 2017).

In *Fgfr3* mouse models, previous studies on mouse model *Fgfr3*^{+ /K644E} mutation associated to thanatophoric dysplasia, both ubiquitously and under Nestin promoter, presented severe overgrowth of cerebrum and cortex, while *Fgfr3*^{-/-} mouse presented an underdeveloped neocortex (Inglis-Broadgate et al., 2005; Moldrich et al., 2011; Thomson et al., 2009, 2007). It is commonly accepted that the premature fusion of cranial sutures observed in craniosynostoses modifies brain morphology and is associated with cognitive impairment via a chronic increase in intracranial pressure (Aldridge et al., 2010; Arnaud-López et al., 2007; Gürbüz et al., 2016; Martínez-Abadías et al., 2011). Here, taking advantage of the absence of abnormal skull phenotype in the *Fgfr3*^{A385E/+} mice, we analyzed the role of activating *Fgfr3*

gain-of-function mutation in the brain. The brain of *Fgfr3*^{A385E/+} mice did not present severe morphological modifications, thus indicating that *Fgfr3*^{A385E} mutation had a moderate impact on brain embryonic neurogenesis. By contrast, the analysis of adult hippocampal neurogenesis showed decreased progenitor proliferation in the dentate gyrus, supported by decreased granular zone of the dentate gyrus.

Interestingly, previous studies reported decreased progenitor proliferation in FGFR1,2,3 loss-of-function mutations, while overactivation of FGFR3 (*Fgfr3*^{TDIIK650E}) promote increased progenitor differentiation in the dentate gyrus (Kang and Hébert, 2015). Our results contrast with these observations. We observed that an overactivation of FGFR3 led to decreased cell proliferation in *Fgfr3*^{A385E/+} mice. It seemed that the level of phosphorylation of the receptor interfered with neurogenesis: *Fgfr3*^{TDIIK650E} mutation led to the excessive receptor activation levels whereas *Fgfr3*^{A385E} mutation led to a more moderate overactivation. These data suggested that FGFR regulation of hippocampal neurogenesis is linked to the level of FGFR3 activation.

We analyzed the effect of decreased neurogenesis on cognitive performance in *Fgfr3*^{A385E/+} mice. We observed that *Fgfr3*^{A385E/+} mice exhibited severe impairments in learning and memory functions without any locomotion, anxiety-related behavioral or spatial memory phenotype. While, the effect of FGFR signals on memory is unclear, to date, our study is the first to associate *Fgfr3* mutation to cognitive abnormalities in mice. Mechanistically, the deficit in learning and memory performances can be explained, at least in part, by the decreased hippocampal neurogenesis observed in our mutant mice. Interestingly, the deletion of *Fgfr2* in embryo and adult mice showed decreased progenitor proliferation and differentiation in the dentate gyrus with specific negative effect on associative and spatial memory capacity (Stevens et al., 2012). Collectively, our data demonstrate that *Fgfr3* gain-of-function mutation lead to severe learning and memory deficits.

In addition, a decreased coping strategy to an inescapable stress (previously name “depression like behavior”) was observed in *Fgfr3*^{A385E/+} mice. This role of FGFR3 was previously reported in major depressive disorders in human associated with downregulation of the receptor (Evans et al., 2004). Furthermore, patients with FGFR3 related-craniosynostosis syndromes, showed an impairment of emotional control and anxiety behavior (de Jong et al., 2010; Maliepaard et al., 2014; Yarnell et al., 2015). Today, no study reported depressive or mood

disorders in craniosynostoses cases. Animal models studies also demonstrated the antidepressant and anxiolytic effect of FGF2 in FGF2 knock-out or exogenous FGF2 injection (Elsayed et al., 2012; Salmaso et al., 2016). In contrast to FGF2, FGF9 plays a depressive effect in mouse (Aurbach et al., 2015). Both FGF2 and FGF9 are among the major FGFR3 ligands and can also bind the other FGFRs. These observations are in agreement with our data and could involve a complex combination of different FGFs and FGFR1, 2, 3 bindings. However, it is unclear how the antidepressant phenotype observed in *Fgfr3*^{A385E/+} mice could be translated in human condition.

To confirm the direct implication of FGFR3 in cognitive disorders observed in *Fgfr3*^{A385E/+} mice, we decided to treat mice with BGJ398, a tyrosine kinase inhibitor. BGJ398 was selected for its highest binding specificity for FGFR3 and a previous work showed the efficacy of BGJ398 in skeletal anomalies in an FGFR3 related Achondroplasia mouse model (Komla-Ebri et al., 2016). Here, intracerebroventricular injection of BGJ398 in adult *Fgfr3*^{A385E/+} mice showed rescue of memory impairment and antidepressant effect. These data demonstrated the direct impact of the *Fgfr3* gain-of-function mutation on cognitive performances. We demonstrated also that FGFR3 played a major role in hippocampal adult neurogenesis and we established a direct link between hippocampal anomalies and learning and stress response.

These results highlighted the presence of cognitive impairment without a phenotype of craniosynostosis in a mouse model expressing *Fgfr3* gain-of-function mutation. Our data suggest that the brain of patients with FGFR3-related craniosynostosis can be affected by the mutation independently of skull anomalies.

MATERIAL AND METHODS

Patient imaging

Two patients diagnosed with CAN (mutation: A391E) were included after informed consent. Clinical pictures and a T2-weighted MRI (GE 1.5T Optima MR450W) performed at 2 years of age were obtained for patient 1. An age-matched T2-weighted MRI from a patient without craniofacial conditions was also included after informed consent. Coronal sections of the two MRIs were reconstructed using Carestream PACS v11.0 (Carestream Health, Rochester, NY, USA).

A CT-scan (64-slice CT system, LightSpeed VCT; General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI, USA) from patient 2, performed at 1 year of age, was imported into Mimics 20.0 (Materialise, Leuven, Belgium) and segmented for rendering purposes, after informed consent.

Generation of human cDNA FGFR3 constructs

Full length human FGFR3 cDNA was purchased from Origene Technologies Inc. (Rockville, MD, USA). Sequence fragments of 624bp of the gene containing either A391E or P250R mutations and localized between unique restriction sites for CpoI and MluI enzymes were generated by Eurofins Genomics services (Les Ulis, France). Both full length FGFR3 cDNA and sequence fragments were digested using CpoI (Anza™ 63 CpoI Enzyme, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) and MluI (Anza™ 28 MluI Enzyme, Thermo Fischer Scientific) according to manufacturer's instructions. Digested fragments were separated on agarose gel and purified with NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Full length cDNA containing A391E or P250R mutations were then assembled using T4 ligation kit and amplification into MAX Efficiency™ DH5α Competent Cells (Thermo Fischer Scientific). Full length human FGFR3 cDNA with G380R mutation was obtained as previously described (Gibbs et Legeai-Mallet, 2007). All cDNA sequences were verified by Sanger sequencing (supp table 2).

Transient transfections of cDNA FGFR3 constructs

Human embryonic kidney (HEK) cells were cultured in 6 well plates and transiently transfected at 80% confluence with FGFR3 human constructs (FGFR3, FGFR3^{A391E}, FGFR3^{G380R}, FGFR3^{P250R})

using JetPrime (Polyplus-transfection) following the manufacturer's instructions (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Cells were then depleted overnight and treated with Fgf2 100ng/ml (Catalog Number: AF-100-18B, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) for 5 minutes. Transfected cells were then lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, and 0.25% sodium deoxycholate, supplemented with protease and phosphatase inhibitors; Roche (Bazel, Switzerland)).

Western blotting, Immunoblotting

Cell and brain lysates were subjected to SDS–polyacrylamide gels electrophoresis on NuPAGE 4–12% bis–tris acrylamide gels (Life Technologies, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) and then transferred on PVDF membranes. Immunoblotting were performed using standard protocols: anti-FGFR3 polyclonal antibody (Sigma-Aldrich F0425; 1:1,000 dilution), anti-Phospho-FGF Receptor antibody (Cell Signaling, 3471S, 1:1000 dilution), anti–phospho-ERK1/2 monoclonal antibody (Cell Signaling catalog 4370; 1:1,000 dilution), anti-ERK1/2 polyclonal antibody (Sigma-Aldrich M5670; 1:1000 dilution), Anti-Actin Antibody (MAB1501, 1:5000 dilution, Millipore, Burlington, MA, USA). FGFR3 polyclonal antibody, anti-Phospho-FGF Receptor antibody were revealed by incubation with IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG and IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibodies (LI-COR, Lincoln, NE, USA), 1:10 000 dilution) and revealed using Odyssey® CLx Imaging System (LI-COR). Rest of the antibodies were incubated with Goat anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies coupled to peroxidase (1:10 000 dilution, Amersham, Little Chalfont, Royaume-Uni) and detected by chemiluminescence (ECL, Amersham, Little Chalfont, Royaume-Uni).

Mouse Model

All animal studies were conducted according to an animal study protocol approved by the animal Care and Use Committee.

Fgfr3^{A385E/+} mice were generated by Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch, France). Plasmid containing homologous sequence to Exon 5 to 16 of *Fgfr3* with the 1553GCA>GAA substitution (A385E, Exon 9) with a Neomycin cassette and Cre recombinase under *Prm1* promoter flanked by two LoxP sites was stably inserted into BALB/cN mouse ES cells by homologous recombination. Positive clone was then aggregated into C57BL/6 blastocysts and chimaeras

with germline transmission was selected. Cassette was excised in male germline thanks to Prm1 promoter, allowing *Fgfr3*^{A385E} mutation expression.

Genotyping

Genomic DNA was isolated from tail biopsy at 7 days by proteinase K digestion and extracted using NucleoSpin Tissue according to manufacturer's instructions (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Genotypes were determined by two Polymerase Chain Reaction (PCR) respectively using primer couple 5'-GCTTCCCGCTTAAGCGACAGGTAAC-3' and 5'-AAAGGGCTAGCTGCTCGGACTTCTATA-3' for the first and 5'-GCTTCCCGCTTAAGCGACAGGTAAC-3' and 5'-GAAGTTATACTAGAGCGGCCGTTTAC-3' for the second (sup table 2).

Skeletal phenotype analysis

Long bones and body lengths were measured by caliper (VWRi819-0013, VWR International). Whole skeleton radiographies were acquired using a MX-20 unit (Ultra Focus DXA, Faxitron, Tucson, AZ, USA). μ CT acquisitions were performed using a SkyScan 1172 scanner (Bruker, Billerica, MA, USA). The following settings were applied for acquisition, for skull: 100ms exposure, 80kV voltage, 100 μ A current, and 19.9 μ m resolution; for femur: 250ms exposure, 80kV voltage, 100 μ A current, 6.00 μ m resolution. Scans were reconstructed using NRecon software (Bruker, Billerica, MA, USA). The reconstructed μ CT images were analyzed using OsiriX 64-bit version software (Pixmeo, Geneva, Switzerland) for the skull and CTan software (Bruker, Billerica, MA, USA) for the femur. For femurs, BV/TV, Trabecular thickness, Trabecular number, Trabecular separation and Structure model index were measured on a section in secondary spongiosa. Cortical thickness was measured at midshaft.

Geometric morphometric analysis

We included 26 mice at 21 days of age (P21, 9 wild-type, 8 heterozygous and 9 homozygous), 28 mice at 90 days of age (P90, 10 wild-type, 8 heterozygous and 10 homozygous) and 26 mice at 180 days of age (P180, 9 wild-type, 8 heterozygous and 9 homozygous). μ CT images (performed as previously described) were imported into Avizo 2019.1 (ThermoFisher, MA, USA) for 3D reconstruction of the skull and subsequently, 102 anatomical landmarks were positioned on each skull (Supp. Mat. XX). The landmark coordinates were exported into MorphoJ (Klingenberg, 2011) for geometric morphometric analysis including Procrustes

superimposition and computation of mean models for each age group and genotype. The Procrustes distances (d) separating groups in the morphospace were computed and significance was assessed using permutation tests (10,000 permutation rounds). A significant value of d was interpreted as significant shape differences between the two groups compared. Shape differences were visualized by heat maps projected onto a 3D mouse skull or mandible using Avizo 2019.1 (ThermoFisher, MA, USA).

Tissue histology and immunohistology

Femur

Long bones were dissected, fixed overnight in cold 4% PFA solution, decalcified using EDTA 0.5M solution and embedded in paraffin. Serial sections of 5 μ m were obtained using a HM 340E microtome. Sections were stained using Hematoxylin-Eosin and Safranin-O. For immunohistochemistry, sections were labeled with antibodies against Collagen type X (Diagomics, 2031501005, 1:50 dilution), and Collagen type I (polyclonal antibody, Novotec, catalog 20151; 1:1,000 dilution).

Brain

Mice were deeply anesthetized with Ketamine/Xylazine intra-peritoneal injection and transcardially perfused with cold PBS followed by cold 4% PFA. Brains were dissected and post-fixed overnight in 4% PFA solution at 4°C. Serial coronal floating of 30 μ m were obtained using a VT1000S vibratome (Leica, G). For Immunofluorescence staining, slides were labelled with antibodies against FGFR3 (polyclonal antibody, Sigma-Aldrich, catalog F0425; 1:250 dilution), Ki67 (monoclonal antibody, Abcam ab92353; 1:500 dilution), NeuN (polyclonal antibody, Proteintech, 26975-1-AP, 1:250 dilution). Slides were washed and incubated with Donkey anti-Rabbit Alexa Fluor 594 (Life Technologies, 1:2000 dilution). Slides were mounted using DAPI-Fluoromount -G[®] (SouthernBiotech) containing DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole) for nuclear staining.

Doublecortin immunolabelling (polyclonal antibody, Santa Cruz, #SC 8066, 1:500 dilution) was performed as previously described (Denny et al., 2012)

TUNEL assay was performed using ApopTag[®] Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, Burlington, MA, USA) following manufacturer's protocol.

Skin

Human and mouse skin samples were fixed overnight in 4% PFA solution at 4°C. Serial sections of 5µm were cut and stained using Hematoxylin-Eosin.

Microscopic image acquisition and quantification

Bright field images were captured with an Olympus PD70-IX2-UCB microscope and CellSens software. Fluorescence images were obtained using a Yokogawa CSU-X1 spinning disk scanner coupled to a Zeiss Observer Z1 inverted microscope and controlled by Zen Blue software (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Cell counting and area measurements were performed with Zen Blue software (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne). For Immunofluorescence staining quantification, 6 successive slices of brain were measured on both hemispheres for each individual to obtain a mean value.

Brain MRI

Mice brain MRI were acquired at the Small Animal Imaging Platform (Faculté de Médecine, Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Paris, France) using a small-animal 4.7-T MR imaging unit (Biospec 47/40; Bruker, Billerica, MA, USA) with a resolution of 100µm. Mice were anesthetized with isoflurane gas inhalation during acquisition. Measurement were performed using ImageJ software.

Osteoblast culture

Primary culture of osteoblast from mouse calvaria was obtained by sequential Collagenase type IV digestion of two to three days old pup's calvaria. Cells were expanded in T25 flask until subconfluence in Minimum Essential Medium α (Life technologies) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 2mM glutamine, and 100U/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin and harvested with trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Life Technologies). For mineralization studies, cells were plated in 24 wells plates at 25 000 cells/well and cultured up to 21 days in differentiation medium with 50mg/ml ascorbic acid and 10mM glycerol 2 phosphate di sodium salt hydrate (Sigma-Aldrich). Alkaline phosphatase activity was assessed by fixing cells in cold 4% PFA and incubating wells with 1-Step™ NBT/BCIP Substrate Solution (Thermo Fischer Scientific). Mineralization was assessed by fixing cells in cold 4% PFA and incubating wells with 2% Alizarin red solution (Sigma). Cell density was assessed by fixing cells

in cold methanol and incubation cells with 0.5% Crystal violet/25% methanol solution. Colorations were then resuspended in DMSO and absorbance was measured at 570nm for Alizarin red and Crystal violet and 410nm for ALP.

For proteic lysates, cells were plated in 6 well plates at 200 000 cells/well and cultured up to 21 days in differentiation medium. Cells were depleted overnight and treated with Fgf2 100ng/ml (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) for 5 minutes. Cells were then lysed in RIPA lysis buffer.

For proliferation studies, cells were plated in 96 wells plate at 1 000 cells/well and recorded in culture in differentiation medium for 7 days using Incucyte® Live-Cell Analysis System. Each well was imaged every 3 hours.

Sanger sequencing

For sequencing, RNA were extracted using RNeasy Kit (QIAGEN) from osteoblasts and brain and reverse transcribed using SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Thermo fisher, Waltham, MA, USA).

PCR products were amplified using GoTaq® DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) with primer couple 5'-GGAGGAGCTGATGGAAACTG-3' and 5'-AACATTGGCCAGAACAGGAC-3'. PCR product were sequenced using the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fischer Scientific) according to the manufacturer's recommendations. Sequences were analyzed using DNADynamo (Blue Tractor Software).

Surgery and Drug treatment

BGJ398 was purchased from LC Laboratories, Woburn, MA, USA. For BGJ398 injection, 4 months old *Fgfr3*^{A385E/+} mice received daily intra-ventricular administration of BGJ398 (1µg per injection) or vehicle (artificial cerebrospinal fluid, DMSO 5%) for seven days. Injection was performed 1 hour before testing.

Intra-ventricular cannula implantation

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride (20mg/ml BW) (1000 Virbac) and xylazine (100mg/ml BW) (Rompun 2%; Bayer) and placed in a stereotaxic frame (900SL-KOPF). Ophthalmic eye ointment was applied to the cornea to

prevent desiccation during surgery. The area around the incision was trimmed and Vetoquinol was applied. After exposure of the dorsal skull, one hole were made at the following coordinates: anterior-posterior (AP), -0.5 and medial-lateral (ML), -1.0 (in mm, from bregma). Through the holes, a guide cannula (C235GS, 26 gauge, Plastics One) inserted with a dummy cannula (C235DCS; Plastics One) was implanted aiming at the ventricle and secured to the skull with dental cement (Super-Bond C&B, Sun Medical Ltd.). Finally, the incision of the scalp was sutured around the cannula and the mouse was observed until fully mobile in a recovery chamber.

Drug preparation and cannula infusion

BGJ398 was dissolved in ACSF to the target concentrations of $0.66\mu\text{g}/\mu\text{l}$. During 7 days, the experimenter gently restrained the mouse and replaced a dummy cannula with an injector cannula (C235IS; intra-ventricular: 33 gauge, extending 0.5 mm beyond the 1.5 -mm guide cannula). The drug was infused ($1.0\ \mu\text{l}/\text{side}$ at a rate of $1\ \mu\text{l}/\text{min}$) using a syringe pump (Harvard Apparatus) with one $10\text{-}\mu\text{l}$ Hamilton syringes connected to the injector cannula. After the infusion, the injector was removed and the dummy cannula replaced.

Behavior tests (Commons et al., 2017; Glatigny et al., 2019)

3-foot shock contextual fear conditioning (CFC)

Mice were transported a short distance from the holding mouse facility to the testing room in their home cages and left undisturbed for at least one hour before the beginning of the test. The conditioning chambers were obtained from Bioseb (France) with internal dimensions of $25 \times 25 \times 25$ cm. Each chamber was located inside a larger, insulated plastic cabinet that provided protection from outside light and noise ($67 \times 55 \times 50$ cm, Bioseb, France), and mice were tested individually in the conditioning boxes. Floors of the chamber consisted of 27 stainless steel bars wired to a shock generator with scrambler for the delivery of foot shock. Signal generated by the mice movements was recorded and analyzed through a high sensitivity weight transducer system. The analog signal was transmitted to the Freezing software module through the load cell unit for recording purposes and analysis of time active / time immobile (Freezing) was performed. The CFC procedure took place over two consecutive days. On day 1, mice were placed in the conditioning chamber, and received 3 foot-shocks (1.5 sec, 0.5 mA), which were administrated at 60 , 120 and 180 sec after the

animals were placed in the chamber. They were returned to their home cages, 60 sec after the final shock. Contextual fear memory was assessed 24 hours after conditioning by returning the mice to the conditioning chamber and measuring freezing behavior during a 4 min retention test. Freezing was scored and analyzed automatically using Packwin 2.0 software (Bioseb, France). Freezing behavior was considered to occur if the animals froze for a period of at least two seconds. Behavior was scored by the Freezing software and analyzed by two observers blind to mouse treatment (M.C. and S.M).

Novel object recognition paradigm (NOR)

We used a modified version of the NOR task as described in Glatigny et al., 2019. Mice were transported a short distance from the holding mouse facility to the testing room in their home cages and left undisturbed for at least one hour before the beginning of the test. The testing room was lit with two 60-W light bulbs and behavior sessions were recorded with a camera above the testing arena (grey plastic box (60 × 40 × 32 cm)). Mice could not contact or see each other during the exposures. The light intensity was equal in all parts of the arena (approximately 20 lx). Two different objects were used, available in triplicate. The objects were (A) a blue ceramic pot (diameter 6.5 cm, maximal height 7.5 cm) and (B) a clear, plastic funnel (diameter 8.5 cm, maximal height 8.5 cm). The objects that serve as a novel object, as well as the left/right localization of the objects, were counterbalanced within each group. The objects elicited equal levels of exploration as determined in pilot experiments and training phase. Between exposures, mice were held individually in standard cages, the objects and arenas were cleaned with phagospore, and the bedding replaced.

The NOR paradigm consists of three phases (over 3 days): a habituation phase, a training phase, and a testing phase. Mice were always placed in the center of the arena at the start of each exposure. On day 1: the habituation phase, mice were given 5 min to explore the arena, without any objects and were then taken back to their home cage. On day 2, the training phase, mice were allowed to explore, for 10 min, two identical objects arranged in a symmetric opposite position from the center of the arena and were then transported to their home cage. On day 3, the testing phase, mice were given 15 minutes to explore two objects: a familiar object and a novel one, in the same arena, keeping the same object localization.

The following behaviors were considered as exploration of the objects: sniffing, licking, or touching the object with the nose or with the front legs or directing the nose to the object at a distance ≤ 1 cm. Investigation was not scored if the mouse was on top of the object or completely immobile. The preference index for the novel object was calculated as (time spent exploring the new object / the total time spent exploring both objects), and the discrimination index was calculated as (time spent exploring the new object - time spent exploring the familiar object) / (total time spent exploring both objects). As a control, preference index for the (right/left) object location or for the object A versus B during the training phase of the novel object recognition (NOR) was measured in all groups of mice exposed to the test. We confirm here that no initial preference for any exposed object (A or B) or any orientation (right/left) was observed in any groups. The locomotion was assessed for each mouse. Behavior was scored on videos by two observers blind to treatment and the total exploration time of the objects was quantified in the training and testing phases (M.C. and S.M).

Light-to-Dark Transition test (D/LT)

This test is based on the innate aversion of rodents to brightly illuminated areas and on their spontaneous exploratory behavior in response to the stressor that light represents. The test apparatus consists of a dark, safe compartment and an illuminated, aversive one. The lit compartment was brightly illuminated with an 8 W fluorescent tube (1000 lx). Naive mice were placed individually in the testing chamber in the middle of the dark area facing away from the doorway to the light compartment. Mice were tested for 10 min, and two parameters were recorded: time spent in the lit compartment and the number of transitions between compartments, indices of anxiety-related behavior and exploratory activity. Behavior was scored using an infrared light beam activity monitor using actiMot2 Software (PhenoMaster Software, TSE) and it was statistically analyzed using Prism program.

Open Field Test (OFT)

This test takes advantage of the aversion of rodents to brightly lit areas. Each mouse is placed in the center of the OFT chamber (43 × 43 cm chamber) and allowed to explore for 30 min. Mice were monitored throughout each test session by infrared light beam activity monitor using actiMot2 Software (PhenoMaster Software, TSE). The overall motor activity was

quantified as the total distance travelled (ambulation). Anxiety was quantified by measuring the time and distance spent in the center versus periphery of the open-field chamber.

Morris Water Maze (MWM)

Animals were transported a short distance from the holding mouse facility to the testing room in their home cages and left undisturbed for at least one hour prior to the first trial. The MWM with an automatic tracking system was employed for assessing spatial learning and memory. The apparatus was a white circular swimming pool (diameter: 200 cm, walls: 60 cm high), which was located in a room with various distal cues. The pool was filled with water (depth: 50 cm) maintained at $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, which was made opaque by the addition of a nontoxic white paint. A 12 cm round platform was hidden 1.0 cm below the water surface. The maze was virtually divided into four arbitrary, equally spaced quadrants delineated by the cardinal points north (N), east (E), south (S), and west (W). The pool was located in a brightly lit room. Extra maze geometric and high-contrast cues were mounted on the walls of the swimming pool with the ceiling providing illumination. Data was collected using a video camera fixed to the ceiling and connected to a videotracking system (Anymaze). Each daily trial consisted of four swimming trials, in which each mouse was placed in the pool facing the wall of the tank and allowing the animal to swim to the platform before 120 sec had elapsed. A trial terminated when the animal reached the platform, where it remained for 5 sec. Mice were removed and placed back in their home cages for a 5 min inter-trial interval. To prevent hypothermia, the animals were gently dried with a paper towel between and after the trials. The starting point differed at each trial, and different sequences of release points were used from day to day. Swimming time to the platform was calculated as an evaluation of performance of the mice to locate the target. Animal movements were recorded using Anymaze to calculate parameters of the performance of mice. Behavior was scored by observers blind to genotype (M.C. and S.M).

Tail suspension test (TST)

This test is based on the observation that rodents, after initial escape-oriented movements, develop an immobile posture when placed in an inescapable stressful situation. Each mouse is hung in an uncontrollable fashion by their tail at above 25 cm from the floor. Mice were tested for 5 min, and the time spent immobile was quantified.

Forced swim test (FST)

This test is based on a similar observation than the TST. Each mouse is placed in a cylinder (height: 25 cm and diameter: 10 cm) filled with water (23-25°C). Mice were tested for 5 min, and the time spent immobile (behavioral despair) was quantified.

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm s.e.m. Statistical parameters including the exact sample size (n), post hoc tests, and statistical significance are reported in every figure and figure legend. Data were estimated to be statistically significant when $p \leq 0.05$ by nonparametric Mann-Whitney U test or Student's t test, and one-way ANOVAs when appropriate. Significant ANOVAs were followed by a two-way repeated-measures analysis of variance with a post hoc Tukey's HSD multiple comparisons test for pairwise differences between each mouse groups. The significance threshold was set at $P \leq 0.05$. Statistical analyses were performed using GraphPad PRISM (v5) (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). All values are shown as mean \pm SD.

REFERENCES

- Abdel-Salam, G.M.H., Flores-Sarnat, L., El-Ruby, M.O., Parboosingh, J., Bridge, P., Eid, M.M., El-Badry, T.H., Effat, L., Curatolo, P., Temtamy, S.A., 2011. Muenke syndrome with pigmentary disorder and probable hemimegalencephaly: An expansion of the phenotype. *Am. J. Med. Genet.* 155, 207–214. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33777>
- Aldridge, K., Hill, C.A., Austin, J.R., Percival, C., Martinez-Abadias, N., Neuberger, T., Wang, Y., Jabs, E.W., Richtsmeier, J.T., 2010. Brain phenotypes in two FGFR2 mouse models for Apert syndrome. *Dev. Dyn.* 239, 987–997. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22218>
- Al-Namnam, N.M., Hariri, F., Thong, M.K., Rahman, Z.A., 2019. Crouzon syndrome: Genetic and intervention review. *J Oral Biol Craniofac Res* 9, 37–39. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2018.08.007>
- Arnaud-López, L., Fragoso, R., Mantilla-Capacho, J., Barros-Núñez, P., 2007. Crouzon with acanthosis nigricans. Further delineation of the syndrome. *Clin. Genet.* 72, 405–410. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00884.x>
- Aurbach, E.L., Inui, E.G., Turner, C.A., Hagenauer, M.H., Prater, K.E., Li, J.Z., Absher, D., Shah, N., Blandino, P., Bunney, W.E., Myers, R.M., Barchas, J.D., Schatzberg, A.F., Watson, S.J., Akil, H., 2015. Fibroblast growth factor 9 is a novel modulator of negative affect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 11953–11958. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510456112>
- Chen, F., Degnin, C., Laederich, M., Horton, W., Hristova, K., 2011. The A391E mutation enhances FGFR3 activation in the absence of ligand. *Biochim Biophys Acta* 1808, 2045–2050. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.04.007>
- Chen, F., Sarabipour, S., Hristova, K., 2013. Multiple Consequences of a Single Amino Acid Pathogenic RTK Mutation: The A391E Mutation in FGFR3. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056521>
- Coll, G., Lemaire, J.-J., Di Rocco, F., Barthélémy, I., Garcier, J.-M., De Schlichting, E., Sakka, L., 2016. Human Foramen Magnum Area and Posterior Cranial Fossa Volume Growth in Relation to Cranial Base Synchronosis Closure in the Course of Child Development: *Neurosurgery* 79, 722–735. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000001309>
- Coll, G., Sakka, L., Botella, C., Pham-Dang, N., Collet, C., Zerah, M., Arnaud, E., Di Rocco, F., 2018. Pattern of Closure of Skull Base Synchronoses in Crouzon Syndrome. *World Neurosurgery* 109, e460–e467. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.09.208>
- Colvin, J.S., Bohne, B.A., Harding, G.W., McEwen, D.G., Ornitz, D.M., 1996. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.* 12, 390–397. <https://doi.org/10.1038/ng0496-390>
- Commons, K.G., Cholanians, A.B., Babb, J.A., Ehlinger, D.G., 2017. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chem Neurosci* 8, 955–960. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00042>
- de Jong, T., Bannink, N., Bredero-Boelhouwer, H.H., van Veelen, M.L.C., Bartels, M.C., Hoeve, L.J., Hoozeboom, A.J.M., Wolvius, E.B., Lequin, M.H., van der Meulen, J.J.N.M., van Adrichem, L.N.A., Vaandrager, J.M., Ongkosuwito, E.M., Joosten, K.F.M., Mathijssen, I.M.J., 2010. Long-term functional outcome in 167 patients with syndromic craniosynostosis; defining a syndrome-specific risk profile. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63, 1635–1641. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2009.10.029>
- Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A., Leder, P., 1996. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84, 911–921.
- Denny, C.A., Burghardt, N.S., Schachter, D.M., Hen, R., Drew, M.R., 2012. 4- to 6-week-old adult-born hippocampal neurons influence novelty-evoked exploration and contextual fear conditioning. *Hippocampus* 22, 1188–1201. <https://doi.org/10.1002/hipo.20964>
- Di Rocco, F., Biosse Duplan, M., Heuzé, Y., Kaci, N., Komla-Ebri, D., Munnich, A., Mugniery, E., Benoist-Lasselain, C., Legeai-Mallet, L., 2014. FGFR3 mutation causes abnormal membranous

- ossification in achondroplasia. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2914–2925.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu004>
- Di Rocco, F., Collet, C., Legeai-Mallet, L., Arnaud, E., Le Merrer, M., Hadj-Rabia, S., Renier, D., 2011. Crouzon syndrome with acanthosis nigricans: a case-based update. *Childs Nerv Syst* 27, 349–354. <https://doi.org/10.1007/s00381-010-1347-z>
- Elsayed, M., Banasr, M., Duric, V., Fournier, N.M., Licznarski, P., Duman, R.S., 2012. Antidepressant effects of Fibroblast Growth Factor-2 in behavioral and cellular models of depression. *Biol Psychiatry* 72, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.03.003>
- Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31, 47–59.
- Evans, S.J., Choudary, P.V., Neal, C.R., Li, J.Z., Vawter, M.P., Tomita, H., Lopez, J.F., Thompson, R.C., Meng, F., Stead, J.D., Walsh, D.M., Myers, R.M., Bunney, W.E., Watson, S.J., Jones, E.G., Akil, H., 2004. Dysregulation of the fibroblast growth factor system in major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15506–15511. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406788101>
- Gibbs, L., Legeai-Mallet, L., 2007. FGFR3 intracellular mutations induce tyrosine phosphorylation in the Golgi and defective glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773, 502–512. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.12.010>
- Glatigny, M., Moriceau, S., Rivagorda, M., Ramos-Brossier, M., Nascimbeni, A.C., Lante, F., Shanley, M.R., Boudarene, N., Rousseaud, A., Friedman, A.K., Settembre, C., Kuperwasser, N., Friedlander, G., Buisson, A., Morel, E., Codogno, P., Oury, F., 2019. Autophagy Is Required for Memory Formation and Reverses Age-Related Memory Decline. *Curr. Biol.*
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.12.021>
- Grosso, S., Farnetani, M.A., Berardi, R., Bartalini, G., Carpentieri, M., Galluzzi, P., Mostardini, R., Morgese, G., Balestri, P., 2003. Medial temporal lobe dysgenesis in Muenke syndrome and hypochondroplasia. *American Journal of Medical Genetics Part A* 120A, 88–91.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.10171>
- Gudernova, I., Vesela, I., Balek, L., Buchtova, M., Dosedelova, H., Kunova, M., Pivnicka, J., Jelinkova, I., Roubalova, L., Kozubik, A., Krejci, P., 2015. Multikinase activity of fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitors SU5402, PD173074, AZD1480, AZD4547 and BGJ398 compromises the use of small chemicals targeting FGFR catalytic activity for therapy of short stature syndromes. *Hum. Mol. Genet.* <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv441>
- Gürbüz, F., Ceylaner, S., Topaloğlu, A.K., Yüksel, B., 2016. Crouzonodermoskeletal Syndrome with Hypoplasia of Corpus Callosum and Inferior Vermis. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 8, 373–374.
<https://doi.org/10.4274/jcrpe.3343>
- Heuzé, Y., Boyadjiev, S.A., Marsh, J.L., Kane, A.A., Cherkez, E., Boggan, J.E., Richtsmeier, J.T., 2010. New insights into the relationship between suture closure and craniofacial dysmorphology in sagittal nonsyndromic craniosynostosis. *J Anat* 217, 85–96. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01258.x>
- Huang, J.-Y., Lynn Miskus, M., Lu, H.-C., 2017. FGF-FGFR Mediates the Activity-Dependent Dendritogenesis of Layer IV Neurons during Barrel Formation. *J. Neurosci.* 37, 12094–12105.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1174-17.2017>
- Inglis-Broadgate, S.L., Thomson, R.E., Pellicano, F., Tartaglia, M.A., Pontikis, C.C., Cooper, J.D., Iwata, T., 2005. FGFR3 regulates brain size by controlling progenitor cell proliferation and apoptosis during embryonic development. *Developmental Biology* 279, 73–85.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.035>
- Kang, W., Hébert, J.M., 2015. FGF Signaling Is Necessary for Neurogenesis in Young Mice and Sufficient to Reverse Its Decline in Old Mice. *J Neurosci* 35, 10217–10223.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1469-15.2015>
- Kitamura, T., Inokuchi, K., 2014. Role of adult neurogenesis in hippocampal-cortical memory consolidation. *Mol Brain* 7, 13. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-13>
- Klingenberg, C.P., 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour* 11, 353–357. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>

- Komla-Ebri, D., Dambroise, E., Kramer, I., Benoist-Lasselín, C., Kaci, N., Le Gall, C., Martin, L., Busca, P., Barbault, F., Graus-Porta, D., Munnich, A., Kneissel, M., Di Rocco, F., Biosse-Duplan, M., Legeai-Mallet, L., 2016. Tyrosine kinase inhibitor NVP-BGJ398 functionally improves FGFR3-related dwarfism in mouse model. *J. Clin. Invest.* 126, 1871–1884. <https://doi.org/10.1172/JCI83926>
- Kruszka, P., Addissie, Y.A., Agochukwu, N.B., Doherty, E.S., Muenke, M., 1993. Muenke Syndrome, in: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Stephens, K., Amemiya, A. (Eds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Laurita, J., Koyama, E., Chin, B., Taylor, J.A., Lakin, G.E., Hankenson, K.D., Bartlett, S.P., Nah, H.-D., 2011. The Muenke syndrome mutation (Fgfr3P244R) causes cranial base shortening associated with growth plate dysfunction and premature perichondrial ossification in murine basicranial synchondroses. *Dev. Dyn.* 240, 2584–2596. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22752>
- Li, E., You, M., Hristova, K., 2006. FGFR3 dimer stabilization due to a single amino acid pathogenic mutation. *J. Mol. Biol.* 356, 600–612. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.077>
- Maliepaard, M., Mathijssen, I.M.J., Oosterlaan, J., Okkerse, J.M.E., 2014. Intellectual, Behavioral, and Emotional Functioning in Children With Syndromic Craniosynostosis. *Pediatrics* 133, e1608–e1615. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-3077>
- Martínez-Abadías, N., Heuzé, Y., Wang, Y., Jabs, E.W., Aldridge, K., Richtsmeier, J.T., 2011. FGF/FGFR Signaling Coordinates Skull Development by Modulating Magnitude of Morphological Integration: Evidence from Apert Syndrome Mouse Models. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026425>
- Merrill, A.E., Sarukhanov, A., Krejci, P., Idoni, B., Camacho, N., Estrada, K.D., Lyons, K.M., Deixler, H., Robinson, H., Chitayat, D., Curry, C.J., Lachman, R.S., Wilcox, W.R., Krakow, D., 2012. Bent bone dysplasia-FGFR2 type, a distinct skeletal disorder, has deficient canonical FGF signaling. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.02.005>
- Meyers, G.A., Orlow, S.J., Munro, I.R., Przylepa, K.A., Jabs, E.W., 1995. Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Nat. Genet.* 11, 462–464. <https://doi.org/10.1038/ng1295-462>
- Mir A, Wu T, Orlow SJ, 2013. Cutaneous features of crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *JAMA Dermatol* 149, 737–741. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2013.3019>
- Moldrich, R.X., Mezzera, C., Holmes, W.M., Goda, S., Brookfield, S.J., Rankin, A.J., Barr, E., Kurniawan, N., Dewar, D., Richards, L.J., López-Bendito, G., Iwata, T., 2011. Fgfr3 regulates development of the caudal telencephalon. *Developmental Dynamics* 240, 1586–1599. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22636>
- Muenke, M., Gripp, K.W., McDonald-McGinn, D.M., Gaudenz, K., Whitaker, L.A., Bartlett, S.P., Markowitz, R.I., Robin, N.H., Nwokoro, N., Mulvihill, J.J., Losken, H.W., Mulliken, J.B., Guttmacher, A.E., Wilroy, R.S., Clarke, L.A., Hollway, G., Adès, L.C., Haan, E.A., Mulley, J.C., Cohen, M.M., Bellus, G.A., Francomano, C.A., Moloney, D.M., Wall, S.A., Wilkie, A.O.M., Zackai, E.H., 1997. A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. *Am J Hum Genet* 60, 555–564.
- Neben, C.L., Idoni, B., Salva, J.E., Tuzon, C.T., Rice, J.C., Krakow, D., Merrill, A.E., 2014. Bent bone dysplasia syndrome reveals nucleolar activity for FGFR2 in ribosomal DNA transcription. *Hum. Mol. Genet.* 23, 5659–5671. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu282>
- Neben, C.L., Tuzon, C.T., Mao, X., Lay, F.D., Merrill, A.E., 2017. FGFR2 mutations in bent bone dysplasia syndrome activate nucleolar stress and perturb cell fate determination. *Hum. Mol. Genet.* 26, 3253–3270. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx209>
- Okubo, Y., Kitamura, T., Anzai, M., Endo, W., Inui, T., Takezawa, Y., Suzuki-Muromoto, S., Miyabayashi, T., Togashi, N., Oba, H., Saitsu, H., Matsumoto, N., Haginoya, K., 2017. A patient with Muenke syndrome manifesting migrating neonatal seizures. *Brain Dev.* <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2017.05.007>

- Richtsmeier, J.T., Flaherty, K., 2013. Hand in glove: brain and skull in development and dysmorphogenesis. *Acta Neuropathol.* 125, 469–489. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1104-y>
- Robin, N.H., Falk, M.J., Haldeman-Englert, C.R., 1993. FGFR-Related Craniosynostosis Syndromes, in: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Stephens, K., Amemiya, A. (Eds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeai-Mallet, L., Pelet, A., Rozet, J.M., Maroteaux, P., Le Merrer, M., Munnich, A., 1994. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* 371, 252–254. <https://doi.org/10.1038/371252a0>
- Salmaso, N., Stevens, H.E., McNeill, J., ElSayed, M., Ren, Q., Maragnoli, M.E., Schwartz, M.L., Tomasi, S., Sapolsky, R.M., Duman, R., Vaccarino, F.M., 2016. Fibroblast Growth Factor 2 Modulates Hypothalamic Pituitary Axis Activity and Anxiety Behavior Through Glucocorticoid Receptors. *Biological Psychiatry, New Insight Into Depression Therapeutics* 80, 479–489. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.02.026>
- Stevens, H.E., Jiang, G.Y., Schwartz, M.L., Vaccarino, F.M., 2012. Learning and memory depend on fibroblast growth factor receptor 2 functioning in hippocampus. *Biol Psychiatry* 71, 1090–1098. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.03.013>
- Su, N., Xu, X., Li, Cuiling, He, Q., Zhao, L., Li, Can, Chen, S., Luo, F., Yi, L., Du, X., Huang, H., Deng, C., Chen, L., 2010. Generation of Fgfr3 conditional knockout mice. *Int. J. Biol. Sci.* 6, 327–332.
- Thomson, R.E., Kind, P.C., Graham, N.A., Etherson, M.L., Kennedy, J., Fernandes, A.C., Marques, C.S., Hevner, R.F., Iwata, T., 2009. Fgf receptor 3 activation promotes selective growth and expansion of occipitotemporal cortex. *Neural Dev* 4, 4. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-4-4>
- Thomson, R.E., Pellicano, F., Iwata, T., 2007. Fibroblast growth factor receptor 3 kinase domain mutation increases cortical progenitor proliferation via mitogen-activated protein kinase activation. *Journal of Neurochemistry* 100, 1565–1578. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04285.x>
- Twigg et al., 2008. Skeletal Analysis of the Fgfr3P244R Mouse, a Genetic Model for the Muenke Craniosynostosis Syndrome.
- Twigg, S.R.F., Wilkie, A.O.M., 2015. A Genetic-Pathophysiological Framework for Craniosynostosis. *American Journal of Human Genetics* 97, 359. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.07.006>
- Wilkie, A.O.M., Byren, J.C., Hurst, J.A., Jayamohan, J., Johnson, D., Knight, S.J.L., Lester, T., Richards, P.G., Twigg, S.R.F., Wall, S.A., 2010. Prevalence and complications of single gene and chromosomal disorders in craniosynostosis. *Pediatrics* 126, e391–e400. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-3491>
- Yarnell, C.M.P., Addissie, Y.A., Hadley, D.W., Guillen Sacoto, M.J., Agochukwu, N.B., Hart, R.A., Wiggs, E.A., Platte, P., Paelecke, Y., Collmann, H., Schweitzer, T., Kruszka, P., Muenke, M., 2015. Executive Function and Adaptive Behavior in Muenke Syndrome. *J. Pediatr.* 167, 428–434. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.04.080>
- Zhou, S., Xie, Y., Tang, J., Huang, J., Huang, Q., Xu, W., Wang, Z., Luo, F., Wang, Q., Chen, H., Du, X., Shen, Y., Chen, D., Chen, L., 2015. FGFR3 Deficiency Causes Multiple Chondroma-like Lesions by Upregulating Hedgehog Signaling. *PLoS Genetics* 11, undefined-undefined. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005214>

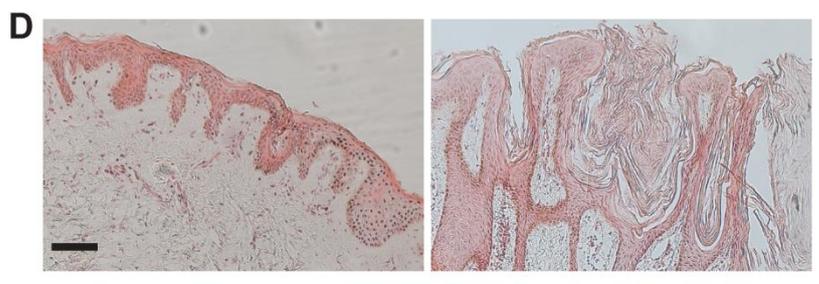
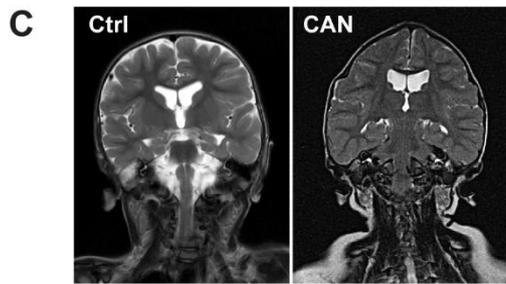
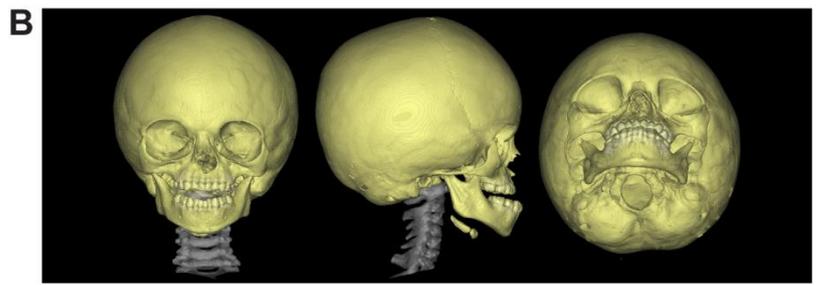


Figure 1: Phenotypic trait of Crouzon syndrome with acanthosis Nigricans

A. Craniofacial features of CAN Patient 1 at age of 2 months and 11 years, with brachycephaly, midface hypoplasia, bulging eyes and underdeveloped upper jaw. The late appearance of acanthosis nigricans (AN) is visible especially on skin folds of the neck (right panel). **B.** CT scan of Patient 2 at 1 year old, showing lambdoid fusion, facial retrusion and reduced foramen magnum. **C.** Brain magnetic resonance imaging of 2 year-old control (left) and CAN Patient 1 (right) on coronal plane showing the compressed brain and the severe cranioencephalic disproportion. **D.** Skin biopsy of normal (left) and AN (right) areas of 11 years old Patient 1. HES staining revealed hyperkeratosis and dilatation of the hair follicles. Scale bar 100µm.

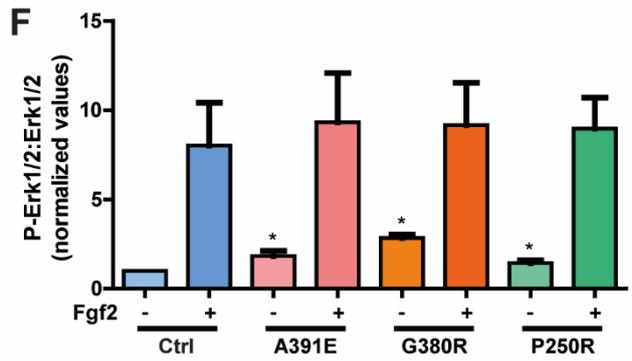
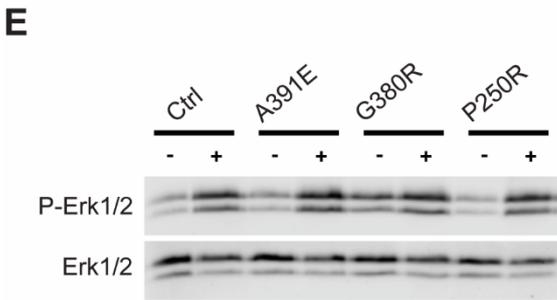
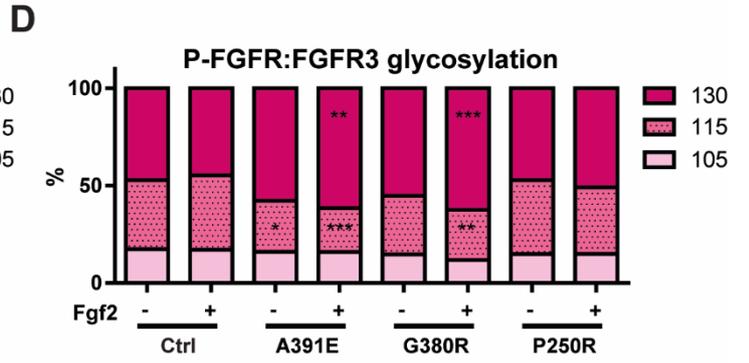
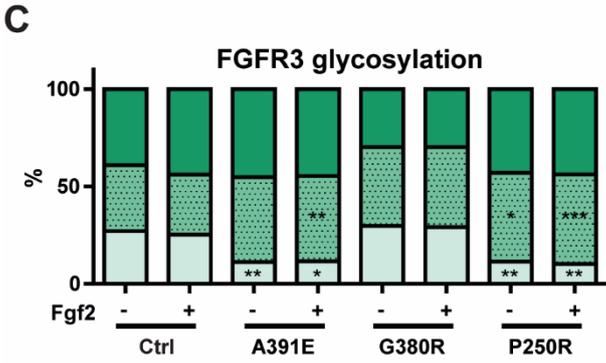
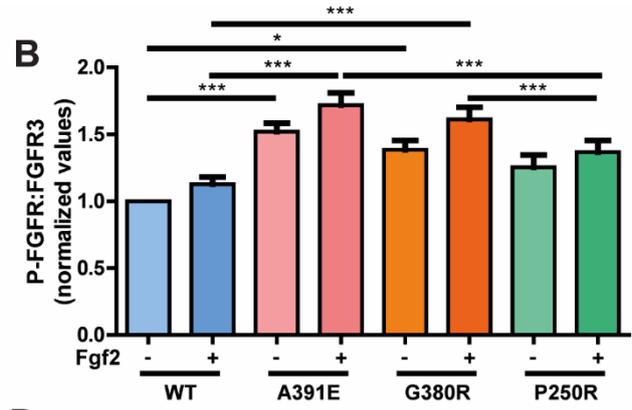
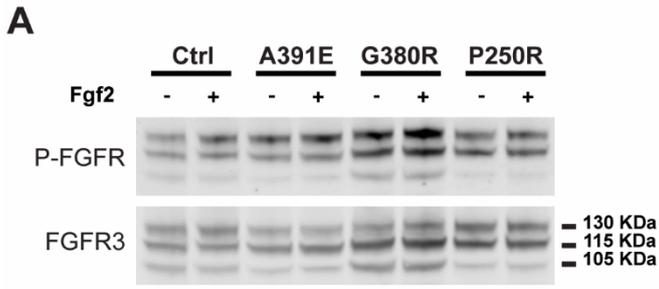


Figure 2: Gain-of-function Ala391Glu mutation affects FGFR3 protein synthesis and Mapkinase pathway.

A. Phosphorylated *FGFR3* expression in HEK293 cells transfected with *FGFR3* (Control, Ctrl), *FGFR3*^{A391E} (CAN), *FGFR3*^{G380R} (ACH), *FGFR3*^{P250R} (Muenke). **B.** Quantification of P-FGFR:FGFR3 ratio (n = 6 independent experiments). Data are normalized to Control. **C.** Percentage of P-FGFR:FGFR3 ratio of 130KDa, 115KDa and 105KDa isoforms for Control, CAN, ACH and Muenke. (n = 6 independent experiments). **D.** Percentage of 130KDa, 115KDa and 105KDa isoforms for Control, CAN, ACH and Muenke. (n = 6 independent experiments). **E.** Phosphorylated Erk1/2 expression in HEK293 cells transfected with *FGFR3* (Control, Ctrl), *FGFR3*^{A391E} (CAN), *FGFR3*^{G380R} (ACH), *FGFR3*^{P250R} (Muenke). **F.** Quantification of P-Erk1/2:Erk1/2 ratio. Data are normalized to WT. * P < 0.05 (n = 5 independent experiments). ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test.

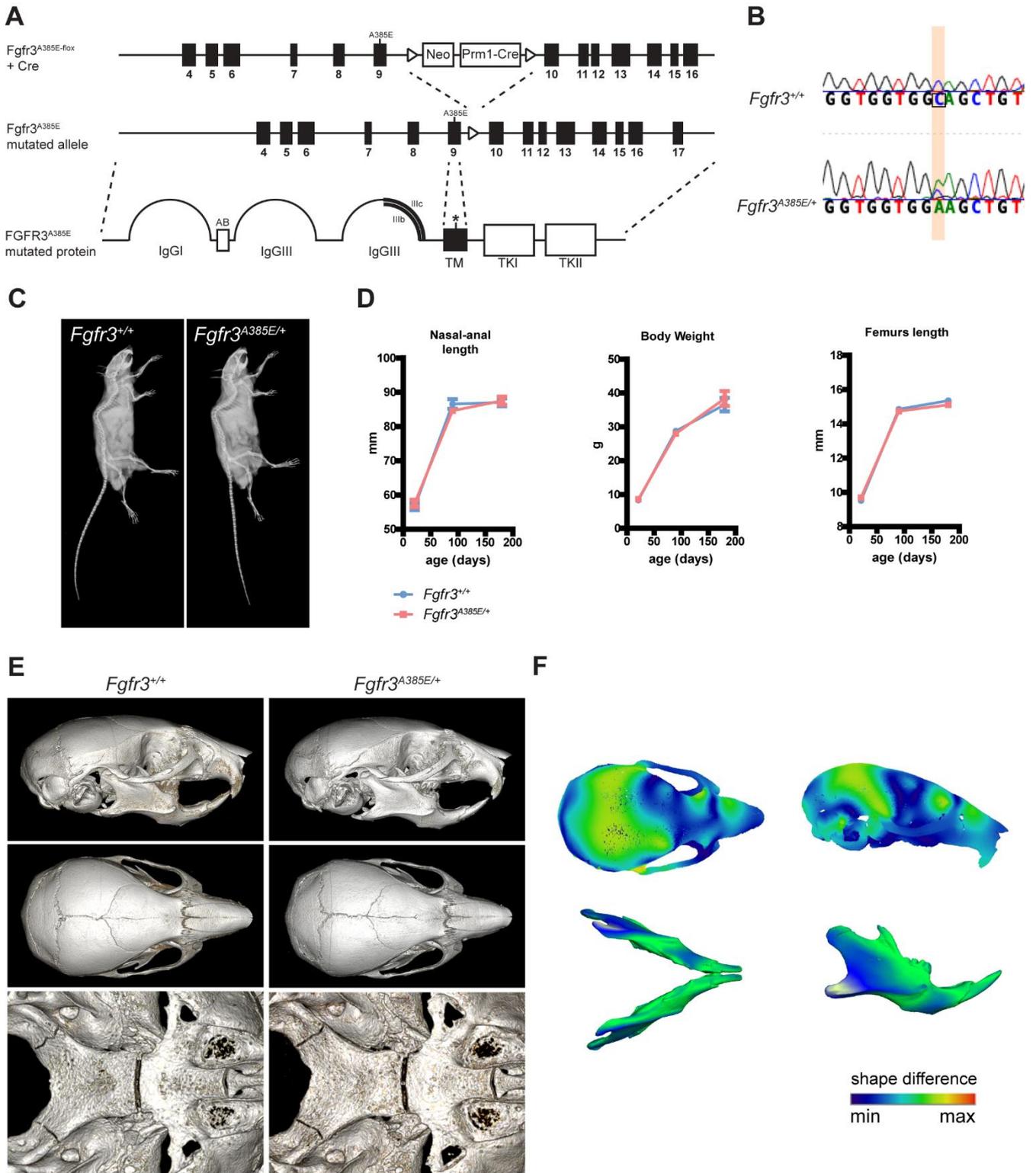


Figure 3: CAN mouse model (*Fgfr3*^{A385E/+}) shows normal skeletal development.

A. The point mutation p.Ala385Glu mutation was inserted in a cassette with the neomycin gene (NEO) flanked by LoxP sites into exon 9 through homologous recombination in ES cells. Once germline insertion was established, Prm1 promoter allowed cassette to be excised in male germline at the first generation. **B.** Presence of the heterozygous mutation p.Ala385Glu in RNA isolated from calvarial osteoblast. **C.** Radiographs of 3 months old animals showing normal skeletal phenotype in *Fgfr3*^{A385E/+} compared to *Fgfr3*^{+/+}. **D.** Nasal-anal length, body weight and lengths of femurs measured at P21, P90 and P180 males (P21: *Fgfr3*^{+/+} n = 11; *Fgfr3*^{A385E/+} n = 10; P90: *Fgfr3*^{+/+} n = 10; *Fgfr3*^{A385E/+} n = 12; P180: *Fgfr3*^{+/+} n = 10; *Fgfr3*^{A385E/+}, n = 12). **E.** μ CT of *Fgfr3*^{+/+} (n=9) and *Fgfr3*^{A385E/+} (n=8) at P21 showing normal skull morphology. Cranial sutures and skull base synchondroses were found patents. **F.** 3D rendering (heat map) of shape differences between *Fgfr3*^{+/+} and *Fgfr3*^{A385E/+} for the skull and the mandible (studied separately) at P21. Morphometric analysis was performed on μ CT scanners of P21, P90, and P180 *Fgfr3*^{A385E/+} mouse and control littermates. Skull shape did not show any significant differences for *Fgfr3*^{A385E/+} compared to controls at the three stages. Mandible shape was only significantly different from controls for P21 *Fgfr3*^{A385E/+} mice (d=0.0159; P<0.01).

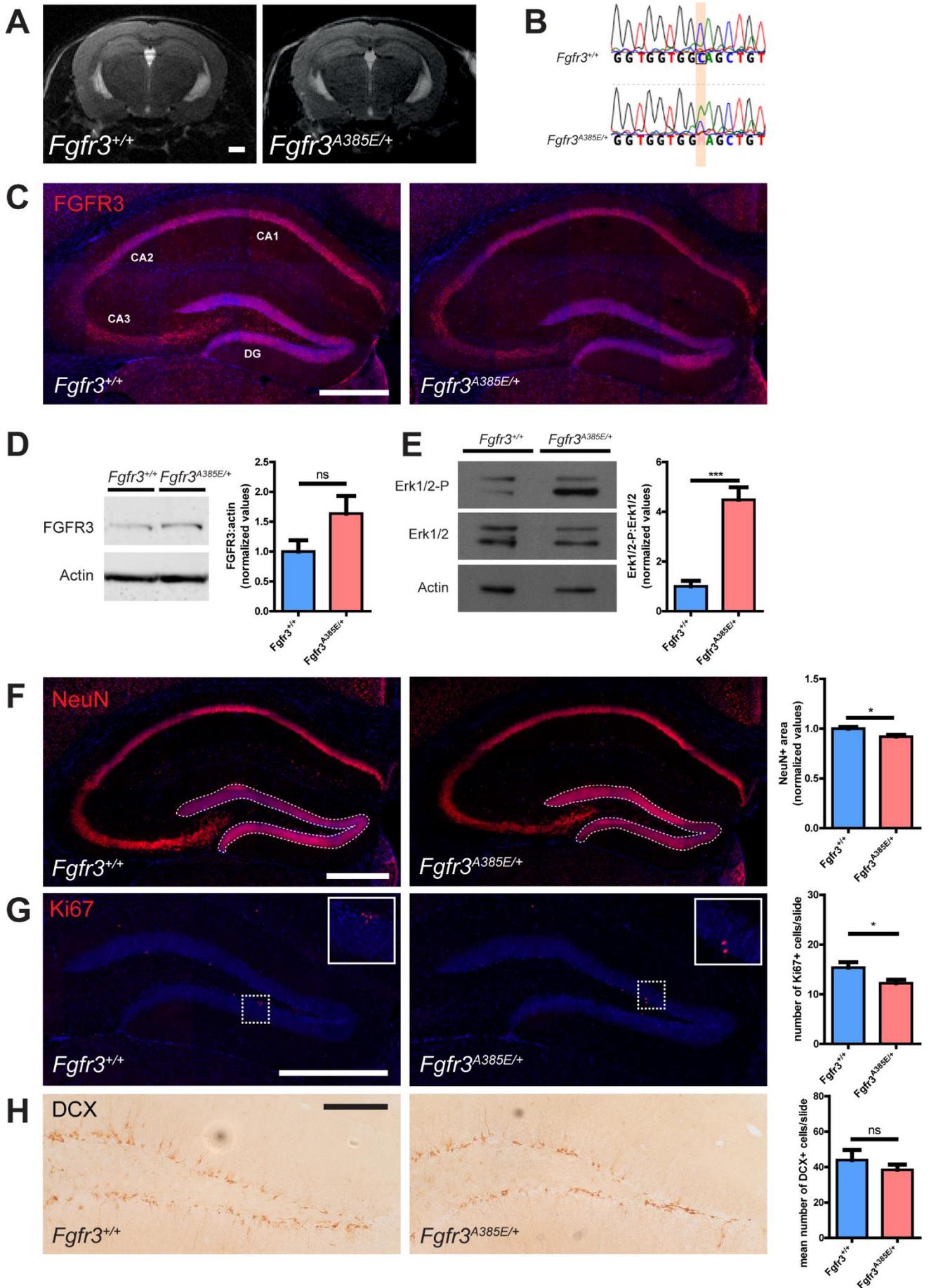


Figure 4: Defective neurogenesis in CAN hippocampus.

A Representative brain MRI performed on 4 months old animals. No morphological anomaly could be observed on mutant mice (*Fgfr3*^{+/+}, n = 5; *Fgfr3*^{A385E/+}, n = 7). Scale bar 1mm. **B.** Presence of the heterozygous mutation p.Ala385Glu in RNA isolated from hippocampus **C.** Immunofluorescence for FGFR3 on 4 months old animal brain. Similar FGFR3 pattern expression for *Fgfr3*^{A385E/+} (n=5) and *Fgfr3*^{+/+} (n=5). Scale bar 100µm. **D.** FGFR3 expression in hippocampus lysates (4 months old animal) (*Fgfr3*^{+/+}, n=5; *Fgfr3*^{A385E/+}, n=5). **E.** Phosphorylated ERK1/2 hippocampus expression. *Fgfr3*^{A385E/+} mutant show significant increase of phosphorylation level (*Fgfr3*^{+/+} n = 9; *Fgfr3*^{A385E/+} n = 7). **F.** Immunofluorescence labeling for NeuN. Measurements of NeuN in the dentate gyrus area, significant decreased in *Fgfr3*^{A385E/+} (n=6) compared to *Fgfr3*^{+/+} (n = 7); Data are normalized to *Fgfr3*^{+/+}. Scale bar 500µm. **G.** Immunofluorescence labeling for Ki67. Number of Ki67 labelled cells in *Fgfr3*^{A385E/+} (n=6) and *Fgfr3*^{+/+} (n = 6). Scale bar 500µm. DAPI counterstain (blue). **H.** Immunohistochemistry for DCX. Number of DCX labelled cells in *Fgfr3*^{+/+} (n = 6) and *Fgfr3*^{A385E/+} (n=8) Scale bar 500µm. * P<0.05, *** P<0.001. ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test and Student's unpaired t test.

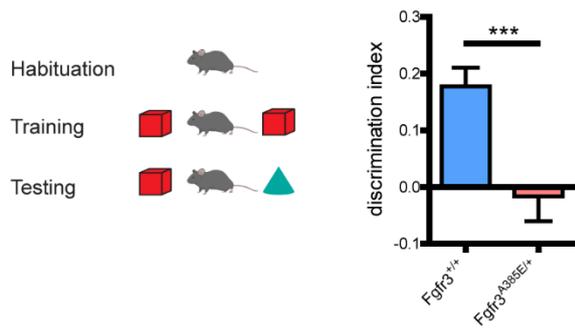
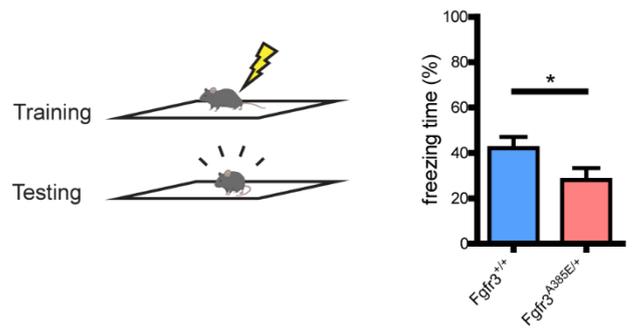
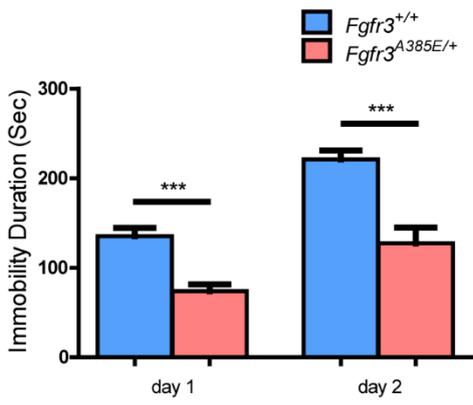
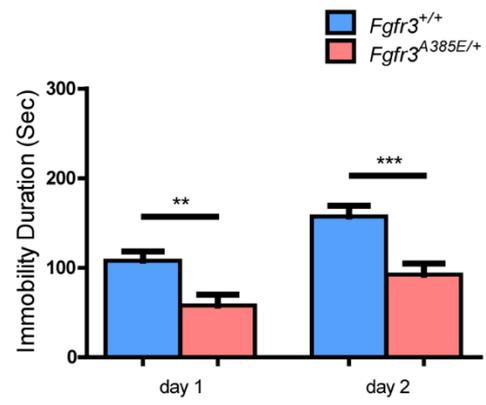
A**B****C****D**

Figure 5: Learning impairment and abnormal stress-coping behavior in CAN model.

A. Novel object recognition (NOR) performed in 4 months old male animals. Discrimination index was measured 24h after training phase to assess memory performance of *Fgfr3*^{A385E/+} and their control littermates. NOR was performed on two independent groups of *Fgfr3*^{A385E/+} (n=17) and their controls (n=14). **B.** Contextual Fear Conditioning (CFC) performed in 4 month-old male animals in two independent groups (*Fgfr3*^{+/+}, n=13; *Fgfr3*^{A385E/+} n=12). Percent freezing time was recorded for training phase (as control for basal level) and testing phase (to assess memory performance). **C.** Forced swim test (FST) performed in 4 month-old male animals in two independent groups. FST was performed during two consecutive days. Immobility duration was assessed for both day 1 and day 2. (*Fgfr3*^{+/+}, n=17; *Fgfr3*^{A385E/+}, n=14). **D.** Tail suspension test (TST) performed in 4 month-old male animals during two consecutive days and immobility duration was assessed for both. (*Fgfr3*^{+/+}, n=17; *Fgfr3*^{A385E/+} n=14).

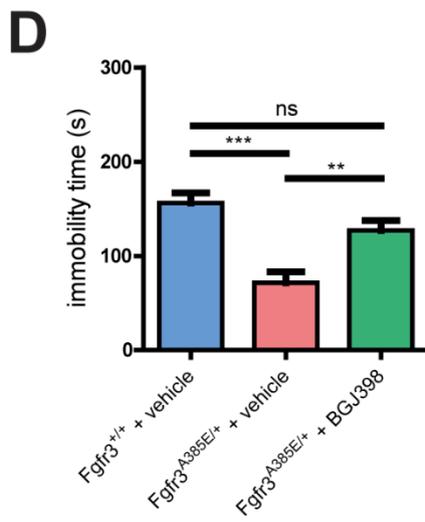
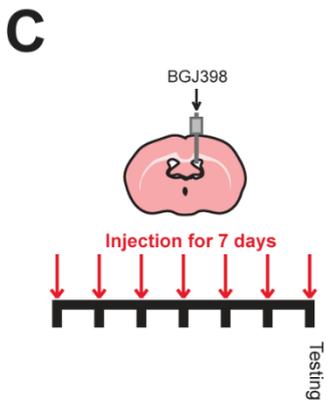
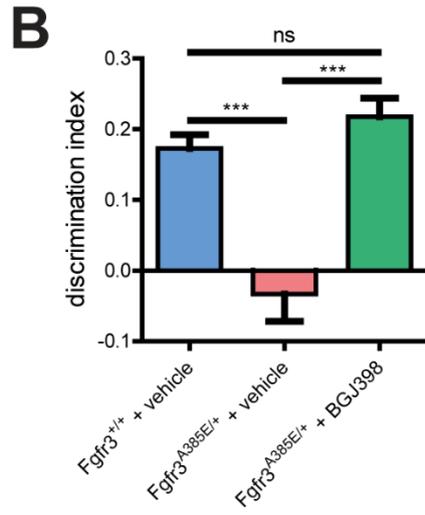
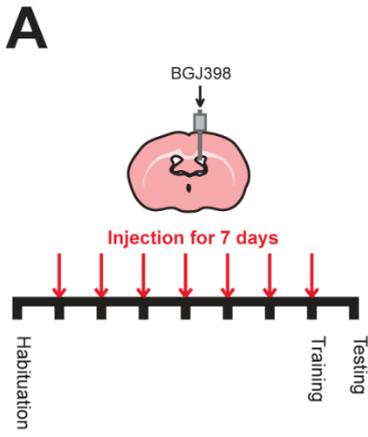
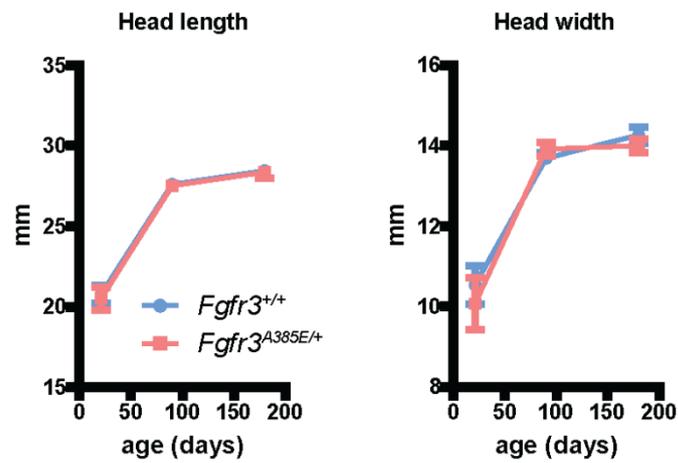


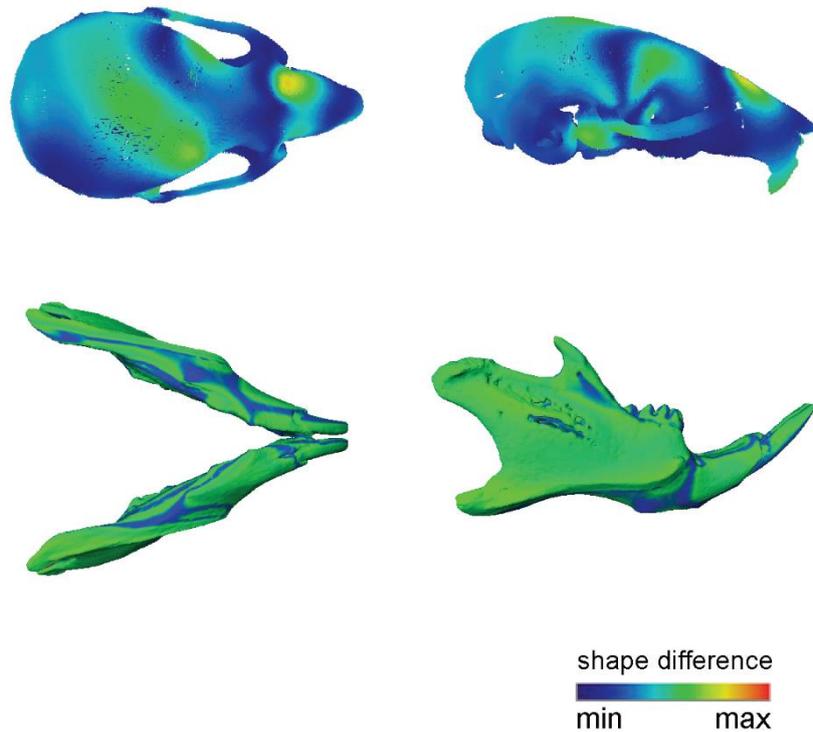
Figure 6: Downregulation of *Fgfr3*^{A385E/+} phosphorylation in hippocampus restored memory deficit abnormal stress coping behavior.

A. Local daily intracerebroventricular injection with either BGJ398 or vehicle in 4 month-old male animals during 7 days. NOR training session occurred 1 hour after last injection **B.** NOR performed on groups injected with vehicle or BGJ398. Injection and NOR were performed on two independent groups with the three conditions each (*Fgfr3*^{+/+} + vehicle, n=15; *Fgfr3*^{A385E/+} + vehicle, n=14; *Fgfr3*^{A385E/+} + BGJ398, n=14). **C.** Local daily intracerebroventricular injection with either BGJ398 or vehicle in 4 month-old male animals during 7 days. One FST testing session occurring 1 hour after last injection. Immobility duration was assessed during testing. **D.** FST performed on groups injected with vehicle or BGJ398. Injection and FST were performed on two independent groups with the three conditions each (*Fgfr3*^{+/+} + vehicle, n=15; *Fgfr3*^{A385E/+} + vehicle, n=14; *Fgfr3*^{A385E/+} + BGJ398, n=14). *P<0.05 **P<0.01, ***P<0.001.NS Not significant by ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test and Student's unpaired t test.

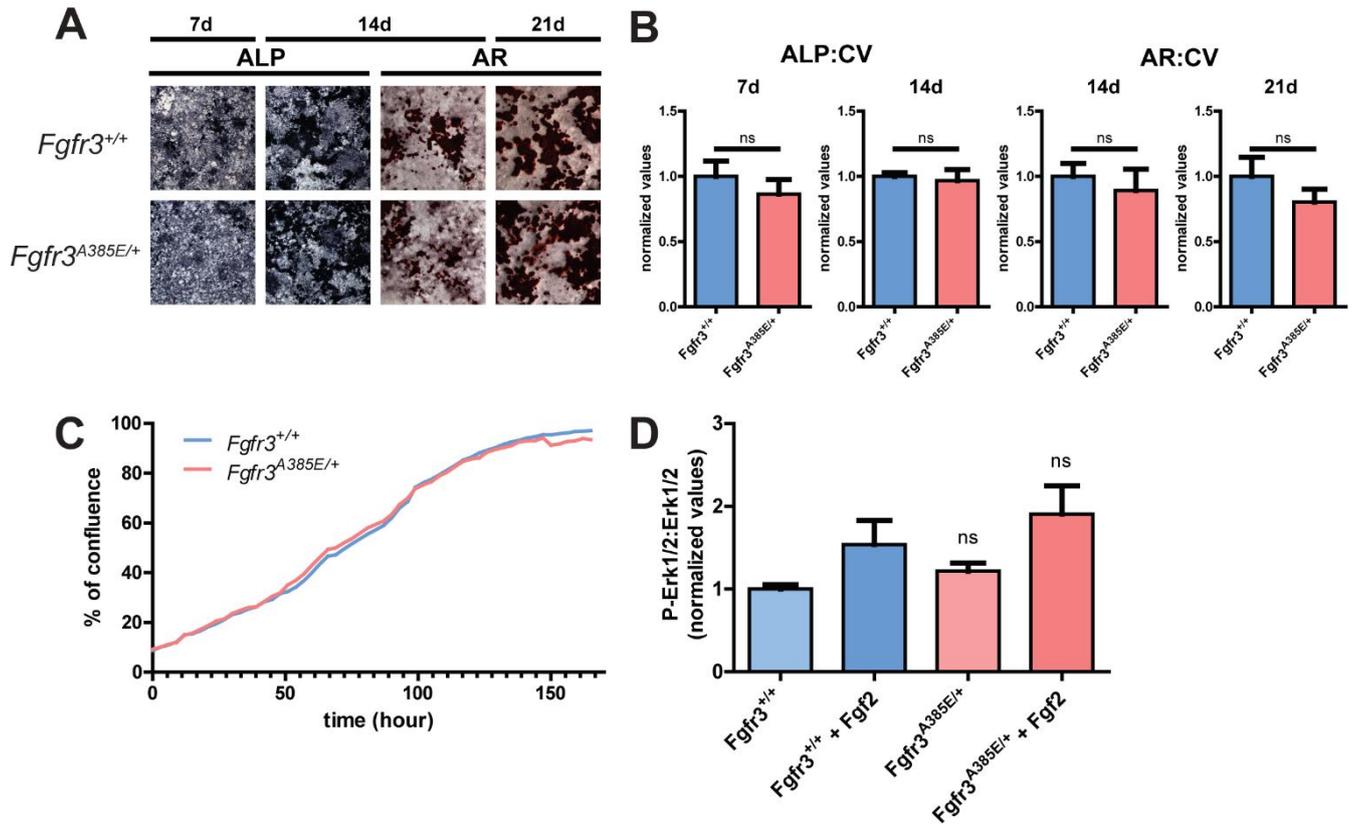
Supplementary Material:



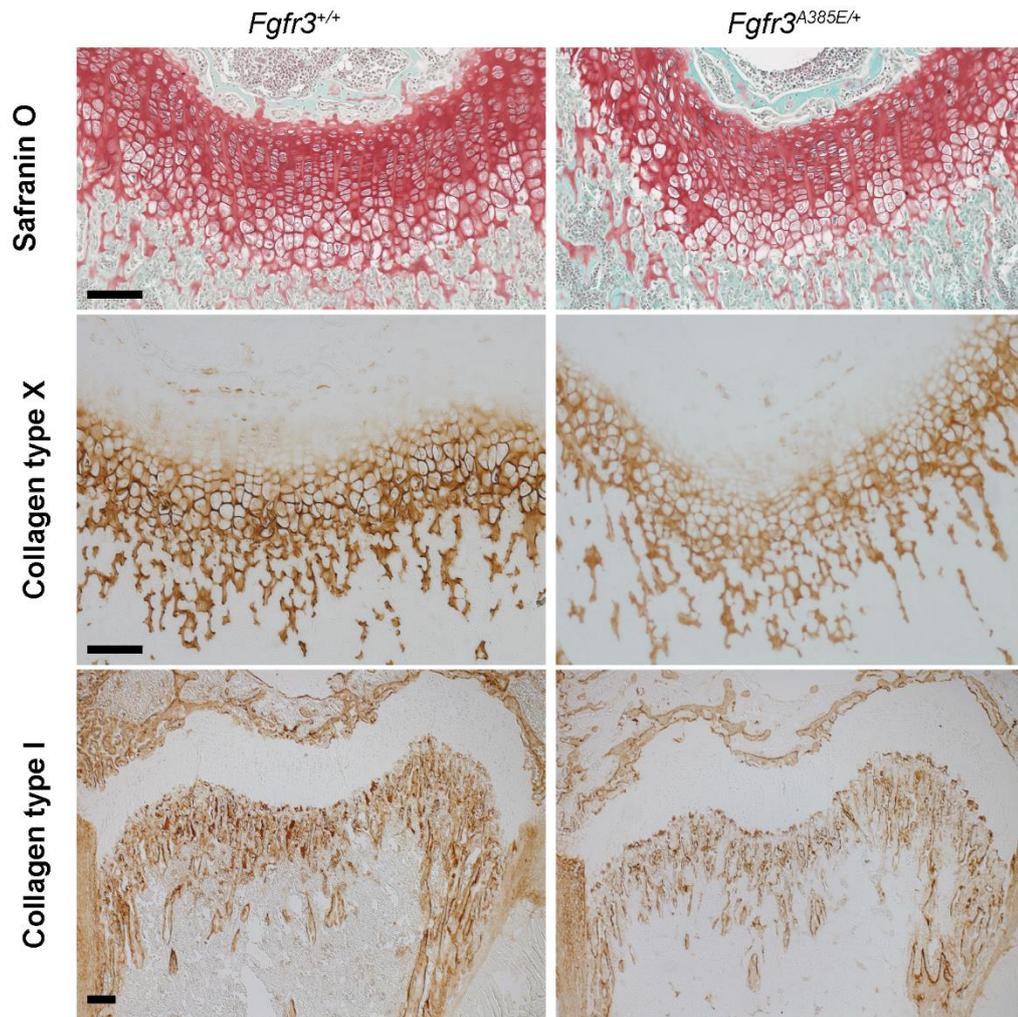
Supplementary 1: Measurements of the skull. Length and width of the skull of mice at P21, P90 and P180. (P21: *Fgfr3*^{+/+}, n = 11; *Fgfr3*^{A385E/+} n = 10; P90: *Fgfr3*^{+/+}, n = 17; *Fgfr3*^{A385E/+} n = 18; P180: *Fgfr3*^{+/+}, n = 10; *Fgfr3*^{A385E/+} n = 12). NS. Student's unpaired t test.



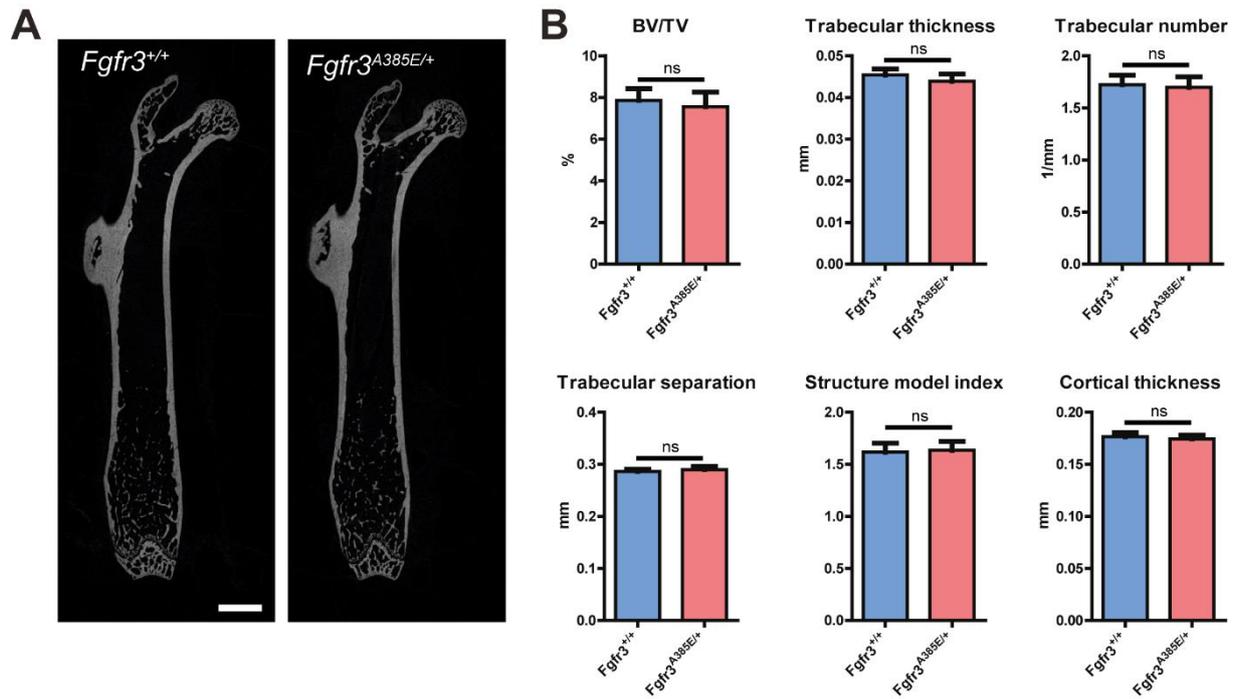
Supplementary 2: Morphometric analysis of the skull. 3D rendering (heat map) of shape differences between *Fgfr3*^{+/+}, and *Fgfr3*^{A385E/A385E} for the skull and the mandible (studied separately) at P21. Skull shape of *Fgfr3*^{A385E/A385E} was significantly different from control (d=0.0141; P<0.05) and from *Fgfr3*^{A385E/+} (d=0.0153; P<0.05) at P21. Mandible shape of *Fgfr3*^{A385E/A385E} did not show significant difference from control (d=0.0117, NS) and from *Fgfr3*^{A385E/+} (d=0.0121; NS).



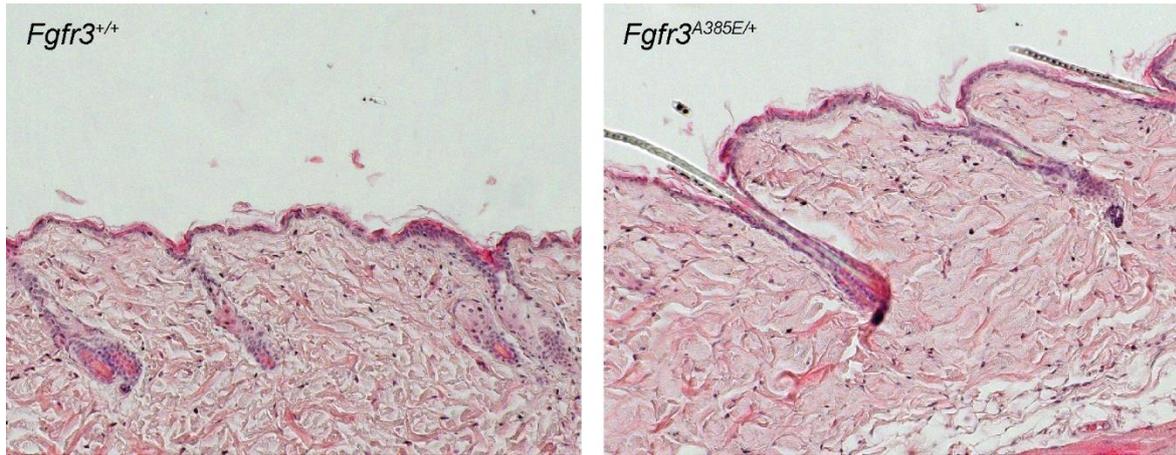
Supplementary 3: Calvarial osteoblast culture. **A.** Alkaline phosphatase activity (ALP) and Alizarin Red (AR) staining of osteoblasts isolated from calvaria of *Fgfr3*^{+/+}, and *Fgfr3*^{A385E/A385E} (7 days: *Fgfr3*^{+/+}, n = 6; *Fgfr3*^{A385E/+} n = 5; 14-21 days: *Fgfr3*^{+/+}, n = 9; *Fgfr3*^{A385E/+}, n = 8). NS. Student's unpaired t test. **B.** Quantification of ALP and AR normalized with Crystal violet staining (CV). **C.** Osteoblast proliferation was assessed using Incucyte cell imaging system. **D.** Quantification of P-Erk1/2:Erk1/2 ratio. n = 5 independent experiments. ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test. NS. Not significant.



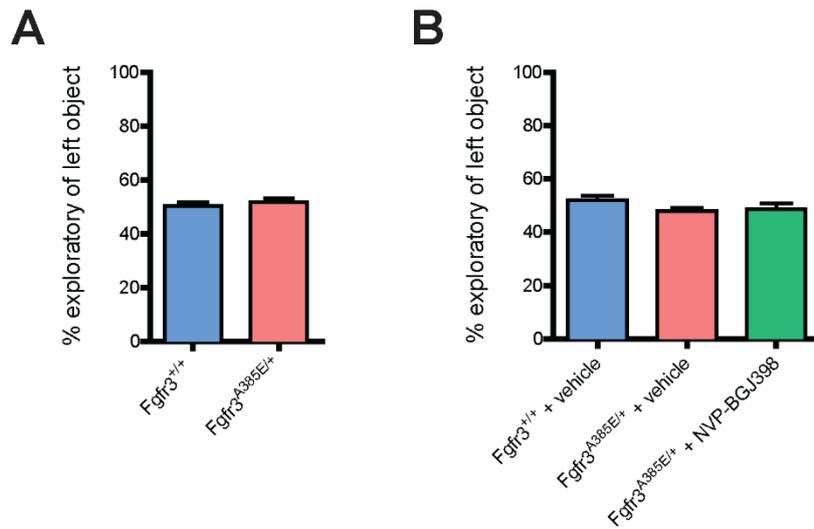
Supplementary 4: Histological analysis of femoral distal growth plate. Representative safranin O staining (upper panel) of *Fgfr3*^{+/+} (n = 6), *Fgfr3*^{A385E/+} (n=5) and Collagen type X and Collagen type I immunostaining. Scale bar 100µm.



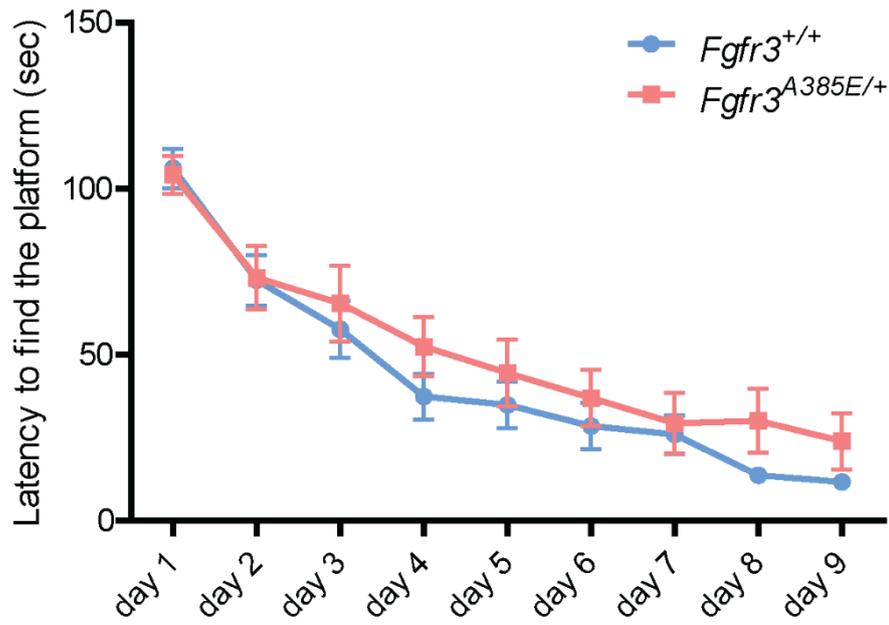
Supplementary 5: μ CT scan of femurs. **A** Representative μ CT scan performed on 3 months old *Fgfr3*^{A385E/+} (n = 9) and *Fgfr3*^{+/+} (n = 9) male femurs. **B.** Bar graphs show bone volume (BV/TV), Trabecular thickness, Trabecular number, Trabecular separation, Structure model index and Cortical Thickness. Student's unpaired t test. NS. Not significant.



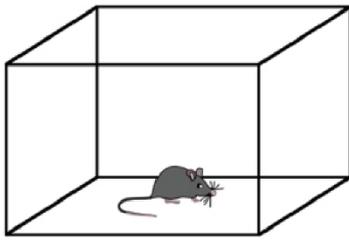
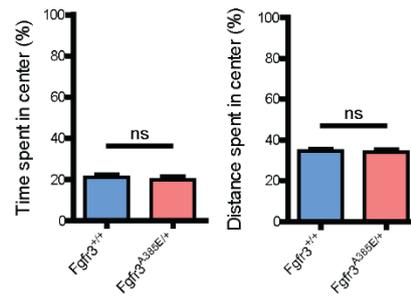
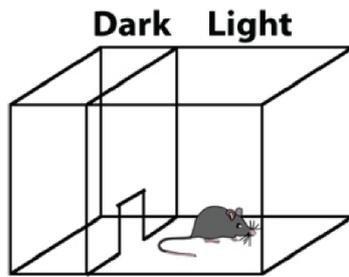
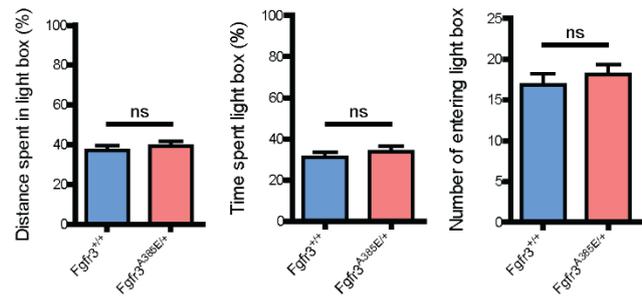
Supplementary 6: Skin mouse analysis. Hematoxylin and Eosin staining of *Fgfr3*^{A385E/+} mouse skin (n=4) and *Fgfr3*^{+/+} (n=4) at 10 week-of age.



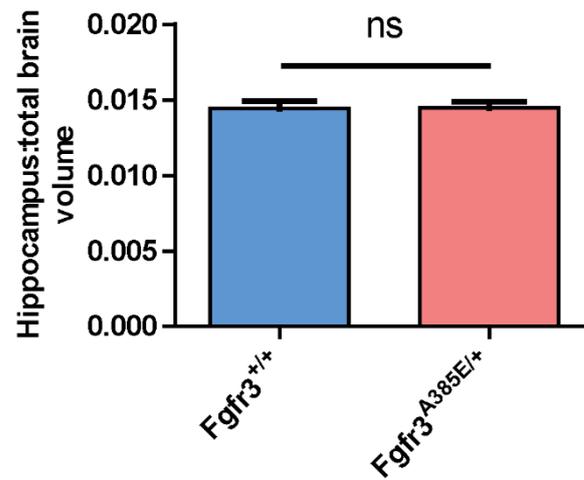
Supplementary 7: NOR behavior training recording. **A.** Percentage of exploration of both object measured during training phase of NOR (fig 4A). Animals were equally exploring the two similar objects (*Fgfr3*^{+/+}, n=17; *Fgfr3*^{A385E/+}, n=14). **B.** Percentage of exploration of both object measured during training phase of NOR after 7 days of BGJ398 injection (fig 4F). Animals were equally exploring the two similar objects (*Fgfr3*^{+/+} + vehicle, n=15; *Fgfr3*^{A385E/+} + vehicle, n=14; *Fgfr3*^{A385E/+} + BGJ398, n=14). ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test Student's unpaired t test. NS. Not significant.



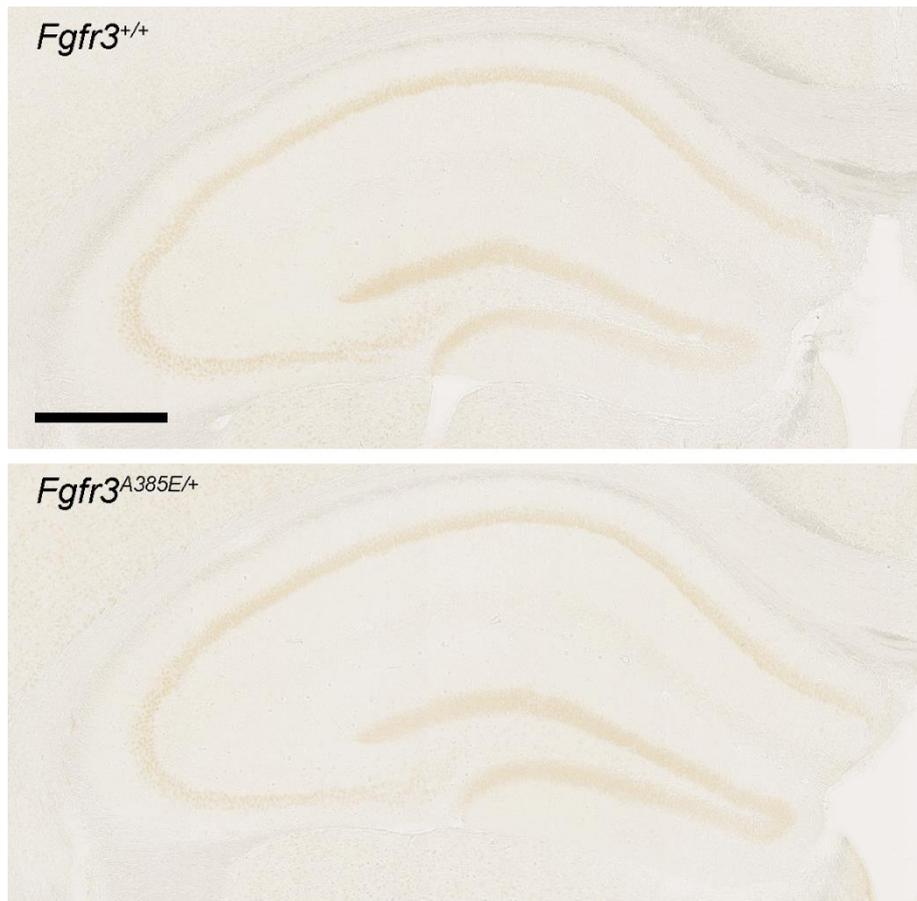
Supplementary 8: Morris Water Maze behavior tests. Test performed at 4 month-old animals. (*Fgfr3*^{+/+}, n=17; *Fgfr3*^{A385E/+}, n=14) during the 9 days of the test Student's unpaired t test. NS. Not significant.

A**Open Field Test****B****Dark/Light Test**

Supplementary 9: Anxiety assessment in 4 months old animals. A. Open field performed in *Fgfr3*^{+/+}, n=17 and *Fgfr3*^{A385E/+}, n=14. **B.** Light-to-Dark Transition test performed in *Fgfr3*^{+/+}, n=17; *Fgfr3*^{A385E/+}, n=14. Student's unpaired t test. NS. Not significant.



Supplementary 10: Hippocampal volume measurement. Measurements performed on brain MRI images of 4 months old animals. Hippocampal volume is normalized on total brain volume. (*Fgfr3*^{+/+}, n = 5; *Fgfr3*^{A385E/+}, n = 7). Student's unpaired t test. NS. Not significant.



Supplementary 11: Apoptosis assessment in 4 months old mice hippocampus. Representative Apoptag (TUNEL) staining performed on 6 consecutive hippocampus slides per individual (*Fgfr3*^{+/+}, n=6; *Fgfr3*^{A385E/+}, n=6). Scale bar 500 μ m.

Supplementary Table 1: Percentage of FGFR3 glycosylated forms detected in HEK293 transfected cells.

FGFR3	Fgf2	130 Kda (%)	115 Kda (%)	105 Kda (%)
Control	-	39,0	33,8	27,1
	+	43,9	30,7	25,4
Ala391Glu	-	45,2	43,6	11,2
	+	44,6	43,9	11,5
Gly380Arg	-	29,8	40,3	29,8
	+	29,8	40,9	29,2
Pro250Arg	-	42,9	45,6	11,5
	+	43,8	46,0	10,2
P-FGFR:FGFR3		130 Kda (%)	115 Kda (%)	105 Kda (%)
Control	-	47,2	35,4	17,4
	+	44,7	38,3	17,0
Ala391Glu	-	57,8	26,1	16,1
	+	61,5	22,6	15,9
Gly380Arg	-	55,2	30,1	14,7
	+	62,4	25,7	11,9
Pro250Arg	-	47,1	38,0	14,8
	+	50,8	34,2	15,0

Supplementary Table 2: List of primers.

name	sequence 5'-3'	comment
Ef	GCTCCCCTTAAGCGACAGGTAAC	genotyping <i>Fgfr3</i> ^{A385E/+} mice
Er	AAAGGGCTAGCTGCTCGGACTTCTAT A	
Lxr	GAAGTTATACTAGAGCGGCCGTTTAC	
9-10 F	GGAGGAGCTGATGGAAACTG	Osteoblast and hippocampus sequencing
9-10 R	AACATTGGCCAGAACAGGAC	
OrDNA_seq 1	GGCGTGACGGTGGGAGGTCT	FGFR3 cDNA sequencing
OrDNA_seq 2	GTGCCCTCGGAGCGTGCCTG	
OrDNA_seq 3	CAGCCCCACATCCAGTGGCTC	
OrDNA_seq 4	TGCTTCGGCCAGGTGGTCATG	
OrDNA_seq 5	GTCCTGCTCTGGGAGATCTTC	
OrDNA_seq 6	GCTGCTCTGCAACGGTCTCCT	
OrDNA_seq 7	AAACTGGACCTGTATATTTGT	
OrDNA_seq 8	GTAAGTTACTGGGCCCTGAG	

Supplementary Table 3: Procrustes distances obtained for morphometric analysis of skulls.

Skull		
P21	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/A385E}
	<i>Fgfr3</i> ^{+/+}	0.0148 (0.940)
	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	0.0141 (0.0171)
	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	0.0153 (0.0165)
P90	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/A385E}
	<i>Fgfr3</i> ^{+/+}	0.0136 (0.4746)
	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	0.0110 (0.9791)
	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	0.0110 (0.9791)
P180	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/A385E}
	<i>Fgfr3</i> ^{+/+}	0.0136 (0.5337)
	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	0.0149 (0.2335)
	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	0.0173 (0.0780)
Mandible		
P21	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/A385E}
	<i>Fgfr3</i> ^{+/+}	0.0159 (0.0069)
	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	0.0117 (0.0972)
	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	0.0121 (0.3203)
P90	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/A385E}
	<i>Fgfr3</i> ^{+/+}	0.0191 (0.3838)
	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	0.0102 (0.3460)
	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	0.0162 (0.3958)
P180	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/A385E}
	<i>Fgfr3</i> ^{+/+}	0.0176 (0.4368)
	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	0.0123 (0.1850)
	<i>Fgfr3</i> ^{A385E/+}	0.0193 (0.0978)

Preliminary Data: In vivo evaluation of “TransCon CNP” in *Fgfr3*
mouse model mimicking achondroplasia (*Fgfr3*^{Y367C/+})

Nabil Kaci, Maxence Cornille, Laurence Legeai-Mallet

INSERM U1163, Institut Imagine, Hôpital Necker Enfants-Malades; Université Paris-Descartes, Paris, France

Introduction

In 1994, gain-of-function mutations in the Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) were identified to account for a spectrum of chondrodysplasias, including the most common type of short-limb disproportionate dwarfism, Achondroplasia (ACH) (Baujat et al., 2008; Rousseau et al., 1994; Shiang et al., 1994). Anomalies in ACH cartilage was shown (Legeai-Mallet et al., 1998), and ACH mouse models have been generated to study the phenomenon, including the *Fgfr3*^{Y367C/+} mouse model that recapitulates the human ACH phenotype with anomalies in endochondral and membranous ossification, a delayed bone age, an inner ear defect and a hearing loss (Di Rocco et al., 2014; Mugniery et al., 2012; Pannier et al., 2009). In detail, the dwarf mouse model (*Fgfr3*^{Y367C/+}) is characterized by a disproportionate short stature and a growth deficit affecting both endochondral and membranous ossification. An impressive domed skull and a small snout with an anterior cross-bite in *Fgfr3*^{Y367C/+} mice is observed, similar to the prominent forehead (frontal bossing), midface hypoplasia and prognathism observed in achondroplasia. Studying the skull base, a loss of spheno-occipital synchondrosis, is evident, as also observed by MRI in achondroplasia (Baujat et al., 2008; Komla-Ebri et al., 2016). Medullary and upper spinal cord compression due to reduced size of the foramen magnum was observed by MRI in *Fgfr3*^{Y367C/+} mice confirming cervical vertebrae anomalies (Di Rocco et al., 2014). These signs of cervicomedullary compression due to foramen magnum stenosis are similar to those observed in ACH children.

Here, we developed a collaborative project with the company Ascendis (copenhagen..etc) dedicated to evaluate the efficacy of TransCon-CNP on bone growth.

Previouly, our team demonstrated that an analog of type C-natriuretic peptide (CNP) BMN111 was able to increase skeletal growth in *Fgfr3*^{Y367C/+} mouse model, suggesting a possible therapeutic strategy for treating ACH with CNP (Legeai-Mallet, 2016; Lorget et al., 2012; Savarirayan et al., 2019; Wendt et al., 2015).

In this project, we used TransCon-CNP, it is a CNP analog peptide (CNP-38) bound to a carrier via a TransCon linker. The carrier is comprised of a branched 4x10 kDa methoxypolyethylene glycol. CNP-38 is identical to the last 38 amino acids of the full length human CNP and is essentially inactive when bound to the carrier. TransCon-CNP is designed to initiate autocleavage (release of active CNP from the prodrug) at physiological pH and temperature (Breinholt et al., 2019). Here, we evaluated the effect of TransCon-CNP on the craniofacial phenotype of *Fgfr3*^{Y367C/+} mice.

Material and methods

Study approval

Experimental animal procedures and protocols were approved by the French Animal Care and Use Committee.

***Fgfr3*^{Y367C/+} mouse model**

Fgfr3^{Y367C/+} mice were described previously (Pannier et al., 2009). The *Fgfr3*^{Y367C/+} mice were generated under C57BL/6J background by crossing CMV-Cre mice to mice exhibiting the germline transmission of the Y367C mutation corresponding to the human Y373C (Thanatophoric Dysplasia) mutation. The Y367C mutation was introduced into exon 9 of the mouse *Fgfr3* gene along with a NEO cassette flanked by LoxP recombination sites. Due to the CMV promoter, the expression of the *Fgfr3*^{Y367C/+} is ubiquitous. Breeding cohorts consisted of both *Fgfr3*^{Y367C/+} and *Fgfr3*^{+/+} wild-type (WT) littermates.

Genotyping

Genotype was confirmed by Genomic DNA isolated from tail tips by proteinase K digestion and extracted with NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Germany) according to the manufacturer's instructions. PCR was performed using primers as previously described (Pannier et al., 2009).

Compound and vehicle

TransCon CNP 0.69 mg CNP-38/mL formulated in buffer (10mM succinate, 46 g/L mannitol, pH 4.0) was stored at -80°C until use. Solution was thawed overnight at 4°C, mixed thoroughly

by overturning (10x) and brought to room temperature for handling. Vehicle buffer acted as control treatment and was handled as described above for TransCon CNP.

Treatment groups

Animals were tattooed and assigned to treatment groups within litters at 1 days of age. The group 1 consists of 10 *Fgfr3^{+/+}* mice, the group 2 consists of 9 *Fgfr3^{Y367C/+}* mice treated with vehicle and the group 3 consists of 13 *Fgfr3^{Y367C/+}* mice treated with TransCon CNP at 5.6 mg/kg/day. TransCon CNP was administered daily via subcutaneous injection for 15 days. Dosing was initiated immediately at day 1 after birth. Injections was administered into the upper right, upper left, lower right or lower left quadrant of the back. The location of the injection site was rotated for each injection. Body weights were collected every day. Animals exhibiting a $\geq 20\%$ decrease in body weight, from the last recorded body weight, was euthanized immediately.

Euthanasia

All mice were humanely euthanized with carbon dioxide. Euthanasia was performed in accordance with accepted French national and European legislation.

Micro-computed-tomography (μ CT) analysis of skull synchondroses

The heads of all mice were isolated, and skin was stripped before placed in ethanol 70% at 4°C. μ CT scans of the skulls were acquired on the Skyscan-1172 (Bruker) with the following parameters: 18.53 μ m resolution, 100ms exposure, 80V, 100 μ A, 0.5° rotation step. The μ CT data were analyzed using OsiriX software (Pixmeo), offering post processing techniques in 2D and 3D.

Synchondroses closure assessment was done following Madeline and Elster classification (Madeline and Elster, 1995). Assessment of the grade of closure of the SOS (spheno-occipital synchondrosis), IOS (inter occipital synchondroses) and ISS (inter sphenoidal synchondrosis) was performed. Grade I was given when borders of synchondroses were completely separated, Grade II correspond to clear separation of the synchondrosis seen along most sections with indistinct areas or suspicious for bony bridging, Grade III corresponded to synchondroses showing bony bridge between the two borders, Grade IV correspond to

completely fused synchondroses with remnants of margin (cartilage) and Grade V correspond to totally fused synchondroses.

Statistics

Comparison of growth between groups were conducted by means of Mann-Whitney test. Proportional distribution of grading of synchondrosis was compared between groups by means of Fisher's exact test. Level of significance set to $P < 0.05$.

Results

The μ CT analyses of the *Fgfr3*^{Y367C/+} mice treated with TransCon CNP also showed a mild modification of the shape of the skull, the domed macrocephalic cranium seemed to be less pronounced (Fig **Erreur ! Source du renvoi introuvable.1**). We did not observe improvement of the malocclusion or modification of alteration of the skull vault in the treated mice with TransCon CNP compared to vehicle treated mice.

An effect on synchondroses closure was evident, where closure was significantly prevented by the treatment, with the IOS showing grade III opening in 67% (8/12), 17% of Grade IV (2/12) and 17% of Grade V (2/12) in TransCon CNP-treated *Fgfr3*^{Y367C/+}, as compared to vehicle treated *Fgfr3*^{Y367C/+} mice that showed 100% of Grade V (9/9) (Fig 2B-D).

Other synchondroses were less impacted; for the ISS 8% of treated mice showed Grade IV (1/12) and 92% showed Grade V (11/12), while vehicle group showed 11% of Grade IV (1/9) and 89% of Grade V (8/9), and for SOS the treated mice exhibited 100% of Grade V (12/12), while vehicle group showed 11% of Grade IV (1/9) and 89% of Grade V (8/9). All *Fgfr3*^{+/+} animals showed Grade I opening of all synchondroses (Fig 2A).

The μ CT analysis revealed a shape-change of the foramen magnum in treated mice, likely resulting from the change in synchondroses closure (Fig 3A), however not changing the area of the foramen magnum significantly (Fig 3B) (NS, Mann-Whitney test).

In conclusion, the TransCon CNP (5.6 mg/kg) prevents the premature fusion of SOS in some cases and IOS synchondroses in a large number of treated *Fgfr3*^{Y367C/+} mice and slightly modifies the shape of the foramen magnum.

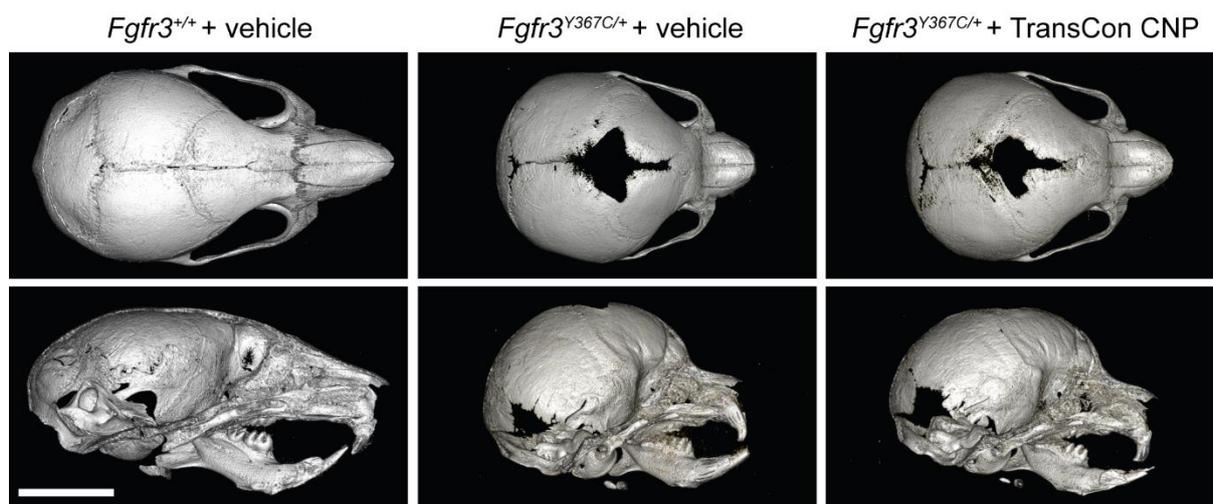


Figure 1: Three-dimensional representation of the μ CT scanings of the skulls of wild-type *Fgfr3*^{+/+} mice or *Fgfr3*^{Y367C/+} mice treated with vehicle or TransCon CNP.

Representative images were a dome-shaped macrocephalic cranium with an impressive alteration of the vault and malocclusion was evident in *Fgfr3*^{Y367C/+} mice compared to wild-type *Fgfr3*^{+/+} littermates. The macrocephalic aspect of the skull of the treated *Fgfr3*^{Y367C/+} mice was slightly modified. (bar= 5 mm).

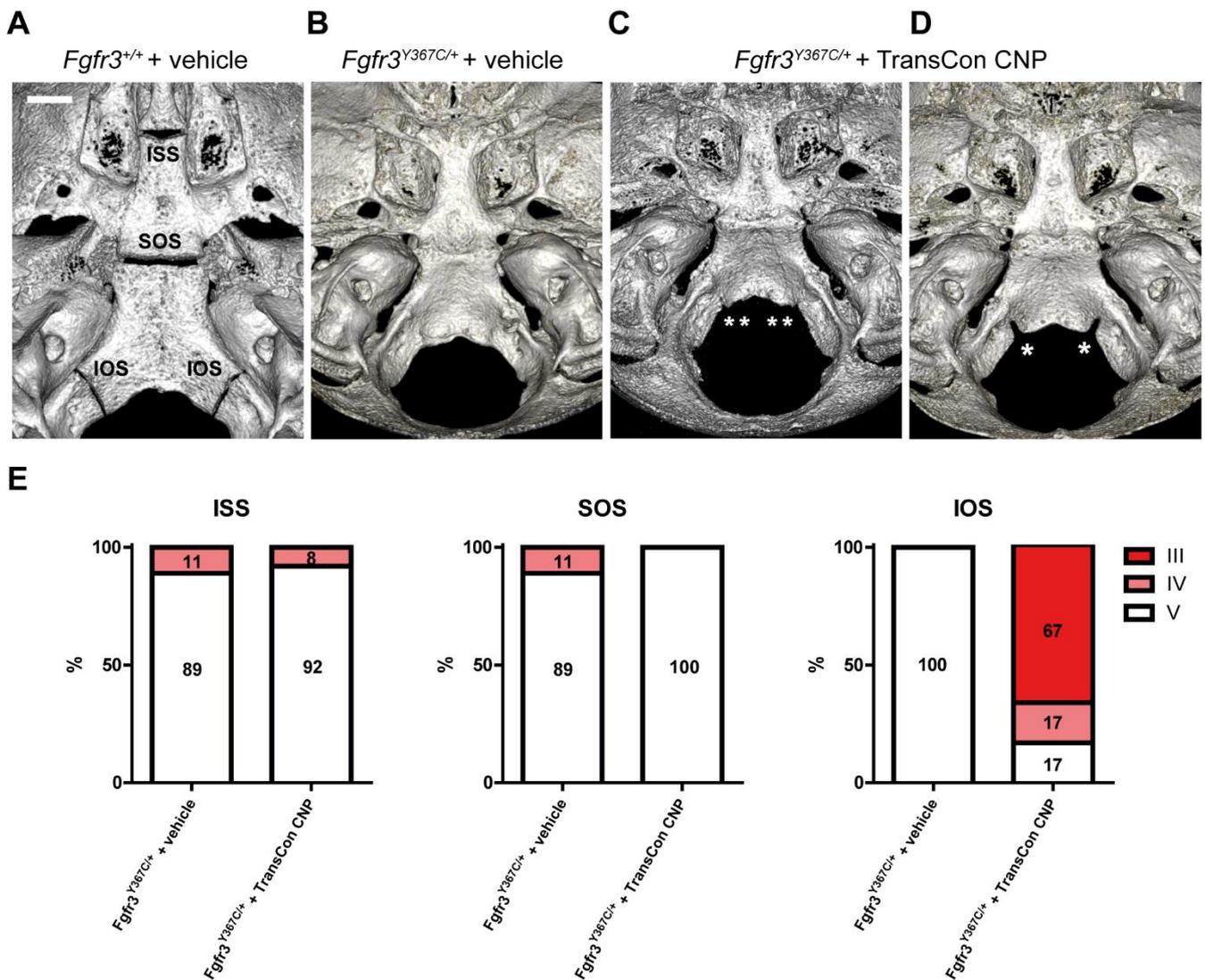


Figure 2: The impact of TransCon CNP treatment on the cranial base synchondroses in *Fgfr3*^{Y367C/+} mice. (A) Representative picture of the grade I (*Fgfr3*^{+/+} mice), the SOS (sphenoccipital synchondrosis), IOS (inter occipital synchondroses) and ISS (inter sphenoidal synchondrosis) were visible. (B) Representative picture of grade V (*Fgfr3*^{Y367C/+} mice treated with vehicle) and (C) grade IV and (D) grade III (*Fgfr3*^{Y367C/+} mice treated with TransCon CNP). The stars indicate the presence of open synchondroses (* corresponding to Grade III and ** corresponding to grade IV). (bar= 1 mm). (E) Histograms representing the distribution of the various patterns of the closure of the synchondroses namely Grades (III, IV, V) as defined by Madeline and Elster (1995) observed in *Fgfr3*^{Y367C/+} mice treated with vehicle or TransCon CNP. Distribution is significantly different for IOS grading (P=0.0002, Fischer's exact test).

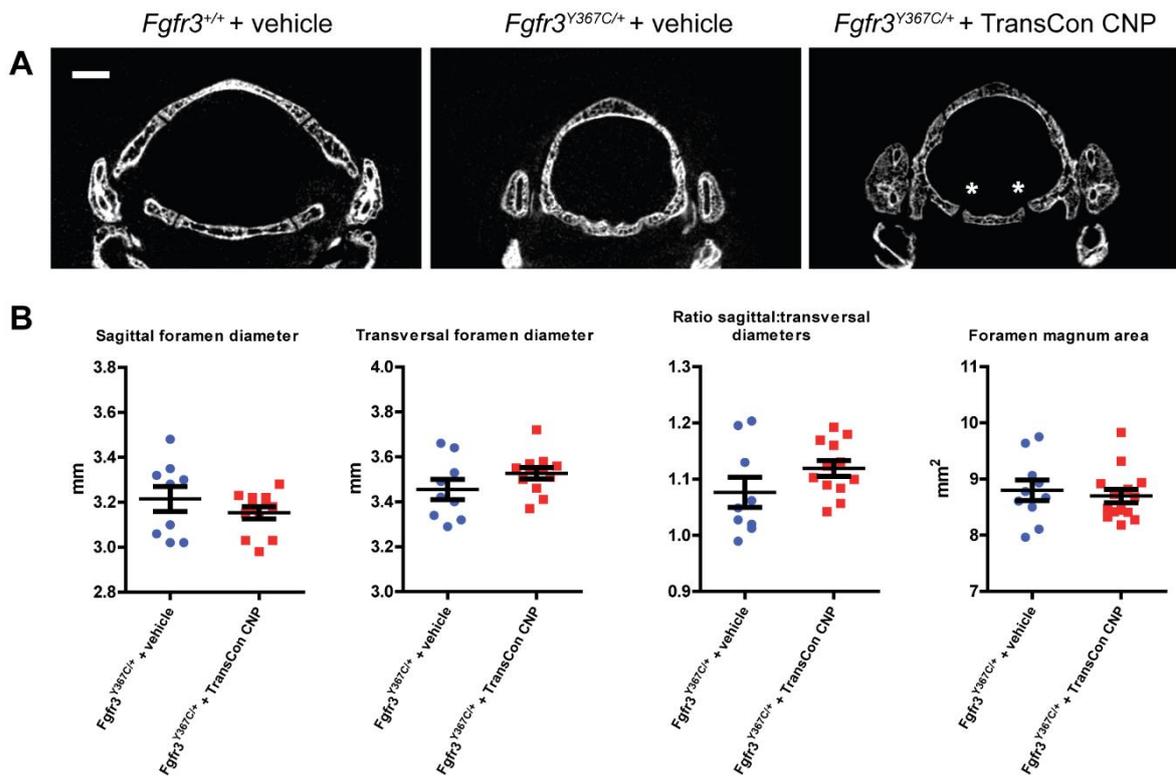


Figure 3: The appearance of the foramen magnum in *Fgfr3*^{Y367C/+} mice after TransCon CNP treatment. (A) In wild-type condition (*Fgfr3*^{+/+} mice) the foramen magnum was ovoid whereas in vehicle treated *Fgfr3*^{Y367C/+} mice the foramen magnum was rounder. The TransCon CNP treatment slightly modified the shape of the foramen magnum. The white stars show the open synchondroses (IOS) in a TransCon CNP-treated *Fgfr3*^{Y367C/+} mouse. (bar= 1 mm). (B) The μ CT analyses of the *Fgfr3*^{Y367C/+} mice treated with TransCon CNP also showed a mild modification of the shape of the skull, the domed macrocephalic cranium seemed to be less pronounced. We did not observe improvement of the malocclusion or modification of alteration of the skull vault in the treated mice with TransCon CNP compared to vehicle treated mice.

References

- Baujat, G., Legeai-Mallet, L., Finidori, G., Cormier-Daire, V., Le Merrer, M., 2008. Achondroplasia. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 22, 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2007.12.008>
- Breinholt, V.M., Rasmussen, C.E., Mygind, P.H., Kjølgaard-Hansen, M., Faltinger, F., Bernhard, A., Zettler, J., Hersel, U., 2019. TransCon CNP, a sustained-release C-Type Natriuretic Peptide prodrug, a potentially safe and efficacious new therapeutic modality for the treatment of comorbidities associated with FGFR3-related skeletal dysplasias. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* <https://doi.org/10.1124/jpet.119.258251>
- Di Rocco, F., Biosse Duplan, M., Heuzé, Y., Kaci, N., Komla-Ebri, D., Munnich, A., Mugniery, E., Benoist-Lasselin, C., Legeai-Mallet, L., 2014. FGFR3 mutation causes abnormal membranous ossification in achondroplasia. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2914–2925. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu004>
- Komla-Ebri, D., Dambroise, E., Kramer, I., Benoist-Lasselin, C., Kaci, N., Le Gall, C., Martin, L., Busca, P., Barbault, F., Graus-Porta, D., Munnich, A., Kneissel, M., Di Rocco, F., Biosse-Duplan, M., Legeai-Mallet, L., 2016. Tyrosine kinase inhibitor NVP-BGJ398 functionally improves FGFR3-related dwarfism in mouse model. *J. Clin. Invest.* 126, 1871–1884. <https://doi.org/10.1172/JCI83926>
- Legeai-Mallet, L., 2016. C-Type Natriuretic Peptide Analog as Therapy for Achondroplasia. *Endocr. Dev.* 30, 98–105. <https://doi.org/10.1159/000439334>
- Legeai-Mallet, L., Benoist-Lasselin, C., Delezoide, A.-L., Munnich, A., Bonaventure, J., 1998. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Mutations Promote Apoptosis but Do Not Alter Chondrocyte Proliferation in Thanatophoric Dysplasia. *J. Biol. Chem.* 273, 13007–13014. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.13007>
- Lorget, F., Kaci, N., Peng, J., Benoist-Lasselin, C., Mugniery, E., Oppeneer, T., Wendt, D.J., Bell, S.M., Bullens, S., Bunting, S., Tsuruda, L.S., O'Neill, C.A., Di Rocco, F., Munnich, A., Legeai-Mallet, L., 2012. Evaluation of the Therapeutic Potential of a CNP Analog in a Fgfr3 Mouse Model Recapitulating Achondroplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 1108–1114. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.10.014>
- Madeline, L.A., Elster, A.D., 1995. Suture closure in the human chondrocranium: CT assessment. *Radiology* 196, 747–756. <https://doi.org/10.1148/radiology.196.3.7644639>
- Mugniery, E., Dacquin, R., Marty, C., Benoist-Lasselin, C., Vernejoul, M.-C. de, Jurdic, P., Munnich, A., Geoffroy, V., Legeai-Mallet, L., 2012. An activating Fgfr3 mutation affects trabecular bone formation via a paracrine mechanism during growth. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2503–2513. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds065>
- Pannier, S., Couloigner, V., Messaddeq, N., Elmaleh-Bergès, M., Munnich, A., Romand, R., Legeai-Mallet, L., 2009. Activating Fgfr3 Y367C mutation causes hearing loss and inner ear defect in a mouse model of chondrodysplasia. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1792, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.11.010>
- Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeai-Mallet, L., Pelet, A., Rozet, J.M., Maroteaux, P., Le Merrer, M., Munnich, A., 1994. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* 371, 252–254. <https://doi.org/10.1038/371252a0>
- Savarirayan, R., Irving, M., Bacino, C.A., Bostwick, B., Charrow, J., Cormier-Daire, V., Le Quan Sang, K.-H., Dickson, P., Harmatz, P., Phillips, J., Owen, N., Cherukuri, A., Jayaram, K., Jeha, G.S., Larimore, K., Chan, M.-L., Huntsman Labeled, A., Day, J., Hoover-Fong, J., 2019. C-Type Natriuretic Peptide Analogue Therapy in Children

- with Achondroplasia. *N. Engl. J. Med.* 381, 25–35.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1813446>
- Shiang, R., Thompson, L.M., Zhu, Y.-Z., Church, D.M., Fielder, T.J., Bocian, M., Winokur, S.T., Wasmuth, J.J., 1994. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 78, 335–342.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90302-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90302-6)
- Wendt, D.J., Dvorak-Ewell, M., Bullens, S., Lorget, F., Bell, S.M., Peng, J., Castillo, S., Aoyagi-Scharber, M., O'Neill, C.A., Krejci, P., Wilcox, W.R., Rimoin, D.L., Bunting, S., 2015. Neutral endopeptidase-resistant C-type natriuretic peptide variant represents a new therapeutic approach for treatment of fibroblast growth factor receptor 3-related dwarfism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 353, 132–149.
<https://doi.org/10.1124/jpet.114.218560>

Discussion

Phénotype squelettique du CAN

Le syndrome de Crouzon avec acanthosis nigricans est une craniosynostose syndromique rare. Il se caractérise par une fusion des sutures coronales, parfois accompagnée de la fusion d'autres sutures, par une hypoplasie du maxillaire, due à une fusion des synchondroses de la base du crâne et par la présence d'un acanthosis nigricans. Le CAN est dû à une mutation FGFR3 spécifique localisée en position p.Ala391Glu dans le domaine transmembranaire de la protéine (Arnaud-López et al., 2007; Di Rocco et al., 2011).

Dans ce projet de thèse, nous avons généré et étudié le premier modèle murin pour le syndrome CAN. Les souris CAN expriment de manière ubiquitaire à l'état hétérozygote la mutation p.Ala385Glu, équivalente à la mutation p.Ala391Glu humaine. Les analyses macroscopiques, radiologiques, histologiques et les scanners μ CT montrent que les souris CAN *Fgfr3*^{A385E/+} ne présentent pas de craniosténoses. Nous n'avons pas observé de fusion des sutures crâniennes, ni de fusion des synchondroses de la base du crâne. Cette absence de phénotype squelettique rappelle les résultats obtenus dans un autre modèle murin *Fgfr3* exprimant une mutation responsable du syndrome de Muenke. Les souris Muenke hétérozygotes *Fgfr3*^{P244R/+} pour la mutation p.Pro244Arg présentaient un phénotype craniofacial léger avec une pénétrance incomplète (seuls certaines souris mâles présentaient un phénotype, aucune femelle n'était affectée). Les animaux homozygotes *Fgfr3*^{P244R/P244R} présentaient une hypoplasie du maxillaire accompagnée d'une fusion partielle des synchondroses ISS et SOS (formation de ponts osseux). Cependant, les souris homozygotes *Fgfr3*^{P244R/P244R} ne présentaient pas de fusion des sutures crâniennes (Laurita et al., 2011; Mansour et al., 2013; Twigg et al., 2008).

En ce qui concerne les souris CAN, une légère modification de la morphologie crânienne fut observée à l'aide d'analyses morphométriques. Les phénotypes craniofaciaux légers observés chez les souris CAN et Muenke peuvent être comparés avec les modèles murins d'achondroplasie (*Fgfr3*^{G369C/+}, *Fgfr3*^{G380R/+}, *Fgfr3*^{Y367C/+}) présentant une fusion prématurée des synchondroses et, dans des cas rares, une fusion partielle des sutures coronales (observée dans le cas de la souris *Fgfr3*^{Y367C/+}) (Di Rocco et al., 2014; Pannier et al., 2009). Il est intéressant de mentionner que les différents modèles murins invalidés pour FGFR3 qui ne montrent pas d'anomalie craniofaciale (Colvin et al., 1996; Deng et al., 1996; Su et al., 2010), tandis que

l'invalidation de FGFR3 chez l'Homme (syndrome CATSHL) conduit à la formation des os wormiens au niveau de la suture. De part ces différents résultats, FGFR3 ne semble pas essentiel au développement et au maintien de la suture crânienne chez la souris.

Au niveau des os longs, les souris CAN ne présentent pas d'anomalie du squelette, que ce soit dans les souris hétérozygotes ou homozygotes. Le modèle CAN ne montre pas de modification de la plaque de croissance des os longs, et ne présente pas de modification de l'os trabéculaire ou cortical (scanner μ CT). On peut donc conclure que la mutation CAN chez la souris n'affecte pas ni la chondrogenèse ni l'ostéogenèse au niveau des membres. Dans le cas du modèle Muenke *Fgfr3*^{P244R/+}, il a été montré une diminution de l'épaisseur et de la densité de l'os trabéculaire et corticale, sans modification de la croissance du squelette. Le modèle *Fgfr3*^{P244R/+} semble présenter, au niveau des membres, une ostéogenèse réduite tandis que la chondrogenèse n'est pas affectée. En revanche le phénotype squelettique des modèles de chondrodysplasie est différent, les modèles murins d'achondroplasie présentent tous une diminution de la chondrogenèse. Le modèle *Fgfr3*^{Y367C/+} avec une expression ubiquitaire présente une diminution de la densité osseuse au niveau des os longs, tandis qu'une expression spécifique au niveau des ostéoblastes grâce à une Cre recombinase, exprimée sous un promoteur pour le collagène de type I, ne montre quant à elle pas de phénotype dans l'ossification endochondrale et membranaire (Mugniery et al., 2012). L'impact de la mutation *Fgfr3*^{Y367C/+} semble se faire principalement sur le cartilage. L'effet sur l'ossification se fait lui aussi via le cartilage par un mécanisme paracrine. Enfin, les modèles invalidés pour FGFR3 présentent une croissance accrue des os longs et de la colonne vertébrale, avec et une diminution de la densité osseuse (Colvin et al., 1996; Deng et al., 1996; Su et al., 2010). Dans les modèles murins de chondrodysplasie, une amplification de la chondrogenèse et une ostéogenèse réduite sont observés.

Les modèles de craniosynostoses CAN et Muenke ne présentent pas de fusion de suture, les modèles de nanisme *Fgfr3*^{G369C/+} et *Fgfr3*^{G380R/+} ne présentent pas de disproportion des membres, tandis que le modèle *Fgfr3*^{Y367C/+}, exprimant la mutation du TD, létale *in utero* ou à la naissance chez l'homme, est capable de dépasser l'âge de sevrage. On peut noter que le phénotype des différents modèles murins *Fgfr3* semble systématiquement moins sévère que les pathologies humaines liées à FGFR3.

L'impact de FGFR3 sur le développement du crâne et des os longs semble moins important chez la Souris qu'il ne l'est chez l'Homme. On peut émettre l'hypothèse que cette différence de phénotype des deux espèces provient d'une différence dans le rôle joué par FGFR3 et ses partenaires dans l'ossification endochondrale et membranaire.

Le rôle de FGFR3 dans le développement et la maintenance de la suture est aujourd'hui moins bien défini que son rôle au niveau du cartilage de croissance. De ces différentes observations, on peut cependant penser que, chez la Souris, FGFR3 n'est pas nécessaire au développement et au maintien de la suture crânienne, puisque la souris invalidée pour *Fgfr3* ne présente pas de phénotype craniofacial. Par ailleurs, son activation peut être suffisante pour promouvoir la fusion de la suture, comme cela est observé dans le modèle *Fgfr3*^{Y367C/+}. Dans le développement des os longs, FGFR3 est un régulateur négatif de la croissance osseuse. Il est nécessaire à la régulation de la différenciation chondrocytaire et agit indirectement sur l'ostéogenèse. Chez l'Homme, on peut émettre l'hypothèse que ce rôle varie. FGFR3 pourrait être nécessaire au développement et au maintien de la suture, puisque les patients pour le syndrome CATSHL (invalidation de FGFR3) présentent des os wormiens au niveau des sutures. En revanche, FGFR3 est nécessaire à la régulation de la chondrogenèse dans les os longs chez l'Homme et dans les modèles murins de chondrodysplasies.

Par ailleurs, il n'est pas rapporté d'anomalie notable au niveau de la base du crâne dans le cas de l'invalidation de FGFR3 chez l'Homme et la Souris. L'inactivation de FGFR3 induit une augmentation de la différenciation chondrocytaire des os longs, sans l'augmenter au niveau de la synchondrose. On peut émettre l'hypothèse que le rôle de FGFR3 dans l'ossification endochondrale diffère entre le cartilage de croissance des os longs et le cartilage de croissance de la synchondrose. FGFR3 serait alors davantage impliqué dans la régulation de la chondrogenèse des os longs, tandis que son rôle serait plus secondaire dans la synchondrose. Cette hypothèse est cependant à pondérer à la différence de nature du tissu, la croissance de la base du crâne étant dépendante de la pression exercée par la croissance du reste du crâne et du cerveau.

Les phénotypes observés pour les patients atteints de craniosynostoses associées à FGFR3 sont de sévérité extrêmement variable. Certains cas de CAN présentent un crâne en trèfle tandis que certains cas de Muenke présentent un phénotype léger (pas de fusion de suture). On peut donc émettre l'hypothèse que le signal FGFR3 dans les craniosynostoses est influencé

par des facteurs moléculaires aujourd'hui non identifiés et qui sont associés à un polymorphisme dans la population générale. Ces facteurs pourraient alors aggraver le phénotype ou, à l'inverse, auraient un effet protecteur. Cette hypothèse peut être appuyée par le fait que 80% des craniosynostoses n'ont pas de base moléculaire identifiée, et pourraient être associées à des polymorphismes inconnus d'autres gènes partenaires des FGF et FGFR. Des défauts de pénétrance sont parfois observés dans certains cas de Muenke au sein d'une même famille. On peut alors émettre l'hypothèse qu'une variabilité de régulation épigénétique de FGFR3 et ses partenaires soit liée à cette variabilité phénotypique.

Certains traits phénotypiques sont communs entre les syndromes des chondrodysplasies et des craniosynostoses. Au niveau du crâne, la fusion des synchondroses est retrouvée dans les chondrodysplasies et les craniosynostoses, et la fusion partielle des sutures est retrouvée dans certains cas d'achondroplasie et du nanisme thanatophore (TD). Au niveau du squelette axial et appendiculaire, la réduction de la distance interpédiculaire est retrouvée dans l'achondroplasie et dans certains cas de CAN, tandis qu'un retard de croissance staturo-pondérale est retrouvé chez certains patients CAN. Enfin, l'acanthosis nigricans a été rapporté dans des cas de SADDAN, d'achondroplasie et d'hypochondroplasie (Kumar et al., 2011; Mustafa et al., 2014; Van Esch and Fryns, 2004). Les différentes pathologies peuvent alors être regroupées au sein d'un long continuum phénotypique, allant de la TD létale aux cas de Muenke ne présentant pas de fusion de suture. Elles pourraient ainsi être considérées sous la forme d'un spectre phénotypique étendu de chondrodysplasie-craniosynostose associée à FGFR3, prenant compte des variabilités phénotypiques des différents syndromes, au niveau craniofacial et squelettique.

Les études de biologie moléculaire ont montré que dans les chondrodysplasies et les craniosynostoses, les mutations FGFR3 sont activatrices. Les deux types de pathologies sont associées à une suractivation du récepteur. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables des différents phénotypes n'ont jusqu'à présent pas été identifiées.

Les mutations augmentent l'activité du récepteur. Les travaux de Hristova et al. ont précédemment montré que la mutation CAN induisait une augmentation de la stabilité du dimère de FGFR3 et que la proportion de dimère était augmentée en absence et en présence de ligand FGF1 (Chen et al., 2013, 2011; Li et al., 2006). Nos résultats, ainsi que ceux de Gibbs et Legeai-Mallet (Gibbs and Legeai-Mallet, 2007), montrent que les mutations de FGFR3

modifient la modification post-traductionnelle du récepteur. Gibbs et Legeai-Mallet ont ainsi montré que la mutation p.Lys650Glu liée au TD augmentait la proportion de récepteurs FGFR3 peu glycosylés (immatures) dans la cellule. Dans notre étude, nous montrons que les mutations du CAN et du Muenke augmentent la proportion de récepteurs FGFR3 partiellement glycosylés (forme intermédiaire) et une diminution de la forme peu glycosylée, tandis que la mutation de l'achondroplasie n'affecte pas les proportions de forme du récepteur. Nous avons de plus montré que la forme totalement glycosylée était proportionnellement plus activée que les autres formes dans le cas du CAN. Il est intéressant de noter que dans le cas du CAN et du Muenke, la maturation est modifiée de manière similaire, en opposition à l'achondroplasie. Ceci pourrait constituer une piste pour de futurs travaux différenciant les mécanismes de craniosynostoses et chondrodysplasies.

Il a par ailleurs été montré à plusieurs reprises que les mutations des FGFR pouvaient modifier la localisation cellulaire des récepteurs. Gibbs et Legeai-Mallet ont montré que dans le cas de la mutation p.Lys650Glu, la modification de la maturation conduisait à une séquestration d'une importante partie des protéines FGFR3 dans l'appareil de Golgi, où elles présentent une suractivation ectopique (Gibbs and Legeai-Mallet, 2007). On peut également citer le cas de la dysplasie osseuse avec incurvation des membres (Bent Bone Dysplasia), associée aux mutations p.Tyr381Asp et p.Met391Arg de FGFR2 au niveau de son domaine transmembranaire. Contrairement aux craniosynostoses associées à FGFR2, elle présente un phénotype léthal à la naissance touchant l'ensemble du squelette. L'étude de cette pathologie a permis de mettre en évidence l'activité de FGFR2 en tant que facteur nucléaire. FGFR2 semble naturellement pouvoir être transporté au niveau du noyau, où il va interagir avec FGF2 et d'autres facteurs. Le complexe va se positionner au niveau du promoteur de certains gènes ostéoblastiques et modifier leur expression, favorisant la prolifération ostéoblastique au détriment de la différenciation. Les mutations p.Tyr381Asp et p.Met391Arg semblent accroître ce phénomène, bien que les intermédiaires impliqués dans ce mécanisme reste inconnus (Merrill et al., 2012; Neben et al., 2017, 2014). Il est intéressant de noter que, tout comme p.Tyr381Asp et p.Met391Arg pour FGFR2, p.Ala391Glu touche la partie transmembranaire de FGFR3. Hristova et al. ont montré qu'Ala391Glu modifiait l'environnement du domaine transmembranaire afin de stabiliser le dimère de récepteurs (Chen et al., 2011). On peut émettre l'hypothèse que la mutation liée au CAN modifie

également la localisation cellulaire du récepteur en modifiant son niveau de maturation, d'une manière analogue à la mutation p.Lys650Glu. La forme intermédiaire du récepteur étant surreprésentée, le transport du récepteur à la membrane cellulaire associé à sa maturation pourrait être affecté. Cette modification du transport pourrait participer à une augmentation de l'activation du récepteur de manière ectopique et non réduite à la membrane. Ceci pourrait expliquer en partie la capacité du récepteur à s'activer sans interaction avec un ligand FGF2 exogène. On pourrait également émettre l'hypothèse que la forme intermédiaire soit transportée à la membrane plasmique sans glycosylation complète, augmentant ainsi la proportion de récepteur pouvant être activé à la membrane. On peut également émettre l'hypothèse que la mutation CAN favorise une autre localisation cellulaire du récepteur, à la manière de p.Tyr381Asp et p.Met391Arg pour FGFR2 augmentant la localisation au noyau.

Une autre hypothèse expliquant la perturbation du signal serait liée à la spécificité de FGFR3 pour les différents FGF. L'étude du modèle murin du Muenke *Fgfr3^{P244R/+}* a montré des problèmes auditifs dus à une augmentation de différenciation des cellules ciliées au détriment des cellules piliers dans l'organe de Corti au niveau de l'oreille interne. Mansour et al. ont montré que ce défaut de différenciation était due, chez les mutants, à une affinité augmentée pour FGF10 des isoformes mutées FGFR3b^{P244R} et FGFR3c^{P244R}. FGF10 active normalement les récepteurs FGFR1b et FGFR2b, et se substitue chez le mutant à FGF8, ligand contrôlant la différenciation des cellules piliers via FGFR3. La mutation modifie dans ce cas les réponses cellulaires conduites par FGF10 et FGF8 via FGFR3 (Mansour et al., 2013). Dans le cas du CAN, le syndrome partage chez l'Homme une similarité phénotypique avec le syndrome de Crouzon lié à FGFR2. Les deux syndromes présentent un faciès crouzonoïde, avec une fusion des sutures coronales et une hypoplasie du maxillaire. Au niveau de la suture, FGFR2 et FGFR3 sont exprimés dans les progéniteurs ostéoblastiques. On peut émettre l'hypothèse que FGFR2 et FGFR3 mutés présentent une affinité augmentée pour un ligand FGF commun. La réponse cellulaire à ce ligand est alors similaire entre les deux récepteurs mutés, conduisant à un phénotype craniofacial similaire. Une étude des affinités relatives de FGFR2 et FGFR3 pour leurs différents ligands FGF en présence de mutations Crouzon et CAN permettrait de tester cette hypothèse.

Phénotype neurologique et cognitif du CAN

Au cours de notre étude du syndrome CAN, nous nous sommes également intéressés à l'effet de la mutation au niveau du système nerveux central. Notre étude reposait sur différentes observations montrant une anomalie de structure des aires du cerveau chez les patients FGFR3. Dans la dysplasie thanatophore, une malformation des lobes temporaux, un élargissement des gyri et une dysplasie de l'hippocampe ont été observés (Itoh et al., 2013). Dans le syndrome de Muenke, un élargissement et une malformation des lobes temporaux et de l'hippocampe a également été rapportée (Grosso et al., 2003). Dans le CAN, une hypoplasie du corps calleux a été rapportée (Gürbüz et al., 2016). Notre étude reposait également sur différentes études rapportant des troubles du comportement chez les patients. Dans le cas du Muenke, il a été montré chez les patients une hyperactivité avec déficit d'attention. De plus, les patients présentent de plus une capacité de mémoire de travail réduite, des troubles du contrôle des émotions et des interactions sociales et de l'anxiété (de Jong et al., 2012; Maliepaard et al., 2014; Yarnell et al., 2015). Les résultats de ces études sont cependant hétérogènes. La variabilité des conclusions de ces études tient en partie de la diversité des méthodologies utilisées. Les tests cognitifs ne sont pas toujours comparables entre eux, et le choix des contrôles peut influencer les résultats. Certaines études prendront comme groupe contrôle une population d'enfants sains, d'autres utiliseront les frères/sœurs sains des patients comme contrôle. FGFR3 est exprimé largement dans l'ensemble du système nerveux central embryonnaire et adulte, comme au niveau du cortex, du cervelet et de l'hippocampe. Au niveau de l'hippocampe, structure fortement impliqué dans les processus cognitifs, FGFR3 est fortement exprimé dans le gyrus denté (DG) et dans les Cornes d'Amon (CA1 à 3), avec FGFR1 et FGFR2 (Bansal et al., 2003; Peters et al., 1993). Ces résultats nous ont conduits à analyser particulièrement l'hippocampe et la neurogenèse hippocampique dans le cas du modèle CAN.

Effets sur la neurogenèse

Nos résultats d'IRM montrent que la morphologie globale du cerveau et de l'hippocampe ne sont pas impactées dans le modèle murin CAN. En revanche, chez le CAN adulte, la prolifération cellulaire est diminuée au niveau de la région sub-granulaire du gyrus denté, site de prolifération des progéniteurs neuronaux. De même, la taille de la zone granulaire dans

cette structure est réduite. Nous n'avons en revanche pas pu mettre en évidence d'anomalie prononcée dans les processus de différenciation neuronale. Les effets de FGFR3 sur la régulation de la prolifération des progéniteurs neuronaux et la neurogenèse n'ont pas été clairement identifiés. Des études précédentes ont montré une réduction de la taille du cerveau antérieur dans un modèle invalidé pour FGFR3, marquée par une diminution du volume hippocampique (Moldrich et al., 2011). Ce modèle présente une augmentation et une diminution de la prolifération respectivement dans le cortex et l'amygdale. Par ailleurs, le modèle *Fgfr3*^{K644E/+}, exprimant de manière ubiquitaire ou bien spécifiquement au niveau du système nerveux central la mutation associée à la dysplasie thanatophore, montre une malformation majeure des lobes temporaux avec une augmentation du volume cérébral, causée par une augmentation de la prolifération cellulaire embryonnaire (Inglis-Broadgate et al., 2005; Thomson et al., 2009, 2007). Dans l'hippocampe adulte, la mutation *Fgfr3*^{K644E/+} maintient une augmentation de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs (Kang and Hébert, 2015). On peut également citer les études réalisées sur le ligand FGF2, qui lorsqu'il est injecté à des souris adultes au niveau ventriculaire à forte dose, a un effet positif sur la neurogenèse. En revanche, pas de différence du taux de prolifération et de différenciation n'est observée lorsque FGF2 est surexprimé de manière transgénique ubiquitaire (Jin et al., 2003; Zucchini et al., 2008).

Au cours du développement craniofacial, la croissance du cerveau et de la voûte crânienne sont concomitantes et interdépendantes : la croissance du cerveau exerce une pression qui influence la croissance de la voûte crânienne, et à l'inverse la voûte crânienne exerce une résistance qui régule la croissance du cerveau. Cette réciprocité a notamment été montrée dans le modèle murin du syndrome d'Apert (*Fgfr2*^{+/^{P253R}}), dans lequel la fusion prématurée de la voûte réduisait la croissance du cerveau, tandis que l'expression de la mutation uniquement dans le système nerveux (Nestin-Cre) modifiait la morphologie de la voûte (Hill et al., 2013; Luo et al., 2017; Richtsmeier and Flaherty, 2013). Dans le modèle CAN, l'absence d'anomalie de morphologie du cerveau est en adéquation avec l'absence d'anomalie de la voûte. Le modèle CAN murin ne présentant pas d'anomalie de structure du cerveau, on peut penser que la mutation a un faible impact sur le développement et la prolifération au stade embryonnaire, contrairement au modèle *Fgfr3*^{K644E/+} présentant une croissance excessive du cortex (Inglis-Broadgate et al., 2005). Il est intéressant de noter que ces deux cas de

suractivation de FGFR3 montrent des effets opposés sur la prolifération des progéniteurs au niveau embryonnaire et dans l'hippocampe adulte. La mutation p.Lys650Glu induit cependant une suractivation bien plus intense du récepteur FGFR3 que la mutation p.Ala391Glu, expliquant la sévérité du phénotype TD comparé au CAN. On peut émettre l'hypothèse que le niveau d'activation de la voie MAPK, en conséquence de l'activation de FGFR3, a un effet positif ou négatif sur la prolifération des progéniteurs neuronaux adultes. On peut faire un parallèle de cette situation avec le fait que l'activation de FGFR3 a un effet anti-mitogénique dans les chondrocytes postnataux tandis qu'elle a un effet mitogénique sur les chondrocytes embryonnaires précoces et dans certains types de cancers. On peut émettre l'hypothèse que l'intensité du signal MAPK module la nature de l'effet sur la prolifération cellulaire (Krejci, 2014). On peut également supposer que d'autres facteurs intracellulaires dépendants du stade de développement, du type cellulaire ou du contexte tissulaire influent sur ce signal.

Phénotype cognitif du modèle CAN

Nous nous sommes ensuite intéressés à connaître si le défaut léger de neurogenèse hippocampique observé chez les souris CAN avait des répercussions sur leurs capacités cognitives. Les analyses de comportement des souris CAN montrent une diminution des capacités d'apprentissage. Bien que les tests d'anxiété ne semblent pas être modifiés, le modèle CAN présente par contre un phénotype mimant un effet antidépresseur, avec une diminution de réponse à un événement stressant. Le traitement des souris CAN pendant 7 jours avec l'inhibiteur de tyrosine kinase BGJ398 (Infigratinib), a ensuite permis de restaurer à la fois la diminution de capacité d'apprentissage et l'effet antidépresseur.

Les résultats obtenus montrent qu'une diminution des capacités de mémoire a été observée dans des tests de mémoire associative et contextuelle, mais n'a pas été observée dans le cas de la mémoire spatiale. Peu d'informations existent sur le rôle joué par les FGFR dans les processus de mémorisation. Au niveau de l'hippocampe, FGFR1, FGFR2 et FGFR3 semblent avoir des profils d'expressions chevauchant. L'étude du modèle invalidé conditionnellement pour FGFR2 a montré que celui-ci présentait d'importants défauts de structure hippocampique, avec une neurogenèse réduite et une performance faible dans les mémoires associative et spatiale, lorsque la délétion apparaissait au stade embryonnaire. A l'inverse, la délétion induite à l'âge adulte influait peu sur la structure du cerveau et affectait la mémoire

associative sans affecter la mémoire spatiale à long terme. (Stevens et al., 2012). Cette étude démontre l'importance de FGFR2 pour la régulation de la neurogenèse embryonnaire et adulte et de la mémoire à court et long terme. On peut émettre l'hypothèse que FGFR2 agit comme régulateur positif de la neurogenèse impliquée dans l'apprentissage.

Ces résultats peuvent par ailleurs être comparés aux résultats du modèle CAN. A la manière de FGFR2 invalidé à l'âge adulte, la mutation du modèle CAN affecte peu la structure cérébrale, mais affecte la neurogenèse adulte et la mémoire associative à court terme. On remarque ici qu'une perte-de-fonction de FGFR2 et un gain-de-fonction de FGFR3 conduisent à des phénotypes proches. On peut supposer que FGFR2 et FGFR3 ont des effets antagonistes dans la régulation de la neurogenèse adulte et de la mémoire à court terme. On peut également formuler l'hypothèse que la neurogenèse liée à l'apprentissage dépend d'une régulation fine de l'intensité du signal FGFR dans le système nerveux central, une variation d'intensité conduisant à des troubles cognitifs.

Dans le modèle CAN, nous avons montré que la prolifération était diminuée dans l'hippocampe. La diminution de la prolifération est fréquemment corrélée dans la littérature à une diminution de la capacité de mémoire. Néanmoins, il est très probable que ce défaut n'explique que partiellement le phénotype cognitif. On peut supposer que des défauts au niveau de la plasticité synaptique (ou les FGF jouent un rôle) puissent également jouer un rôle dans la diminution des capacités de mémoire du CAN. On peut émettre l'hypothèse que d'autres régions du cerveau, comme le cortex ou l'amygdale, pour lesquels nous n'avons pas mis en évidence d'anomalie, puissent également être impliqués dans ce phénotype.

La diminution des capacités d'apprentissage du modèle CAN reflète bien les troubles au niveau de la mémoire de travail observés chez les patients atteints de craniosynostoses liées à FGFR3 (Muenke). L'analogie est cependant difficile pour l'effet antidépresseur entre le modèle murin CAN et les patients. Il n'a pas été rapporté d'épisode dépressif chez les patients atteints de craniosynostose liée aux FGFR. Cependant, les patients Muenke présentent des troubles du contrôle émotionnel, qui suggèrent que les processus liés aux émotions et aux humeurs pourraient d'une certaine manière être affectés. Il est évident que la réponse émotionnelle du patient puisse être impactée par l'expérience psycho-sociale qu'il rencontre avec une craniosynostose : dysmorphie faciale, opérations chirurgicales multiples, etc.

L'effet antidépresseur de la mutation CAN rappelle l'effet antidépresseur de FGF2 : Une invalidation de FGF2 a été montrée comme ayant un effet dépressif (et anxiogène), tandis qu'une injection de FGF2 a un effet antidépresseur. FGF9 a également été montré comme induisant un effet dépressif et anxiogène (Aurbach et al., 2015; Elsayed et al., 2012; Salmaso et al., 2016; Wang et al., 2018). Une étude a par ailleurs montré dans un modèle invalidé pour FGF2, présentant un phénotype d'anxiété, que l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) était alors diminuée dans le DG. Ce phénotype peut être restauré par injection de FGF2. Par ailleurs, l'étude des modèles murins invalidés conditionnellement pour *Fgfr1* et *Fgfr2* montrent une diminution de l'anxiété, tandis que l'invalidation de *Fgfr3* ne montre pas de modification. Ces phénotypes d'anxiété ne sont pas restaurés par l'injection de FGF2. Les auteurs en concluent alors que l'effet de FGF2 sur l'anxiété pourrait ne pas être médié par ces trois récepteurs ou que d'autres FGF seraient impliqués (et impactés par l'invalidation des récepteurs) (Salmaso et al., 2016). L'étude ne s'est penchée que sur le phénotype d'anxiété, sans étudier la capacité de réponse au stress aigu comme nous l'avons fait chez le modèle CAN. Par ailleurs, les souris CAN, comme le modèle invalidé pour *Fgfr3*, ne présente pas de modification de l'anxiété ; on peut donc conclure que FGFR3 ne régule pas ce mécanisme.

La dépression est un processus complexe chez l'Homme. Ce qui est mesuré dans le cas de la Souris est difficilement comparable aux tests pratiqués chez l'Homme. On mesure chez la Souris une réponse à un événement stressant, impliquant les émotions, la volonté et la motivation de l'animal. Les FGF semblent jouer un rôle primordial dans ces mécanismes. Les détails de cette régulation sont cependant inconnus. Il est par exemple probable que d'autres FGF en dehors de FGF2 et FGF9 soient impliqués. On ignore par ailleurs quels FGFR sont impliqués (FGFR1, FGFR2, FGFR3, mais également FGFR4 ou FGFR5). FGF2 et FGF9 pouvant tous deux se lier à FGFR3, le rôle de FGFR3 dans les mécanismes de réponse au stress n'est pas clair. Il est possible que ce processus mette en jeu une combinatoire complexe de plusieurs FGF activant plusieurs FGFR, dans laquelle le rôle de chacun serait difficile à déchiffrer. La poursuite de l'étude des modèles invalidés pour *Fgfr1*, *Fgfr2* et *Fgfr3* initiée par Salmaso et al. permettrait de mieux comprendre l'implication des trois récepteurs dans la réponse au stress (Salmaso et al., 2016). De même, l'étude de l'effet des FGF sur l'expression et la régulation du GR et des glucocorticoïdes permettrait de mieux comprendre ce mécanisme.

Dans cette étude, nous avons employé l'inhibiteur BGJ398 afin d'effectuer un sauvetage du phénotype cognitif du modèle CAN. BGJ398 possède une très forte affinité pour FGFR3 et agit au niveau du site accepteur d'ATP. BGJ398 a précédemment montré un effet positif dans l'amélioration du phénotype squelettique du modèle murin d'achondroplasie *Fgfr3*^{Y367C/+} (Biosse Duplan et al., 2016; Komla-Ebri et al., 2016). Dans le modèle CAN, BGJ398 a été injecté de manière intraventriculaire pendant sept jours. La molécule a donc pu cibler l'hippocampe, mais également d'autres régions du cerveau possiblement impliquées dans le phénotype cognitif. Ce traitement apporte la validation que le phénotype cognitif est une conséquence directe de l'activation de FGFR3. Le temps de traitement étant relativement court, on peut supposer que la modification de l'activation de FGFR3 à court terme est suffisante pour modifier son effet sur la mémoire et sur la réponse au stress. Par ailleurs, il serait intéressant dans une future étude d'évaluer l'effet cellulaire du traitement par BGJ398 au niveau de l'hippocampe.

Les troubles cognitifs présents chez les patients Muenke, les achondroplases et le modèle murin de CAN, laissent penser qu'ils constituent une part notable du phénotype des pathologies génétiques liées à FGFR3. Une meilleure caractérisation des capacités cognitives des patients, notamment les patients CAN, permettrait une meilleure compréhension de l'effet de la mutation et du gène sur le système nerveux central. De même, il est fort probable que de tels troubles cognitifs puissent être observés dans les craniosynostoses liées à FGFR1 et 2 pour lesquelles un développement intellectuel normal est rapporté, comme le syndrome de Pfeiffer ou de Crouzon, mais également dans le cas de leurs modèles murins respectifs. On peut ainsi supposer que les mutations associées au Muenke, à l'Apert ou au Crouzon, exprimées de manière conditionnelle dans le cerveau, entraînent un phénotype cognitif semblable au CAN. Le traitement par BGJ398 apporte de plus une preuve de concept que ce phénotype peut être restauré. De futurs travaux employant une injection systémique de BGJ398 permettrait une avancée vers un traitement du phénotype.

Etude de l'effet du TransCon-CNP sur les synchondroses de la base du crâne dans un modèle murin d'achondroplasie *Fgfr3*^{Y367C/+}

Le CNP est un régulateur naturel de la signalisation FGFR3. En se fixant à son récepteur NPR2, il inhibe la phosphorylation de RAF en aval du récepteur FGFR3. La compagnie BioMarin a développé un peptide analogue du CNP de 39 acides aminés, BMN111 (Vosoritide), dont la durée de vie est allongée par rapport au CNP endogène. BMN111 a été injecté quotidiennement pendant 15 jours au modèle murin d'achondroplasie *Fgfr3*^{Y367C/+} et a montré un effet positif sur la croissance osseuse et sur le phénotype (Lorget et al., 2012). BMN111 a ensuite montré des effets positifs sur le modèle murin *Fgfr3*^{G380R/+} ainsi que chez les patients achondroplasiques (essai clinique de phase 2) (Lorget et al., 2012; Savarirayan et al., 2019; Wendt et al., 2015).

La compagnie Ascendis a par la suite développé le TransCon-CNP, un analogue du CNP de 38 acides aminés lié à un transporteur TransCon. Nous avons étudié l'effet de la molécule TransCon-CNP sur le phénotype du modèle d'achondroplasie *Fgfr3*^{Y367C/+}. Le CNP a naturellement une demi-vie dans l'organisme estimée entre deux et trois minutes en raison des peptidases endogènes. Le transporteur TransCon sert alors de protection et permet d'allonger la demi-vie du CNP (plus de 65 heures), assurant un relargage progressif de celui-ci. La stratégie du TransCon-CNP permettra d'espacer les injections de la molécule aux patients et de proposer une injection hebdomadaire au lieu d'une injection journalière comme dans le cas de BMN111 (protocole BioMarin) (Breinholt et al., 2019). Nous avons ici mesuré l'effet du TransCon-CNP dans un protocole similaire à celui de BMN111 avec une injection sous-cutanée quotidienne de 5.6 mg/kg pendant 15 jours à partir de P1.

Les souris *Fgfr3*^{Y367C/+} traitées par le TransCon-CNP ne présentaient pas de modification majeure de la morphologie crânienne. Au niveau de la base du crâne, une diminution de la fusion prématurée des synchondroses a été observée. Tandis qu'elles étaient fusionnées chez les souris *Fgfr3*^{Y367C/+} injectées par le véhicule, les souris traitées présentaient en majorité un retard de fusion de la synchondrose IOS. Les synchondroses ISS et SOS ont montré une légère amélioration pour une minorité des individus. Cette modification de l'IOS n'a cependant pas modifiée l'ouverture du foramen magnum de façon significative. Cette modification du

phénotype de la souris *Fgfr3*^{Y367C/+} est intéressante car, dans le cas du traitement par BMN111, l'état des synchondroses n'avait pas été analysée et pas d'effet n'avait été observé sur l'ouverture du foramen magnum (Lorget et al., 2012). La modification de la base du crâne dans l'achondroplasie constitue un point essentiel car la fusion de la base du crâne cause une hypoplasie de l'étage moyen de la face et une compression cervico-médullaire du tronc cérébrale au niveau du foramen magnum, nécessitant une intervention chirurgicale.

On peut s'interroger sur l'impact moindre du traitement sur l'ISS et la SOS. Le récepteur du CNP, NPR2, est retrouvé exprimé dans les trois synchondroses (Holmes et al., 2018). L'action du CNP devrait donc être observée dans ces trois sites. Il faut cependant noter que, au stade P1, les souris *Fgfr3*^{Y367C/+} présentent déjà un pont osseux formé au niveau de l'ISS et de la SOS, tandis que l'IOS est ouverte (données non publiées). On peut donc penser qu'une injection post-natale du TransCon-CNP est trop tardive pour pouvoir enrayer la fusion de ces deux sites. L'IOS n'étant pas encore fusionnée, c'est là que l'effet le plus important est observé. On peut donc penser qu'une injection au cours de la gestation du TransCon-CNP pourrait avoir un effet plus important sur l'ensemble de la base du crâne.

Un parallèle peut être effectué ici avec les essais de traitement d'un modèle murin d'achondroplasie par la méclozine (Matsushita et al., 2015, 2013). Il a été montré qu'un traitement de la mère gestante par la méclozine à partir du stade E14.5 puis, après la naissance, traitement des nouveau-nés jusqu'au stade P4.5, diminuaient le niveau de fusion des synchondroses, ce qui n'avait pas été le cas dans un traitement uniquement post-natal (Matsushita et al., 2016).

Par ailleurs, le traitement par BMN111 d'un modèle murin du syndrome de Crouzon *Fgfr2*^{C342Y/+} a également montré un effet modéré sur l'amélioration du phénotype. BMN111 n'a pas permis de prévenir la fusion prématurée des sutures crâniennes. Une légère augmentation de la longueur de la partie antérieure de la base du crâne a été observée. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la concentration du BMN111 injecté ne serait peut-être pas suffisante pour agir au niveau des synchondroses (Holmes et al., 2018). La concentration du TransCon-CNP peut dans notre cas être également impliquée dans l'amélioration modérée du phénotype en présence de la drogue. Une concentration plus forte ou plus faible, dans le cas d'un effet de saturation ou d'une dose toxique, pourrait améliorer l'effet du TransCon-CNP.

Annexes



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



Craniosynostosis: State of the Art 2019

Animal models of craniosynostosis

M. Cornille^{a,1}, E. Dambroise^{a,1}, D. Komla-Ebri^{a,b,1}, N. Kaci^{a,c}, M. Biosse-Duplan^a,
F. Di Rocco^{d,e,**}, L. Legeai-Mallet^{a,*}

^aInserm U1163, Paris university, institut Imagine, 75015 Paris, France^bMolecular Endocrinology Laboratory, Department of Medicine, Imperial College London, W12 ONN London, United Kingdom^cInovation, 75013 Paris, France^dCentre de référence craniosténoses, université de Lyon, 69677 Bron France^eService de neurochirurgie pédiatrique, université Lyon, hôpital Femme-Mère-Enfant, 69677, Bron, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2019

Received in revised form 22 July 2019

Accepted 16 September 2019

Available online 26 September 2019

Keywords:

Mouse model

Zebrafish

Syndromic craniosynostosis

Suture

Skull growth

ABSTRACT

Background. – Various animal models mimicking craniosynostosis have been developed, using mutant zebrafish and mouse. The aim of this paper is to review the different animal models for syndromic craniosynostosis and analyze what insights they have provided in our understanding of the pathophysiology of these conditions.

Material and methods. – The relevant literature for animal models of craniosynostosis was reviewed.

Results. – Although few studies on craniosynostosis using zebrafish were published, this model appears useful in studying the suture formation mechanisms conserved across vertebrates. Conversely, several mouse models have been generated for the most common syndromic craniosynostoses, associated with mutations in *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* and *TWIST* genes and also in *MSX2*, *EFFNA*, *GLI3*, *FREM1*, *FGF3/4* genes. The mouse models have also been used to test pharmacological treatments to restore craniofacial growth.

Conclusions. – Several zebrafish and mouse models have been developed in recent decades. These animal models have been helpful for our understanding of normal and pathological craniofacial growth. Mouse models mimicking craniosynostoses can be easily used for the screening of drugs as therapeutic candidates.

© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The mouse and zebrafish genomes have been well known for two decades and demonstrate great similarity to the human genome. Various genetic tools allow manipulation of both animal genomes with high accuracy, to delete, add or replace specific sequences so as to produce several types of mutation and modulate gene expression and function. Despite differences in cell identity and timing during organogenesis, these two species possess a cranial vault the organization of which is analogous to humans. Skull development is a complex dynamic process involving multiple components: the various ossification centers of the head grow during embryonic life and form multiple membranous flat bones.

The bones end up reaching each other and forming a connecting fibrous junction or suture that maintains a separation and allows smooth deformation during the growth of the brain and skull. Craniosynostosis occurs when maintenance of this borderline fails and a bony bridge forms between the two bones, causing premature suture fusion. Syndromic craniosynostosis is often associated with single-point mutation in specific genes. Among the most frequently mutated genes are the *FGFR1-3* and *TWIST* genes.

Mouse and zebrafish models have been helpful in understanding the complex pathophysiology of craniosynostosis. These animal models are useful not only for our knowledge of the condition but also to develop new therapeutic approaches. The current treatment of craniosynostosis is almost exclusively surgical and consists in reshaping the skull while removing the fused sutures by osteotomies. Because these surgeries are associated with morbidity and mortality, and successive craniofacial procedures are needed to reshape the face and skull of the child, especially in syndromic cases, pharmacological approaches are a promising therapeutic alternative.

* Corresponding author at: Inserm U1163, Paris university, institut Imagine, 24 boulevard du Montparnasse 75015 Paris, France.

** Co-corresponding author at: Service de neurochirurgie pédiatrique, université de Lyon, hôpital Mère-Enfant, Lyon, France

E-mail addresses: federico.dirocco@chu-lyon.fr (F. Di Rocco), laurence.legeai-mallet@inserm.fr (L. Legeai-Mallet).

¹ Equal contributors.

2. Material and methods

A literature search for relevant studies on animal models of craniosynostosis was performed, focusing on zebrafish and mouse models.

3. Results

Several zebrafish and mouse models have been reported. The most relevant mouse models, exhibiting FGFR-related craniosynostoses mimicking human pathologies, are summarized in Table 1.

4. Mouse models of craniosynostosis

4.1. Mouse model mimicking Pfeiffer syndrome (*Fgfr1*^{P250R/+})

Zhou et al. generated a mouse model for Pfeiffer syndrome by inserting the P250R mutation in the murine *Fgfr1* gene using homologous recombination [1]. This mutation corresponds to the human Pro252Arg mutation causing the mild form of Pfeiffer syndrome. Heterozygous *Fgfr1*^{P250R/+} animals presented normal skull structure at birth, but quickly (postnatal day 3) developed craniofacial anomalies and smaller size. At postnatal day 21 days, they showed fusion of the coronal, frontal and sagittal sutures. The skulls of these animals presented facial asymmetry, with a shortened and dome-shaped neurocranium. Hypertelorism and midface hypoplasia were also observed in several animals. However, *Fgfr1*^{P250R/+} did not show skull base anomalies. Homozygous *Fgfr1*^{P250R/P250R} animals displayed a similar phenotype to the heterozygous *Fgfr1*^{P250R/+}, but with smaller body size. Neither *Fgfr1*^{P250R/+} or *Fgfr1*^{P250R/P250R} animals exhibited anomalies of the growth plate in the long bones. Calvaria analysis of *Fgfr1*^{P250R/+} and *Fgfr1*^{P250R/P250R} mice revealed advanced bone mineralization at 7 days of age and both pre-osteoblast proliferation and osteoblast differentiation were increased in their cranial sutures. Differentiated osteoblasts showed increased expression of bone sialoprotein, osteocalcin and osteopontin. Mutant osteoblasts also showed higher expression of osteoblast differentiation activator core binding transcription factor α subunit 1 (CBFA1). *In vitro* studies then revealed that *Fgfr1*^{P250R/+} induced increased expression of CBFA1 in murine fibroblasts in response to Fgf2 ligand.

This model presents a strong craniofacial phenotype consistent with the human pathology. It is interesting to note that endochondral ossification does not seem to be affected by the mutation in either long bones or skull base. Membranous ossification is severely affected, with disruption of proliferation and differentiation of osteoblasts in the calvaria. The increased expression of CBFA1 detected in presence of the mutation suggests that it plays an essential mediating role in the pathophysiology of this syndrome.

4.2. Mouse models mimicking Apert syndrome (*Fgfr2*^{S252W/+} and *Fgfr2*^{P253R/+})

The mouse model for Apert syndrome was generated by ubiquitous expression of the Ser252Trp mutation in *Fgfr2* murine gene. Ser252Trp mutation is the most frequent mutation associated with Apert syndrome. It is located in the linker region of the protein, connecting the extracellular immunoglobulin II and immunoglobulin III domains for recognition of the ligand. It causes increased affinity for FGFR2 ligands and impaired binding specificity.

Fgfr2^{S252W/+} mice present a phenotype of variable severity [2]. However, all animals showed a smaller size at birth and presented significantly shorter naso-anal length in later stages. No limb or paw abnormalities were found. However, they showed craniofacial abnormalities, with dome-shaped skulls, midface hypoplasia,

malocclusion, and wide-spaced eyes. In the skull base, mutant newborns presented reduced presphenoid bone length. There were no strong anomalies in the growth plate of *Fgfr2*^{S252W/+} long bones, suggesting that their reduced size may not be due to major disruption in endochondral ossification processes.

Craniosynostoses were noticeable mostly in coronal sutures, with significant overlapping between frontal and parietal bones and premature suture closure at embryonic stage E18.5. *Fgfr2*^{S252W/+} mice calvaria also presented thinner bone. Closer examination of osteoblasts in newborn coronal sutures did not show alteration of proliferation and differentiation processes, as was observed in the *Fgfr1*^{P250R/+} mouse model. However, increased levels of apoptosis were detected, providing a probable cause for the reduced bone thickness.

This model, while not mimicking the long bone phenotype observed in Apert syndrome, showed a strong craniofacial phenotype. The craniosynostosis observed in coronal sutures in presence of the equivalent human mutation makes it a good model for studying this syndrome.

Another model for Apert syndrome was created by inserting the Pro253Arg mutation into the *Fgfr2* murine gene [3]. This mutation is found in one-third of patients with Apert syndrome. *Fgfr2*^{P253R/+} mice presented reduced size and brachycephaly. A third of the animals died before 20 days of age. Differently from *Fgfr2*^{S252W/+} mice, syndactyly was present in several animals. Craniofacial phenotype featured a dome-shaped skull, wide-spaced eyes and midface hypoplasia with malocclusion of the teeth. A morphometric approach showed disproportion of the nasal and frontal bones and increased skull width. Fusion of coronal sutures was observed at 3 weeks of ages. Accelerated ossification and increased expression of osteoblast differentiation markers (CBFA1, osteopontin, osteocalcin) were observed in the calvaria of *Fgfr2*^{P253R/+} animals. In accordance with the reduced body size of *Fgfr2*^{P253R/+} animals, endochondral ossification was also affected by the mutation. The skull base was shortened in *Fgfr2*^{P253R/+} mice, while the growth of secondary ossification and growth plate in long bones were delayed. The growth plate presented a decrease in proliferating cell number and in collagen X expression in hypertrophic chondrocytes. Bone-marrow cells from *Fgfr2*^{P253R/+} mice presented overactivation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Erk1/2). This kinase is part of the MAPK signaling pathway downstream of *Fgfr2*.

Yin L. et al. then performed *ex-vivo* cultures of calvaria and femurs of *Fgfr2*^{P253R/+} embryos that they treated with the MEK1/2 inhibitor, PD98059. Reduced coronal suture fusion and increased femur length were observed after treatment with this inhibitor, showing the mediating role of the MAPK pathway in the mouse phenotype.

The *Fgfr2*^{P253R/+} mouse model presents an interesting phenotype compared with the manifestations of the syndrome in humans. While presenting a severe craniofacial phenotype, it also presents syndactyly and shortening of long bones, as frequently observed in patients carrying the *Fgfr2* Pro253Arg mutation, showing the important role of *Fgfr2* in both endochondral and membranous ossification processes. The phenotypic rescue observed with the Erk1/2 inhibitor not only enables the molecular effect of the mutation on *Fgfr2* downstream signaling pathway to be deciphered, but also provides an interesting example of a drug-mediated strategy for treating syndromic craniosynostosis.

4.3. Mouse models mimicking Crouzon syndrome (*Fgfr2*^{C342Y/+} and *Fgfr2*^{W290R/+})

The first mouse model for Crouzon syndrome was generated by inserting the Cys342Tyr mutation, frequently found in human Crouzon and Pfeiffer syndromes, into the murine *Fgfr2* gene thanks

Table 1
Synopsis of the most common craniosynostosis mouse models.

Mouse model	Syndrome	Affected sutures	Cranial features	Facial features	Skull base features	Other features	References
<i>Fig1^{2p22sw}</i>	Pfeiffer	Coronal, frontal, sagittal	Short and dome-shaped skull	Snout deviation, hypertelorism, midface hypoplasia, malocclusion	-	Decreased body size	Zhou et al., 2000
<i>Fig1^{2p22sw}</i>	Apert	Coronal, delayed sagittal	Dome-shaped skull	hypertelorism, midface hypoplasia, malocclusion	Short presphenoid bone	Decreased body size	Chen et al., 2003
<i>Fig1^{2p22sw}</i>	Apert	Coronal, delayed posterior frontal	Dome-shaped skull, brachycephaly	Snout deviation, hypertelorism, midface hypoplasia, malocclusion	Retarded growth	Decreased body size, retarded long-bone growth	Yin et al., 2007
<i>Fig1^{2p22sw}</i>	Crouzon	Coronal, sagittal, lambdoid	Dome-shaped skull	Snout deviation, short face, hypertelorism, malocclusion	-	-	Eswarakumar et al., 2004
<i>Fig1^{2p22sw}</i>	Crouzon	Coronal, lambdoid	Dome-shaped skull	Snout deviation, midface hypoplasia, malocclusion	Presphenoid bone absent, basiphenoid dysmorphia	Decreased body size	Mai et al., 2010
<i>Fig1^{2p22sw}</i>	Beare-Stevenson	Coronal, lambdoid, zygomatic, frontomaxillary, frontonasal, premaxillary-maxillary, intermaxillary	Dome-shaped skull, brachycephaly	Midface hypoplasia, malocclusion	Reduced sphenoid width	Decreased body size	Wang et al., 2012
<i>Fig1^{3p24sw}</i>	Muenke	Coronal, premaxillary-maxillary	Dome-shaped skull	Snout deviation, malocclusion	Premature fusion of intersphenoidal and sphenooctipital synchondroses	Slightly decreased body size	Laurita et al., 2011, Twigg et al., 2009

to Cre recombinase under the control of PGK promoter [4]. The Cys342Tyr mutation is located in exon 9 of the gene and only affects the *Fgfr2IIIc* isoform. Heterozygous *Fgfr2^{C342Y/+}* mice were viable and fertile while *Fgfr2^{C342Y/C342Y}* animals died shortly after birth. *Fgfr2^{C342Y/+}* mice presented shortened face and skewed snout, bulging eyes and dome-shaped skull. Frontal and parietal bone overlapped in E16.5 embryos, leading to coronal suture fusion in adult animals. Shortening of the sphenoid part of the skull base and reduction of maxillary bone with missing molar also accounted for this facial shortening.

Homozygous *Fgfr2^{C342Y/C342Y}* mice presented a similar but more severe phenotype, with cleft palate closure failure and thickened skull base. Homozygous animals also presented an appendicular and axial phenotype, with shorter and thicker bones. Bony bridges were found in knee joints, with fusion of vertebrae. In addition, *Fgfr2^{C342Y/C342Y}* mice presented defective development of tracheal cartilage and lungs, explaining the early lethality.

Eswarakumar et al. then looked at osteogenesis and chondrogenesis. Significantly increased expression of osteopontin and *Cbfa1* was found in calvaria of E18.5 *Fgfr2^{C342Y/+}* and *Fgfr2^{C342Y/C342Y}* embryos. This correlated with increased proliferation of osteoprogenitors in the skull vault at early stages and in long bones. In contrast, expression of the genes related to chondrogenesis was not modified in the long bones of *Fgfr2^{C342Y/+}* and *Fgfr2^{C342Y/C342Y}* newborns.

These results suggest that endochondral and intramembranous ossification processes are affected differently by the mutation during embryonic development. *Fgfr2^{C342Y/+}* mice, while mimicking all important features of Crouzon syndrome, highlighted an early role of *Fgfr2IIIc* signaling in osteoblast proliferation and a different role in chondrocyte and osteoblast lineages.

Another mouse model for Crouzon syndrome was generated by N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) mutagenesis screen. Animals heterozygous for *Fgfr2^{W290R/+}* mutation were obtained and bred to generate WT, *Fgfr2^{W290R/+}* and *Fgfr2^{W290R/W290R}* animals [5]. This mutation has been identified in many patients affected by Crouzon syndrome or Pfeiffer syndrome. Unlike the *Fgfr2^{C342Y}* mutation, which affects only the IIIc isoform, this mutation is located in both IIIb and IIIc isoforms of *Fgfr2*. While *Fgfr2* expression was normal in heterozygous animals, increased expression was found in both isoforms in homozygous animals. Consistent with studies of molecular effects of the *Fgfr2^{W290R}* mutation, increased activation of the Erk1/2 pathway was found in *Fgfr2^{W290R/W290R}* animals.

Fgfr2^{W290R/+} heterozygote animals presented craniofacial malformations aggravating with age, with short snout, dome-shaped skull and malocclusion of the incisors. Fusion of coronal and lambdoid sutures could be observed in young animals.

Homozygous *Fgfr2^{W290R/W290R}* animals, however, died at postnatal day 1, showing severe craniofacial ossification retardation, and reduced cranial bones with reduced osteoblast differentiation. Additionally, *Fgfr2^{W290R/W290R}* animals presented organ agenesis incompatible with life: no development of limbs or teeth, missing lacrimal and submandibular glands, and atrophied gastrointestinal tract and lungs.

Endochondral ossification was disrupted in both *Fgfr2^{W290R/+}* and *Fgfr2^{W290R/W290R}* animals, with dysmorphia of the skull base, thickened nasal septum cartilage and abnormal sternum cartilage. *Fgfr2^{W290R/W290R}* animals also featured fused zygomatic arches and fusion of vertebrae.

The strong phenotype observed on homozygous animals can be explained by the effect of the mutation on both isoforms, while previous *Fgfr2^{C342Y/+}* mice featured the modification of only one isoform. Interestingly, the phenotype observed in heterozygous animals can be associated with phenotypic traits found in Crouzon syndrome patients, while the homozygous phenotype is similar to observations in Pfeiffer syndrome: tracheal and

visceral abnormalities, ankyloses of vertebral bodies. This finding highlights the strong clinical relevance of this model for understanding the role of *Fgfr2* in development and bone organogenesis.

4.4. Mouse model mimicking Beare-Stevenson syndrome (*Fgfr2^{Y394C/+}*)

A mouse model of Beare-Stevenson syndrome with cutis gyrate syndrome was generated to better understand the cellular and molecular pathogenesis of the syndrome by ubiquitous insertion of the Tyr394Cys mutation into the *Fgfr2* murine gene. *Fgfr2^{Y394C/+}* animals displayed reduced growth and death by 2 weeks of age [6]. They presented premature fusion of coronal, zygomatic and squamosal sutures, midface hypoplasia and brachycephalic skull. Fusion of sternbral bones and enlarged umbilical stump were also observed. Coronal suture synostosis could be observed at E17.5, presenting an irregular osteogenic front, decreased cell proliferation and increased expression of osteoblast differentiation marker Runx2 and alkaline phosphatase between the osteogenic fronts. The skin phenotype of *Fgfr2^{Y394C/+}* mice featured cutis gyrate, epidermal acanthosis and papillomatosis, with significantly thicker epidermis than in wild-type. Epidermal cell proliferation and epidermal differentiation markers were elevated. In contrast, apoptotic markers were decreased in *Fgfr2^{Y394C/+}*.

In vitro studies of *Fgfr2^{Y394C}* then revealed constitutive ligand-independent overactivation of the receptor and of its downstream MAPK p38 pathway. Thus, *in utero* treatment of *Fgfr2^{Y394C/+}* animals with p38 inhibitor SB203580 improved the skin phenotype, produced a minor effect on the craniofacial phenotype and did not improve the survival rate.

This mouse model presents a strong phenotype consistent with the craniofacial and skin phenotype observed in patients with Beare-Stevenson syndrome. Interestingly, the model displayed decreased osteoblast proliferation, while differentiation was increased. These results can be contrasted to previous *Fgfr* mouse models, where both mechanisms were increased, and suggest a complex involvement of both processes in suture fusion.

4.5. Mouse model mimicking Muenke syndrome (*Fgfr3^{P244R/+}*)

The mouse model for Muenke syndrome was generated using a Cre-LoxP system. Murine exon 7 of *Fgfr3* containing the Pro244Arg mutation, homologous to the human Pro250Arg mutation, was inserted into the gene with two LoxP sites by crossover [7,8]. The resulting mice were then crossed with mice expressing Cre recombinase under *Gata1* promoter. The phenotype of *Fgfr3^{P244R/+}* heterozygotes and *Fgfr3^{P244R/P244R}* homozygous animals was variable, depending on genetic background and sex. While the first mutants were from a mixed background, the analyzed animals were generated by backcrossing into congenic lines. Only a minority of *Fgfr3^{P244R/+}* animals presented craniofacial abnormalities, while penetrance was notably increased in homozygous mice. Interestingly, the sex bias observed in patients was reversed in *Fgfr3^{P244R/+}* and *Fgfr3^{P244R/P244R}* mice, with no heterozygous females affected, and 100% of homozygous males affected. The craniofacial phenotype was variable, with rounding of the skull, skewing of the snout and malocclusion of incisors and molars. Coronal synostosis was observed in only 2 animals, which do not allow it to be determined as the cause of the observed craniofacial variations. Fusion of zygomatic bone and synostosis of the ipsilateral premaxillary suture were, however, observed in mutant animals, associated with skewing of the snout. Additionally, analysis of the skull base of *Fgfr3^{P244R/+}* mutant mice showed a premature closure of intersphenoidal and sphenoccipital synchondroses in a large number of animals at 3 weeks of age. This premature closure was correlated with malocclusion of incisors and molars.

Precise histological analysis of these synchondroses demonstrated abnormal endochondral ossification, with reduced chondrocyte differentiation and primary bone spongiosa, and accelerated secondary and perichondrial ossification, leading to the formation of bony bridges. This skull base phenotype can be related to the reduction in skull base length observed in patients. Furthermore, analysis of the temporomandibular joint of *Fgfr3*^{P244R/+} mutant mice found delayed development of the condylar head. As in skull-base synchondroses, reduced chondrocyte proliferation and differentiation were observed after 3 weeks of age, with reduced primary bone spongiosa. Moreover, condylar cartilage presented arthritic features and all *Fgfr3*^{P244R/+} mice presented low-frequency sensorineural hearing loss. Deep examination of the inner ear found an excess of pillar cells throughout the cochlear duct, suggesting an essential role of the *Fgfr3* signaling in inner-ear development. This phenotype is relevant, as hearing loss affects a large proportion of Muenke patients.

Unlike the craniofacial phenotype, no long-bone phenotype was observed in *Fgfr3*^{P244R/+} mice, although heterozygous and homozygous animals presented reduction in femoral head and cortical head bone mineral density.

Interestingly, this model for Muenke syndrome showed a phenotype with low penetrance. Moreover, the sex bias was reversed compared to humans, with males more severely affected than females. The lower severity of the craniofacial phenotype of *Fgfr3*^{P244R/+} mice in comparison to previously cited mouse models for *Fgfr1*- and *Fgfr2*-related craniosynostosis supports the idea that *Fgfr3* plays a later and more subtle role in membrane ossification and osteoblast maturation in mice.

4.6. Mouse model mimicking Saethre-Chotzen syndrome (*Twist*^{-/-})

Because *TWIST* haploinsufficiency leads to Saethre-Chotzen syndrome, the mouse model proposed for this syndrome is a *Twist*^{+/-} heterozygous mouse [9]. Several studies have evaluated the *Twist*^{+/-} Saethre-Chotzen mouse model at various ages and focusing on different parameters [10–12]. Homozygous *Twist*-null mice present a lethal embryonic phenotype. Embryo and new-born studies reported extra toes on one or both hindfeet in *Twist*^{+/-} heterozygotes and minor defects in several bones of the calvaria (squamosal, interparietal, and supraoccipital). From P9 to P13, these mice showed an abnormal coronal suture closure process that has been shown to be governed by endochondral ossification. Coronal suture fusion is not the only defect in the skull of *Twist*^{+/-} mice, which also mice present a limited regenerative capacity of the cranial vault (analyzed on a resynostosis model) and anomalies in the development of the skull base. Accelerated sphenoid-occipital synchondrosis tether formation has been reported in *Twist*^{+/-} mice. However, this anomaly occurs at P25–P30, well after normal coronal suture fusion time. For this reason, it is unlikely that the observed skull base defects are responsible for the coronal fusion. The Saethre-Chotzen syndrome mouse model presents incomplete penetrance and variable expressivity, and noteworthy that this has also been reported in human patients.

Another mouse model exists using *Twist 1*, based on the finding, in a cohort of patients presenting isolated sagittal and coronal craniosynostosis, of 1 case with an isolated sagittal synostosis due to a novel mutation in *Twist1* box: Ser188Leu. [13]. The homologous Serine in *Twist1* is mutated in a mouse model called Charlie Chaplin (CC). CC mice were generated through ENU mutagenesis. CC⁺ mice harbor the heterozygous single amino acid substitution mutation Ser192Pro in the *Twist* box of *Twist1*. The phenotype of this model, however, includes single sagittal stenosis. The mice present hindlimb polydactyly and anomalies of sagittal, coronal and lambdoidal sutures. However, the CC mouse phenotype is variable,

with 50% of the animals presenting polydactyly in both hindlimbs. The large majority of the analyzed CC⁺ mice (94%) showed coronal synostosis at P10.

The model was presented in a study highlighting the inhibitory role of *Twist* proteins toward *Runx2* and their necessary inhibition to determine osteoblast differentiation [14]. However, since the mouse model does not present an isolated single-suture fusion, but sagittal, coronal and lambdoidal suture irregularities at the same time, the CC model is far from ideal to study isolated sagittal synostosis.

4.7. Mouse model mimicking Boston-type craniosynostosis (*Msx2* transgenic)

Two mouse lineages express the *Msx2* mutation Pro7His, also observed in Boston-type craniosynostosis patients, under two different promoters: *TIMP1* and *CMV* (ubiquitous promoters) [15]. The third model overexpresses the wild-type form of *Msx* (*CMV* promoter). All three models present premature fusion of sagittal, coronal and lambdoidal sutures from P1 with variable expressivity. With these results, Liu et al. concluded that the *Msx2* mutations responsible for the craniosynostosis are gain-of-function mutations. Nonetheless, it is also interesting to note that these models have incomplete penetrance: 30% of mutant *Msx2*-expressing mice and 70% of WT overexpressing mice show a craniosynostosis phenotype.

4.8. Mouse model mimicking trigonocephaly (*Frem1*^{ba}, *Frem1*^{Qbrick})

Frem1 mice were developed following the identification of 5 patients with de novo CNVs involving *Frem1* gene and 3 patients presenting missense mutation in the same gene [16]. Firstly, Vissers et al. used *in situ* hybridization to investigate the pattern of expression of *Frem1*. They observed *Frem1* presence in the skull area where the posterior-frontal suture would arise in E14.5–E16.5 mice. Secondly, immunostaining for *Frem1* in P0 mice revealed consistent expression of the protein in pericranium and dura mater surrounding the frontal bones. *Frem1* expression was also observed in osteoprogenitors localized in between the frontal bones, suggesting a role in the developing frontal and nasal sutures.

To validate their findings, they compared the pathological human phenotype with two *Frem1* mouse models. The first, named *Frem1*^{bat}, results from a single nucleotide substitution that affects the normal mRNA splicing of *Frem1*. The substitution leads to frameshift and premature truncation of the *Frem1* protein, and for this reason *Frem1*^{bat} is thought to be a hypomorphic allele. The second mouse model is *Frem1*^{Qbrick}, which presents a null allele. In both models, homozygote mice present peculiar dysmorphologies compared to control mice. Morphometric analyses showed deformation of frontal and nasal bones in mutant mice. As previously shown in other craniosynostosis mouse models, incomplete penetrance was observed: only 45% of the homozygote *Frem1* mutant mice presented defects in the frontal region of the skull, in the form of pronounced deviation of the midface and a shortened snout. Moreover, both *Frem1*^{bat} and *Frem1*^{Qbrick} P28 mice displayed advanced posterior frontal suture fusion compared to wild-type control mice. Furthermore, heterozygous mutant mice partly exhibit these anomalies.

4.9. Mouse model mimicking EFNA4 non-syndromic coronal synostosis (*Epha4*^{-/-})

Loss-of-function heterozygous mutations in *EFNA* have been observed in patients with non-syndromic coronal synostosis [17].

To validate the link between the phenotype and these genetic findings, Ting et al. carried out analyses with an EphA4 mutant mouse presenting coronal synostosis [18]. The phenotype of *Epha4*^{-/-} mice includes uni/bi-lateral coronal synostosis, a phenotype that was previously observed in *Twist1*^{+/-} mice (and presented in the Saethre-Chotzen syndrome section above). This observation, paired with the fact that analyses of *Epha4* performed by *in situ* hybridization showed decreased expression of this protein in *Twist1*^{+/-} mice, suggests a role of *Epha4* as an effector of *Twist1*. At the same time, *Twist1* expression in *Epha4*^{-/-} mice was unchanged, suggesting that *Twist1* acts through Eph-ephrin signaling, regulating coronal suture development.

4.10. Mouse model mimicking Greig cephalopolysyndactyly (*Gli3*^{Xt-J/Xt-J})

Greig cephalopolysyndactyly syndrome is caused by missense mutations in *GLI3* and characterized by craniofacial abnormalities including macrocephaly and scaphocephaly (long and narrow cranial vault, respectively). Craniosynostosis has also been reported in patients with Greig cephalopolysyndactyly, although it is not always present. One of the peculiar features observed in these patients is the presence of polydactyly in both hands and feet.

In wild-type mouse embryos, *Gli3* transcripts were highly and strictly expressed on the interparietal side of the lambdoid and interfrontal sutures, suggesting a role of the protein in their development. A mutant mouse model called Extra-toes (*Gli3*^{Xt-J/Xt-J}), presenting a deletion of *Gli3*, is considered a valid model for Greig cephalopolysyndactyly syndrome [19]. Extra-toes is a spontaneous semi-dominant mouse mutation, and the affected mice exhibit polydactyly as well as defects in the craniofacial region. In E18.5 *Gli3*^{Xt-J/Xt-J} mice, a dome-shaped skull was observed, with lambdoid suture fusion and cranial base anomalies. Rice and colleagues showed, through *in situ* hybridization experiments, that *Gli3*^{Xt-J/Xt-J} mice show abnormal expression of *Ptch1* in the area where the lambdoid suture subsequently develops, while at the same time *Twist1* expression is downregulated [20]. Lack of *Twist1* expression in the suture stops the inhibition of *Runx2*, allowing osteoblast differentiation, bone formation and, consequently, craniosynostosis. Interestingly, the same group demonstrated an increase in cell proliferation in E16.5 *Gli3*^{Xt-J/Xt-J} mice at suture level and were able to rescue the craniosynostosis phenotype using FGF2 beads.

5. Zebrafish models of craniosynostoses

Zebrafish has been used to study craniofacial development. As in mammals, the zebrafish skeleton is formed via both endochondral and membranous ossification processes. A majority of studies focused on the early stages of craniofacial skeleton development, including the formation of the neurocranium and viscerocranium. The former provides a support for the brain and sensory systems while the latter corresponds to the mandibular elements and respiratory apparatus. Both of these structures are mostly formed of cartilage at 5 days after fecundation and are later replaced by bone. At this stage, the zebrafish presents a simplified skeleton with a cartilage consisting of a few cell layers that are easy to study using Alcian blue/Alizarin red staining or live imaging. The formation of these structures early during zebrafish development has been extensively studied due to structure homology between fish and mammals [21]. For example, the bones forming the jaw and connecting the viscerocranium to the ear in fish are evolutionarily speaking the precursor of the mammalian middle ear. Likewise, the anterior neurocranium is an excellent model for the hard palate. Both of these structures derive from cranial neural crest cells and

their formation seems to be regulated by a conserved genetic network across vertebrate species. Several studies demonstrated that knockdown of genes involved in human cleft palate formation, such as *irf6*, *faf1* or *crispld2*, induces a similar phenotype in zebrafish [22–24].

Contrary to the neurocranium and the viscerocranium, zebrafish cranial vault development occurs at 3–6 weeks post-fertilization, at the juvenile stage. In zebrafish as in mammals, the calvaria is formed by thin membranous bones separated by sagittal and coronal sutures, separating frontal and parietal bones. One specificity of the zebrafish calvaria is the persistence of the sutures following skull extension and growth throughout life [25]. The same characteristic is observed in rodents. Moreover, zebrafish bones flanking the coronal sutures derive from mesoderm, whereas in mammals coronal sutures mark the boundary between anterior neural crest bones and the posterior mesoderm bones. Despite these differences, the conservation of the anatomical calvaria structures and the accessibility of the skull make zebrafish a good model to study suture formation.

Unlike in mouse models, only a few studies of skull formation and craniosynostosis were performed in zebrafish, due to a lack of adult zebrafish mutants. Most craniofacial mutants are obtained by large-scale forward-genetic chemical ENU treatment or insertional mutagenesis screening focused on severe craniofacial defects mainly affecting neurocranium and viscerocranium. Also, mutants were screened at early embryonic stages (5–6 days post-fecundation), which limits the screening to the identification of genes that are important in early development, while genes controlling later stages were not studied.

6. Discussion

Animal models have proved useful for understanding craniofacial growth.

In particular, because of analogous craniofacial development between mice and humans, several models mimicking human pathology have been generated.

The mouse interfrontal suture, localized between frontal bones and analogous to the human metopic suture, undergoes fusion between postnatal days 7 and 12. The other sutures (sagittal, coronal, lambdoid) remain patent throughout the life of the mouse. For many years, various research groups have studied the role of key genes and their signaling in craniosynostoses processes, using various mouse models. These models mimicked the human pathology, with varying exactness, and allowed pharmacological treatment of the phenotype to be tested. These studies constitute a first step and promise progress in treatment design for the pathology.

Zebrafish is also a valuable model for studying craniofacial skeletal development and cranial vault formation. The use of this teleost fish as a predictive model for human development and diseases has been increasing for 30 years, for multiple reasons. Firstly, as a vertebrate, zebrafish share a high degree of sequence homology with the human genome; 70% of human genes have a zebrafish orthologue, and the genome of zebrafish was sequenced in the early 2000s. Secondly, the rapidity of embryogenesis, the external development and the optical transparency of the embryo allow live imaging experiments and developmental studies. The short generation time and the huge number of descendants (about 100 per clutch) make zebrafish a powerful model for genetic screening and therapeutic trials.

Studies on skull formation using zebrafish demonstrated the relevance of the model, with suture formation mechanisms conserved across vertebrate species. Topcweska et al. demonstrated, by *in situ* hybridization, that most of the genes involved in suture development in mammals are conserved in zebrafish:

coll1a1a, *col2a1a*, *coll10a1*, *bgal/osteocalcin*, *fgfrs*, *twist2*, *twist3*, *runx2a*, *runx2b*, *sp7*, and *osteopontin* [25]. Moreover, study of the expression of IL11RA, which is involved in premature fusion of cranial sutures in patients with Crouzon-like syndromes and pansynostosis, revealed its presence in the coronal sutures of zebrafish and mouse. These results confirm the role of IL11ra in frontal and parietal bone separation [26].

Other studies highlighted mechanisms involved in calvaria and suture formation and in premature fusion of the sutures. Due to skull accessibility and existence of transgenic lines with promoters driving fluorescent reporter expression in the developing craniofacial skeleton (e.g. *runx2*, *sp7*, type I collagen), zebrafish is a suitable model for live imaging. Kague et al. used this strategy to study the dynamic process involved in calvaria formation and demonstrated the importance of *Sp7*, a gene required for osteoblast differentiation, in this process [27]. *Sp7* mutant fish present abnormal calvaria formation with no normal patterned sutures and skull bones. Using a transgenic line expressing the green fluorescent protein (GFP) under the control of *Runx2*, expressed in early osteoblasts, they demonstrated that signaling from differentiated osteoblasts is critical to limiting overproliferation of immature osteoblasts, leading to abnormal bone overlap and suture formation. Their study thus highlighted a new mechanism involved in skull patterning and showed that signals from the bone itself are required for orderly recruitment of precursor cells and growth along the edge.

It is well known that retinoic acid (RA) influences suture formation. In humans, partial loss of CYP26B1, an enzyme able to inactivate RA, induces severe defects in the calvarial plates of the skull roof, including premature fusion of the coronal sutures between the frontal and parietal plates. The phenotype of CYP26B1-null humans is more severe, with smaller and fragmented calvaria. Laue et al., using a hypomorphic CYP26B1 zebrafish model, demonstrated that premature fusion is due to premature transition of osteoblasts to preosteocytes within the coronal sutures [28]. This premature accumulation of preosteocytes within the suture of the hypomorphs leads to ectopic mineralization of the sutural matrix, whence the apparent hyperossification. A more recent study completed previous results and explained the different phenotypes observed between hypomorph and amorph patients. Treating juvenile zebrafish with a high level of exogenous RA or with Cyp26 inhibitors, Jeradi et al. obtained a phenotype similar to amorph patients, with thinner and fragmented calvaria [29]. They demonstrated that the fragmented calvaria is due not only to premature differentiation of osteoblasts into preosteocytes but also to activation of osteoclasts through the resultant preosteocytes.

In the last decade, new tools were developed to perform mutagenesis of candidate genes, such as CrispR/Cas9 technology, which targets the Cas9 endonuclease at specific sites in the genome using specific guideRNAs. This technology is fast improving and it is now possible to generate both targeted knockout and knock-in mutants in zebrafish. The development of this technology will be useful for testing putative disease alleles and studying the impact of mutations on skull formation from a dynamic cellular and molecular point of view.

7. Conclusion

Several zebrafish and mouse models mimicking craniosynostoses have been developed in recent decades. These animal models have been helpful for our understanding of normal and pathological craniofacial growth. They can be easily used for the screening of drugs as therapeutic candidates.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

- [1] 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* 2000;9:2001–8.
- [2] Chen L, Li D, Li C, Engel A, Deng C-X. A Ser252Trp [corrected] substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 (*Fgfr2*) results in craniosynostosis. *Bone* 2003;33:169–78.
- [3] 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* 2008;42:631–43, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2007.11.019>.
- [4] Eswarakumar VP, Horowitz MC, Locklin R, Morriss-Kay GM, Lonai P. A gain-of-function mutation of *Fgfr2c* demonstrates the roles of this receptor variant in osteogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:12555–60, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0405031101>.
- [5] Mai S, Wei K, Flenniken A, Adamson SL, Rossant J, Aubin JE, et al. The missense mutation W290R in *Fgfr2* causes developmental defects from aberrant *Il1b* and *Il1c* signaling. *Dev Dyn* 2010;239:1888–900, <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.22314>.
- [6] Wang Y, Zhou X, Oberoi K, Phelps R, Couwenhoven R, Sun M, et al. p38 Inhibition ameliorates skin and skull abnormalities in *Fgfr2* Beare–Stevenson mice. *J Clin Invest* 2012;122:2153–64, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI62644>.
- [7] Laurita J, Koyama E, Chin B, Taylor JA, Lakin GE, Hankenson KD, et al. The Muenke syndrome mutation (*Fgfr3*P244R) causes cranial base shortening associated with growth plate dysfunction and premature perichondrial ossification in murine basicranial synchondroses. *Dev Dyn* 2011;240:2584–96, <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.22752>.
- [8] Twigg SRF, Healy C, Babbs C, Sharpe JA, Wood WG, Sharpe PT, et al. Skeletal analysis of the *Fgfr3*(P244R) mouse, a genetic model for the Muenke craniosynostosis syndrome. *Dev Dyn* 2009;238:331–42, <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.21790>.
- [9] Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Danse JM, Bloch-Zupan A, Yoshida K, Stoetzel C, et al. The variable expressivity and incomplete penetrance of the twist-null heterozygous mouse phenotype resemble those of human Saethre–Chotzen syndrome. *Hum Mol Genet* 1998;7:945–57.
- [10] Behr B, Longaker MT, Quarto N. Craniosynostosis of coronal suture in *twist1* mice occurs through endochondral ossification recapitulating the physiological closure of posterior frontal suture. *Front Physiol* 2011;2:37, <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2011.00037>.
- [11] Carver EA, Oram KF, Gridley T. Craniosynostosis in *Twist* heterozygous mice: a model for Saethre–Chotzen syndrome. *Anat Rec* 2002;268:90–2, <http://dx.doi.org/10.1002/ar.10124>.
- [12] Hermann CD, Lee CSD, Gadepalli S, Lawrence KA, Richards MA, Olivares-Navarrete R, et al. Interrelationship of cranial suture fusion, basicranial development, and resynostosis following suturotomy in *twist1*(+/-) mice, a murine model of Saethre–Chotzen syndrome. *Calcif Tissue Int* 2012;91:255–66, <http://dx.doi.org/10.1007/s00223-012-9632-3>.
- [13] Seto ML, Hing AV, Chang J, Hu M, Kapp-Simon KA, Patel PK, et al. Isolated sagittal and coronal craniosynostosis associated with TWIST box mutations. *Am J Med Genet A* 2007;143A:678–86, <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.31630>.
- [14] Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Sosic D, Hong N, et al. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell* 2004;6:423–35.
- [15] Liu YH, Kundu R, Wu L, Luo W, Ignelzi MA, Snead ML, et al. Premature suture closure and ectopic cranial bone in mice expressing *Msx2* transgenes in the developing skull. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6137–41.
- [16] Vissers LELM, Cox TC, Maga AM, Short KM, Wiradjaja F, Janssen IM, et al. Heterozygous mutations of *FREM1* are associated with an increased risk of isolated metopic craniosynostosis in humans and mice. *PLoS Genet* 2011;7:e1002278, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002278>.
- [17] Merrill AE, Bochkukova EG, Brugger SM, Ishii M, Pilz DT, Wall SA, et al. Cell mixing at a neural crest-mesoderm boundary and deficient ephrin–Eph signaling in the pathogenesis of craniosynostosis. *Hum Mol Genet* 2006;15:1319–28, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddl052>.
- [18] Ting M-C, Wu NL, Roybal PG, Sun J, Liu L, Yen Y, et al. EphA4 as an effector of *Twist1* in the guidance of osteogenic precursor cells during calvarial bone growth and in craniosynostosis. *Dev Camb Engl* 2009;136:855–64, <http://dx.doi.org/10.1242/dev.028605>.
- [19] Hui CC, Joyner AL. A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toes1 mutation contains an intragenic deletion of the *Gli3* gene. *Nat Genet* 1993;3:241–6, <http://dx.doi.org/10.1038/ng0393-241>.
- [20] Rice DPC, Connor EC, Veltmaat JM, Lana-Elola E, Veistinen L, Tanimoto Y, et al. *Gli3*Xt-J/Xt-J mice exhibit lambdoid suture craniosynostosis which results from altered osteoprogenitor proliferation and differentiation. *Hum Mol Genet* 2010;19:3457–67, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq258>.
- [21] Mork L, Crump G. Zebrafish Craniofacial Development: A Window into Early Patterning. *Curr Top Dev Biol* 2015;115:235–69, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bs.ctdb.2015.07.001>.

- [22] Dougherty M, Kamel G, Grimaldi M, Gfrerer L, Shubinets V, Ethier R, et al. Distinct requirements for *wnt9a* and *irf6* in extension and integration mechanisms during zebrafish palate morphogenesis. *Dev Camb Engl* 2013;140:76–81, <http://dx.doi.org/10.1242/dev.080473>.
- [23] Ghassibe-Sabbagh M, Desmyter L, Langenberg T, Claes F, Boute O, Bayet B, et al. FAF1, a gene that is disrupted in cleft palate and has conserved function in zebrafish. *Am J Hum Genet* 2011;88:150–61, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.01.003>.
- [24] Yuan Q, Chiquet BT, Devault L, Warman ML, Nakamura Y, Swindell EC, et al. Craniofacial abnormalities result from knock down of nonsyndromic clefting gene, *crisp1d2*, in zebrafish. *Genes NYN* 2000 2012;50:871–81, <http://dx.doi.org/10.1002/dvg.22051>.
- [25] Topczewska JM, Shoela RA, Tomaszewski JP, Mirmira RB, Gosain AK. The Morphogenesis of Cranial Sutures in Zebrafish. *PLoS One* 2016;11:e0165775, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0165775>.
- [26] Keupp K, Li Y, Vargel I, Hoischen A, Richardson R, Neveling K, et al. Mutations in the interleukin receptor *IL11RA* cause autosomal recessive Crouzon-like craniosynostosis. *Mol Genet Genomic Med* 2013;1:223–37, <http://dx.doi.org/10.1002/mgg3.28>.
- [27] Kague E, Roy P, Asselin G, Hu G, Simonet J, Stanley A, et al. Osterix/Sp7 limits cranial bone initiation sites and is required for formation of sutures. *Dev Biol* 2016;413:160–72, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.03.011>.
- [28] Laue K, Pogoda H-M, Daniel PB, van Haeringen A, Alanay Y, von Ameln S, et al. Craniosynostosis and multiple skeletal anomalies in humans and zebrafish result from a defect in the localized degradation of retinoic acid. *Am J Hum Genet* 2011;89:595–606, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.09.015>.
- [29] Jeradi S, Hammerschmidt M. Retinoic acid-induced premature osteoblast-to-preosteocyte transitioning has multiple effects on calvarial development. *Dev Camb Engl* 2016;143:1205–16, <http://dx.doi.org/10.1242/dev.129189>.

Références

- Abuharbeid, S., Czubyko, F., Aigner, A., 2006. The fibroblast growth factor-binding protein FGF-BP. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1463–1468. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.10.017>
- Adameyko, I., Fried, K., 2016. The Nervous System Orchestrates and Integrates Craniofacial Development: A Review. *Front Physiol* 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00049>
- Agochukwu, N.B., Solomon, B.D., Benson, L.J., Muenke, M., 2013. Talocalcaneal coalition in Muenke syndrome: report of a patient, review of the literature in FGFR-related craniosynostoses, and consideration of mechanism. *Am. J. Med. Genet. A* 161A, 453–460. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35233>
- Agochukwu, N.B., Solomon, B.D., Gropman, A.L., Muenke, M., 2012. Epilepsy in Muenke syndrome: FGFR3-related craniosynostosis. *Pediatr. Neurol.* 47, 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2012.07.004>
- Agochukwu, N.B., Solomon, B.D., Muenke, M., 2014. Hearing loss in syndromic craniosynostoses: introduction and consideration of mechanisms. *Am J Audiol* 23, 135–141. https://doi.org/10.1044/2014_AJA-13-0036
- al-Qattan, M.M., Phillips, J.H., 1997. Clinical features of Crouzon's syndrome patients with and without a positive family history of Crouzon's syndrome. *J Craniofac Surg* 8, 11–13.
- Aldridge, K., Hill, C.A., Austin, J.R., Percival, C., Martinez-Abadias, N., Neuberger, T., Wang, Y., Jabs, E.W., Richtsmeier, J.T., 2010. Brain phenotypes in two FGFR2 mouse models for Apert syndrome. *Dev. Dyn.* 239, 987–997. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22218>
- AMANN, R., TRUEB, B., 2013. Evidence that the novel receptor FGFR1L1 signals indirectly via FGFR1. *Int J Mol Med* 32, 983–988. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1484>
- Aravidis, C., Konialis, C.P., Kosmaidou, Z., 2014. A familial case of Muenke syndrome. Diverse expressivity of the FGFR3 Pro252Arg mutation--case report and review of the literature. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 27, 1502–1506. <https://doi.org/10.3109/14767058.2013.860520>
- Arman, E., Haffner-Krausz, R., Chen, Y., Heath, J.K., Lonai, P., 1998. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5082–5087.
- Armelin, H.A., 1973. Pituitary Extracts and Steroid Hormones in the Control of 3T3 Cell Growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 2702–2706.
- Arnaud, E., Meneses, P., Lajeunie, E., Thorne, J.A., Marchac, D., Renier, D., 2002. Postoperative mental and morphological outcome for nonsyndromic brachycephaly. *Plast. Reconstr. Surg.* 110, 6–12; discussion 13.
- Arnaud-López, L., Fragoso, R., Mantilla-Capacho, J., Barros-Núñez, P., 2007. Crouzon with acanthosis nigricans. Further delineation of the syndrome. *Clin. Genet.* 72, 405–410. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00884.x>
- Aurbach, E.L., Inui, E.G., Turner, C.A., Hagenauer, M.H., Prater, K.E., Li, J.Z., Absher, D., Shah, N., Blandino, P., Bunney, W.E., Myers, R.M., Barchas, J.D., Schatzberg, A.F., Watson, S.J., Akil, H., 2015. Fibroblast growth factor 9 is a novel modulator of negative affect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 11953–11958. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510456112>
- Azoury, S.C., Reddy, S., Shukla, V., Deng, C.-X., 2017. Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) Mutation Related Syndromic Craniosynostosis. *Int J Biol Sci* 13, 1479–1488. <https://doi.org/10.7150/ijbs.22373>
- Baertschi, S., Zhuang, L., Trueb, B., 2007. Mice with a targeted disruption of the *Fgfr1* gene die at birth due to alterations in the diaphragm. *FEBS J.* 274, 6241–6253. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06143.x>
- Bansal, R., Lakhina, V., Remedios, R., Tole, S., 2003. Expression of FGF receptors 1, 2, 3 in the embryonic and postnatal mouse brain compared with *Pdgfralpha*, *Olig2* and *Plp/dm20*:

- implications for oligodendrocyte development. *Dev. Neurosci.* 25, 83–95.
<https://doi.org/72258>
- Baujat, G., Legeai-Mallet, L., Finidori, G., Cormier-Daire, V., Le Merrer, M., 2008. Achondroplasia. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22, 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2007.12.008>
- Beenken, A., Mohammadi, M., 2009. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8, 235–253. <https://doi.org/10.1038/nrd2792>
- Behr, B., Longaker, M.T., Quarto, N., 2011. Craniosynostosis of Coronal Suture in *Twist1*^{+/-} Mice Occurs Through Endochondral Ossification Recapitulating the Physiological Closure of Posterior Frontal Suture. *Front Physiol* 2. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00037>
- Behr, B., Longaker, M.T., Quarto, N., 2010. Differential activation of canonical Wnt signaling determines cranial sutures fate: A novel mechanism for sagittal suture craniosynostosis. *Developmental Biology* 344, 922–940. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.06.009>
- Bellus, G.A., Gaudenz, K., Zackai, E.H., Clarke, L.A., Szabo, J., Francomano, C.A., Muenke, M., 1996. Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. *Nat. Genet.* 14, 174–176.
<https://doi.org/10.1038/ng1096-174>
- Bellus, G.A., McIntosh, I., Smith, E.A., Aylsworth, A.S., Kaitila, I., Horton, W.A., Greenhaw, G.A., Hecht, J.T., Francomano, C.A., 1995. A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. *Nat. Genet.* 10, 357–359.
<https://doi.org/10.1038/ng0795-357>
- Belov, A.A., Mohammadi, M., 2013. Molecular Mechanisms of Fibroblast Growth Factor Signaling in Physiology and Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015958>
- Bernal, A., Arranz, L., 2018. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci* 75, 2177–2195. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2794-z>
- BGJ-398 (CHEBI:63451) [WWW Document], n.d. URL
<https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:63451> (accessed 9.1.19).
- Bhatt, S., Diaz, R., Trainor, P.A., 2013. Signals and Switches in Mammalian Neural Crest Cell Differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008326>
- Biosse Duplan, M., Komla-Ebri, D., Heuzé, Y., Estivals, V., Gaudas, E., Kaci, N., Benoist-Lasselien, C., Zerah, M., Kramer, I., Kneissel, M., Porta, D.G., Di Rocco, F., Legeai-Mallet, L., 2016. Meckel's and condylar cartilages anomalies in achondroplasia result in defective development and growth of the mandible. *Hum Mol Genet* 25, 2997–3010.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddw153>
- Blair, H.C., Robinson, L.J., Huang, C.L.-H., Sun, L., Friedman, P.A., Schlesinger, P.H., Zaidi, M., 2011. Calcium and bone disease. *Biofactors* 37, 159–167. <https://doi.org/10.1002/biof.143>
- Blomberg, M., Jeppesen, E.M., Skovby, F., Benfeldt, E., 2010. FGFR3 mutations and the skin: report of a patient with a FGFR3 gene mutation, acanthosis nigricans, hypochondroplasia and hyperinsulinemia and review of the literature. *Dermatology (Basel)* 220, 297–305.
<https://doi.org/10.1159/000297575>
- Blount, J.P., Louis, R.G., Tubbs, R.S., Grant, J.H., 2007. Pansynostosis: a review. *Childs Nerv Syst* 23, 1103–1109. <https://doi.org/10.1007/s00381-007-0362-1>
- Bonaventure, J., El Ghouzzi, V., 2003. Molecular and cellular bases of syndromic craniosynostoses. *Expert Rev Mol Med* 5, 1–17. <https://doi.org/doi:10.1017/S1462399403005751>
- Borello, U., Cobos, I., Long, J.E., Murre, C., Rubenstein, J.L., 2008. FGF15 promotes neurogenesis and opposes FGF8 function during neocortical development. *Neural Dev* 3, 1–19.
<https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-17>
- Breinholt, V.M., Rasmussen, C.E., Mygind, P.H., Kjølgaard-Hansen, M., Faltinger, F., Bernhard, A., Zettler, J., Hersel, U., 2019. TransCon CNP, a sustained-release C-Type Natriuretic Peptide prodrug, a potentially safe and efficacious new therapeutic modality for the treatment of

- comorbidities associated with FGFR3-related skeletal dysplasias. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* <https://doi.org/10.1124/jpet.119.258251>
- Breitbart, A.S., Eaton, C., McCarthy, J.G., 1989. Crouzon's syndrome associated with acanthosis nigricans: ramifications for the craniofacial surgeon. *Ann Plast Surg* 22, 310–315.
- Brewer, J.R., Mazot, P., Soriano, P., 2016. Genetic insights into the mechanisms of Fgf signaling. *Genes Dev.* 30, 751–771. <https://doi.org/10.1101/gad.277137.115>
- Britto, J.A., Evans, R.D., Hayward, R.D., Jones, B.M., 2001. From genotype to phenotype: the differential expression of FGF, FGFR, and TGFbeta genes characterizes human cranioskeletal development and reflects clinical presentation in FGFR syndromes. *Plast. Reconstr. Surg.* 108, 2026–2039; discussion 2040–2046.
- Chen, C., Lin, S., Su, Y., Huang, J., Wang, W., 2006. A cloverleaf skull associated with Crouzon syndrome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 91, F98. <https://doi.org/10.1136/adc.2005.087577>
- Chen, F., Degnin, C., Laederich, M., Horton, W., Hristova, K., 2011. The A391E mutation enhances FGFR3 activation in the absence of ligand. *Biochim Biophys Acta* 1808, 2045–2050. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2011.04.007>
- Chen, F., Sarabipour, S., Hristova, K., 2013. Multiple Consequences of a Single Amino Acid Pathogenic RTK Mutation: The A391E Mutation in FGFR3. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056521>
- Chen, L., Adar, R., Yang, X., Monsonigo, E.O., Li, C., Hauschka, P.V., Yayon, A., Deng, C.X., 1999. Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *J. Clin. Invest.* 104, 1517–1525. <https://doi.org/10.1172/JCI6690>
- Chen, L., Li, D., Li, C., Engel, A., Deng, C.-X., 2003. A Ser252Trp [corrected] substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) results in craniosynostosis. *Bone* 33, 169–178.
- Cinalli, G., Renier, D., Sebag, G., Sainte-Rose, C., Arnaud, E., Pierre-Kahn, A., 1995. Chronic tonsillar herniation in Crouzon's and Apert's syndromes: the role of premature synostosis of the lambdoid suture. *J. Neurosurg.* 83, 575–582. <https://doi.org/10.3171/jns.1995.83.4.0575>
- Cohen, M.M., 1999. Let's call it "Crouzonodermoskeletal syndrome" so we won't be prisoners of our own conventional terminology. *Am. J. Med. Genet.* 84, 74.
- Coleman, S.J., Bruce, C., Chioni, A.-M., Kocher, H.M., Grose, R.P., 2014. The ins and outs of fibroblast growth factor receptor signalling. *Clinical Science* 127, 217–231. <https://doi.org/10.1042/CS20140100>
- Coll, G., Sakka, L., Botella, C., Pham-Dang, N., Collet, C., Zerah, M., Arnaud, E., Di Rocco, F., 2018. Pattern of Closure of Skull Base Synchronroses in Crouzon Syndrome. *World Neurosurgery* 109, e460–e467. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.09.208>
- Colvin, J.S., Bohne, B.A., Harding, G.W., McEwen, D.G., Ornitz, D.M., 1996. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.* 12, 390–397. <https://doi.org/10.1038/ng0496-390>
- Connerney, J., Andreeva, V., Leshem, Y., Mercado, M.A., Dowell, K., Yang, X., Lindner, V., Friesel, R.E., Spicer, D.B., 2008. Twist1 homodimers enhance FGF responsiveness of the cranial sutures and promote suture closure. *Developmental Biology* 318, 323–334. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.03.037>
- Conrady, C.D., Patel, B.C., 2018. Crouzon Syndrome, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Coughlin, S.R., Barr, P.J., Cousens, L.S., Fretto, L.J., Williams, L.T., 1988. Acidic and basic fibroblast growth factors stimulate tyrosine kinase activity in vivo. *J. Biol. Chem.* 263, 988–993.
- Crouzon, O., 1935. La dysostose cranio-faciale héréditaire. *Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris* 6, 41–45. <https://doi.org/10.3406/bmsap.1935.9331>
- Da Costa, A.C., Anderson, V.A., Holmes, A.D., Lo, P., Wray, A.C., Chong, D.K., Greensmith, A.L., Meara, J.G., 2013. Longitudinal study of the neurodevelopmental characteristics of treated and

- untreated nonsyndromic craniosynostosis in infancy. *Childs Nerv Syst* 29, 985–995. <https://doi.org/10.1007/s00381-012-2017-0>
- Dabrowski, A., Terauchi, A., Strong, C., Umemori, H., 2015. Distinct sets of FGF receptors sculpt excitatory and inhibitory synaptogenesis. *Development* 142, 1818–1830. <https://doi.org/10.1242/dev.115568>
- Das, S., Munshi, A., 2018. Research advances in Apert syndrome. *J Oral Biol Craniofac Res* 8, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2017.05.006>
- de Jong, T., Bannink, N., Bredero-Boelhouwer, H.H., van Veelen, M.L.C., Bartels, M.C., Hoeve, L.J., Hoozeboom, A.J.M., Wolvius, E.B., Lequin, M.H., van der Meulen, J.J.N.M., van Adrichem, L.N.A., Vaandrager, J.M., Ongkosuwito, E.M., Joosten, K.F.M., Mathijssen, I.M.J., 2010. Long-term functional outcome in 167 patients with syndromic craniosynostosis; defining a syndrome-specific risk profile. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63, 1635–1641. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2009.10.029>
- de Jong, T., Maliepaard, M., Bannink, N., Raat, H., Mathijssen, I.M.J., 2012. Health-related problems and quality of life in patients with syndromic and complex craniosynostosis. *Childs Nerv Syst* 28, 879–882. <https://doi.org/10.1007/s00381-012-1681-4>
- de Lahunta, A., Glass, E.N., Kent, M., 2016. Embryonic Development of the Central Nervous System. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 46, 193–216. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.10.011>
- Deckelbaum, R.A., Holmes, G., Zhao, Z., Tong, C., Basilico, C., Loomis, C.A., 2012. Regulation of cranial morphogenesis and cell fate at the neural crest-mesoderm boundary by engrailed 1. *Development* 139, 1346–1358. <https://doi.org/10.1242/dev.076729>
- Delashaw, J.B., Persing, J.A., Broaddus, W.C., Jane, J.A., 1989. Cranial vault growth in craniosynostosis. *Journal of Neurosurgery* 70, 159–165. <https://doi.org/10.3171/jns.1989.70.2.0159>
- Delezoide, A.-L., Benoist-Lasselin, C., Legeai-Mallet, L., Le Merrer, M., Munnich, A., Vekemans, M., Bonaventure, J., 1998. Spatio-temporal expression of FGFR 1, 2 and 3 genes during human embryo-fetal ossification. *Mechanisms of Development* 77, 19–30. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(98\)00133-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00133-6)
- Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A., Leder, P., 1996. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84, 911–921.
- Deng, C.X., Wynshaw-Boris, A., Shen, M.M., Daugherty, C., Ornitz, D.M., Leder, P., 1994. Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev.* 8, 3045–3057. <https://doi.org/10.1101/gad.8.24.3045>
- Di Rocco, F., Biosse Duplan, M., Heuzé, Y., Kaci, N., Komla-Ebri, D., Munnich, A., Mugniery, E., Benoist-Lasselin, C., Legeai-Mallet, L., 2014. FGFR3 mutation causes abnormal membranous ossification in achondroplasia. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2914–2925. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu004>
- Di Rocco, F., Collet, C., Legeai-Mallet, L., Arnaud, E., Le Merrer, M., Hadj-Rabia, S., Renier, D., 2011. Crouzon syndrome with acanthosis nigricans: a case-based update. *Childs Nerv Syst* 27, 349–354. <https://doi.org/10.1007/s00381-010-1347-z>
- Dicus Brookes, C., Golden, B.A., Turvey, T.A., 2014. Craniosynostosis syndromes. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 22, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.cxom.2014.04.001>
- Dudka, A.A., Sweet, S.M.M., Heath, J.K., 2010. Signal transducers and activators of transcription-3 binding to the fibroblast growth factor receptor is activated by receptor amplification. *Cancer Res.* 70, 3391–3401. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3033>
- Ekstrand, J., Hellsten, J., Tingström, A., 2008. Environmental enrichment, exercise and corticosterone affect endothelial cell proliferation in adult rat hippocampus and prefrontal cortex. *Neurosci. Lett.* 442, 203–207. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.06.085>
- Elsayed, M., Banasr, M., Duric, V., Fournier, N.M., Licznarski, P., Duman, R.S., 2012. Antidepressant effects of Fibroblast Growth Factor-2 in behavioral and cellular models of depression. *Biol Psychiatry* 72, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.03.003>

- Eswarakumar, V.P., Horowitz, M.C., Locklin, R., Morriss-Kay, G.M., Lonai, P., 2004. A gain-of-function mutation of Fgfr2c demonstrates the roles of this receptor variant in osteogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12555–12560. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405031101>
- Eswarakumar, V.P., Lax, I., Schlessinger, J., 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews, Fibroblast Growth Factors* 16, 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.001>
- Eswarakumar, V.P., Monsonigo-Ornan, E., Pines, M., Antonopoulou, I., Morriss-Kay, G.M., Lonai, P., 2002. The Il1c alternative of Fgfr2 is a positive regulator of bone formation. *Development* 129, 3783–3793.
- Fafilek, B., Hampl, M., Ricankova, N., Vesela, I., Balek, L., Kunova Bosakova, M., Gudernova, I., Varecha, M., Buchtova, M., Krejci, P., 2017. Statins do not inhibit the FGFR signaling in chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 25, 1522–1530. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2017.05.014>
- Furdui, C.M., Lew, E.D., Schlessinger, J., Anderson, K.S., 2006. Autophosphorylation of FGFR1 Kinase Is Mediated by a Sequential and Precisely Ordered Reaction. *Molecular Cell* 21, 711–717. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.022>
- Gallagher, E.R., Ratisoontorn, C., Cunningham, M.L., 1993. Saethre-Chotzen Syndrome, in: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Stephens, K., Amemiya, A. (Eds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Gao, Z., Ure, K., Ables, J.L., Lagace, D.C., Nave, K.-A., Goebbels, S., Eisch, A.J., Hsieh, J., 2009. Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nature Neuroscience* 12, 1090–1092. <https://doi.org/10.1038/nn.2385>
- Garcia, S., Dirat, B., Tognacci, T., Rochet, N., Mouska, X., Bonnafous, S., Patouraux, S., Tran, A., Gual, P., Marchand-Brustel, Y.L., Gennero, I., Gouze, E., 2013. Postnatal Soluble FGFR3 Therapy Rescues Achondroplasia Symptoms and Restores Bone Growth in Mice. *Science Translational Medicine* 5, 203ra124-203ra124. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006247>
- Gibbs, L., Legeai-Mallet, L., 2007. FGFR3 intracellular mutations induce tyrosine phosphorylation in the Golgi and defective glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773, 502–512. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.12.010>
- Gines, E., Rodriguez-Pichardo, A., Jorquera, E., Moreno, J.C., Camacho, F., 1996. Crouzon disease with acanthosis nigricans and melanocytic nevi. *Pediatr Dermatol* 13, 18–21.
- Glaser, R.L., Jiang, W., Boyadjiev, S.A., Tran, A.K., Zachary, A.A., Van Maldergem, L., Johnson, D., Walsh, S., Oldridge, M., Wall, S.A., Wilkie, A.O.M., Jabs, E.W., 2000. Paternal Origin of FGFR2 Mutations in Sporadic Cases of Crouzon Syndrome and Pfeiffer Syndrome. *Am J Hum Genet* 66, 768–777.
- Goetz, R., Mohammadi, M., 2013. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 166–180. <https://doi.org/10.1038/nrm3528>
- Goldfarb, M., Schoorlemmer, J., Williams, A., Diwakar, S., Wang, Q., Huang, X., Giza, J., Tchetchik, D., Kelley, K., Vega, A., Matthews, G., Rossi, P., Ornitz, D.M., D'Angelo, E., 2007. FIBROBLAST GROWTH FACTOR HOMOLOGOUS FACTORS CONTROL NEURONAL EXCITABILITY THROUGH MODULATION OF VOLTAGE GATED SODIUM CHANNELS. *Neuron* 55, 449–463. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.006>
- Gonçalves, J.T., Schafer, S.T., Gage, F.H., 2016. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167, 897–914. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.021>
- González-Del Angel, A., Caro-Contreras, A., Alcántara-Ortigoza, M.A., Ramos, S., Cruz-Alcívar, R., Moyers-Pérez, P., 2017. Unique association of hypochondroplasia with craniosynostosis and cleft palate in a Mexican family. *Am. J. Med. Genet. A.* <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38526>
- Goriely, A., Wilkie, A.O.M., 2012. Paternal Age Effect Mutations and Selfish Spermatogonial Selection: Causes and Consequences for Human Disease. *Am J Hum Genet* 90, 175–200. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.12.017>
- Götz, M., Huttner, W.B., 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrm1739>

- Governale, L.S., 2015. Craniosynostosis. *Pediatric Neurology* 53, 394–401.
<https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2015.07.006>
- Greives, M.R., Odessey, E.A., Waggoner, D.J., Shenaq, D.S., Aradhya, S., Mitchell, A., Whitcomb, E., Warshawsky, N., He, T.-C., Reid, R.R., 2013. RUNX2 quadruplication: additional evidence toward a new form of syndromic craniosynostosis. *J Craniofac Surg* 24, 126–129.
<https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e31826686d3>
- Grosso, S., Farnetani, M.A., Berardi, R., Bartalini, G., Carpentieri, M., Galluzzi, P., Mostardini, R., Morgese, G., Balestri, P., 2003. Medial temporal lobe dysgenesis in Muenke syndrome and hypochondroplasia. *American Journal of Medical Genetics Part A* 120A, 88–91.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.10171>
- Gudernova, I., Vesela, I., Balek, L., Buchtova, M., Dosedelova, H., Kunova, M., Pivnicka, J., Jelinkova, I., Roubalova, L., Kozubik, A., Krejci, P., 2015. Multikinase activity of fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitors SU5402, PD173074, AZD1480, AZD4547 and BGJ398 compromises the use of small chemicals targeting FGFR catalytic activity for therapy of short stature syndromes. *Hum. Mol. Genet.* <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv441>
- Guillemot, F., Zimmer, C., 2011. From Cradle to Grave: The Multiple Roles of Fibroblast Growth Factors in Neural Development. *Neuron* 71, 574–588.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.002>
- Gürbüz, F., Ceylaner, S., Topaloğlu, A.K., Yüksel, B., 2016. Crouzonodermoskeletal Syndrome with Hypoplasia of Corpus Callosum and Inferior Vermis. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 8, 373–374.
<https://doi.org/10.4274/jcrpe.3343>
- Hafner, C., van Oers, J.M.M., Vogt, T., Landthaler, M., Stoehr, R., Blaszyk, H., Hofstaedter, F., Zwarthoff, E.C., Hartmann, A., 2006. Mosaicism of activating FGFR3 mutations in human skin causes epidermal nevi. *J Clin Invest* 116, 2201–2207.
<https://doi.org/10.1172/JCI28163>
- Haupt, L.M., Murali, S., Mun, F.K., Teplyuk, N., Mei, L.F., Stein, G.S., van Wijnen, A.J., Nurcombe, V., Cool, S.M., 2009. The heparan sulfate proteoglycan (HSPG) glypican-3 mediates commitment of MC3T3-E1 cells toward osteogenesis. *J. Cell. Physiol.* 220, 780–791.
<https://doi.org/10.1002/jcp.21825>
- Hayashi, Y., Jinnou, H., Sawamoto, K., Hitoshi, S., 2018. Adult neurogenesis and its role in brain injury and psychiatric diseases. *J. Neurochem.* 147, 584–594. <https://doi.org/10.1111/jnc.14557>
- He, L., Shobnam, N., Wimley, W.C., Hristova, K., 2011. FGFR3 Heterodimerization in Achondroplasia, the Most Common Form of Human Dwarfism. *J Biol Chem* 286, 13272–13281.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.205583>
- Helsten, T., Schwaederle, M., Kurzrock, R., 2015. Fibroblast growth factor receptor signaling in hereditary and neoplastic disease: biologic and clinical implications. *Cancer Metastasis Rev.* <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9579-8>
- Herman, T.E., Sargar, K., Siegel, M.J., 2014. Crouzono-dermo-skeletal syndrome, Crouzon syndrome with acanthosis nigricans syndrome. *J Perinatol* 34, 164–165.
<https://doi.org/10.1038/jp.2013.139>
- Hill, C.A., Martinez-Abadias, N., Motch, S.M., Austin, J.R., Wang, Y., Jabs, E.W., Richtsmeier, J.T., Aldridge, K., 2013. Postnatal brain and skull growth in an Apert syndrome mouse model. *Am J Med Genet A* 161, 745–757. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35805>
- Hirai, H., Hamada, J., Hasegawa, K., Ishii, E., 2017. Acanthosis nigricans in a Japanese boy with hypochondroplasia due to a K650T mutation in FGFR3. *Clin Pediatr Endocrinol* 26, 223–228.
<https://doi.org/10.1297/cpe.26.223>
- Hollway, G.E., Suthers, G.K., Battese, K.M., Turner, A.M., David, D.J., Mulley, J.C., 1998. Deafness due to Pro250Arg mutation of FGFR3. *The Lancet* 351, 877–878. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)24012-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)24012-8)
- Holmes, G., Zhang, L., Rivera, J., Murphy, R., Assouline, C., Sullivan, L., Oppeneer, T., Jabs, E.W., 2018. C-type natriuretic peptide analog treatment of craniosynostosis in a Crouzon syndrome mouse model. *PLoS One* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201492>

- Horton, W.A., Hall, J.G., Hecht, J.T., 2007. Achondroplasia. *Lancet* 370, 162–172.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61090-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61090-3)
- Inglis-Broadgate, S.L., Thomson, R.E., Pellicano, F., Tartaglia, M.A., Pontikis, C.C., Cooper, J.D., Iwata, T., 2005. FGFR3 regulates brain size by controlling progenitor cell proliferation and apoptosis during embryonic development. *Developmental Biology* 279, 73–85.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.035>
- Ishii, M., Sun, J., Ting, M.-C., Maxson, R.E., 2015. The Development of the Calvarial Bones and Sutures and the Pathophysiology of Craniosynostosis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 115, 131–156.
<https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.004>
- Itoh, K., Pooh, R., Kanemura, Y., Yamasaki, M., Fushiki, S., 2013. Brain malformation with loss of normal FGFR3 expression in thanatophoric dysplasia type I. *Neuropathology* 33, 663–666.
<https://doi.org/10.1111/neup.12036>
- Itoh, N., Ornitz, D.M., 2008. Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Developmental Dynamics* 237, 18–27. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21388>
- Iwata, T., Hevner, R.F., 2009. Fibroblast growth factor signaling in development of the cerebral cortex. *Development, Growth & Differentiation* 51, 299–323. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01104.x>
- Iwata, T., Li, C.L., Deng, C.X., Francomano, C.A., 2001. Highly activated Fgfr3 with the K644M mutation causes prolonged survival in severe dwarf mice. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1255–1264.
<https://doi.org/10.1093/hmg/10.12.1255>
- Jabs, E.W., Li, X., Scott, A.F., Meyers, G., Chen, W., Eccles, M., Mao, J.I., Charnas, L.R., Jackson, C.E., Jaye, M., 1994. Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nat. Genet.* 8, 275–279. <https://doi.org/10.1038/ng1194-275>
- Jabs, E.W., Müller, U., Li, X., Ma, L., Luo, W., Haworth, I.S., Klisak, I., Sparkes, R., Warman, M.L., Mulliken, J.B., 1993. A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 75, 443–450.
- Janssen, A., Hosen, M.J., Jeannin, P., Coucke, P.J., De Paepe, A., Vanakker, O.M., 2013. Second family with the Boston-type craniosynostosis syndrome: novel mutation and expansion of the clinical spectrum. *Am. J. Med. Genet. A* 161A, 2352–2357.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36077>
- Jeftha, A., Stephen, L., Morkel, J.A., Beighton, P., 2004. Crouzonodermoskeletal syndrome. *J Clin Pediatr Dent* 28, 173–176.
- Jenkins, D., Seelow, D., Jehee, F.S., Perlyn, C.A., Alonso, L.G., Bueno, D.F., Donnai, D., Josifova, D., Josifova, D., Mathijssen, I.M.J., Morton, J.E.V., Orstavik, K.H., Sweeney, E., Wall, S.A., Marsh, J.L., Nurnberg, P., Passos-Bueno, M.R., Wilkie, A.O.M., 2007. RAB23 mutations in Carpenter syndrome imply an unexpected role for hedgehog signaling in cranial-suture development and obesity. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 1162–1170. <https://doi.org/10.1086/518047>
- Jin, K., Sun, Y., Xie, L., Batteur, S., Mao, X.O., Smelick, C., Logvinova, A., Greenberg, D.A., 2003. Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell* 2, 175–183. <https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2003.00046.x>
- Johnson, D., Wilkie, A.O.M., 2011. Craniosynostosis. *Eur J Hum Genet* 19, 369–376.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.235>
- Jonquoy, A., Mugniery, E., Benoist-Lasselain, C., Kaci, N., Corre, L.L., Barbault, F., Girard, A.-L., Merrer, Y.L., Busca, P., Schibler, L., Munnich, A., Legeai-Mallet, L., 2012. A novel tyrosine kinase inhibitor restores chondrocyte differentiation and promotes bone growth in a gain-of-function Fgfr3 mouse model. *Hum. Mol. Genet.* 21, 841–851.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddr514>
- Kajdic, N., Spazzapan, P., Velnar, T., 2018. Craniosynostosis - Recognition, clinical characteristics, and treatment. *Bosn J Basic Med Sci* 18, 110–116. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2017.2083>

- Kalinina, J., Dutta, K., Ilghari, D., Beenken, A., Goetz, R., Eliseenkova, A.V., Cowburn, D., Mohammadi, M., 2012. The alternatively spliced acid box region plays a key role in FGF receptor autoinhibition. *Structure* 20, 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.10.022>
- Kang, W., Hébert, J.M., 2015. FGF Signaling Is Necessary for Neurogenesis in Young Mice and Sufficient to Reverse Its Decline in Old Mice. *J Neurosci* 35, 10217–10223. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1469-15.2015>
- Khominsky, A., Yong, R., Ranjitkar, S., Townsend, G., Anderson, P.J., 2018. Extensive phenotyping of the orofacial and dental complex in Crouzon syndrome. *Archives of Oral Biology* 86, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.10.022>
- Knierim, J.J., 2015. The hippocampus. *Current Biology* 25, R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Ko, J.M., 2016. Genetic Syndromes Associated with Craniosynostosis. *J Korean Neurosurg Soc* 59, 187–191. <https://doi.org/10.3340/jkns.2016.59.3.187>
- Koizumi, H., Tomoyori, T., Sato, K.C., Ohkawara, A., 1992. An association of acanthosis nigricans and Crouzon syndrome. *J. Dermatol.* 19, 122–126.
- Komla-Ebri, D., Dambroise, E., Kramer, I., Benoist-Lasselin, C., Kaci, N., Le Gall, C., Martin, L., Busca, P., Barbault, F., Graus-Porta, D., Munnich, A., Kneissel, M., Di Rocco, F., Biosse-Duplan, M., Legeai-Mallet, L., 2016. Tyrosine kinase inhibitor NVP-BGJ398 functionally improves FGFR3-related dwarfism in mouse model. *J. Clin. Invest.* 126, 1871–1884. <https://doi.org/10.1172/JCI83926>
- Krejci, P., 2014. The paradox of FGFR3 signaling in skeletal dysplasia: Why chondrocytes growth arrest while other cells over proliferate. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 759, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.11.001>
- Krejci, P., Aklia, A., Kaucka, M., Sevcikova, E., Prochazkova, J., Masek, J.K., Mikolka, P., Pospisilova, T., Spoustova, T., Weis, M., Paznekas, W.A., Wolf, J.H., Gutkind, J.S., Wilcox, W.R., Kozubik, A., Jabs, E.W., Bryja, V., Salazar, L., Vesela, I., Balek, L., 2012. Receptor Tyrosine Kinases Activate Canonical WNT/ β -Catenin Signaling via MAP Kinase/LRP6 Pathway and Direct β -Catenin Phosphorylation. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035826>
- Krejci, P., Salazar, L., Kashiwada, T.A., Chlebova, K., Salasova, A., Thompson, L.M., Bryja, V., Kozubik, A., Wilcox, W.R., 2008. Analysis of STAT1 Activation by Six FGFR3 Mutants Associated with Skeletal Dysplasia Undermines Dominant Role of STAT1 in FGFR3 Signaling in Cartilage. *PLoS One* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003961>
- Kruszka, P., Addissie, Y.A., Agochukwu, N.B., Doherty, E.S., Muenke, M., 1993. Muenke Syndrome, in: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Stephens, K., Amemiya, A. (Eds.), *GeneReviews*[®]. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Kruszka, P., Addissie, Y.A., Yarnell, C.M.P., Hadley, D.W., Sacoto, M.J.G., Platte, P., Paelecke, Y., Collmann, H., Snow, N., Schweitzer, T., Boyadjiev, S.A., Aravidis, C., Hall, S.E., Mulliken, J.B., Roscioli, T., Muenke, M., 2016. Muenke syndrome: An international multicenter natural history study. *American Journal of Medical Genetics Part A* 170, 918–929. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37528>
- Kumar, K.V.S.H., Shaikh, A., Sharma, R., Prusty, P., 2011. SADDAN syndrome. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 24, 851–852.
- Kurosu, H., Ogawa, Y., Miyoshi, M., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K.P., Baum, M.G., Schiavi, S., Hu, M.-C., Moe, O.W., Kuro-o, M., 2006. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J. Biol. Chem.* 281, 6120–6123. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500457200>
- Kyono, A., Avishai, N., Ouyang, Z., Landreth, G.E., Murakami, S., 2012. FGF and ERK signaling coordinately regulate mineralization-related genes and play essential roles in osteocyte differentiation. *J Bone Miner Metab* 30, 19–30. <https://doi.org/10.1007/s00774-011-0288-2>
- Lagace, D.C., Donovan, M.H., DeCarolis, N.A., Farnbauch, L.A., Malhotra, S., Berton, O., Nestler, E.J., Krishnan, V., Eisch, A.J., 2010. Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *PNAS* 107, 4436–4441. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910072107>

- Lagaude, M., Barreau, M., Jokic, M., Gerard, M., DiRocco, F., Hadj-Rabia, S., Domp Martin, A., Verneuil, L., 2014. [Acanthosis nigricans in children and Crouzon syndrome]. *Ann Dermatol Venereol* 141, 685–688. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2014.06.020>
- Lajeunie, E., Heuertz, S., El Ghouzzi, V., Martinovic, J., Renier, D., Le Merrer, M., Bonaventure, J., 2006. Mutation screening in patients with syndromic craniosynostoses indicates that a limited number of recurrent FGFR2 mutations accounts for severe forms of Pfeiffer syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 14, 289–298. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201558>
- Lajeunie, E., Le Merrer, M., Bonaïti-Pellie, C., Marchac, D., Renier, D., 1995. Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. *Am. J. Med. Genet.* 55, 500–504. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320550422>
- Lassiter, R.N.T., Stark, M.R., Zhao, T., Zhou, C., 2014. Signaling mechanisms controlling cranial placode neurogenesis and delamination. *Dev Biol* 389, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.11.025>
- Laurita, J., Koyama, E., Chin, B., Taylor, J.A., Lakin, G.E., Hankenson, K.D., Bartlett, S.P., Nah, H.-D., 2011. The Muenke syndrome mutation (Fgfr3P244R) causes cranial base shortening associated with growth plate dysfunction and premature perichondrial ossification in murine basicranial synchondroses. *Dev. Dyn.* 240, 2584–2596. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22752>
- Lee, D.S., Chung, K.C., 2010. Eugène Apert and his Contributions to Plastic Surgery. *Ann Plast Surg* 64, 362–365. <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e3181b0bb53>
- Legeai-Mallet, L., Benoist-Lasselín, C., Munnich, A., Bonaventure, J., 2004. Overexpression of FGFR3, Stat1, Stat5 and p21Cip1 correlates with phenotypic severity and defective chondrocyte differentiation in FGFR3-related chondrodysplasias. *Bone* 34, 26–36.
- Lemonnier, J., Haÿ, E., Delannoy, P., Lomri, A., Modrowski, D., Caverzasio, J., Marie, P.J., 2001. Role of N-cadherin and protein kinase C in osteoblast gene activation induced by the S252W fibroblast growth factor receptor 2 mutation in Apert craniosynostosis. *J. Bone Miner. Res.* 16, 832–845. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.5.832>
- Li, C., Chen, L., Iwata, T., Kitagawa, M., Fu, X.Y., Deng, C.X., 1999. 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.
- Li, E., You, M., Hristova, K., 2006. FGFR3 dimer stabilization due to a single amino acid pathogenic mutation. *J. Mol. Biol.* 356, 600–612. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.077>
- Li, G., Fang, L., Fernández, G., Pleasure, S.J., 2013. The ventral hippocampus is the embryonic origin for adult neural stem cells in the dentate gyrus. *Neuron* 78, 658–672. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.019>
- Liu, A., Li, J.Y.H., Bromleigh, C., Lao, Z., Niswander, L.A., Joyner, A.L., 2003. FGF17b and FGF18 have different midbrain regulatory properties from FGF8b or activated FGF receptors. *Development* 130, 6175–6185. <https://doi.org/10.1242/dev.00845>
- Long, F., 2012. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 27–38. <https://doi.org/10.1038/nrm3254>
- Long, F., Ornitz, D.M., 2013. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a008334. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008334>
- Lorget, F., Kaci, N., Peng, J., Benoist-Lasselín, C., Mugniery, E., Oppeneer, T., Wendt, D.J., Bell, S.M., Bullens, S., Bunting, S., Tsuruda, L.S., O'Neill, C.A., Di Rocco, F., Munnich, A., Legeai-Mallet, L., 2012. Evaluation of the Therapeutic Potential of a CNP Analog in a Fgfr3 Mouse Model Recapitulating Achondroplasia. *Am J Hum Genet* 91, 1108–1114. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.10.014>
- Luo, F., Xie, Y., Xu, W., Huang, J., Zhou, S., Wang, Z., Luo, X., Liu, M., Chen, L., Du, X., 2017. Deformed Skull Morphology Is Caused by the Combined Effects of the Maldevelopment of Calvarias, Cranial Base and Brain in FGFR2-P253R Mice Mimicking Human Apert Syndrome. *Int. J. Biol. Sci.* 13, 32–45. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16287>
- Maddaluno, L., Urwyler, C., Werner, S., 2017. Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair. *Development* 144, 4047–4060. <https://doi.org/10.1242/dev.152587>

- Madeline, L.A., Elster, A.D., 1995. Suture closure in the human chondrocranium: CT assessment. *Radiology* 196, 747–756. <https://doi.org/10.1148/radiology.196.3.7644639>
- Mai, S., Wei, K., Flenniken, A., Adamson, S.L., Rossant, J., Aubin, J.E., Gong, S.-G., 2010. The missense mutation W290R in *Fgfr2* causes developmental defects from aberrant IIIb and IIIc signaling. *Dev. Dyn.* 239, 1888–1900. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22314>
- Makrythanasis, P., Temtamy, S., Aglan, M.S., Otaify, G.A., Hamamy, H., Antonarakis, S.E., 2014. A novel homozygous mutation in *FGFR3* causes tall stature, severe lateral tibial deviation, scoliosis, hearing impairment, camptodactyly, and arachnodactyly. *Hum. Mutat.* 35, 959–963. <https://doi.org/10.1002/humu.22597>
- Maliepaard, M., Mathijssen, I.M.J., Oosterlaan, J., Okkerse, J.M.E., 2014. Intellectual, Behavioral, and Emotional Functioning in Children With Syndromic Craniosynostosis. *Pediatrics* 133, e1608–e1615. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-3077>
- Manning, B.D., Cantley, L.C., 2007. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129, 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Mansour, S.L., Li, C., Urness, L.D., 2013. Genetic rescue of Muenke syndrome model hearing loss reveals prolonged FGF-dependent plasticity in cochlear supporting cell fates. *Genes Dev.* 27, 2320–2331. <https://doi.org/10.1101/gad.228957.113>
- Mansour, S.L., Twigg, S.R.F., Freeland, R.M., Wall, S.A., Li, C., Wilkie, A.O.M., 2009. Hearing loss in a mouse model of Muenke syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 18, 43–50. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn311>
- Marie, P.J., 2008. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 473, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.030>
- Maroteaux, P., Lamy, M., Robert, J.M., 1967. [Thanatophoric dwarfism]. *Presse Med* 75, 2519–2524.
- Martin, L., Kaci, N., Estibals, V., Goudin, N., Garfa-Traore, M., Benoist-Lassel, C., Dambroise, E., Legeai-Mallet, L., 2018. Constitutively-active *FGFR3* disrupts primary cilium length and IFT20 trafficking in various chondrocyte models of achondroplasia. *Hum Mol Genet* 27, 1–13. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx374>
- Martinez-Perez, D., Vander Woude, D.L., Barnes, P.D., Scott, R.M., Mulliken, J.B., 1996. Jugular foraminal stenosis in Crouzon syndrome. *Pediatr Neurosurg* 25, 252–255.
- Maruyama, T., Mirando, A.J., Deng, C.-X., Hsu, W., 2010. The Balance of WNT and FGF Signaling Influences Mesenchymal Stem Cell Fate During Skeletal Development. *Sci Signal* 3, ra40. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000727>
- Matsuo, I., Kimura-Yoshida, C., 2014. Extracellular distribution of diffusible growth factors controlled by heparan sulfate proteoglycans during mammalian embryogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0545>
- Matsushita, M., Hasegawa, S., Kitoh, H., Mori, K., Ohkawara, B., Yasoda, A., Masuda, A., Ishiguro, N., Ohno, K., 2015. Meclozine promotes longitudinal skeletal growth in transgenic mice with achondroplasia carrying a gain-of-function mutation in the *FGFR3* gene. *Endocrinology* 156, 548–554. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1914>
- Matsushita, M., Kitoh, H., Ohkawara, B., Mishima, K., Kaneko, H., Ito, M., Masuda, A., Ishiguro, N., Ohno, K., 2013. Meclozine facilitates proliferation and differentiation of chondrocytes by attenuating abnormally activated *FGFR3* signaling in achondroplasia. *PLoS ONE* 8, e81569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081569>
- Matsushita, M., Mishima, K., Esaki, R., Ishiguro, N., Ohno, K., Kitoh, H., 2016. Maternal administration of meclozine for the treatment of foramen magnum stenosis in transgenic mice with achondroplasia. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* 1–5. <https://doi.org/10.3171/2016.7.PEDS16199>
- Matsushita, T., Wilcox, W.R., Chan, Y.Y., Kawanami, A., Bükülmez, H., Balmes, G., Krejci, P., Mekikian, P.B., Otani, K., Yamaura, I., Warman, M.L., Givol, D., Murakami, S., 2009. *FGFR3* promotes synchondrosis closure and fusion of ossification centers through the MAPK pathway. *Hum. Mol. Genet.* 18, 227–240. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn339>

- Mefford, H.C., Shafer, N., Antonacci, F., Tsai, J.M., Park, S.S., Hing, A.V., Rieder, M.J., Smyth, M.D., Speltz, M.L., Eichler, E.E., Cunningham, M.L., 2010. Copy Number Variation Analysis in Single-Suture Craniosynostosis: Multiple Rare Variants Including RUNX2 Duplication in Two Cousins With Metopic Craniosynostosis. *Am J Med Genet A* 152A, 2203–2210. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33557>
- Merrill, A.E., Sarukhanov, A., Krejci, P., Itoni, B., Camacho, N., Estrada, K.D., Lyons, K.M., Deixler, H., Robinson, H., Chitayat, D., Curry, C.J., Lachman, R.S., Wilcox, W.R., Krakow, D., 2012. Bent bone dysplasia-FGFR2 type, a distinct skeletal disorder, has deficient canonical FGF signaling. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.02.005>
- Merzlyakov, M., You, M., Li, E., Hristova, K., 2006. Transmembrane helix heterodimerization in lipid bilayers: probing the energetics behind autosomal dominant growth disorders. *J. Mol. Biol.* 358, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.086>
- Meyers, G.A., Orlow, S.J., Munro, I.R., Przylepa, K.A., Jabs, E.W., 1995. Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Nat. Genet.* 11, 462–464. <https://doi.org/10.1038/ng1295-462>
- Miletich, I., Sharpe, P.T., 2004. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 72, 200–212. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20012>
- Miller, D.L., Ortega, S., Bashayan, O., Basch, R., Basilico, C., 2000. Compensation by Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1) Does Not Account for the Mild Phenotypic Defects Observed in FGF2 Null Mice. *Mol Cell Biol* 20, 2260–2268.
- Mir A, Wu T, Orlow SJ, 2013. CUTaneous features of crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *JAMA Dermatol* 149, 737–741. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2013.3019>
- Miraoui, H., Oudina, K., Petite, H., Tanimoto, Y., Moriyama, K., Marie, P.J., 2009. Fibroblast growth factor receptor 2 promotes osteogenic differentiation in mesenchymal cells via ERK1/2 and protein kinase C signaling. *J. Biol. Chem.* 284, 4897–4904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805432200>
- Miyake, M., Ishii, M., Koyama, N., Kawashima, K., Kodama, T., Anai, S., Fujimoto, K., Hirao, Y., Sugano, K., 2010. 1-tert-Butyl-3-[6-(3,5-dimethoxy-phenyl)-2-(4-diethylamino-butylamino)-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-yl]-urea (PD173074), a Selective Tyrosine Kinase Inhibitor of Fibroblast Growth Factor Receptor-3 (FGFR3), Inhibits Cell Proliferation of Bladder Cancer Carrying the FGFR3 Gene Mutation along with Up-Regulation of p27/Kip1 and G1/G0 Arrest. *J Pharmacol Exp Ther* 332, 795–802. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.162768>
- Mohammadi, M., Froum, S., Hamby, J.M., Schroeder, M.C., Panek, R.L., Lu, G.H., Eliseenkova, A.V., Green, D., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., 1998. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *EMBO J.* 17, 5896–5904. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.20.5896>
- Moko, S.B., Blandin de Chalain, T.M., 2001. New Zealand Maori family with the pro250arg fibroblast growth factor receptor 3 mutation associated with craniosynostosis. *J Craniomaxillofac Surg* 29, 22–24.
- Moldrich, R.X., Mezzera, C., Holmes, W.M., Goda, S., Brookfield, S.J., Rankin, A.J., Barr, E., Kurniawan, N., Dewar, D., Richards, L.J., López-Bendito, G., Iwata, T., 2011. Fgfr3 regulates development of the caudal telencephalon. *Developmental Dynamics* 240, 1586–1599. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22636>
- Moloney, D.M., Wall, S.A., Ashworth, G.J., Oldridge, M., Glass, I.A., Francomano, C.A., Muenke, M., Wilkie, A.O., 1997. Prevalence of Pro250Arg mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in coronal craniosynostosis. *Lancet* 349, 1059–1062.
- Monsonogo-Ornan, E., Adar, R., Feferman, T., Segev, O., Yayon, A., 2000. The transmembrane mutation G380R in fibroblast growth factor receptor 3 uncouples ligand-mediated receptor activation from down-regulation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 516–522. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.2.516-522.2000>

- Moon, A.M., Guris, D.L., Seo, J., Li, L., Hammond, J., Talbot, A., Imamoto, A., 2006. Crkl deficiency disrupts Fgf8 signaling in a mouse model of 22q11 deletion syndromes. *Dev. Cell* 10, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.12.003>
- Morita, J., Nakamura, M., Kobayashi, Y., Deng, C.-X., Funato, N., Moriyama, K., 2014. Soluble form of FGFR2 with S252W partially prevents craniosynostosis of the apert mouse model. *Dev. Dyn.* 243, 560–567. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24099>
- Morriss-Kay, G.M., Wilkie, A.O., 2005. Growth of the normal skull vault and its alteration in craniosynostosis: insights from human genetics and experimental studies. *Journal of Anatomy* 207, 637. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00475.x>
- Moser, S.C., van der Eerden, B.C.J., 2019. Osteocalcin—A Versatile Bone-Derived Hormone. *Front. Endocrinol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00794>
- Muenke, M., Gripp, K.W., McDonald-McGinn, D.M., Gaudenz, K., Whitaker, L.A., Bartlett, S.P., Markowitz, R.I., Robin, N.H., Nwokoro, N., Mulvihill, J.J., Losken, H.W., Mulliken, J.B., Guttmacher, A.E., Wilroy, R.S., Clarke, L.A., Hollway, G., Adès, L.C., Haan, E.A., Mulley, J.C., Cohen, M.M., Bellus, G.A., Francomano, C.A., Moloney, D.M., Wall, S.A., Wilkie, A.O.M., Zackai, E.H., 1997. A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. *Am J Hum Genet* 60, 555–564.
- Muenke, M., Kress, W., Collmann, H., Solomon, B., 2011. *Craniosynostoses: Molecular Genetics, Principles of Diagnosis and Treatment*. Karger Medical and Scientific Publishers.
- Mugniery, E., Dacquin, R., Marty, C., Benoist-Lassel, C., Vernejoul, M.-C. de, Jurdic, P., Munnich, A., Geoffroy, V., Legeai-Mallet, L., 2012. An activating Fgfr3 mutation affects trabecular bone formation via a paracrine mechanism during growth. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2503–2513. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd5065>
- Müller Smith, K., Fagel, D.M., Stevens, H.E., Rabenstein, R.L., Maragnoli, M.E., Ohkubo, Y., Picciotto, M.R., Schwartz, M.L., Vaccarino, F.M., 2008. Deficiency in inhibitory cortical interneurons associates with hyperactivity in fibroblast growth factor receptor 1 mutant mice. *Biol. Psychiatry* 63, 953–962. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.09.020>
- Murakami, S., Balmes, G., McKinney, S., Zhang, Z., Givol, D., Crombrughe, B. de, 2004. Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes & Development* 18, 290. <https://doi.org/10.1101/gad.1179104>
- Mustafa, M., Moghrabi, N., Bin-Abbas, B., 2014. Hypochondroplasia, Acanthosis Nigrans, and Insulin Resistance in a Child with FGFR3 Mutation: Is It Just an Association? *Case Rep Endocrinol* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/840492>
- Nagase, T., Nagase, M., Hirose, S., Ohmori, K., 2000. Crouzon syndrome with acanthosis nigricans: case report and mutational analysis. *Cleft Palate Craniofac. J.* 37, 78–82. [https://doi.org/10.1597/1545-1569\(2000\)037<0078:CSWANC>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1597/1545-1569(2000)037<0078:CSWANC>2.3.CO;2)
- Narayana, J., Horton, W.A., 2015. FGFR3 biology and skeletal disease. *Connect. Tissue Res.* 1–18. <https://doi.org/10.3109/03008207.2015.1051224>
- Naski, M.C., Colvin, J.S., Coffin, J.D., Ornitz, D.M., 1998. Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development* 125, 4977–4988.
- Naski, M.C., Wang, Q., Xu, J., Ornitz, D.M., 1996. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat. Genet.* 13, 233–237. <https://doi.org/10.1038/ng0696-233>
- Neben, C.L., Idoni, B., Salva, J.E., Tuzon, C.T., Rice, J.C., Krakow, D., Merrill, A.E., 2014. Bent bone dysplasia syndrome reveals nucleolar activity for FGFR2 in ribosomal DNA transcription. *Hum. Mol. Genet.* 23, 5659–5671. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu282>
- Neben, C.L., Tuzon, C.T., Mao, X., Lay, F.D., Merrill, A.E., 2017. FGFR2 mutations in bent bone dysplasia syndrome activate nucleolar stress and perturb cell fate determination. *Hum. Mol. Genet.* 26, 3253–3270. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx209>

- Nørgaard, P., Hagen, C.P., Hove, H., Dunø, M., Nissen, K.R., Kreiborg, S., Jørgensen, F.S., 2012. Crouzon syndrome associated with acanthosis nigricans: prenatal 2D and 3D ultrasound findings and postnatal 3D CT findings. *Acta Radiol Short Rep* 1. <https://doi.org/10.1258/arsr.2012.110017>
- O'Donnell, P., Goldman, J.W., Gordon, M.S., Shih, K., Choi, Y.J., Lu, D., Kabbarah, O., Ho, W., Rooney, I., Lam, E.T., 2012. 621 A Phase I Dose-escalation Study of MFGR1877S, a Human Monoclonal Anti-fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) Antibody, in Patients (pts) with Advanced Solid Tumors. *European Journal of Cancer*, 24 EORTC – NCI – AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics 48, 191–192. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(12\)72418-8](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(12)72418-8)
- Olsen, S.K., Li, J.Y.H., Bromleigh, C., Eliseenkova, A.V., Ibrahimi, O.A., Lao, Z., Zhang, F., Linhardt, R.J., Joyner, A.L., Mohammadi, M., 2006. Structural basis by which alternative splicing modulates the organizer activity of FGF8 in the brain. *Genes Dev.* 20, 185–198. <https://doi.org/10.1101/gad.1365406>
- Ono, N., Ono, W., Nagasawa, T., Kronenberg, H.M., 2014. A subset of chondrogenic cells provides early mesenchymal progenitors in growing bones. *Nat. Cell Biol.* 16, 1157–1167. <https://doi.org/10.1038/ncb3067>
- Ornitz, D.M., Itoh, N., 2015. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4, 215–266. <https://doi.org/10.1002/wdev.176>
- Ornitz, D.M., Itoh, N., 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2, reviews3005.1-reviews3005.12.
- Ornitz, D.M., Legeai-Mallet, L., 2017. Achondroplasia: Development, Pathogenesis, and Therapy. *Dev Dyn* 246, 291–309. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24479>
- Ornitz, D.M., Marie, P.J., 2015. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Dev.* 29, 1463–1486. <https://doi.org/10.1101/gad.266551.115>
- Ornitz, D.M., Marie, P.J., 2002. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* 16, 1446–1465. <https://doi.org/10.1101/gad.990702>
- Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G., Goldfarb, M., 1996. Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. *J. Biol. Chem.* 271, 15292–15297. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15292>
- Paek, H., Gutin, G., Hébert, J.M., 2009. FGF signaling is strictly required to maintain early telencephalic precursor cell survival. *Development* 136, 2457–2465. <https://doi.org/10.1242/dev.032656>
- Pannier, S., Couloigner, V., Messaddeq, N., Elmaleh-Bergès, M., Munnich, A., Romand, R., Legeai-Mallet, L., 2009. Activating Fgfr3 Y367C mutation causes hearing loss and inner ear defect in a mouse model of chondrodysplasia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1792, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.11.010>
- Parada, C., Chai, Y., 2015. Mandible and Tongue Development. *Curr Top Dev Biol* 115, 31–58. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.023>
- Passos-Bueno, M.R., Sertié, A.L., Jehee, F.S., Fanganiello, R., Yeh, E., 2008. Genetics of craniosynostosis: genes, syndromes, mutations and genotype-phenotype correlations. *Front Oral Biol* 12, 107–143. <https://doi.org/10.1159/000115035>
- Patten, A.R., Yau, S.Y., Fontaine, C.J., Meconi, A., Wortman, R.C., Christie, B.R., 2015. The Benefits of Exercise on Structural and Functional Plasticity in the Rodent Hippocampus of Different Disease Models. *Brain Plasticity* 1, 97–127. <https://doi.org/10.3233/BPL-150016>
- Peng, W.C., Lin, X., Torres, J., 2009. The strong dimerization of the transmembrane domain of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) is modulated by C-terminal juxtamembrane residues. *Protein Sci* 18, 450–459. <https://doi.org/10.1002/pro.65>
- Perlyn, C.A., Morriss-Kay, G., Darvann, T., Tenenbaum, M., Ornitz, D.M., 2006. A model for the pharmacological treatment of Crouzon syndrome. *Neurosurgery* 59, 210–215. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000224323.53866.1E>

- Peskett, E., Kumar, S., Baird, W., Jaiswal, J., Li, M., Patel, P., Britto, J.A., Pauws, E., 2017. Analysis of the Fgfr2C342Y mouse model shows condensation defects due to misregulation of Sox9 expression in prechondrocytic mesenchyme. *Biol Open* 6, 223–231. <https://doi.org/10.1242/bio.022178>
- Peters, K., Ornitz, D., Werner, S., Williams, L., 1993. Unique Expression Pattern of the FGF Receptor 3 Gene during Mouse Organogenesis. *Developmental Biology* 155, 423–430. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1040>
- Pettitt, D.A., Arshad, Z., Mishra, A., McArthur, P., 2017. Apert syndrome: A consensus on the management of Apert hands. *J Craniomaxillofac Surg* 45, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2016.11.018>
- Piccolo, N.D., Sarabipour, S., Hristova, K., 2017. A New Method to Study Heterodimerization of Membrane Proteins and Its Application to Fibroblast Growth Factor Receptors. *J. Biol. Chem.* 292, 1288–1301. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.755777>
- Pino, A., Fumagalli, G., Bifari, F., Decimo, I., 2017. New neurons in adult brain: distribution, molecular mechanisms and therapies. *Biochem. Pharmacol.* 141, 4–22. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.07.003>
- Preston, R.A., Post, J.C., Keats, B.J., Aston, C.E., Ferrell, R.E., Priest, J., Nouri, N., Losken, H.W., Morris, C.A., Hurtt, M.R., 1994. A gene for Crouzon craniofacial dysostosis maps to the long arm of chromosome 10. *Nat. Genet.* 7, 149–153. <https://doi.org/10.1038/ng0694-149>
- Reardon, W., Winter, R.M., Rutland, P., Pulley, L.J., Jones, B.M., Malcolm, S., 1994. Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nat. Genet.* 8, 98–103. <https://doi.org/10.1038/ng0994-98>
- Reddy, B.S., Garg, B.R., Padiyar, N.V., Krishnam, A.S., 1985. An unusual association of acanthosis nigricans and Crouzon's disease--a case report. *J. Dermatol.* 12, 85–90.
- Renier, D., El-Ghouzzi, V., Bonaventure, J., Le Merrer, M., Lajeunie, E., 2000. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation in nonsyndromic coronal synostosis: clinical spectrum, prevalence, and surgical outcome. *J. Neurosurg.* 92, 631–636. <https://doi.org/10.3171/jns.2000.92.4.0631>
- RESERVES, I.U.--T.D., n.d. Orphanet: Dysostose cléido crânienne [WWW Document]. URL https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=1452 (accessed 9.16.19a).
- RESERVES, I.U.--T.D., n.d. Orphanet: Syndrome de Bohring Opitz [WWW Document]. URL https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=97297 (accessed 8.31.19b).
- RESERVES, I.U.--T.D., n.d. Orphanet: Craniofrontonasal syndrome [WWW Document]. URL [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?Lng=FR&data_id=1687&Disease_Disease_Search_diseaseType=ORPHA&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=1520&Disease\(s\)/group%20of%20diseases=Craniofrontonasal-syndrome&title=Craniofrontonasal-syndrome&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?Lng=FR&data_id=1687&Disease_Disease_Search_diseaseType=ORPHA&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=1520&Disease(s)/group%20of%20diseases=Craniofrontonasal-syndrome&title=Craniofrontonasal-syndrome&search=Disease_Search_Simple) (accessed 8.31.19c).
- Rice, D.P., 2008. Developmental anatomy of craniofacial sutures. *Front Oral Biol* 12, 1–21. <https://doi.org/10.1159/000115028>
- Rice, D.P., Aberg, T., Chan, Y., Tang, Z., Kettunen, P.J., Pakarinen, L., Maxson, R.E., Thesleff, I., 2000. Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. *Development* 127, 1845–1855.
- Rice, D.P., Rice, R., 2008. Locate, condense, differentiate, grow and confront: developmental mechanisms controlling intramembranous bone and suture formation and function. *Front Oral Biol* 12, 22–40. <https://doi.org/10.1159/000115030>
- Richtsmeier, J.T., Flaherty, K., 2013. Hand in glove: brain and skull in development and dysmorphogenesis. *Acta Neuropathol.* 125, 469–489. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1104-y>
- Rijken, B.F.M., Lequin, M.H., Van Veelen, M.-L.C., de Rooij, J., Mathijssen, I.M.J., 2015. The formation of the foramen magnum and its role in developing ventriculomegaly and Chiari I

- malformation in children with craniosynostosis syndromes. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 43, 1042–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2015.04.025>
- Rimoin, D.L., Lachman, R., Unger, S., 2014. Chondrodysplasias, in: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05630-0>
- Robin, N.H., Falk, M.J., Haldeman-Englert, C.R., 1993. FGFR-Related Craniosynostosis Syndromes, in: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Stephens, K., Amemiya, A. (Eds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Roscioli, T., Elakis, G., Cox, T.C., Moon, D.J., Venselaar, H., Turner, A.M., Le, T., Hackett, E., Haan, E., Colley, A., Mowat, D., Worgan, L., Kirk, E.P., Sachdev, R., Thompson, E., Gabbett, M., McGaughan, J., Gibson, K., Gattas, M., Freckmann, M.-L., Dixon, J., Hoefsloot, L., Field, M., Hackett, A., Kamien, B., Edwards, M., Adès, L.C., Collins, F.A., Wilson, M.J., Savarirayan, R., Tan, T.Y., Amor, D.J., McGillivray, G., White, S.M., Glass, I.A., David, D.J., Anderson, P.J., Gianoutsos, M., Buckley, M.F., 2013. Genotype and clinical care correlations in craniosynostosis: findings from a cohort of 630 Australian and New Zealand patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 163C, 259–270. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31378>
- Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeai-Mallet, L., Pelet, A., Rozet, J.M., Maroteaux, P., Le Merrer, M., Munnich, A., 1994. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* 371, 252–254. <https://doi.org/10.1038/371252a0>
- Rousseau, F., el Ghouzzi, V., Delezoide, A.L., Legeai-Mallet, L., Le Merrer, M., Munnich, A., Bonaventure, J., 1996. Missense FGFR3 mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I (TD1). *Hum. Mol. Genet.* 5, 509–512.
- Rymer, K., Shiang, R., Hsiung, A., Pandya, A., Bigdeli, T., Webb, B.T., Rhodes, J., n.d. Expanding the phenotype for the recurrent p.Ala391Glu variant in FGFR3: Beyond crouzon syndrome and acanthosis nigricans. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 0, e656. <https://doi.org/10.1002/mgg3.656>
- Sahara, S., O’Leary, D.D.M., 2009. Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron* 63, 48–62. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.006>
- Salmaso, N., Stevens, H.E., McNeill, J., ElSayed, M., Ren, Q., Maragnoli, M.E., Schwartz, M.L., Tomasi, S., Sapolsky, R.M., Duman, R., Vaccarino, F.M., 2016. Fibroblast Growth Factor 2 Modulates Hypothalamic Pituitary Axis Activity and Anxiety Behavior Through Glucocorticoid Receptors. *Biological Psychiatry, New Insight Into Depression Therapeutics* 80, 479–489. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.02.026>
- Sanchez-Lara, P.A., Carmichael, S.L., Graham, J.M., Lammer, E.J., Shaw, G.M., Ma, C., Rasmussen, S.A., National Birth Defects Prevention Study, 2010. Fetal constraint as a potential risk factor for craniosynostosis. *Am. J. Med. Genet. A* 152A, 394–400. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33246>
- Sarabipour, S., Hristova, K., 2016. Mechanism of FGF receptor dimerization and activation. *Nat Commun* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10262>
- Sarabipour, S., Hristova, K., 2013. FGFR3 Transmembrane Domain Interactions Persist in the Presence of Its Extracellular Domain. *Biophys J* 105, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.05.053>
- Savarirayan, R., Irving, M., Bacino, C.A., Bostwick, B., Charrow, J., Cormier-Daire, V., Le Quan Sang, K.-H., Dickson, P., Harmatz, P., Phillips, J., Owen, N., Cherukuri, A., Jayaram, K., Jeha, G.S., Larimore, K., Chan, M.-L., Huntsman Labeled, A., Day, J., Hoover-Fong, J., 2019. C-Type Natriuretic Peptide Analogue Therapy in Children with Achondroplasia. *N. Engl. J. Med.* 381, 25–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1813446>
- Schlosser, G., 2014. Early embryonic specification of vertebrate cranial placodes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 3, 349–363. <https://doi.org/10.1002/wdev.142>
- Schwartz, R.A., 1994. Acanthosis nigricans. *J. Am. Acad. Dermatol.* 31, 1–19; quiz 20–22.

- Schweitzer, D.N., Graham, J.M., Lachman, R.S., Jabs, E.W., Okajima, K., Przylepa, K.A., Shanske, A., Chen, K., Neidich, J.A., Wilcox, W.R., 2001. Subtle radiographic findings of achondroplasia in patients with Crouzon syndrome with acanthosis nigricans due to an Ala391Glu substitution in FGFR3. *Am. J. Med. Genet.* 98, 75–91.
- Sedano, H.O., Gorlin, R.J., 1987. Acanthosis nigricans. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 63, 462–467.
- Sharma, V.P., Fenwick, A.L., Brockop, M.S., McGowan, S.J., Goos, J.A.C., Hooeboom, A.J.M., Brady, A.F., Jeelani, N.O., Lynch, S.A., Mulliken, J.B., Murray, D.J., Phipps, J.M., Sweeney, E., Tomkins, S.E., Wilson, L.C., Bennett, S., Cornall, R.J., Broxholme, J., Kanapin, A., 500 Whole-Genome Sequences (WGS500) Consortium, Johnson, D., Wall, S.A., van der Spek, P.J., Mathijssen, I.M.J., Maxson, R.E., Twigg, S.R.F., Wilkie, A.O.M., 2013. Mutations in TCF12, encoding a basic helix-loop-helix partner of TWIST1, are a frequent cause of coronal craniosynostosis. *Nat. Genet.* 45, 304–307. <https://doi.org/10.1038/ng.2531>
- Shiang, R., Thompson, L.M., Zhu, Y.-Z., Church, D.M., Fielder, T.J., Bocian, M., Winokur, S.T., Wasmuth, J.J., 1994. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 78, 335–342. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90302-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90302-6)
- Shiller, J.G., 1959. Craniofacial dysostosis of Crouzon; a case report and pedigree with emphasis on heredity. *Pediatrics* 23, 107–112.
- Shiotsugu, J., Katsuyama, Y., Arima, K., Baxter, A., Koide, T., Song, J., Chandraratna, R.A.S., Blumberg, B., 2004. Multiple points of interaction between retinoic acid and FGF signaling during embryonic axis formation. *Development* 131, 2653–2667. <https://doi.org/10.1242/dev.01129>
- Shukla, V., Coumoul, X., Wang, R.-H., Kim, H.-S., Deng, C.-X., 2007. RNA interference and inhibition of MEK-ERK signaling prevent abnormal skeletal phenotypes in a mouse model of craniosynostosis. *Nat. Genet.* 39, 1145–1150. <https://doi.org/10.1038/ng2096>
- Singh, S., Groves, A.K., 2016. The Molecular Basis of Craniofacial Placode Development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 5, 363–376. <https://doi.org/10.1002/wdev.226>
- Smid, C.J., Modaff, P., Alade, A., Legare, J.M., Pauli, R.M., 2018. Acanthosis nigricans in achondroplasia. *Am. J. Med. Genet. A* 176, 2630–2636. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.40506>
- Steiling, H., Werner, S., 2003. Fibroblast growth factors: key players in epithelial morphogenesis, repair and cytoprotection. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 533–537.
- Stevens, H.E., Jiang, G.Y., Schwartz, M.L., Vaccarino, F.M., 2012. Learning and memory depend on fibroblast growth factor receptor 2 functioning in hippocampus. *Biol Psychiatry* 71, 1090–1098. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.03.013>
- Su, N., Xu, X., Li, Cuiling, He, Q., Zhao, L., Li, Can, Chen, S., Luo, F., Yi, L., Du, X., Huang, H., Deng, C., Chen, L., 2010. Generation of Fgfr3 conditional knockout mice. *Int. J. Biol. Sci.* 6, 327–332.
- Suslak, L., Glista, B., Gertzman, G.B., Lieberman, L., Schwartz, R.A., Desposito, F., 1985. Crouzon syndrome with periapical cemental dysplasia and acanthosis nigricans: the pleiotropic effect of a single gene? *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 21, 127–134.
- Tamagaki, H., Furukawa, Y., Yamaguchi, R., Hojo, H., Aimoto, S., Smith, S.O., Sato, T., 2014. Coupling of transmembrane helix orientation to membrane release of the juxtamembrane region in FGFR3. *Biochemistry* 53, 5000–5007. <https://doi.org/10.1021/bi500327q>
- Tanimoto, Y., Yokozeki, M., Hiura, K., Matsumoto, K., Nakanishi, H., Matsumoto, T., Marie, P.J., Moriyama, K., 2004. A soluble form of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) with S252W mutation acts as an efficient inhibitor for the enhanced osteoblastic differentiation caused by FGFR2 activation in Apert syndrome. *J. Biol. Chem.* 279, 45926–45934. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404824200>
- Tanner, Y., Grose, R.P., 2016. Dysregulated FGF signalling in neoplastic disorders. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Cytokinetic ring construction and constriction* 53, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.10.012>

- Tavormina, P.L., Shiang, R., Thompson, L.M., Zhu, Y.Z., Wilkin, D.J., Lachman, R.S., Wilcox, W.R., Rimoin, D.L., Cohn, D.H., Wasmuth, J.J., 1995. Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.* 9, 321–328. <https://doi.org/10.1038/ng0395-321>
- Temiyasathit, S., Jacobs, C.R., 2010. The osteocyte primary cilium and its role in bone mechanotransduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192, 422. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05243.x>
- Terauchi, A., Johnson-Venkatesh, E.M., Toth, A.B., Javed, D., Sutton, M.A., Umemori, H., 2010. Distinct FGFs promote differentiation of excitatory and inhibitory synapses. *Nature* 465, 783–787. <https://doi.org/10.1038/nature09041>
- Terranova, J.I., Ogawa, S.K., Kitamura, T., 2019. Adult hippocampal neurogenesis for systems consolidation of memory. *Behavioural Brain Research* 372, 112035. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112035>
- Teven, C.M., Farina, E.M., Rivas, J., Reid, R.R., 2014. Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. *Genes Dis* 1, 199–213. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.09.005>
- Thisse, B., Thisse, C., 2005. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Developmental Biology* 287, 390–402. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.09.011>
- Thompson, N.M., Hecht, J.T., Bohan, T.P., Kramer, L.A., Davidson, K., Brandt, M.E., Fletcher, J.M., 1999. Neuroanatomic and neuropsychological outcome in school-age children with achondroplasia. *Am. J. Med. Genet.* 88, 145–153.
- Thomson, R.E., Kind, P.C., Graham, N.A., Etherson, M.L., Kennedy, J., Fernandes, A.C., Marques, C.S., Hevner, R.F., Iwata, T., 2009. Fgf receptor 3 activation promotes selective growth and expansion of occipitotemporal cortex. *Neural Dev* 4, 4. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-4-4>
- Thomson, R.E., Pellicano, F., Iwata, T., 2007. Fibroblast growth factor receptor 3 kinase domain mutation increases cortical progenitor proliferation via mitogen-activated protein kinase activation. *Journal of Neurochemistry* 100, 1565–1578. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04285.x>
- Tolarova, M.M., Harris, J.A., Ordway, D.E., Vargervik, K., 1997. Birth prevalence, mutation rate, sex ratio, parents' age, and ethnicity in Apert syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 72, 394–398.
- Tomlinson, D.C., L'Hôte, C.G., Kennedy, W., Pitt, E., Knowles, M.A., 2005. Alternative Splicing of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Produces a Secreted Isoform That Inhibits Fibroblast Growth Factor–Induced Proliferation and Is Repressed in Urothelial Carcinoma Cell Lines. *Cancer Res* 65, 10441–10449. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1718>
- Toydemir, R.M., Brassington, A.E., Bayrak-Toydemir, P., Krakowiak, P.A., Jorde, L.B., Whitby, F.G., Longo, N., Viskochil, D.H., Carey, J.C., Bamshad, M.J., 2006. A novel mutation in FGFR3 causes camptodactyly, tall stature, and hearing loss (CATSHL) syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 935–941. <https://doi.org/10.1086/508433>
- Tsang, M., Dawid, I.B., 2004. Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Sci. STKE* 2004, pe17. <https://doi.org/10.1126/stke.2282004pe17>
- Twigg et al., 2008. Skeletal Analysis of the Fgfr3P244R Mouse, a Genetic Model for the Muenke Craniosynostosis Syndrome.
- Twigg, S.R.F., Wilkie, A.O.M., 2015. A Genetic-Pathophysiological Framework for Craniosynostosis. *American Journal of Human Genetics* 97, 359. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.07.006>
- Urbán, N., Guillemot, F., 2014. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci* 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00396>
- Vajo, Z., Francomano, C.A., Wilkin, D.J., 2000. The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr. Rev.* 21, 23–39. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0387>

- van den Elzen, M.E.P., Twigg, S.R.F., Goos, J.A.C., Hoogeboom, A.J.M., van den Ouweland, A.M.W., Wilkie, A.O.M., Mathijssen, I.M.J., 2014. Phenotypes of craniofrontonasal syndrome in patients with a pathogenic mutation in EFN1. *Eur J Hum Genet* 22, 995–1001. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.273>
- Van Esch, H., Fryns, J.E., 2004. Acanthosis nigricans in a boy with achondroplasia due to the classical Gly380Arg mutation in FGFR3. *Genet. Couns.* 15, 375–377.
- Vidal Sanahuja, R., Gean Molins, E., Sánchez Garré, C., Quilis Esquerro, J., García Fructuoso, G., Costa Clara, J.M., 2012. [Presentation of two cases of Crouzon syndrome: allelic cranio-stenotic conditions of FGFR genes]. *An Pediatr (Barc)* 77, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2012.03.024>
- Vogels, A., Fryns, J.-P., 2006. Pfeiffer syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 1, 19. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-19>
- Volynsky, P.E., Polyansky, A.A., Fakhrutdinova, G.N., Bocharov, E.V., Efremov, R.G., 2013. Role of dimerization efficiency of transmembrane domains in activation of fibroblast growth factor receptor 3. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 8105–8108. <https://doi.org/10.1021/ja4011942>
- Vora, S.R., Camci, E.D., Cox, T.C., 2016. Postnatal Ontogeny of the Cranial Base and Craniofacial Skeleton in Male C57BL/6J Mice: A Reference Standard for Quantitative Analysis. *Front Physiol* 6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00417>
- Walker, T.L., Yasuda, T., Adams, D.J., Bartlett, P.F., 2007. The Doublecortin-Expressing Population in the Developing and Adult Brain Contains Multipotential Precursors in Addition to Neuronal-Lineage Cells. *J. Neurosci.* 27, 3734–3742. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5060-06.2007>
- Wang, L., Li, X.-X., Chen, X., Qin, X.-Y., Kardami, E., Cheng, Y., 2018. Antidepressant-Like Effects of Low- and High-Molecular Weight FGF-2 on Chronic Unpredictable Mild Stress Mice. *Front Mol Neurosci* 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00377>
- Wang, Y., Spatz, M.K., Kannan, K., Hayk, H., Avivi, A., Gorivodsky, M., Pines, M., Yayon, A., Lonai, P., Givol, D., 1999. A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 4455–4460. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4455>
- Wang, Y., Xiao, R., Yang, F., Karim, B.O., Iacovelli, A.J., Cai, J., Lerner, C.P., Richtsmeier, J.T., Leszl, J.M., Hill, C.A., Yu, K., Ornitz, D.M., Elisseeff, J., Huso, D.L., Jabs, E.W., 2005. Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome FGFR2+/S252W mouse. *Development* 132, 3537–3548. <https://doi.org/10.1242/dev.01914>
- Wang, Y., Zhou, X., Oberoi, K., Phelps, R., Couwenhoven, R., Sun, M., Rezza, A., Holmes, G., Percival, C.J., Friedenthal, J., Krejci, P., Richtsmeier, J.T., Huso, D.L., Rendl, M., Jabs, E.W., 2012. p38 Inhibition ameliorates skin and skull abnormalities in Fgfr2 Beare-Stevenson mice. *J Clin Invest* 122, 2153–2164. <https://doi.org/10.1172/JCI62644>
- Wei, X., Hu, M., Mishina, Y., Liu, F., 2016. Developmental Regulation of the Growth Plate and Cranial Synchronosis. *J Dent Res* 95, 1221–1229. <https://doi.org/10.1177/0022034516651823>
- Weinstein, M., Xu, X., Ohyama, K., Deng, C.X., 1998. FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development* 125, 3615–3623.
- Wendt, D.J., Dvorak-Ewell, M., Bullens, S., Lorget, F., Bell, S.M., Peng, J., Castillo, S., Aoyagi-Scharber, M., O'Neill, C.A., Krejci, P., Wilcox, W.R., Rimoin, D.L., Bunting, S., 2015. Neutral endopeptidase-resistant C-type natriuretic peptide variant represents a new therapeutic approach for treatment of fibroblast growth factor receptor 3-related dwarfism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 353, 132–149. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.218560>
- Werner, S., Duan, D.S., de Vries, C., Peters, K.G., Johnson, D.E., Williams, L.T., 1992. Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand-binding specificities. *Mol. Cell. Biol.* 12, 82–88. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.1.82>
- Wigg, K., Tofts, L., Benson, S., Porter, M., 2016. The neuropsychological function of children with achondroplasia. *Am. J. Med. Genet. A* 170, 2882–2888. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37779>

- Wilkes, D., Rutland, P., Pulleyn, L.J., Reardon, W., Moss, C., Ellis, J.P., Winter, R.M., Malcolm, S., 1996. A recurrent mutation, ala391glu, in the transmembrane region of FGFR3 causes Crouzon syndrome and acanthosis nigricans. *J Med Genet* 33, 744–748.
- Wilkie, A.O., Johnson, D., Wall, S.A., 2017. Clinical Genetics of Craniosynostosis. *Curr Opin Pediatr* 29, 622–628. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000542>
- Wilkie, A.O.M., Byren, J.C., Hurst, J.A., Jayamohan, J., Johnson, D., Knight, S.J.L., Lester, T., Richards, P.G., Twigg, S.R.F., Wall, S.A., 2010. Prevalence and complications of single gene and chromosomal disorders in craniosynostosis. *Pediatrics* 126, e391–e400. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-3491>
- Wilkin, D.J., Szabo, J.K., Cameron, R., Henderson, S., Bellus, G.A., Mack, M.L., Kaitila, I., Loughlin, J., Munnich, A., Sykes, B., Bonaventure, J., Francomano, C.A., 1998. Mutations in fibroblast growth-factor receptor 3 in sporadic cases of achondroplasia occur exclusively on the paternally derived chromosome. *Am J Hum Genet* 63, 711–716.
- Wittkowske, C., Reilly, G.C., Lacroix, D., Perrault, C.M., 2016. In Vitro Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00087>
- Wöhrle, S., Weiss, A., Ito, M., Kauffmann, A., Murakami, M., Jagani, Z., Thuery, A., Bauer-Probst, B., Reimann, F., Stamm, C., Pornon, A., Romanet, V., Guagnano, V., Brümmendorf, T., Sellers, W.R., Hofmann, F., Roberts, C.W.M., Graus Porta, D., 2013. Fibroblast Growth Factor Receptors as Novel Therapeutic Targets in SNF5-Deleted Malignant Rhabdoid Tumors. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077652>
- Xu, F., Teitelbaum, S.L., 2013. Osteoclasts: New Insights. *Bone Research* 1, 11–26. <https://doi.org/10.4248/BR201301003>
- Xu, W., McDonald-McGinn, D.M., Melchiorre, A.J., Zackai, E.H., Bartlett, S.P., Taylor, J.A., 2018. Crouzon with Acanthosis Nigricans and Odontogenic Tumors: A Rare Form of Syndromic Craniosynostosis. *Cleft Palate Craniofac. J.* 55, 296–300. <https://doi.org/10.1177/1055665617723918>
- Yamashita, A., Morioka, M., Kishi, H., Kimura, T., Yahara, Y., Okada, M., Fujita, K., Sawai, H., Ikegawa, S., Tsumaki, N., 2014. Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature* 513, 507. <https://doi.org/10.1038/nature13775>
- Yang, Z., Wang, K.K.W., 2015. Glial Fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci* 38, 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>
- Yarnell, C.M.P., Addissie, Y.A., Hadley, D.W., Guillen Sacoto, M.J., Agochukwu, N.B., Hart, R.A., Wiggs, E.A., Platte, P., Paelecke, Y., Collmann, H., Schweitzer, T., Kruszka, P., Muenke, M., 2015. Executive Function and Adaptive Behavior in Muenke Syndrome. *J. Pediatr.* 167, 428–434. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.04.080>
- Yasuda, T., Nah, H.D., Laurita, J., Kinumatsu, T., Shibukawa, Y., Shibutani, T., Minugh-Purvis, N., Pacifici, M., Koyama, E., 2012. Muenke syndrome mutation, Fgfr3P^{244R}, causes TMJ defects. *J. Dent. Res.* 91, 683–689. <https://doi.org/10.1177/0022034512449170>
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., Ornitz, D.M., 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64, 841–848. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90512-w](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90512-w)
- Yin, L., Du, X., Li, C., Xu, X., Chen, Z., Su, N., Zhao, L., Qi, H., Li, F., Xue, J., Yang, J., Jin, M., Deng, C., Chen, L., 2008. A Pro253Arg mutation in fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) causes skeleton malformation mimicking human Apert syndrome by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *Bone* 42, 631–643. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.11.019>
- Yoshida, T., Vivatbutsiri, P., Morriss-Kay, G., Saga, Y., Iseki, S., 2008. Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme. *Mech. Dev.* 125, 797–808. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2008.06.007>
- Yu, C., Wang, F., Kan, M., Jin, C., Jones, R.B., Weinstein, M., Deng, C.-X., McKeehan, W.L., 2000. Elevated Cholesterol Metabolism and Bile Acid Synthesis in Mice Lacking Membrane Tyrosine

- Kinase Receptor FGFR4. *J. Biol. Chem.* 275, 15482–15489.
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.20.15482>
- Zeller, R., López-Ríos, J., Zuniga, A., 2009. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 10, 845–858.
<https://doi.org/10.1038/nrg2681>
- Zhou, Y.X., Xu, X., Chen, L., Li, C., Brodie, S.G., Deng, C.X., 2000. A Pro250Arg substitution in mouse Fgfr1 causes increased expression of Cbfa1 and premature fusion of calvarial sutures. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2001–2008.
- Zucchini, S., Buzzi, A., Barbieri, M., Rodi, D., Paradiso, B., Binaschi, A., Coffin, J.D., Marzola, A., Cifelli, P., Belluzzi, O., Simonato, M., 2008. FGF-2 Overexpression Increases Excitability and Seizure Susceptibility but Decreases Seizure-Induced Cell Loss. *J Neurosci* 28, 13112–13124.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1472-08.2008>

RÉSUMÉ

Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) est un récepteur à activité tyrosine kinase. Sa fonction est de réguler la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire dans de nombreux tissus. Les mutations gain-de-fonction du gène codant FGFR3 sont responsables de deux types de maladies génétiques : les chondrodysplasies, caractérisées par des anomalies de la croissance des os longs, et les craniosynostoses, caractérisées par une fusion prématurée des sutures crâniennes. Les patients atteints de craniosynostoses liées à des mutations du gène FGFR3 présentent également des troubles comportementaux et cognitifs.

L'objectif de ma thèse fut de mieux comprendre la physiopathologie d'une forme particulière de craniosynostose, le syndrome de Crouzon avec Acanthosis Nigricans (CAN). Le CAN est une forme rare de craniosynostose associée à une mutation FGFR3 spécifique (p.Ala391Glu). Il est caractérisé par une fusion prématurée des sutures coronales, une hypoplasie de l'étage moyen de la face et un acanthosis nigricans, une hyperpigmentation et un épaississement localisé de la peau. La prise en charge de ces patients est chirurgicale et nécessite des interventions séquentielles afin de permettre le bon développement du crâne et du cerveau.

Dans un premier temps, j'ai étudié l'effet de la mutation p.Ala391Glu responsable du CAN sur la phosphorylation de la protéine FGFR3. Les expériences de transfections dans des cultures cellulaires ont montré que la mutation p.Ala391Glu affecte sa maturation et entraîne une suractivation du récepteur en absence ou en présence de son ligand.

En parallèle, nous avons généré le premier modèle murin CAN en insérant la mutation gain-de-fonction p.Ala385Glu dans le gène *Fgfr3* de manière ubiquitaire (*Fgfr3^{A385E/+}*). L'analyse du phénotype squelettique à l'aide d'études radiologique, morphométrique (sur scanners μ CT) et histologique de ce modèle n'ont pas montré d'anomalies majeures au niveau du squelette et du crâne. En parallèle, nous nous sommes intéressés au cerveau de ces souris. Nos travaux ont permis de montrer que FGFR3 était exprimé et suractivé au niveau de l'hippocampe. Ils ont également permis d'observer des anomalies dans les processus de neurogenèse dans le gyrus denté de ces animaux. Afin d'étudier l'impact de la mutation p.Ala391Glu, nous avons réalisé des tests comportementaux. Nos expériences montrent que les souris *Fgfr3^{A385E/+}* présentaient des défauts cognitifs. Nous avons observé des défauts de mémoire importants tandis que l'anxiété était non affectée. Un effet antidépresseur a également été observé chez les mutants. Afin d'établir un lien entre ces anomalies cognitives et le récepteur FGFR3 activé, nous avons traité ces animaux mutants à l'aide d'injections intraventriculaires cérébrales avec un inhibiteur spécifique de FGFR3 (BGJ398). Ce traitement a permis de restaurer les défauts cognitifs et comportementaux observés précédemment.

L'ensemble de ces travaux ont permis de mettre en évidence pour la première fois des anomalies du comportement dans un modèle murin FGFR3 de craniosynostose. Ils permettent de mieux comprendre le rôle joué par FGFR3 à la fois dans le développement craniofacial et squelettique, mais également dans les processus de mémorisation et de réponses émotionnelles.

J'ai également participé au cours de ma thèse à l'étude préclinique mesurant les effets d'un analogue du CNP (TransCon-CNP) sur le phénotype du

MOTS CLÉS

Crouzon, FGFR3, Craniosynostose, Crane, Cerveau, Comportement

ABSTRACT

Fibroblast Growth Factor 3 (FGFR3) is a receptor with tyrosine kinase activity. Its purpose is to regulate survival, proliferation and differentiation of cells in various tissues. Gain-of-function mutations in FGFR3 coding gene are responsible for two types of genetic diseases: chondrodysplasias, characterized by anomalies in long bones growth, and craniosynostoses, characterized by premature fusion of cranial sutures. Patients with craniosynostoses associated to *Fgfr3* mutations also present behavioral and cognitive disorders.

The aim of my thesis was to better understand the physiopathology of a particular form of craniosynostosis, Crouzon syndrome with Acanthosis Nigricans (CAN). CAN is a rare form of craniosynostosis associated to an FGFR3 specific mutation (p.Ala391Glu). It is characterized by premature fusion of coronal sutures, midface hypoplasia and acanthosis nigricans, a hyperpigmentation and thickening of the skin. Management of these patients requires sequential interventions to allow proper development of the skull and brain.

First, I studied the effect of the CAN related p.Ala391Glu mutation on FGFR3 protein phosphorylation. Cell transfection experiments showed that the p.Ala391Glu mutation affect protein maturation and cause an overactivation of receptor in absence or in presence of ligand.

In parallel, we generated the first mouse model for CAN by inserting the gain-of-function p.Ala385Glu mutation in the *Fgfr3* murine gene in a ubiquitous manner (*Fgfr3^{A385E/+}*). Analysis of skeletal phenotype by radiography, morphometry (on μ CT scanners) and histology of this model did not show major anomalies of the skull and skeleton. In parallel, we were also interested in the brain of these mice. Our work showed that FGFR3 was expressed and overactivated at the level of the hippocampus. It also allowed to observe anomalies in neurogenesis processes in the dentate gyrus of these animals. In order to study the impact of the p.Ala391Glu mutation, we performed behavioral tests. Our experiments showed that the *Fgfr3^{A385E/+}* mice presented cognitive disorders. We observed important memory defects while anxiety remained unchanged. An antidepressant effect was also observed in mutants. To establish a link between these cognitive anomalies and the activated FGFR3 receptor, we treated the animals with cerebral intraventricular injection of a specific FGFR3 inhibitor (BGJ398). This treatment allowed to restore the behavioral and cognitive defects previously observed.

This work highlight for the first time behavior anomalies in a FGFR3 related craniosynostosis mouse model. It allow a better understanding of the role played by FGFR3 in craniofacial and skeletal development as well as in memorization and learning processes and emotional responses.

During my thesis, I also participated in the preclinical study of the effect of a CNP analog (TransCon-CNP) on the phenotype of the mouse model *Fgfr3^{Y367C/+}* for achondroplasia, the most frequent form of dwarfism. My work was to study the effect of the molecule on the craniofacial phenotype of this model.

KEYWORDS

Crouzon, FGFR3, Craniosynostosis, Skull, Brain, Behavior