



HAL
open science

Étude fonctionnelle du collagène XV-B dans le développement du système neuromusculaire du poisson zèbre

Emilie Guillon

► **To cite this version:**

Emilie Guillon. Étude fonctionnelle du collagène XV-B dans le développement du système neuromusculaire du poisson zèbre. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10123 . tel-01674160

HAL Id: tel-01674160

<https://theses.hal.science/tel-01674160>

Submitted on 2 Jan 2018

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

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

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

BIOLOGIE MOLECULAIRE INTEGRATIVE ET CELLULAIRE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 10 juillet

par

Madame GUILLON Emilie

TITRE :

**Etude fonctionnelle du collagène XV-B dans le développement
du système neuromusculaire du poisson zèbre**

Directeur de thèse : Dr Florence Ruggiero

JURY

Dr. Sylvie Schneider-Maunoury, Rapporteur
Dr. Jean-Loup Duband, Rapporteur
Pr. Katrin Gieseler
Dr. Julie Batut
Dr. Florence Ruggiero
Dr. Sandrine Bretaud

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme Caroline FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. Georges TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Je tenais tout d'abord à remercier chaleureusement Sylvie Schneider-Maunoury, Jean-Loup Duband, Katrin Gieseler et Julie Batut d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je tenais également à remercier le jury de l'école doctorale BMIC de m'avoir sélectionnée il y a quatre ans pour l'obtention de la bourse de thèse ministérielle qui m'a fourni le financement nécessaire à ce que travail de thèse voit le jour. Je remercie également l'université LYON 1 de m'avoir recrutée en tant qu'ATER pour cette quatrième année.

Bien évidemment un immense merci à l'ensemble de la « Ruggiero team » avec qui j'ai apprécié vivre pendant ces 6 ans et en qui j'ai trouvé une véritable famille de travail qui va énormément me manquer... Vous m'avez tous beaucoup apporté chacun à votre manière et vous ne couperez pas bien sûr pas à vos remerciements individuels le jour J...

Un grand merci particulier à toi Florence pour m'avoir accueillie dans ton équipe, pour ta passion de la science, ta disponibilité, ta détermination et ton optimisme sans faille. Tu sais toujours voir le point positif dans un résultat que l'on trouve parfois inexploitable ou déroutant et surtout trouver les mots et nous communiquer ta « positive attitude » pour nous rebooster quand on y croit plus. Avec toi j'ai pu grandir scientifiquement et apprendre à faire de la science robuste en toute humilité et objectivité et pour cela je t'en remercie. Tu as su changer ma vision de la matrice extracellulaire qui me paraissait assez triste et obscure quand je l'ai découverte sur les bancs de l'université... Bref je suis heureuse d'avoir eu une chef et un repère scientifique comme toi et travailler à ton contact fut un réel enrichissement à la fois scientifique et humain.

Un grand merci à toi Sandrine d'avoir fait véritablement équipe avec moi tout au long de ces 6 dernières années. J'ai adoré notre binôme un peu « fou-fou » qui est parti à la pêche aux collagènes (XVIII puis XV) sans trop savoir ce qu'il allait trouver dans son panier Petit à petit j'ai appris à te connaître, te comprendre, à savoir comment communiquer avec toi et apprendre de toi ... A la fois très similaires sur certains points et complètement aux antipodes sur d'autres dans nos manières d'être et de fonctionner, nous avons su trouver un équilibre malgré nos fortes personnalités et développer une véritable relation professionnelle et humaine qui a parfaitement su fonctionner et qui je l'espère fonctionnera encore longtemps ...

avec toi j'ai vraiment grandi dans un certain sens... Merci pour ton implication dans le projet, ton énergie folle dans les manip, ton envie de tester toujours et encore des nouvelles techniques, tes mails et nos échanges de SMS enthousiastes concernant la biblio ou le montage de manips à des moments incongrus les soirs et week-end qui ont parfois fait rager Laurent ! Cette énergie communicative a vraiment su renforcer mon énergie d'aller à fond dans ce projet ! Merci également pour les discussions scientifiques intensives au moment des corrections de ce manuscrit que j'ai trouvé très enrichissantes. Bref, ca va vraiment me manquer de ne plus travailler avec toi....

Je tenais également à remercier Dominique Le Guellec de m'avoir vraiment fait apprécier la Biologie Cellulaire quand j'étais sur les bancs de la fac et de m'avoir proposé d'intégrer l'équipe de Florence il y a 6 ans pour mon stage de M1. Sans lui je ne vous aurais sans doute pas connu et je serais passé à côté du collagène XV qui fait un peu partie de moi même maintenant...Et surtout merci d'avoir lourdement insisté pour faire produire les anticorps contre COLXV-B !!!

Un grand merci aussi à l'ensemble de l'équipe pédagogique de Biologie cellulaire avec qui j'ai partagé ces 4 ans d'enseignement à l'Université LYON 1. Cette expérience aura su me donner de l'aplomb, développer mon sens de la communication, m'aura appris à prendre des décisions et m'aura fait comprendre que parfois il faut faire face et s'adapter à des situations diverses et variées dans lesquelles on ne maîtrise pas toujours tout... Elle aura surtout conforté mon goût pour l'enseignement que j'espère pouvoir continuer à pratiquer par la suite.

Merci également à tous ceux que j'ai croisés dans ma vie et qui font ce que je suis aujourd'hui car comme m'a dit un jour quelqu'un qui se reconnaîtra, si tu sais dire JE c'est qu'un jour quelqu'un t'a dit TU....

Voilà ...un autre voyage m'attend et je sors plus grandie de cette expérience... donc MERCI

SOMMAIRE

LISTE DES ABBREVIATIONS	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS	14
RESUME/ABSTRACT	18
INTRODUCTION GENERALE	21
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	25
I – Le Collagène XV : structure, expression et fonction	25
A - Le collagène XV est un membre de la superfamille des collagènes	25
B - Caractéristiques structurales du collagène XV	28
1 - Structure de la molécule et arrangement supramoléculaire	28
2 - Un collagène avec des propriétés de protéoglycane à chaînes chondroïtine et héparane sulfate	30
C - Distribution tissulaire du collagène XV	33
1 - Un collagène associé aux lames basales	33
2 - Localisation dans le système neuro-musculaire	36
D - Quelles fonctions pour le collagène XV ?	38
1 - Des propriétés anti-angiogéniques et anti-tumorales	38
2 - Fonctions physiologiques du collagène XV	40
a - Rôle du collagène XV dans le système cardio-vasculaire	41
b - Rôle du collagène XV dans le muscle strié squelettique	42
c - Rôle du collagène XV dans le système nerveux périphérique	44
II - Le poisson zèbre comme modèle d'étude du développement neuromusculaire	46
A - Généralités	46
B - Un modèle de développement et d'imagerie	48
C - Un modèle de génétique et de pathologies humaines	50
III - Développement du muscle squelettique axial	55
A - Myogenèse primaire du poisson zèbre : généralités	56
B - Du mésoderme au myotome primaire : une dynamique complexe	57
1 - Myogenèse des fibres lentes	58
2 - Myogenèse des fibres rapides	61
C - Les voies de signalisations régulant la formation du myotome primaire	64
1 - Voie de signalisation Hedgehog	64
2 - Voies de signalisation des FGFs et des BMPs	68
3 - Le couple Sdf1x/Cxcr4	68

D - Implication des protéines d'adhérence et des molécules de la matrice dans la formation du myotome primaire	69
1 - Implication dans la dynamique cellulaire essentielle à la formation du myotome	69
2 - Régulation de voies de signalisation dans la différenciation musculaire	71
IV- Mise en place de l'innervation motrice	73
A - Mise en place du patron d'innervation moteur chez le poisson zèbre : aspects descriptifs	73
1 - Développement des motoneurones primaires	74
2 - Développement des motoneurones secondaires	76
B - Contrôle du développement axonal (axonogenèse)	77
1 - Interdépendance relative des motoneurones	78
2 - Rôle du myotome dans le contrôle de l'axonogenèse	79
3 - Signaux moléculaires d'origine myotomale impliqués dans le guidage axonal des motoneurones primaires	80
a - Signaux impliqués dans le guidage le long du chemin axonal commun	83
b - Signaux impliqués dans le guidage au niveau du point de choix	85
c - Signaux impliqués dans le guidage le long des trajectoires spécifiques	86
d - Modulation de l'environnement moléculaire présent dans le chemin axonal : activité des gènes <i>diwanka/lh3</i> et <i>unplugged /MuSK</i>	88
4 - Signaux moléculaires impliqués dans le guidage des motoneurones secondaires	92
C - Etablissement des contacts synaptiques : Formation de la jonction neuromusculaire	93
1 - Prepatterning	94
2 - JNMs « en passant »	96
3 - JNMs éparses et myoseptales	97
V- Evaluation des conséquences physiologiques d'altérations du système neuromusculaire : analyse des comportements locomoteurs	97
A - Contractions spontanées	98
B - Contractions en réponse à un stimulus tactile	99
C - Nage	99
MATERIEL ET METHODES	102
- Fiche technique N°1: Conditions d'élevage en laboratoire d'embryons de poisson zèbre	103
- Fiche technique N°2: Profil d'expression de <i>coll5a1b</i> par RT-PCR	104
- Fiche technique N°3: Synthèse de sondes pour hybridation <i>in situ</i>	108
- Fiche technique N°4: Hybridation <i>in situ</i> sur embryons	111
- Fiche technique N°5: Traitement d'embryons à la cyclophamide	115
- Fiche technique N°6: Synthèse et injection d'ARN codant pour une forme dominante négative de la protéine kinase A (dnPKA)	116
- Fiche technique N°7: Production d'anticorps polyclonaux spécifiquement dirigés contre COLXV-B	118
- Fiche technique N°8: Production recombinante de COLXV-B en cellules HEK293	119

- Fiche technique N°9: Western blot COLXV-B	124
- Fiche technique N°10: Traitement collagenase sur surnageant de culture enrichi en COLXV-B	126
- Fiche technique N°11: Immunomarquages sur embryons de 0 a 24 hpf	128
- Fiche technique N°12: Immunomarquages sur embryons de 48 et 72 hpf	130
- Fiche technique N°13: Microinjection de morpholinos	132
- Fiche technique N°14: Test d'efficacité du morpholino sMO15b par RT- PCR	135
- Fiche technique N°15: Evaluation de la motilité des embryons	137
- Fiche technique N°16: Génotypage de mutants <i>unplugged</i>	138
- Fiche technique N°17: Immunomarquages fluorescents sur coupes cryostat	142
RESULTATS	146
I - Expression de <i>Col15a1b</i> au cours du développement embryonnaire : focus sur son expression au cours de la myogenèse primaire	147
<i>Publication 1 : Characterization of spatial and temporal expression pattern of Col15a1b during zebrafish development</i>	
II - Localisation de COLXV-B et son role dans la mise en place du système neuromusculaire	148
<i>Publication 2 : Zebrafish collagen XV-B is a novel myotome-derived cue that paves the axonal motor path and provides contact guidance for axons at the choice point</i>	150
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	196
I - Les collagènes XV dans la spécification des cellules musculaires et contrôle de leur expression par des molécules de signalisation	196
II - Quelle fonction pour le collagène XV dans les tissus nerveux ?	202
A - Fonction dans le guidage des axones moteurs	202
B - Fonction dans les autres tissus nerveux	207
CONCLUSIONS GENERALES	211
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	213
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES ANNEXES	228
<i>Publication 3 : Knockdown of col22a1 gene in zebrafish induces a muscular dystrophy by disruption of the myotendinous junctions</i>	
<i>Publication 4 : Lysyl oxydase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane</i>	
ANNEXES	230
Annexe 1 : Stades du développement embryonnaire du poisson zèbre	230

Liste des Abréviations

Liste des abréviations

Aa	Acide aminé
AChR	Acetylcholin Receptor (Récepteur à Acétylcholine)
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AEBSF	4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
Amp	Ampicilline
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate
BM	Basement Membrane (lame basale)
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMZ	Basement Membrane Zone
BSA	Bovine Serum Albumine
CaP	Caudal primary motoneuron (motoneurone primaire caudal)
CAPS	N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMV	CytoMegaloVirus
COL	Domaine collagénique
COLXV	Collagène XV
CRISPR/Cas 9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats RNA guided Cas 9 nuclease
CS	Chondroïtine Sulfate
CSPG	Protéoglycane à chaînes chondroïtine sulfate
DDR	Discoidin Domain Receptor
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DIG	Digoxygenin
Dmp/Mp	Drosophila multiplexin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide

dnPKA	Forme Dominante Négative de la PKA
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynucleotide Tri-Phosphate
EHH	Echidna Hedgehog
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
Eng	Engrailed
ENU	EthylNitrosourea
FACITs	Fibrillar Associated Collagens with Interrupted Triple helices
FF	Fast Fibers (Fibres Rapides)
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
fMyHC	fast Myosine Heavy Chain
fMyLC	fast Myosine Light Chain
GAG	Glycosaminoglycane
GBS	Gli Binding Site
GFP	Green Fluorescent Protein
HEK	Human Embryonic Kidney
HH	Hedgehog
hpf	heures post fécondation
HRP	Horse Radish Peroxydase
HS	Héparane Sulfate
HSPG	Protéoglycane à chaines héparane sulfate
Hyb A	Hybridation A
Hyb B	Hybridation B
JNM	Jonction Neuromusculaire
jpc	jours post coitum
jpg	Jour post fécondation
kDa	kilo Dalton
LG	Linkage Group
LH3	Lysyl Hydroxylase 3

MEC	Matrice Extracellulaire
MFF	Medial Fast Fibers (fibres rapides médianes)
MiP	Middle Primary motoneuron (motoneurone primaire médian)
MP	Muscle Pioneer (fibres pionnières)
MRF	Myogenic Regulatory Factors
Multiplexines	Multiple Triple Helix with Interruptions
MuSK	Muscle Spécifique Kinase
MyoG	Myogénine
NBT	Nitro Blue tetrazolium
NB	Northern Blot
NC	Domaine Non Collagénique
NHEJ	Non Homologous End Joining
NTMT	0,1M NaCl ; 0,1 M Tris-HCl pH= 9,5; 50mM MgCl ₂ ; 0,1 Tween 20
OCT	Optimum Cutting Temperature
PAGE	PolyAcrylamide GEl
pb	paire de base
PBDTT	PBS 1% DMSO, 0,1% Tween 20 , 0,5% Triton X-100
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBT	PBS- 0.1% Tween 20
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldéhyde
PKA	Protéine Kinase A
Ptc	Patched
PTU	Phenylthiourée
PVDF	Polyvinylidene fluoride
QSP	quantité suffisante pour
RA	Retinoic Acid
Restin	Related to endostatin
RoP	Rostral Primary motoneuron (motoneurone primaire rostral)
RPTP	Receptor Protein Tyrosine Phosphatase

RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SHG	Second Harmonic Generation
SHH	Sonic Hedgehog
sly	sleepy
Smo	Smoothened
smyhc1	slow myosine heavy chain 1
spt	spadetail
SSC	3M NaCl, 0,3M Sodium citrate (20X SSC)
SSF	Slow Superficial Fibers (fibres lentes superficielles)
TALEN	Transcription activator-like effector nucleases
TBS	Tris Buffer Saline
TBST	TBS- 0,05% Tween 20
TEM	Transition Epithélio Mésenchymateuse
TG	Tris Glycine
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
THG	Third Harmonic Generation
TILLING	Targeting Induced Local Lesion IN Genomes
TRITC	Tetramethylrhodamine isothiocyanate
TSPN	Domaine homologue de l'extrémité N-terminale de la thrombospondine-1
TWHH	Twiggy Winkle Hedgehog
VaP	Variable Primary motoneuron (motoneurone primaire variable)
YFP	Yellow fluorescent protein
ZFN	Zinc Finger Nuclease

Table des Illustrations

Table des illustrations

Figure 1	La triple hélice collagénique : signature structurale des collagènes	25
Figure 2	Le collagène XV est un homotrimère d'une chaîne $\alpha 1$ (XV)	29
Figure 3	Le collagène XV est un protégoglycane à chaînes chondroïtine et héparane sulfate	31
Figure 4	Le collagène XV est associé aux fibres de collagène à proximité de la lame basale, dans la région BMZ.	36
Figure 5	Le collagène XV murin est déposé dans les BMZ du système neuromusculaire	37
Figure 6	Modèle illustrant la fonction anti-tumorale du collagène XV dans les épithélia	40
Figure 7	Un rôle pour le collagène XV dans le système neuromusculaire	43
Figure 8	Schéma illustrant les défauts de myélinisation observés sur des nerfs sciatiques de souris <i>Col15a1</i> ^{-/-}	45
Figure 9	Cycle de vie du poisson zèbre	47
Figure 10	Le poisson zèbre est un puissant modèle d'imagerie <i>in vivo</i>	49
Figure 11	Stratégie antisens basée sur l'injection de morpholinos	52
Figure 12	Génération de mutants pour un gène cible : la méthode du TILLING	53
Figure 13	Stratégies de « genome editing » employées chez le poisson zèbre	54
Figure 14	Représentation schématique du myotome primaire du poisson zèbre	56
Figure 15	Les étapes majeures de la myogenèse lente	59
Figure 16	Dynamique de la myogenèse rapide	62

Figure 17	Schéma général de la voie de signalisation Hedgehog	65
Figure 18	Régulation de la spécification des fibres musculaires par la voie Hedgehog	66
Figure 19	Un gradient antéro-postérieur de signalisation FGF et dorso ventral de signalisation BMP détermine le nombre correct de cellules adaxiales qui se différencient en MPs.	69
Figure 20	Implication des molécules de la matrice extracellulaire dans la formation du myotome primaire	71
Figure 21	Développement des motoneurones primaires et secondaires	75
Figure 22	Les grandes familles de couples ligands-récepteurs classiquement impliquées dans le guidage axonal	81
Figure 23	Environnement moléculaire des motoneurones primaires en croissance : régionalisation des signaux myotomaux	82
Figure 24	Modèle proposé concernant le mode d'action du gène <i>diwanka</i> dans la croissance des motoneurones primaires	89
Figure 25	Structure des trois transcrits <i>unplugged</i> et de leurs protéines correspondantes avec la position des mutations présentes dans les différents allèles mutants de <i>unplugged</i>	90
Figure 26	Modèle proposé concernant le mode d'action du gène <i>unplugged</i> dans la sélection au point de choix	91
Figure 27.	Dynamique de formation de la jonction neuromusculaire chez le poisson zèbre	95
Figure 28	Trois types de comportements locomoteurs au cours du développement du poisson zèbre	98
Figure 29	Présence de séquences « GACCAC » correspondant aux motifs cœurs des sites de fixation des facteurs Gli (GBS) dans la région promotrice putative en amont de <i>coll5a1b</i> .	200
Figure 30	Exemples de distribution tissulaire de COLXV-B au cours du développement embryonnaire et dans le système nerveux central adulte du poisson zèbre	208
Tableau 1	La superfamille des collagènes chez les vertébrés	27

Tableau 2	Expression du collagène XV au cours du développement des mammifères	34
Tableau 3	Expression du collagène XV chez les mammifères au stade adulte	35
Tableau 4	Comparaison des propriétés clés des organismes modèles	50

Résumé / Abstract

RESUME

Dès leur sortie de la moelle épinière, les axones moteurs suivent un trajet stéréotypé jusqu'à leur cible musculaire en périphérie, guidés par de nombreux signaux moléculaires. Parallèlement aux molécules de guidage classique diffusibles, les molécules de la matrice extracellulaire constituent des balises moléculaires qui guident les axones moteurs tout au long de leur trajectoire. Le collagène XV (COLXV) est un collagène associé aux lames basales qui est codé par deux paralogues chez le poisson zèbre. Notre laboratoire a précédemment montré que *coll5a1a* était exprimé uniquement au niveau de la notochorde et que ce paralogue contribuait au développement musculaire par modulation de la voie Hedgehog. Au cours de ma thèse, nous avons déterminé le patron d'expression du second paralogue *coll5a1b* au cours du développement et caractérisé la structure primaire de la protéine COLXV-B. De manière intéressante, *coll5a1b* est exprimé transitoirement au cours du développement du tronc, spécifiquement par les cellules adaxiales au cours de leur différenciation en fibres musculaires lentes. Les cellules adaxiales représentent une importante source de molécules de la matrice extracellulaire constitutive du chemin des axones moteurs en croissance. Ainsi, nous avons décidé de déterminer la fonction de *coll5a1b* au cours du développement du système neuromusculaire. Des doubles immunomarquages avec des anticorps que nous avons générés pour reconnaître COLXV-B et des marqueurs cellulaires particuliers ont montré que COLXV-B pavait la trajectoire commune des axones moteurs bien avant l'entrée des axones dans le myotome et persistait dans cette région au moment de la croissance axonale. L'expression d'une forme dominant-négative de la PKA dans les embryons sauvages et la détection immunologique de COLXV-B dans les mutants *unplugged* ont montré que l'expression de *coll5a1b* dépend de la voie de signalisation Hedgehog tandis que l'organisation particulière de COLXV-B dans le trajet des axones moteurs est liée à l'activité du gène *unplugged/MuSK*. Conformément à son expression dans les cellules adaxiales et à sa localisation dans le trajet des axones moteurs, l'inhibition de l'expression de *coll5a1b* par injection de morpholinos (1) altère la différenciation des cellules adaxiales en augmentant le nombre de fibres pionnières et (2) provoque l'arrêt des axones des motoneurons primaires au niveau du point de choix où se fait la sélection des trajectoires. L'absence de la protéine dans le trajet commun provoque également des troncations ou des erreurs de trajectoire des motoneurons secondaires au niveau de ce point de choix. Ce défaut d'innervation s'accompagne d'une atrophie musculaire chez les morphants *coll5a1b* et conduit à un comportement de nage anormal en réponse à une stimulation. Ces données ont permis de montrer de façon inattendue que COLXV-B dont le dépôt dans la trajectoire des axones moteurs est sous la dépendance du signal *unplugged/MuSK* permet de guider la prise de décision des axones au niveau du point de choix. La conservation de la syntenie entre *coll5a1b* et *COL15A1*, la similarité du patron d'expression de *coll5a1b* avec celui de *COL15A1* ainsi que la similarité de séquence de COLXV-B avec ses homologues mammifères suggèrent que *COL15A1* pourrait avoir une fonction identique chez l'humain et représenter une gène candidat pour les maladies neuromusculaires.

Mots clés : Matrice extracellulaire ; Poisson zèbre ; Progéniteurs musculaires ; Guidage axonal ; Signalisation

ABSTRACT

After exiting the spinal cord, motor axons follow a stereotyped path toward their muscle target guided by multiple directional cues. Besides classic guidance molecules, the extracellular matrix provides positional information to guide motoneuron axons along their appropriate paths. Recent evidence shows that collagens play important roles in neuromuscular development. Collagen XV (COLXV) is a basement membrane associated component that is encoded in zebrafish by two paralogs. My laboratory previously reported that *coll5a1a* expression was restricted to notochord and that this paralog contributed to muscle development by interplaying with Hedgehog signaling. My PhD project consisted in the characterization of the expression pattern of the *coll5a1b* paralog during development and in the analysis of the *in vivo* function of this paralog in developing zebrafish embryos. Interestingly, using *in situ* hybridization, we showed that *coll5a1b* is transiently and specifically expressed in the developing trunk by slow fiber precursors, the adaxial cells by the time of their differentiation into slow fibers. Adaxial cells represent an important source of the extracellular matrix path in which motor axons navigate. Therefore we next decided to interrogate the function of *coll5a1b* during development of zebrafish neuromuscular system. Immunofluorescence co-staining with newly generated antibodies to COLXV-B and cell-type specific markers indicated that COLXV-B paves the initial common trajectory of motor axons prior to axonal extension and persisted there by the time of axon progression. Overexpression of dominant-negative PKA in wild-type embryos and immunodetection of COLXV-B in *unplugged* mutants showed that *coll5a1b* expression depends on Hedgehog signaling whereas the critical organization of COLXV-B at the motor path depends upon *unplugged/MuSK* gene activity. Pertinent to its expression in adaxial cells and location at the common path, morpholino-based knockdown of *coll5a1b* compromised adaxial cell differentiation by increasing the number of muscle pioneers and caused primary motoneuron axons to stall abnormally at the choice point where specific pathway selection takes place. Absence of the protein in the common path later provoked secondary axon truncation or pathfinding errors at the choice point. As a consequence of disrupted muscle innervation, *coll5a1b*-morphants exhibited significant muscle fiber atrophy and compromised swimming behavior in response to touch stimulation. Our data identified an unexpected role for COLXV-B as an *unplugged/MuSK*-dependent cue that paves the axonal motor path to guide the decision of axons at the choice point. The conserved syntheny, the broad expression pattern of *coll5a1b* similar to *COL15A1* ortholog and the conservation of the primary sequence of COLXV-B with the mammalian counterparts suggested that the human protein COLXV could display similar function and represent a gene candidate for neuromuscular disorders.

Key words: Extracellular matrix ; Zebrafish ; Muscle precursors; Axonal guidance; Signaling

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE

Les organismes pluricellulaires sont composés d'une multitude de cellules qui s'agencent entre elles pour former des tissus et des organes plus ou moins complexes. Cependant, les tissus ne sont pas composés uniquement de cellules. Une grande partie du volume tissulaire est en effet occupé par l'espace extracellulaire qui est constitué d'un réseau complexe de macromolécules qu'on appelle la matrice extracellulaire (MEC).

La MEC comprend un ensemble de protéines structurales fibreuses, de protéines de liaison, de glycoprotéines et de polysaccharides complexes dont la composition, l'arrangement et les propriétés biomécaniques varient en fonction des tissus. On distingue d'une part la matrice dite interstitielle souvent dense et abondante dans les tissus conjonctifs, et d'autre part, les lames basales qui forment un fin feuillet matriciel hautement spécialisé. Cette lame basale forme un tapis matriciel sur lequel vont s'ancrer les épithélia, mais elle peut également entourer chaque cellule comme par exemple les fibres musculaires. Dans la plupart des cas, elle constitue une zone d'interface entre les cellules et le tissu conjonctif environnant, région privilégiée de communication entre deux tissus adjacents (comme par exemple l'épiderme et le derme dans la peau).

D'un point de vue fonctionnel, la MEC est avant tout connue pour son rôle dans la cohésion entre les cellules dans les tissus et organes et elle est de ce fait considérée comme un véritable ciment biologique. La composition et l'organisation de la MEC confèrent aux tissus leurs propriétés biomécaniques telles que l'élasticité, la résistance aux chocs, la déformabilité ou en encore l'amortissement et/ou biophysiques comme la transparence de la cornée. A ce titre, les composants de la matrice extracellulaire sont utilisés sous forme de gel ou « éponge » ou autre biomatériau pour reconstruire des tissus *ex vivo* dans un but thérapeutique. On peut aujourd'hui reconstruire artificiellement de la peau, du cartilage, de la cornée, des vaisseaux pouvant être utilisés comme modèle d'étude ou en médecine régénérative.

Depuis ces vingt dernières années, un nombre considérable de travaux ont montré que la MEC représente bien plus qu'un simple ciment pour les cellules. Ce réseau multi-protéique complexe contribue de façon dynamique au processus de morphogenèse chez l'embryon, puis à l'homéostasie tissulaire et à la cicatrisation tout au long de la vie. Les macromolécules de la MEC participent ainsi à la différenciation, la prolifération, la survie, la migration et la communication cellulaire en régulant directement (ou indirectement) l'activation de voies de

signalisation, agissant soit comme ligand, soit comme co-facteurs ou encore comme modulateurs de la disponibilité de facteurs solubles.

Le projet de recherche de mon laboratoire d'accueil vise à comprendre la contribution à l'échelle moléculaire de la matrice extracellulaire dans les processus développementaux et physio-pathologiques avec un intérêt tout particulier pour les collagènes. Les collagènes sont les composants majoritaires des MECs représentant à eux seuls 25% des protéines de l'organisme. La superfamille des collagènes est composée de 28 membres partageant une signature structurale commune mais recouvrant une grande diversité de structures, d'expression, de distribution tissulaire et de fonctions. Ils comprennent les collagènes fibrillaires, les plus abondants, et les non-fibrillaires dont la structure modulaire prédit une grande diversité de fonction. Bien étudiés d'un point de vue de leur biosynthèse, de leur structure, et de leur assemblage dans les tissus, leur fonction *in vivo*, en particulier pour les plus récents, reste encore aujourd'hui peu documentée. Cette diversité fonctionnelle est bien illustrée par les travaux de l'équipe montrant leur implication dans des processus aussi divers que l'angiogénèse, l'attachement des muscles, la régénération, l'intégrité cellulaire, la biodisponibilité de facteurs de croissance, les propriétés biomécaniques des tissus. Mon laboratoire s'intéresse plus particulièrement aujourd'hui à l'implication de collagènes dits non conventionnels dans la morphogénèse des tissus dans lesquels ils sont exprimés.

La thématique dans laquelle s'inscrit mon projet de thèse vise à déterminer le rôle du collagène XV, collagène non conventionnel, dans le développement du système musculo-tendineux chez le poisson zèbre. Le collagène XV est principalement exprimé dans le tissu musculaire strié et cardiaque, et son absence conduit à une myopathie légère et des défauts cardiovasculaires chez la souris. Le(s) mécanisme(s) par lequel (lesquels) le collagène XV serait capable de contrôler la formation du tissu musculaire reste(nt) à ce jour obscur(s). Le modèle du poisson zèbre présente de nombreux avantages pour analyser la fonction d'un gène et il est particulièrement bien adapté à l'étude de la myogenèse et des pathologies musculaires (Ingham, 2009). Des travaux publiés récemment dans l'équipe ont permis de mettre en évidence chez le poisson zèbre le rôle clé joué par le collagène XXII dans la stabilisation de la jonction myotendineuse (Charvet *et al.*, 2013).

Deux orthologues du gène codant pour le collagène XV ont été identifiés chez le poisson zèbre et nommés *coll5a1a* et *coll5a1b*. Faisant suite aux travaux de thèse d'Aurélie Pagnon-Minot qui ont permis d'établir un scénario expliquant le mode d'action de *coll5a1a*

dans le développement du myotome embryonnaire (Pagnon-Minot *et al.*, 2008), mon projet de thèse est lui centré sur l'étude du second paralogue *coll5a1b* dont le patron d'expression est plus proche de celui décrit pour les gènes murin et humain. *Coll5a1b* étant exprimé uniquement par les progéniteurs du muscle lent dans le tronc du poisson (Breteaud *et al.*, 2011 ; Résultats partie I), un rôle de ce collagène dans le guidage axonal n'avait pas été anticipé (Guillon *et al.*; Résultats partie II).

Dans le document qui suit, un état de l'art des connaissances actuelles sur le collagène XV et des notions essentielles du développement du muscle squelettique et de la mise en place de l'innervation motrice chez le poisson zèbre seront successivement présentés. Puis, après un descriptif des méthodes employées au cours de ma thèse, les résultats obtenus seront présentés en 2 parties. La première partie concernera la réalisation d'un patron d'expression complet de *coll5a1b* au cours du développement, la seconde s'attachera à décrire les travaux d'analyse de fonction de *coll5a1b* dans la mise en place du système neuromusculaire. Ces résultats seront dans un troisième temps discutés avant de conclure mon document de thèse.

Données Bibliographiques

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I - Le Collagène XV : structure, expression et fonction

A - Le collagène XV est un membre de la superfamille des collagènes

Les collagènes sont définis comme étant des trimères résultant de l'assemblage de 3 chaînes α polypeptidiques dites chaînes α collagéniques qui peuvent être identiques dans le cas d'un homotrimère ou différentes dans le cas d'un hétérotrimère. Cette chaîne α collagénique se caractérise par la présence d'un ou plusieurs domaines collagéniques (COL) présent dans la matrice extracellulaire qui correspondent à une répétition plus ou moins longue d'un triplet (Gly-X-Y)_n où X est souvent la proline et Y l'hydroxyproline. Ces domaines sont responsables de la formation de la triple hélice collagénique qui est la signature ultrastructurale des collagènes (**Figure 1**).

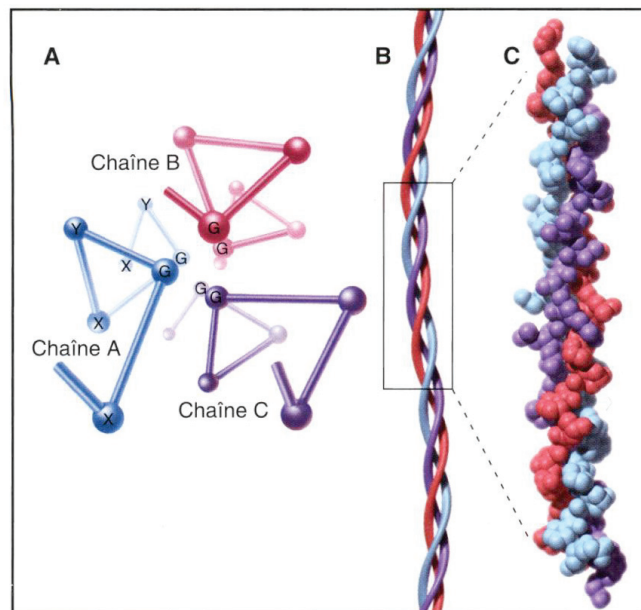


Figure 1. La triple hélice collagénique : signature structurale des collagènes

A - Vue axiale de la triple hélice. Chaque chaîne polypeptidique α collagénique (ici indiquée comme étant la chaîne A, B ou C) forme une hélice gauche poly-proline de type II dont l'axe est centré sur les résidus glycine (G) qui se retrouvent ainsi au cœur de la triple hélice, contrairement aux résidus X et Y dont les chaînes latérales se retrouvent projetées à l'extérieur de la triple hélice. **B - Représentation schématique de la triple hélice.** Les trois hélices gauches formées par les chaînes α s'enroulent autour d'un axe commun avec un décalage de 0,3 nm et forment ainsi une triple hélice droite. **C - Modèle tridimensionnel de la structure de la triple hélice.** Extraits de « Biologie cellulaire » de Thomas D. Pollard et William C. Earnshaw Edition Elsevier 2004

Les différents membres de cette famille présentent une très grande diversité de structure en raison de la présence de domaines non collagéniques (NC) au sein de la chaîne α dont la nature et l'arrangement varient d'un collagène à un l'autre. On décrit à l'heure actuelle 46 chaînes α collagéniques codées par 46 gènes dont l'assemblage donne naissance à 28 types de collagènes. Ces collagènes sont regroupés en plusieurs sous-familles sur la base de leur homologie de structure et/ou de leur arrangement supramoléculaire (**Tableau 1**, Ricard-Blum et Ruggiero, 2005 ; Ricard-Blum, 2011). On distingue ainsi les collagènes fibrillaires qui sont majoritairement présents dans les tissus conjonctifs ; les FACITs pour « Fibrillar Associated Collagens with Interrupted Triple helices » qui sont connus pour interagir avec les collagènes fibrillaires ; les collagènes formant des réseaux comme notamment le collagène IV composant majoritaire des lames basales ou encore les collagènes transmembranaires qui sont enchâssés dans la membrane plasmique et ne forment pas d'arrangement supramoléculaire particulier. Plusieurs collagènes peuvent également générer, par clivage protéolytique, des fragments solubles appelés matricryptines qui exercent une activité biologique propre, différant de la molécule entière (Ricard-Blum, 2011).

Les collagènes XV et XVIII qui nous intéressent plus particulièrement constituent à eux seuls le sous-groupe des multiplexines (« multiple triple helix with interruptions »). Les collagènes XV et XVIII sont structurellement très proches. La chaîne α des multiplexines se caractérise par la présence d'une région COL centrale qui est fréquemment interrompue par de très courts domaines NC qui constituent des domaines « linkers » plus flexibles que la triple hélice mais également plus sensibles aux enzymes protéolytiques. Cette région COL est encadrée par de larges domaines NC présents aux extrémités N- et C-terminales de la molécule. Le domaine C-terminal peut être clivé pour libérer une matricryptine (la restine dans le cas du collagène XV et l'endostatine dans le cas du collagène XVIII) tous deux connus pour leur activité anti-angiogénique dans les tumeurs (O'Reilly *et al.*, 1997 ; Ramchandran *et al.*, 1999). Il est d'ores et déjà intéressant de noter que chez deux modèles d'invertébrés que sont *C. Elegans* et *Drosophila Melanogaster*, il n'existe qu'une multiplexine orthologue des collagènes XV et XVIII, codée respectivement par les gènes *cle-1* et *dmp* (Ackley *et al.*, 2001 ; Meyer et Moussian, 2009). Chez le poisson-zèbre, les deux multiplexines sont conservées et bien distinctes. Notre laboratoire a ainsi caractérisé les orthologues du collagène XVIII (Haftek *et al.*, 2003) et du collagène XV dans ce modèle. Nous savons maintenant qu'il existe deux paralogues codant pour le collagène XV chez le poisson zèbre, *coll5a1a* identifié par Pagnon-Minot *et al.*, (2008) avant mon arrivée au laboratoire et *coll5a1b* caractérisé pendant ma thèse (Breteaud *et al.*, 2011).


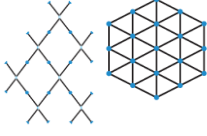


Sous-groupe	Collagène	Chaines α	Assemblages des chaînes α	Assemblage supramoléculaire	Exemples de distribution tissulaire
Collagène fibrillaires	Collagène I	$\alpha_1(I)$; $\alpha_2(I)$	$[\alpha_1(I)]_2, \alpha_2(I)$; $[\alpha_1(I)]_3$		Os, cornée, peau, tendon
	Collagène II	$\alpha_1(II)$	$[\alpha_1(II)]_3$		Cartilage, humeur vitrée
	Collagène III	$\alpha_1(III)$	$[\alpha_1(III)]_3$		Vaisseaux sanguins, os, peau
	Collagène V	$\alpha_1(V)$; $\alpha_2(V)$; $\alpha_3(V)$	$[\alpha_1(V)]_2, \alpha_2(V)$; $[\alpha_1(V)]_3$; $\alpha_3(V)$		Vaisseaux sanguins, os, cornée, peau, tendon, placenta
	Collagène XI	$\alpha_1(XI)$; $\alpha_2(XI)$; $\alpha_3(XI)$	$\alpha_1(XI), \alpha_2(XI), \alpha_3(XI)$		Cartilage, placenta, tendon
	Collagène XXIV	$\alpha_1(XXIV)$	$[\alpha_1(XXIV)]_3$		Os, cornée
	Collagène XXVII	$\alpha_1(XXVII)$	$[\alpha_1(XXVII)]_3$		Cartilage
	Collagène IX	$\alpha_1(IX)$; $\alpha_2(IX)$; $\alpha_3(IX)$	$\alpha_1(IX), \alpha_2(IX), \alpha_3(IX)$		Cartilage, humeur vitrée
	Collagène XII	$\alpha_1(XII)$	$[\alpha_1(XII)]_3$		Tissu conjonctif
	Collagène XIV	$\alpha_1(XIV)$	$[\alpha_1(XIV)]_3$		Tissu conjonctif
	Collagène XVI	$\alpha_1(XVI)$	$[\alpha_1(XVI)]_3$		Cartilage, derme papillaire, Placenta
	Collagène XIX	$\alpha_1(XIX)$	$[\alpha_1(XIX)]_3$		Lames basales
Collagène XX	$\alpha_1(XX)$	$[\alpha_1(XX)]_3$		Généralisé	
Collagène XXI	$\alpha_1(XXI)$	$[\alpha_1(XXI)]_3$		Généralisé	
Collagène XXII	$\alpha_1(XXII)$	$[\alpha_1(XXII)]_3$		Jonctions tissulaires	
Collagène IV	$\alpha_1(IV)$; $\alpha_2(IV)$; $\alpha_3(IV)$; $\alpha_4(IV)$; $\alpha_5(IV)$; $\alpha_6(IV)$	$\alpha_1(IV), \alpha_2(IV), \alpha_3(IV), \alpha_4(IV), \alpha_5(IV), \alpha_6(IV)$	$[\alpha_1(IV)]_2, \alpha_2(IV)$; $\alpha_3(IV), \alpha_4(IV), \alpha_5(IV), \alpha_6(IV)$; $[\alpha_5(IV)]_2, \alpha_6(IV)$		Lames basales
Collagène VIII	$\alpha_1(VIII), \alpha_2(VIII)$	$\alpha_1(VIII), \alpha_2(VIII)$	$[\alpha_1(VIII)]_2, \alpha_2(VIII)$; $[\alpha_1(VIII)]_3$		Lames basales, vaisseaux sanguins, tissus conjonctifs
Collagène X	$\alpha_1(X)$	$[\alpha_1(X)]_3$			Cartilage calcifié
Collagène VII	$\alpha_1(VII)$	$[\alpha_1(VII)]_3$			Lames basales; Fibres d'ancrage
Collagène XIII	$\alpha_1(XIII)$	$[\alpha_1(XIII)]_3$			Jonctions cellulaires
Collagène XVII	$\alpha_1(XVII)$	$[\alpha_1(XVII)]_3$			Hémidesmosomes
Collagène XXIII	$\alpha_1(XXIII)$	$[\alpha_1(XXIII)]_3$			Cerveau, cornée, rein, poumon, peau, tendon
Collagène XXV	$\alpha_1(XXV)$	$[\alpha_1(XXV)]_3$			Cerveau
Collagène XV	$\alpha_1(XV)$	$[\alpha_1(XV)]_3$			Lames basales
Collagène XVIII	$\alpha_1(XVIII)$	$[\alpha_1(XVIII)]_3$			Lames basales
Collagène VI	$\alpha_1(VI)$; $\alpha_2(VI)$; $\alpha_3(VI)$; $\alpha_4(VI)$; $\alpha_5(VI)$; $\alpha_6(VI)$	$\alpha_1(VI), \alpha_2(VI), \alpha_3(VI), \alpha_4(VI), \alpha_5(VI), \alpha_6(VI)$	$[\alpha_1(VI)]_2, \alpha_2(VI)$; $\alpha_3(VI), \alpha_4(VI), \alpha_5(VI), \alpha_6(VI)$		Os, cartilage, peau, cornée
Collagène XXVI	$\alpha_1(XXVI)$	$[\alpha_1(XXVI)]_3$			
Collagène XXVIII	$\alpha_1(XXVIII)$	$[\alpha_1(XXVIII)]_3$			

Tableau 1. La superfamille des collagènes chez les vertébrés

Tableau de synthèse réalisé à partir des revues de Ricard-Blum, 2011 et Byron *et al.*, 2013

B - Caractéristiques structurales du collagène XV

1- Structure de la molécule et arrangement supramoléculaire

Le collagène de type XV est un homotrimère constitué de 3 chaînes α_1 de type XV (α_1 (XV)) codée par le gène *COL15A1* chez l'homme et *Coll5a1* chez la souris, gènes respectivement localisés dans les régions chromosomiques 9q21-q22 et 4B1-B3 (Huebner *et al.*, 1992 ; Hägg *et al.*, 1997b ; Eklund *et al.*, 2000). *COL15A1* est un gène de 145kb qui contient 42 exons codants pour une chaîne polypeptidique de 1363 aa (sans compter le peptide signal). La chaîne α_1 (XV) humaine est composée d'une région COL centrale comprenant 9 domaines COL (COL1 à COL9, les domaines des collagènes étant généralement numérotés à partir de l'extrémité C-terminale), interrompus par 8 domaines NC (NC2 à NC9) (Figure 2A ; Myers *et al.*, 1992 ; Kivirikko *et al.*, 1994). La chaîne α_1 (XV) murine composée de 1367 aa diffère légèrement de la chaîne humaine puisqu'elle ne contient que 7 domaines COL et 6 domaines NC mais conserve une grande similarité de séquence qui atteint 91% entre ces deux espèces (Hägg *et al.*, 1997b). Les domaines NC qui se situent au niveau des interruptions correspondent à de courtes séquences d'une vingtaine de résidus et sont considérées comme des régions linkers. La région centrale est flanquée de deux domaines NC, NC10 et NC1, qui sont respectivement présents aux extrémités N- et C-terminales de la molécule. Le domaine NC10 contient un domaine globulaire TSPN homologue au domaine situé à l'extrémité N-terminale de la thrombospondine-1, présent dans plusieurs autres collagènes (Ruggiero et Ricard-Blum, 2005). Le domaine NC1 contient le domaine restine (« related to endostatin ») qui peut être clivé par des protéases non identifiées, et diffuser alors librement dans la matrice extracellulaire. A l'instar de son homologue l'endostatine, connue pour ses propriétés inhibitrices de l'angiogénèse, la restine montre également des propriétés anti-angiogéniques mais bien moindres que l'endostatine (Ramchandran *et al.*, 1999). Le domaine NC1 contient également le domaine de trimérisation nécessaire à l'assemblage de la triple hélice qui est localisé entre COL1 et le domaine restine (Wirz *et al.*, 2011) (Figure 2A).

Les collagènes de type XV et XVIII se caractérisent également par la présence de résidus cystéines très conservés principalement localisés au niveau des domaines NC, et plus particulièrement au niveau de l'extrémité C-terminale. Toutefois, le collagène XV possède deux résidus cystéines supplémentaires localisés dans la région collagénique centrale. Ces deux cystéines sont impliquées dans la formation de ponts disulfures nécessaires à

l'assemblage supramoléculaire du collagène XV (Kivirikko *et al.*, 1994 ; Li *et al.*, 2000 ; Hurskainen *et al.*, 2010).

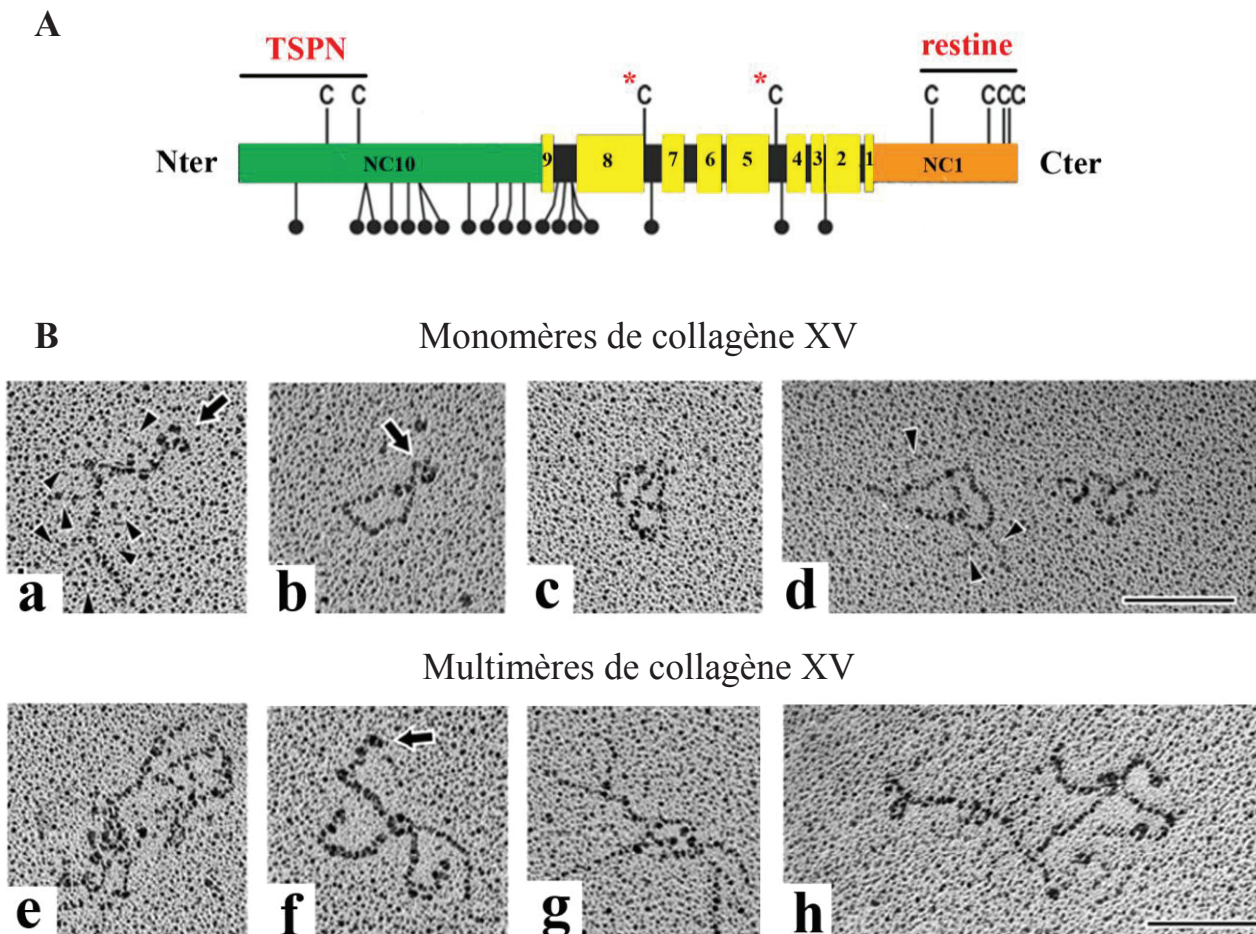


Figure 2. Le collagène XV est un homotrimère d'une chaîne $\alpha 1$ (XV)

A - Structure de la chaîne $\alpha 1$ (XV). Modifié de Myers *et al.*, 2007. La chaîne α_1 (XV) du collagène XV humain est composée d'une région collagénique centrale qui contient 9 domaines collagéniques (jaune) interrompus par des courts domaines non collagéniques (noir). Cette région centrale est flanquée de deux domaines non collagéniques aux extrémités N-terminale (NC10) et C-terminale (NC1) de la protéine. Le domaine NC10 contient un domaine homologue de l'extrémité N-terminale de la thrombospondine-1 (TSPN) et le domaine NC1 peut libérer le fragment restine. Les sites d'attachement potentiels de chaînes glycosaminoclycane de type chondroïtine et héparane sulfate sont représentées par les bâtonnets surmontés d'une boule. Les 2 cystéines (C) importantes pour l'assemblage supramoléculaire du collagène XV sont identifiées par une astérisque.

B - Arrangement moléculaire et supramoléculaire du collagène XV. Clichés d'ombrage tournant réalisés sur du collagène XV purifié, extrait de cordon ombilical humain (Myers *et al.*, 2007). Echelle : 100 nm. Les monomères de collagène XV adoptent la plupart du temps une configuration circulaire irrégulière (b, d molécule de droite) ou une configuration dite « en pretzel » (c, d molécule de gauche), bien qu'une configuration plus allongée soit de temps en temps observée (a). Les monomères peuvent s'associer pour former des multimères compacts (e) ou des multimères cruciformes (f, g, h). Les domaines globulaires TSPN (flèche) ainsi que les brins fins formés par les chaînes glycosaminoglycane (têtes de flèche) sont clairement visibles à la surface des monomères et des multimères.

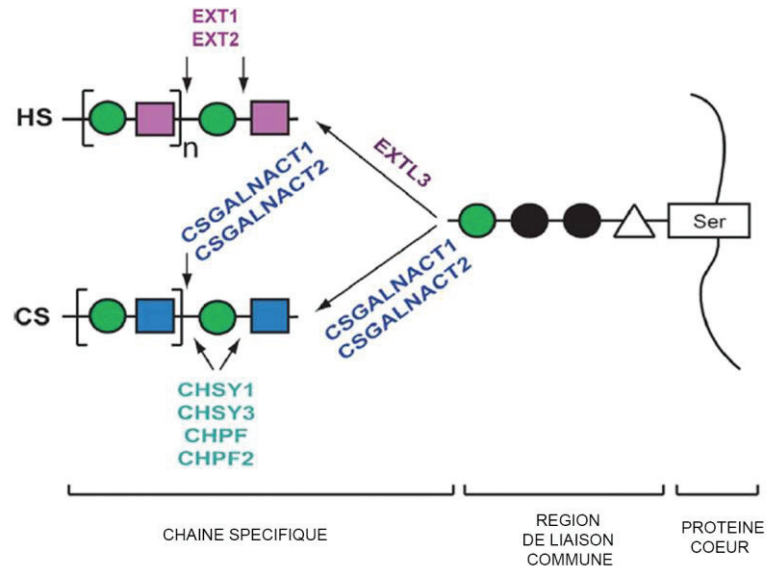
Des expériences d'ombrage tournant en microscopie électronique ont été réalisées sur le collagène XV humain extrait de cordon ombilical et sur des molécules de collagène XV recombinant afin de visualiser la structure de la molécule. Celles-ci ont montré que si la molécule peut parfois adopter une forme en bâtonnet caractéristique des domaines COL, cette molécule, particulièrement flexible en raison de la présence des nombreuses interruptions, présente la plupart du temps une forme circulaire irrégulière ou une forme de pretzel qui n'avait jamais été décrite pour d'autres collagènes (**Figure 2B**, Myers *et al.*, 2007 ; Hurskainen *et al.*, 2010). Ces expériences ont également révélé que les molécules de collagène XV s'associent pour former des multimères compacts, ou des assemblages « cruciformes » résultant d'associations plus simples entre 2 à 4 molécules. Il est intéressant de noter que les domaines TSPN émergent souvent des structures multimériques favorisant leur interaction avec des partenaires potentiels.

2- Un collagène avec des propriétés de protéoglycane à chaînes chondroïtine et héparane sulfate

Le collagène XV humain a la particularité d'être un collagène portant à sa surface des chaînes glycosaminoglycanes (GAGs) de type chondroïtine sulfate (CS) et héparane sulfate (HS) comme les protéoglycanes (Amenta *et al.*, 2005). Ces chaînes résultent de modifications postraductionnelles permettant l'ancrage sur la protéine cœur d'un long enchaînement de motifs sucrés particuliers. Ces chaînes sont greffées sur les résidus sérines de la protéine cœur par l'intermédiaire d'une liaison de type O-glycosidique (**Figure 3A**). Pour une protéine cœur donnée, la longueur, l'arrangement et la composition en sucres de ces chaînes peuvent varier d'une cellule à l'autre au sein d'un même tissu. Leur synthèse implique par ailleurs l'activité de nombreuses enzymes codées par plus de 40 gènes (Zhang, 2010). Présentes sur de nombreux autres protéoglycanes membranaires et matriciels, les chaînes CS et HS participent pleinement à la fonction de ces protéines et ont été impliquées dans la régulation de nombreux processus biologiques dont les plus documentés sont la croissance axonale et l'angiogenèse. Capables d'interagir avec de nombreux partenaires, elles contribuent à la modulation de voies de signalisation (telles que les voies des FGFs, Hedgehog, ou Wnt/ β -caténine) soit en tant que molécules de signalisation à proprement parler, soit en tant que co-récepteurs ou encore en tant que modulateurs de la disponibilité de facteurs solubles (Mikami et Kitagawa 2013 ; Sarrazin *et al.*, 2011). Par ailleurs, ces chaînes connues pour avoir un fort coefficient d'hydratation, peuvent aussi contribuer à la structuration des réseaux formés par les protéines

matricielles pouvant modifier à la fois les propriétés biomécaniques de la matrice en question ou la rendre plus ou moins poreuse aux molécules diffusibles.

A



B

	Muscle strié squelettique	Placenta	Colon	Rein	Poumon	Cordon ombilical
CS	+	+	+	+	+	+
HS	nd	+	+	+	nd	+

Figure 3. Le collagène XV est un protéoglycane à chaînes chondroïtine et héparane sulfate

A- Représentation schématique de la structure des chaînes chondroïtine (CS) et héparane sulfate (HS) avec les enzymes impliquées dans leur synthèse. Extrait de Filipek-Górniok *et al.*, 2013. Ser = sérine ; Gcla = acide glucuronique; GclNac = N acetylglucosamine ; GalNac = N acetylgalactosamine ; Gal = galactose ; Xyl = xylose.

B - Présence relative des chaînes CS et HS à la surface du collagène XV dans différents tissus humains adultes. + : présent, + : présent et majoritaire par rapport à l'autre type de chaîne, nd : non déterminé. Tableau de synthèse réalisé à partir des travaux de Li *et al.*, 2000, Amenta *et al.*, 2005, Myers *et al.*, 2007.

Des analyses *in silico* ont indiqué la présence de 18 sites putatifs d'attachement de glycosaminoglycans (dont 8 sites contenant la séquence consensus D/E-X_{1,2}-S-G/A) sur la chaîne α_1 (XV) humaine, localisés principalement en N-terminale (Figure 2A ; Li *et al.*, 2000 ; Myers *et al.*, 2007). Ce sont essentiellement des expériences de digestion par la chondroïtinase et/ou l'héparinase d'extraits protéiques de différents tissus humains qui ont démontré que le collagène XV porte toujours des motifs glycosylés *in vivo* et ce quelque soit le tissu étudié (Li *et al.*, 2000 ; Amenta *et al.*, 2005 ; Myers *et al.*, 2007 ; Figure 3B).

Principalement décrit comme protéoglycane à chondroïtine sulfate (CSPG), le collagène XV peut également porter une combinaison de chaînes CS et HS dont le ratio diffère d'un tissu à l'autre (on parle alors de protéoglycane hybride). La présence des chaînes CS et HS sur la chaîne $\alpha_1(\text{XV})$ augmentant la masse moléculaire de cette dernière, la protéine qui se retrouve sous la forme d'une bande clairement identifiée à 250 kDa après digestion à la chondroïtinase, migre initialement sous la forme d'une bande diffuse aux environs de 450 kDa. La masse moléculaire moyenne d'une chaîne de type CS étant théoriquement comprise entre 10 et 50 kDa, on a ainsi estimé que chaque chaîne $\alpha_1(\text{XV})$ humaine est décorée de 4 à 20 chaînes GAGs (Li *et al.*, 2000). Chez la souris, il n'existe pas de données indiquant que le collagène XV est effectivement un CSPG, bien que 4 séquences conformes aux sites consensus de fixation des GAGs soient présentes dans la chaîne $\alpha_1(\text{XV})$ murine.

Par ailleurs, l'analyse du collagène XV humain en microscopie électronique après ombrage tournant a confirmé la présence de GAGs et a montré qu'ils sont exposés à la surface du collagène XV aussi bien sous sa forme monomérique que sous ses formes multimériques (**Figure 2B** ; Myers *et al.*, 2007). La forte concentration de ces GAGs ainsi que leur relative accessibilité à la surface des multimères suggère une contribution non négligeable de ces groupements à la fonction du collagène XV *in vivo*.

Ces propriétés de protéoglycane sont également communes au collagène XV et au collagène XVIII. Toutefois, il faut retenir que le collagène XVIII est décrit exclusivement comme un protéoglycane à héparane sulfate (HSPG) ne portant pas de chaînes CS (Halfter *et al.*, 1998) alors que le collagène XV est plutôt majoritairement un CSPG ou un hybride CS/HSPG. Cette différence peut avoir des conséquences majeures dans la fonction de ces deux collagènes étant donné les actions biologiques parfois opposées de ces deux types de chaînes. Par ailleurs, il est intéressant de signaler que les propriétés de protéoglycanes des multiplexines semblent conservées au cours de l'évolution. En effet, des sites consensus d'attachement de GAGs ont été retrouvés dans la séquence de Dmp (également nommée Mp) chez la drosophile et des études biochimiques ont démontré qu'au sein des tissus embryonnaires Dmp/Mp portait uniquement des groupements CS s'apparentant ainsi d'avantage au collagène XV qu'au collagène XVIII sur ce point (Momota *et al.*, 2011).

C- Distribution tissulaire du collagène XV

De nombreuses études se sont attachées à décrire l'expression du collagène XV dans des tissus humains et murins au cours de développement et chez l'adulte analysant tantôt l'expression du collagène XV à l'échelle des transcrits, tantôt à l'échelle de la protéine. Une synthèse de l'ensemble de ces travaux vous est présentée dans les **tableaux 2 et 3** répertoriant l'essentiel des données obtenues (Muragaki *et al.*, 1994 ; Kivirikko *et al.*, 1995 ; Myers *et al.*, 1996 ; Hagg *et al.*, 1997a ; Muona *et al.*, 2002 ; Tomono *et al.*, 2002 ; Amenta *et al.*, 2003 ; Ylikärppä *et al.*, 2003 ; Saika *et al.*, 2004 ; Lisignoli *et al.*, 2009).

1- Un collagène associé aux lames basales

D'une manière générale, il ressort de ces études que le collagène XV possède une très large distribution tissulaire. En effet, il est exprimé dans la quasi totalité des organes étudiés à l'exception du foie. Ce patron d'expression large semble assez bien conservé entre l'homme et la souris bien que certaines données partielles ne permettent pas d'établir des comparaisons pour tous les organes. On peut néanmoins retenir que le collagène XV est majoritairement exprimé au niveau des structures vasculaires (capillaires et/ou vaisseaux sanguins de tous les organes), dans le muscle cardiaque et strié squelettique, aussi bien pendant le développement qu'à l'âge adulte, suggérant un rôle prépondérant du collagène XV dans la mise en place et le maintien de ces structures.

Dans tous les tissus analysés, on a pu constater que le collagène XV est produit par un grand nombre de types cellulaires. Ainsi, les cellules épithéliales, endothéliales, musculaires (lisses, strié squelettiques et strié cardiaques), les cellules d'origine nerveuse mais aussi les cellules du tissu conjonctif comme les fibroblastes, les ostéoblastes et les adipocytes sont capables de produire le collagène XV.

Il est important de noter que le collagène XV est toujours localisé au niveau des lames basales sans pour autant en être un constituant à proprement parler. Ainsi dans la littérature, le collagène XV est communément décrit comme un « basement membrane zone (BMZ) collagen ».

Humain		Souris
ARNm COL15A1	Collagène XV	Collagène XV
Système vasculaire		
Cellules endothéliales (artères, capillaires des organes suivants : rein, poumon, pancréas) ; Cellules musculaires lisses (artères)	BMZ des capillaires (glomérules primitifs rénaux, zones mésangiales et paramésangiales des glomérules plus matures, capillaires intersticiels rénaux, poumon, pancréas) ; BMZ de l'artère glomérulaire afférente rénale	BMZ des capillaires dans les organes suivants : cerveau antérieur , cerveau moyen, cerveau postérieur, moelle épinière, plexus choroïde , méninges , ganglions de racine dorsale , ganglions tête , nerfs périphériques , cœur , poumon, glandes salivaires, pulpe rouge de la rate , thyroïde , thymus, intestin, muscle squelettiques , pancréas exocrine , tubules et glomérules rénaux , testicules
Muscle strié cardiaque		
Cellules musculaires ; Fibroblastes	BMZ autour des cardiomyocytes	BMZ autour des cardiomyocytes
Muscle strié squelettique		
Cellules musculaires ; Fibroblastes		BMZ autour des myotubes
Muscle lisse		
Cellules musculaires ; Fibroblastes		
Système Nerveux central		
Cerveau (NB)		
Système nerveux périphérique		
		Capsule entourant le ganglion de la racine dorsale, Centre du ganglion de la racine dorsale, le long des fibres nerveuses qui partent du ganglion de la racine dorsale
Poumon		
Cellules épithéliales alvéolaires	Tissu fibreux autour des bronchioles	Tissu fibreux autour des bronchioles
Rein		
Cellules épithéliales des tubes collecteurs ; Structures glomérulaires primitives ; Blastème métanéphrique	BMZ tubules renaux	Progéniteurs de la capsule de Bowman
Pancréas		
Cellules épithéliales des acini pancréatiques	BMZ acini pancréatiques ; Faibles signaux dans le stroma fibreux	
Peau		
Fibroblastes		
Œil		
		Cellules de l'épithélium cornéen ; Fibroblastes cornéens ; Epithélium conjonctival ; Stroma cornéen
Os		
Fibroblastes périchondraux		Cartilage de Meckel ; Perichondrium et cartilage périphérique des os long et courts
Références		
Kivirikko <i>et al.</i> , 1995 ; Muragaki <i>et al.</i> , 1994	Hagg <i>et al.</i> , 1997 a	Muona <i>et al.</i> , 2002 ; Saika <i>et al.</i> , 2004

Tableau 2. Expression du collagène XV au cours du développement des mammifères

Notez que l'expression de *Coll15a1* à l'échelle des transcrits chez la souris n'est pas reportée ici en raison de l'absence de donnée à ce sujet dans la littérature. NB = Northern blot. BMZ= Basement membrane zone.

	Humain	Souris
ARNm <i>COL15A1</i>	Collagène XV	Collagène XV
Système vasculaire		
Cellules endothéliales et péricytes de l'artère spiralée ; Cellules endothéliales des capillaires (placenta , muscle strié squelettique , derme)	BMZ des capillaires (muqueuse du petit intestin , derme papillaire , placenta , tubules rénaux , muscle strié squelettique , muscle strié cardiaque , muscle lisse , capillaires intersticiels rénaux) ; BMZ des artères et des veines du derme, de l'artère placentaire, de l'artère glomérulaire afférente rénale ; BMZ vaisseaux sanguin du sein	BMZ des capillaires (méninges, nerfs périphériques , cœur , intestin , muscle squelettiques , pancreas exocrine , tubules et glomérules rénaux , testicules) ; BMZ vaisseaux sanguins intertubulaires
Muscle strié cardiaque		
	BMZ entourant les cardiomyocytes	BMZ entourant les cardiomyocytes
Muscle strié squelettique		
Positif (NB)	BMZ entourant les fibres musculaires ; Léger signal dans le stroma endomysial	BMZ entourant les fibres musculaires
Muscle lisse		
	BMZ de la musculature muqueuse et de la lamina propria du petit intestin, du muscle lisse entourant les veines et veinules, du muscle lisse arrecteur du poil (derme)	
Système Nerveux central		
Cerveau négatif (NB)		
Système nerveux périphérique		
		BMZ de l'endonèvre et du périnèvre (nerf périphérique intramusculaire) ; BMZ cellule de Schwann
Rein		
Positif (NB)	BMZ de la Capsule de Bowman (face externe uniquement), des tubules rénaux et BMZ interstitielle ; Leger marquage dans les zones mésangiales	BMZ des tubules dans la région corticale médullaire, des glomérules ; Capsule de Bowman
Pancréas		
Positif (NB)		
Petit intestin et colon		
Positifs (NB)	BMZ des cryptes intestinales, des villi intestinaux, des cryptes du colon, de l'épithélium bordant la lumière du colon	
Peau		
Fibroblastes ; Cellules endothéliales	BMZ des adipocytes, de la paroi des nerfs , BMZ à l'interface entre le derme et l'épiderme , BMZ et tissus fibreux autour des follicules pileux , Léger signal dans le derme papillaire	
Sein		
	BMZ des adipocytes, des cellules musculaires, des structures nerveuses, des épithélium lobulaires et ductaux. ; Faibles dépôts dans le stroma intralobulaire	
Os		
Ostéoblastes		
Œil		
		Dans les cellules épithéliales basales et suprabasales de la cornée mais pas dans la BMZ subépithéliale.
Placenta		
Fibroblastes dans le stroma vilieux ; trophoblastes des colonnes trophoblastiques ; Cellules stromales de l'endometre , Cellules déciduales de la membrane déciduale	BMZ de l'épithélium vilieux et des cytotrophoblastes ; Stroma fibrovasculaire des villi fibreux et immatures	
Cordon ombilical		
Fibroblastes		
Références		
Kivirikko <i>et al.</i> , 1995 ; Lisignoli <i>et al.</i> , 2009	Myers <i>et al.</i> , 1996 ; Tomono <i>et al.</i> , 2002 ; Amenta <i>et al.</i> , 2003	Muona <i>et al.</i> , 2002 ; Ylikärppä <i>et al.</i> , 2003 ; Saika <i>et al.</i> , 2004

Tableau 3. Expression du collagène XV chez les mammifères au stade adulte

Notez que l'expression de *Coll15a1* à l'échelle des transcrits chez la souris n'est pas reportée ici en raison de l'absence de donnée à ce sujet dans la littérature à l'exception de certains organes (muscle strié cardiaque et strié squelettique, rein) positifs en Northern blot (Hagg *et al.*, 1997a). NB = Northern blot. BMZ= Basement membrane zone.

Des immunomarquages à l'or réalisés sur des coupes de rein, de colon, et de placenta humain ont montré que le collagène XV est presque exclusivement associé aux fibres de collagènes présentes dans le tissu de soutien en étroite proximité avec la lame basale sous-jacente (**Figure 4** ; Amenta *et al.*, 2005). Les particules d'or décorent majoritairement des structures formant des ponts entre les fibres de collagènes. Toutefois, les particules d'or sont également observées en étroite association avec la partie la plus externe de la lame basale. Ces données suggèrent que le collagène XV peut servir de lien structural entre les cellules qui le produisent et le tissu conjonctif sous-jacent. Les auteurs proposent également que, de part la présence de chaînes CS et HS sur la molécule, le collagène XV contribuerait au maintien d'un réseau poreux sous la lame basale essentiel dans la diffusion de molécules extracellulaires de signalisation.

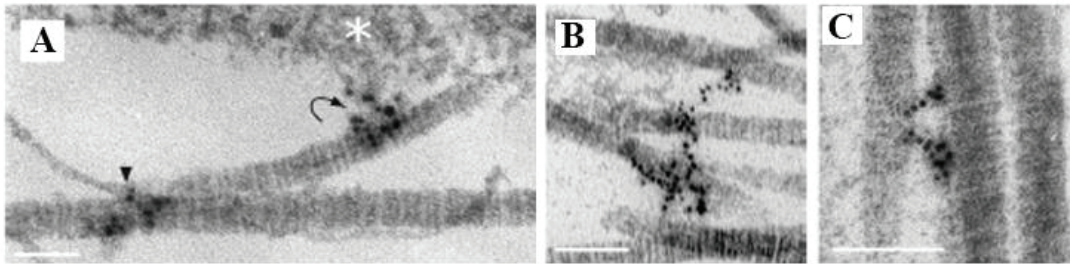


Figure 4. Le collagène XV est associé aux fibres de collagène à proximité de la lame basale, dans la région BMZ.

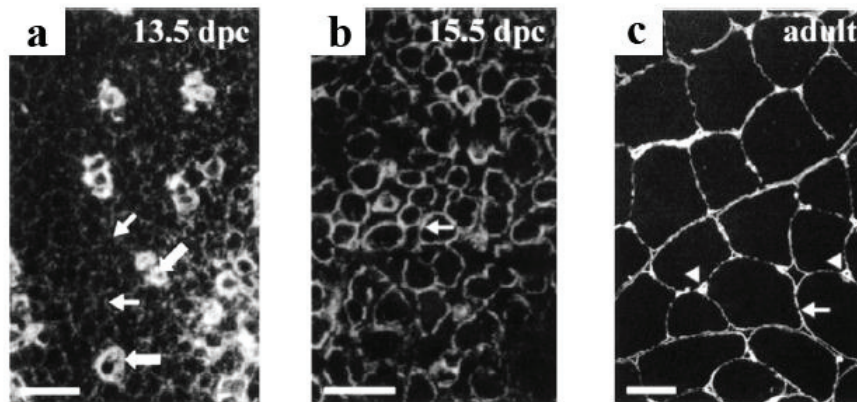
A-C Clichés de microscopie électronique sur des coupes de rein humain après immunomarquage à l'or du collagène XV. Echelles = 100 nm. Extrait de Amenta *et al.*, 2005.

Sur les 3 clichés, les particules d'or forment des ponts entre 2 ou plusieurs fibres de collagènes. Certaines particules d'or (A, flèche incurvée) forment un groupe entre une fibre de collagène et la partie la plus externe de la lame basale (A, étoile).

2 - Localisation du collagène XV dans le système neuro-musculaire

Dans le muscle strié squelettique, les collagènes XV murin et humain sont présents dans la BMZ entourant chaque fibre musculaire (Muona *et al.*, 2002 ; Tomono *et al.*, 2002). Chez la souris, ce dépôt débute pendant la formation des myotubes chez l'embryon et augmente progressivement au cours du développement. Le signal persiste dans la BMZ entourant les myofibres adultes (**Figure 5a-c**, Muona *et al.*, 2002). Les données d'expression de *COL15A1* par hybridation *in situ* indiquent que le collagène XV est produit par les myocytes mononucléés, les fibres musculaires plurinucléées et les fibroblastes (Kivirikko *et al.*, 1995).

Muscle



Structures nerveuses périphériques

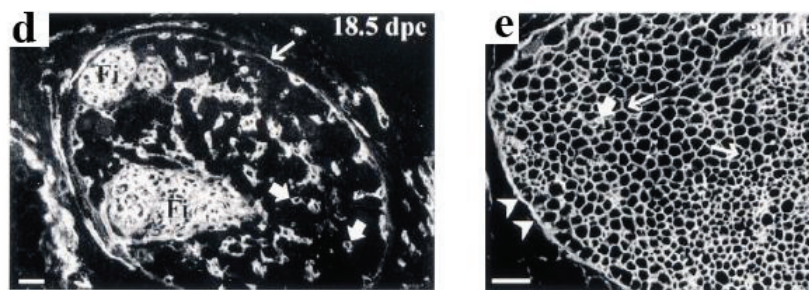


Figure 5. Le collagène XV murin est déposé dans les BMZ du système neuromusculaire

a-c Immunomarquages du collagène XV sur des coupes de muscle strié squelettique foetal (a,b) et adulte (c). Echelles = 10 μm pour a et b et 25 μm pour c. Les myotubes primaires nouvellement formés arborent un faible marquage du collagène XV dans la lame basale à 13.5 jours post-coïtum (jpc) (a, flèches fines) alors que les vaisseaux sanguins sont déjà fortement marqués (a, flèches épaisses). A 15.5 jpc chaque myotube est entouré d'une lame basale continue qui est positive pour le collagène XV (b, flèche fine). Dans le muscle adulte, le collagène XV est localisé dans la BMZ entourant chaque myofibre (c, flèche fine) et entourant les capillaires (c, têtes de flèche).

d-e Immunomarquages du collagène XV sur des coupes de ganglion foetal (d) et de nerf périphériques adulte (e) Echelles = 10 μm . d- A 18.5 jpc un marquage du collagène XV est visible dans la capsule entourant le ganglion (flèche fine), les capillaires (flèches épaisses), et au niveau des fibres nerveuses (Fi). e - Au sein du nerf périphérique mature, le collagène XV est localisé au niveau des BMZ de l'endonèvre (flèches fines) et du périnèvre (têtes de flèches).

Extraits de Muona *et al.*, 2002

Il est intéressant de noter qu'il existe des régions de chevauchement entre les patrons d'expression des collagènes XV et XVIII indiquant une possible redondance ou compensation fonctionnelle entre les deux molécules dans certains tissus. Toutefois l'expression dans le

muscle semble spécifique du collagène XV. En effet, le collagène XVIII est plutôt décrit comme un collagène associé au BM des épithélia et endothélia, n'est retrouvé dans aucun tissu musculaire qu'il soit strié cardiaque, squelettique ou lisse (Tomono *et al.*, 2002).

Chez la souris, le collagène XV est présent dans les structures nerveuses périphériques (Figure 5 d-e ; Muona *et al.*, 2002). Il est retrouvé dans les tissus conjonctifs entourant les ganglions au cours du développement et entourant les nerfs périphériques intramusculaires adultes (endonèvre et périnèvre). La localisation concomitante du collagène XV au niveau de la lame basale du muscle et du nerf laisse penser que le collagène XV peut être présent à l'interface du muscle et du nerf moteur, au niveau de la jonction neuromusculaire. Des marquages révélant le collagène XV et les récepteurs à acétylcholine, marqueurs de la jonction neuromusculaire, ont toutefois permis de montrer que le collagène XV est absent de la BMZ synaptique et plutôt confiné aux BMZ extrasynaptiques et à celles entourant les cellules de Schwann.

Il est intéressant de noter que la large distribution tissulaire du collagène XV au niveau des lames basales est conservée pour les orthologues Dmp/Mp (Momota *et al.*, 2011) et Cle - 1, (Ackley *et al.*, 2001). Néanmoins, chez les deux modèles d'invertébrés, la multiplexine apparaît majoritairement présente dans le système nerveux.

D- Quelles fonctions pour le collagène XV ?

Il n'existe pas à l'heure actuelle de pathologie humaine associée à des mutations dans le gène *COL15A1* et peu d'études fonctionnelles ont été réalisées. Le collagène XV a cependant été étudié à la fois pour ses propriétés anti-angiogéniques et anti-tumorales et pour son rôle dans les structures où il est majoritairement exprimé : le système cardio-vasculaire, le muscle strié squelettique et le système nerveux périphérique.

1- Des propriétés anti-angiogéniques et anti-tumorales

En raison de la similarité de structure du domaine restine du collagène XV avec le domaine endostatine du collagène XVIII, les premières études fonctionnelles concernant le collagène XV se sont principalement focalisées sur l'analyse des propriétés anti-angiogéniques et anti-tumorales du domaine restine (Ramchandran *et al.*, 1999 ; Sasaki *et al.*, 2000). Ces études ont montré que la restine humaine produite de manière recombinante inhibe *in vitro* spécifiquement la migration des cellules endothéliales et la formation de vaisseaux

sanguins induite par le VEGF. Par ailleurs, la restine humaine administrée de manière systémique inhibe la croissance tumorale dans un contexte *in vivo*, en réalisant des xenogreffes d'une lignée de cellules de carcinome rénal humain chez la souris.

Si les travaux précédents tendaient à associer les propriétés anti-tumorales du collagène XV au domaine restine, plusieurs travaux témoignent également aujourd'hui d'un effet direct de la molécule entière sur les cellules tumorales. Le collagène XV serait un suppresseur de tumeur au sein même de la BMZ qui est la première structure remodelée au cours de « l'extravasation » tumorale. En effet, dans plusieurs cas de mélanomes et carcinomes mammaires et colorectaux, le collagène XV n'est plus présent dans la BMZ de l'épithélium malin. Cette absence qui apparaît précocément dans le processus tumoral, marque les premières étapes d'invasion des cellules tumorales dans les tissus sous-jacents en traversant la lame basale. Le collagène XV constituerait une barrière protectrice à l'échappement tumoral (Amenta *et al.*, 2003 ; Amenta *et al.*, 2000). Hurskainen *et al.*, (2010) ont par ailleurs montré que le collagène XV humain recombinant inhibe l'adhésion et la migration de cellules issues de fibrosarcomes lorsque celles-ci sont déposées sur une matrice de fibronectine. Egalement, lorsque l'on fait exprimer le collagène XV dans une lignée cellulaire de carcinome du col de l'utérus, l'adhésion de ces cellules tumorales au collagène de type I est augmentée et leur tumorigénicité *in vivo* est diminuée. Les auteurs ont par ailleurs démontré que ces deux effets étaient indépendants de la présence du domaine restine (Mutolo *et al.*, 2012). Le mécanisme d'action anti-tumoral du collagène XV a été plus amplement étudié dans un modèle cellulaire de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) d'adénocarcinome pancréatique (Clementz *et al.*, 2013). Les auteurs ont montré que le collagène XV surexprimé dans ces cellules interagit avec les E-cadhérines et inhibe leur relocalisation, événement indispensable au processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Le collagène XV interagit aussi avec le récepteur DDR1 et inhibe la voie de signalisation induite par ce récepteur qui est généralement associée à la prolifération et à la migration cellulaire. Enfin, le collagène XV peut également moduler la voie de signalisation de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ qui pourrait être responsable de la diminution de l'expression de la N-cadhérine (essentielle à la migration cellulaire) observée par les auteurs. L'ensemble de ces données a permis d'établir un modèle montrant le mode d'action moléculaire du collagène XV en tant que suppresseur de tumeur (Figure 6, Clementz *et Harris*, 2013).

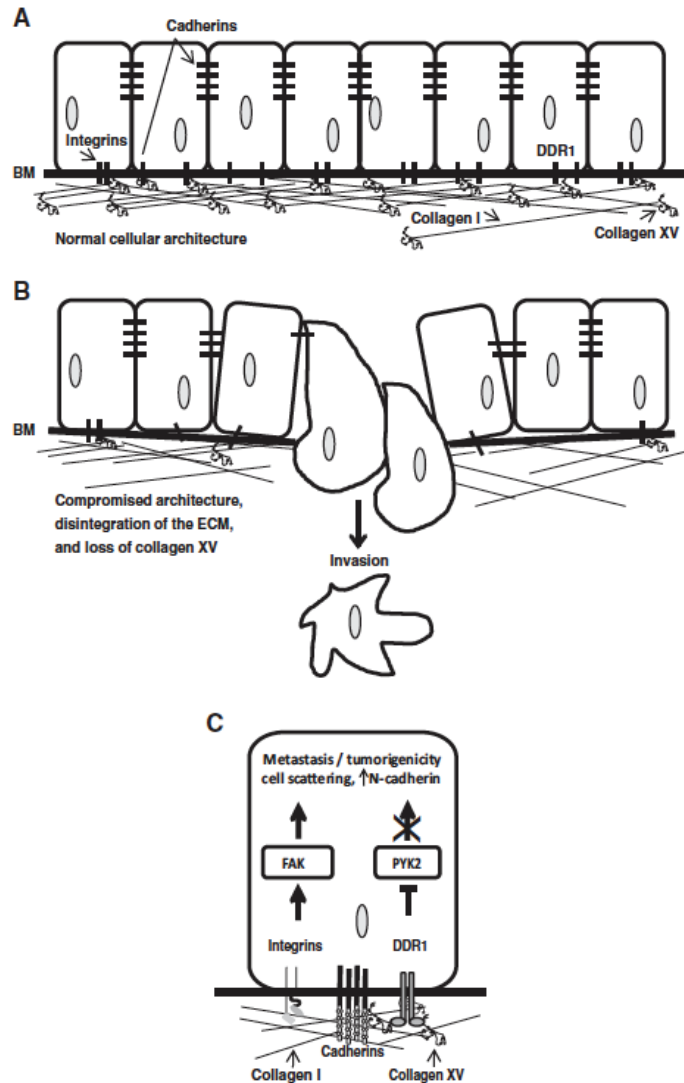


Figure 6. Modèle illustrant la fonction anti-tumorale du collagène XV dans les épithélia.

A - Schéma représentant l'architecture normale d'un épithélium polarisé. BM = lame basale. **B**- L'absence de collagène XV déstabilise l'organisation de la matrice extracellulaire sous l'épithélium ce qui compromet la polarité des cellules et favorise la transition épithélio-mésenchymateuse et l'invasion des cellules tumorales dans les tissus voisins. **C**- Schéma illustrant les interactions du collagène XV avec le collagène I, la E-cadhérine, DDR1 et des voies de signalisation qui en découlent dans un contexte tumoral. Extrait de Clementz et Harris, 2013.

2- Fonctions physiologiques du collagène XV

Les données obtenues concernant le rôle physiologique du collagène XV *in vivo* proviennent essentiellement de l'étude de souris invalidées pour le gène *Coll15a1* (*Coll15a1*^{-/-}) qui ont été générées par le laboratoire de Taina Pihlajaniemi (Eklund *et al.*, 2001). Les souris *Coll15a1*^{-/-} se développent et se reproduisent normalement. Elles ont une durée de vie similaire à celle des souris sauvages de la même portée et ne présentent pas de phénotype apparent en

l'absence d'analyses approfondies. L'analyse de l'expression du collagène XVIII chez ces souris a par ailleurs permis d'exclure un processus de compensation fonctionnelle qui aurait pu être à l'origine de l'absence de phénotype. L'étude des souris doublement invalidées pour *Coll5a1* et *Coll8a1* a par ailleurs confirmé l'absence de compensation fonctionnelle majeure entre les deux collagènes (Ylikärppä *et al.*, 2003).

a- Rôle de du collagène XV dans le système cardio-vasculaire

Les analyses approfondies du système cardiovasculaire (tissu où le collagène XV est fortement exprimé) chez les souris *Coll5a1*^{-/-} effectuées par Eklund *et al.* (2001) puis complétées plus tard par Rasi *et al.* (2010b) indiquent que ces souris présentent une cardiomyopathie légère, mais complexe, dont les caractéristiques histopathologiques et physiopathologiques varient avec l'âge. Par ailleurs, dans une situation de stress cardiaque telle que l'exercice, les souris mutantes sont également prédisposées à développer une dégénérescence du tissu cardiaque.

De manière générale, on peut retenir que la cardiomyopathie développée par les souris *Coll5a1*^{-/-} se caractérise par deux types d'altérations majeures :

- des défauts de structure des capillaires cardiaques (diminution du diamètre et présence de zone de rupture) associés au niveau cellulaire à des anomalies morphologiques (gonflement / repliement) ou à une dégénérescence des cellules endothéliales. Ces altérations ont des conséquences hémodynamiques (extravasation des globules rouges, diminution du flux sanguin dans les micro-vaisseaux) à l'origine de défauts de perfusion localisés. Il en résulte des dommages ischémiques des cardiomyocytes comme la formation d'oedèmes intracellulaires.

- des altérations structurales du myocarde caractérisées par une accumulation d'agrégats protéiques et une désorganisation des fibres de collagène dans la matrice interstitielle située entre les cardiomyocytes, conduisant à une diminution de l'élasticité du tissu cardiaque. La forme et l'organisation des cardiomyocytes sont aussi anormales avec notamment une fragmentation des stries scalariformes, jonctions intercellulaires élaborées spécifiques à ce tissu.

Le collagène XV jouerait ainsi un rôle dans le maintien de l'intégrité de la lame basale entourant les cellules endothéliales des capillaires cardiaques et de la matrice extracellulaire présente dans le myocarde.

Il est intéressant de préciser ici qu'un rôle dans la morphogénèse cardiaque a été récemment attribué à la multiplexine Dmp/Mp chez la drosophile suggérant une conservation fonctionnelle des multiplexines dans le système cardiovasculaire au cours de l'évolution (Harpaz *et al.*, 2013). Mais, contrairement à ce qui a été proposé pour le collagène XV chez la souris, Dmp/Mp ne semble pas jouer un rôle structural dans le maintien de l'intégrité de la matrice extracellulaire mais plutôt un rôle signalétique impliquant le couple Slit/Robo lors de la formation du tube cardiaque.

b- Rôle du collagène XV dans le muscle strié squelettique

En parallèle des défauts cardio-vasculaires précédemment décrits, les souris *Coll5a1^{-/-}* développent une myopathie légère (Eklund *et al.*, 2001).

Cette myopathie se caractérise d'un point de vue histologique par une tendance à l'atrophie musculaire, une dégénérescence des fibres musculaires avec infiltration de macrophages, et la présence de fibres musculaires à noyau central signe d'un processus de régénération (**Figure 7A-E**). Ces altérations qui touchent 2/3 des souris mutantes, surviennent dès l'âge de 3 mois après la naissance et s'intensifient avec l'âge. Les souris se déplacent normalement. Toutefois, les dommages musculaires sont considérablement augmentés quand les souris sont soumises à un exercice intense indiquant un rôle structural du collagène XV. En l'absence du collagène XV, l'attachement des fibres musculaires à la matrice environnante pourrait être fragilisé et être la cause de la dégénérescence musculaire observée chez les souris mutantes. Cependant, des immunomarquages de divers composants de la lame basale ont montré que l'absence du collagène XV ne perturbe pas l'organisation et la structure de la lame basale des fibres musculaires. Plus étonnant encore, cette dernière demeure intacte autour des fibres en dégénérescence, indiquant que la zone de fragilité des fibres musculaires se situerait plutôt entre la lame basale et le tissu conjonctif.

Un rôle du collagène XV dans l'ancrage des fibres musculaires au tissu conjonctif environnant est proposé mais reste à démontrer. Le cas échéant, le collagène XV permettrait d'assurer un continuum structural entre la lame basale et les fibres de collagènes du tissu conjonctif selon le modèle présenté en **Figure 7F**.

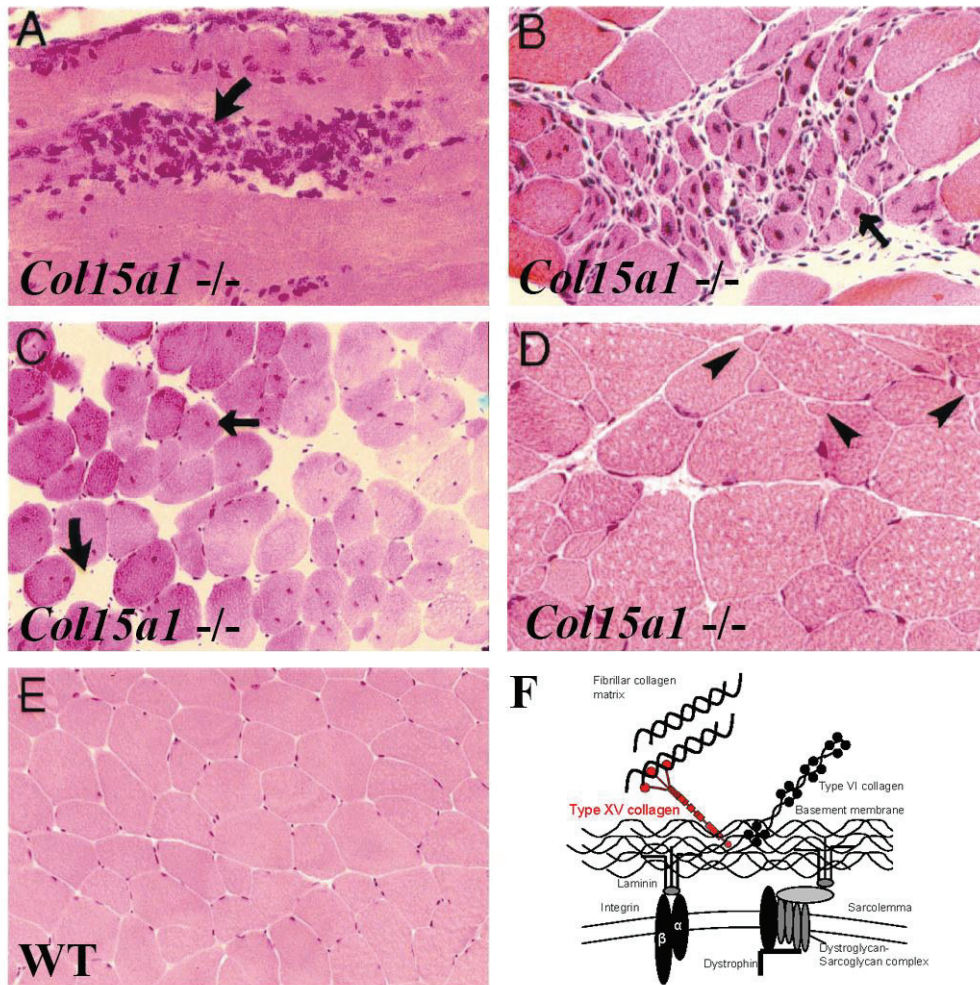


Figure 7. Un rôle pour le collagène XV dans le système neuromusculaire

A-E L'absence du collagène XV chez les souris *Col15a1*^{-/-} se traduit par une myopathie légère. Coupes histologiques colorées à l'hématoxiline éosine de différents muscles striés squelettiques (A gastrocnemius, B triceps brachii, C muscle paraspinal, D quadriceps) issus de souris *Col15a1*^{-/-} ou sauvages (E) âgées de 6 mois. Comparés aux souris sauvages, les muscles des souris *Col15a1*^{-/-} présentent une grande variabilité de la taille des fibres musculaires avec notamment la présence de fibres atrophiées (D, tête de flèches). On peut également observer des fibres musculaires à noyau anormalement central (C, flèche fine), des zones de dégénérescence des fibres musculaires (A et C, flèches courbes) avec infiltration de macrophages (A) ainsi que des zones de régénérescence (B, flèche fine). Extraits de Eklund *et al.*, 2001.

F - Schéma hypothétique positionnant le collagène XV dans le réseau moléculaire d'ancrage de la cellule musculaire au tissu conjonctif.

Modifié d'après J. Piuhola, Université de Oulu, 2002.

D'autre part, les capillaires irriguant les muscles striés squelettiques des souris *Coll5a1^{-/-}* présentent des défauts similaires à ceux qui ont été observés au niveau des capillaires cardiaques (Eklund *et al.*, 2001). Ces altérations ont des conséquences sur la perméabilité vasculaire et sur la microcirculation sanguine dans le muscle strié squelettique (Rygh *et al.*, 2014). Par conséquent, la myopathie légère observée chez les souris *Coll5a1^{-/-}* pourrait en partie être liée à un défaut de perfusion du muscle strié squelettique.

Comme pour le muscle cardiaque, les études chez la drosophile ouvrent encore des perspectives intéressantes quant à une contribution du collagène XV dans la régulation de voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie du muscle squelettique. En effet, si l'absence de Dmp/Mp engendre une myopathie comme il a pu être observé chez les souris *Coll5a1^{-/-}*, il apparaît que la cause est différente. Cette myopathie serait la conséquence d'une dégénérescence mitochondriale causée par une diminution d'activation de la voie de signalisation de l'intégrine β PS (orthologue de l'intégrine β chez les vertébrés) et à une augmentation de la production de radicaux libres dans les fibres musculaires (Momota *et al.*, 2013). Toutefois, il n'est pas à exclure que ces perturbations intracellulaires ne relèvent pas d'un rôle signalétique de Dmp/Mp mais s'apparentent plutôt à des conséquences indirectes d'un défaut d'ancrage des fibres musculaires au tissu conjonctif environnant.

c- Rôle du collagène XV dans le système nerveux périphérique

En raison de la forte présence du collagène XV dans les BMZ du système nerveux périphérique chez la souris, la structure et la physiologie des nerfs périphériques des souris *Coll5a1^{-/-}* ont également été analysées. Cette étude, publiée par Rasi *et al.* (2010a), montre principalement que l'absence du collagène XV altère la maturation des nerfs périphériques en affectant essentiellement le processus de myélinisation (**Figure 8**). Les auteurs ont pris pour modèle d'étude le nerf sensorimoteur sciatique qui comprend:

- des fibres nerveuses non myélinisées dites fibres C (sensitives et autonomes) qui regroupent un ensemble d'axones entourés par une cellule de Schwann.

- des fibres myélinisées qui sont formées initialement par des groupes d'axones délimités par quelques cellules de Schwann et une lame basale en périphérie. Puis par un processus de « radial sorting » les cellules de Schwann séparent les axones en étendant des prolongements au cœur du groupe d'axones, de manière à ce que chaque cellule de Schwann n'entoure et ne myélinise qu'un seul axone.

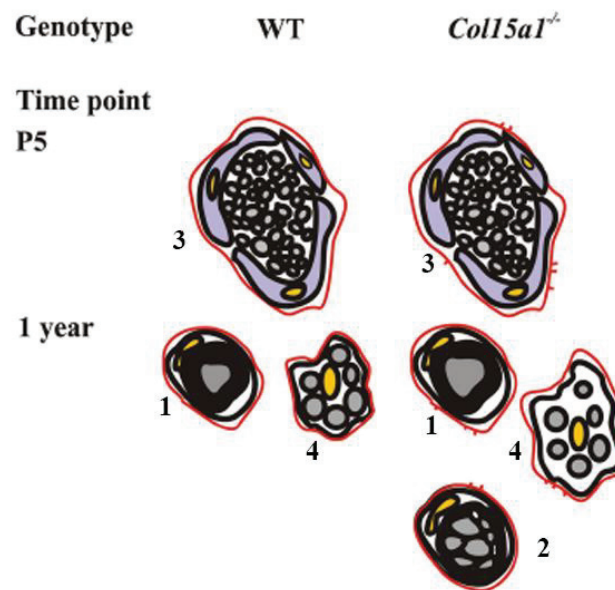


Figure 8. Schéma illustrant les défauts de myélinisation observés sur des nerfs sciatiques des souris *Col15a1*^{-/-}

Au stade de développement P5, le processus de myélinisation est initié dans les souris sauvages et les souris *Col15a1*^{-/-}. Les nerfs de toutes les souris sont formés de paquets d'axones non séparés (3). Des défauts de la lame basale (en rouge) sont déjà observés à ce stade. A 12 mois, les nerfs des souris sauvages contiennent des axones myélinisés (1) et des Fibres C (4). Les nerfs des souris *Col15a1*^{-/-} contiennent des axones normalement myélinisés, des axones poly-myélinisés (2) et des fibres C désorganisées. Extraits de Rasi *et al.*, 2010a.

L'absence de collagène XV se traduit par une présence anormale de myélinisation polyaxonale ainsi que par la présence d'axones moins bien compactés dans les fibres C. Une diminution de l'épaisseur de la gaine de myéline et de rares protrusions au niveau de la lame basale entourant l'ensemble des structures ont également été observées. D'un point de vue physiologique, ces défauts de myélinisation se traduisent essentiellement par une diminution de la vitesse de conduction de l'influx nerveux au niveau des nerfs sensitifs mais ne semblent pas modifier la conductivité des nerfs moteurs.

Les auteurs ont par ailleurs montré que des souris doublement invalidées pour les gènes *Col15a1* et *Lama4* (qui code pour la chaîne $\alpha 4$ des laminines) présentent des défauts de myélinisation plus sévères que ceux observés chez les souris simplement invalidées pour ces gènes. Cet effet cumulatif dû à l'absence combinée de la laminine $\alpha 4$ et du collagène XV suggère une interaction fonctionnelle du collagène XV avec la laminine $\alpha 4$. Toutefois, une interaction physique entre les deux protéines produites de manière recombinante n'a pas pu être démontrée par des tests d'interaction en phase solide (ELISA).

Par ailleurs, le mécanisme moléculaire par lequel le collagène XV contribuerait à cette myélinisation n'est pas encore élucidé. La lame basale est impliquée dans les changements de forme des cellules essentiels au « radial sorting » des cellules de Schwann (Fernandez Valle *et al.*, 1997). Les auteurs proposent que le collagène XV aurait un rôle structural dans le maintien de l'intégrité entre la lame basale et la matrice fibrillaire, procurant à la cellule de Schwann un support physique pour permettre l'organisation des fibres C et la ségrégation des axones.

Il est également intéressant de signaler qu'un rôle dans la formation du système nerveux périphérique a aussi été montré pour les deux multiplexines Dmp/Mp (Meyer and Moussian, 2009) et Cle-1 (Ackley *et al.*, 2001) impliquant principalement ces deux protéines dans le guidage axonal.

II - Le poisson zèbre comme modèle d'étude du développement neuro-musculaire

A-Généralités

Le poisson de l'espèce *Danio rerio* plus communément appelé poisson zèbre est un poisson tropical téléostéen de la famille des cyprinidés originaire d'Asie du Sud, et plus particulièrement d'Inde et du Bangladesh. (Spence *et al.*, 2008). Les eaux stagnantes, les rizières, ou les petits courts d'eau de lent débit et d'une température de 21°C, constituent son habitat naturel idéal. Ce poisson très prisé des aquariophiles débutants pour sa facilité d'élevage, présente de nombreux avantages pour son utilisation en tant que modèle vertébré de laboratoire. Sa taille relativement petite (4 à 5 cm à l'âge adulte) permet le maintien et la reproduction de milliers de poissons dans une animalerie de taille relativement restreinte. Elevé en laboratoire dans une eau de 28,5°C aux paramètres physico-chimiques contrôlés, il présente un cycle de vie relativement court puisqu'il atteint le stade adulte en 3 mois, âge à partir duquel il est capable de se reproduire (Figure 9).

La fécondation chez le poisson zèbre étant externe, l'obtention d'embryons est aisée ce qui n'est pas le cas du modèle murin qui nécessite une intervention chirurgicale. De plus, le taux de fertilité des femelles est très élevé (200 à 500 œufs pondus tous les 10 jours) durant toute l'année ce qui représente un avantage statistique considérable pour des études biologiques.

Ces nombreux avantages naturels couplés au développement d'outils de génétique et d'imagerie ont fait du poisson zèbre, en moins de 30 ans, un excellent modèle de développement, de génétique et d'imagerie qui devient de plus en plus utilisé dans l'étude des pathologies humaines.

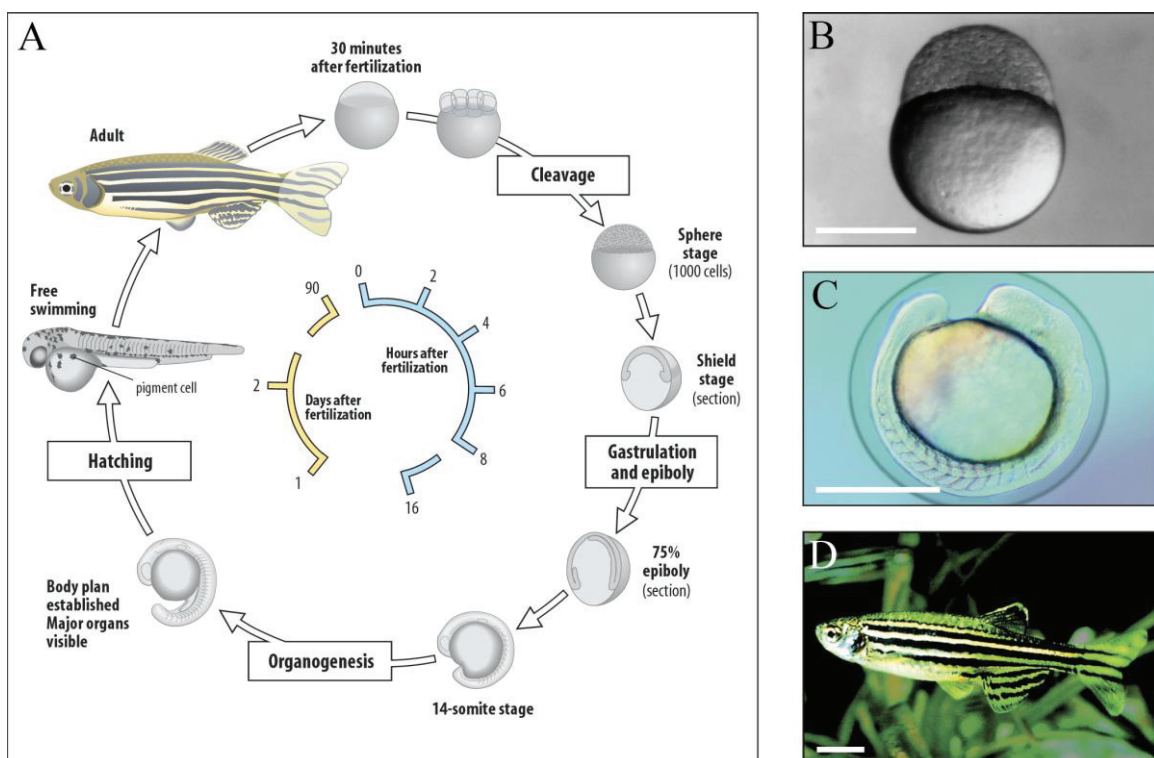


Figure 9. Cycle de vie du poisson zèbre

A- Schéma décrivant les principales étapes du cycle de vie du poisson zèbre. Trente minutes après la fécondation, commence la période de clivage au cours de laquelle on passe d'un embryon d'une cellule à un embryon de mille cellules au stade sphère. S'en suivent les stades d'épiboly et de gastrulation au cours desquelles sont mis en place les différents feuilletts embryonnaires. Entre 10 et 11 heures post fécondation (hpf), commence la somitogenèse, en parallèle de laquelle s'effectue l'organogenèse à partir de 14 hpf. A 24 hpf le plan général de l'embryon est établi et les organes majeurs sont visibles. C'est à partir de ce moment que commence la pigmentation. Vers 3 jours, la somitogenèse et l'organogenèse sont achevées et l'embryon éclot (hatching). La larve commence alors à nager librement et croît progressivement jusqu'à atteindre l'âge adulte. Remarque : les heures indiquées sur le schéma sont valables pour une croissance à 28,5°C. **B-C** Clichés d'embryons de poisson zèbre pris aux stades sphère (B) et 13 somites (C). **D-** Cliché de poisson zèbre adulte. Extrait modifié d'un cours de Développement et de Biologie moléculaire en ligne de Biran E Staveley (Department of Biology Memorial University of New foundland).

B - Un modèle de développement et d'imagerie

La fécondation externe, la transparence optique des embryons, la rapidité de son développement, les capacités de régénération, représentent des avantages qui placent le poisson zèbre comme un modèle de développement irremplaçable. Le poisson zèbre a été introduit comme modèle de laboratoire dès les années 70 par George Streisinger qui était passionné par les poissons tropicaux (Grunwald et Eisen, 2002). Les travaux publiés par la suite par Kimmel en 1995 (Kimmel, 1995) ont permis de caractériser de manière extrêmement précise les différentes phases du développement embryonnaire du poisson zèbre qui sont entièrement visibles sous une simple loupe binoculaire. Une planche détaillée des stades embryonnaires de développement entre 0 et 72 heures post fécondation (hpf) (l'éclosion ayant lieu entre 48 et 72 hpf) issue de ces travaux vous est montrée en **annexe 1**.

Au cours du développement embryonnaire, on distingue 6 grandes périodes : clivage, blastula, gastrulation, segmentation, pharyngula et hatching (éclosion) (**voir annexe 1**). La période de segmentation qui a lieu entre 10 et 24 hpf et qui nous intéresse plus particulièrement, se caractérise principalement par l'élongation de la queue et la mise en place des somites, unités segmentaires mésodermiques répétitives, à l'origine du système musculo-squelettique.

De manière générale, on peut retenir que l'embryon de poisson zèbre se développe assez rapidement puisqu'en moins de 24 h, l'embryon a formé la plupart des ébauches tissulaires et présente déjà une morphologie larvaire capable de mouvements spontanés. Les premiers battements cardiaques sont visibles à partir de 26 hpf, bien que la survie de l'animal ne repose pas sur le système cardiaque avant 14 jours post fécondation (jpf).

Non seulement le développement des organes internes est directement observable de part la transparence des embryons, mais l'enveloppe acellulaire protégeant l'embryon que l'on appelle le chorion est elle même transparente contrairement au poulet ou au serpent. Cette transparence optique des embryons couplée au développement d'outils de transgénèse et de techniques d'imagerie *in vivo* font du poisson zèbre un modèle puissant pour étudier la dynamique du développement des vertébrés. En effet, la génération de lignées transgéniques exprimant des protéines fluorescentes sous le contrôle de promoteurs spécifiques a représenté une véritable levée de verrou pour caractériser *in vivo* la dynamique des mouvements et des changements de forme cellulaires au cours de la morphogenèse (**Figure 10**). Par exemple, la lignée Mnx1:GFP (anciennement HB9:GFP) qui exprime la GFP sous le contrôle d'un promoteur spécifique des motoneurons a permis d'étudier plus en détail la dynamique en

temps réel de la croissance axonale des motoneurones et de visualiser comment les filopodes émis par le cône de croissance axonal vont tâtonner pour trouver leur chemin (Flanagan-Steet *et al.*, 2005). Plus récemment, la technologie « Brainbow » qui se base sur l'expression différentielle d'une combinaison de trois protéines fluorescentes par des neurones individuels a permis de suivre la dynamique des trajectoires neuronales à l'échelle d'un seul neurone (Pan *et al.*, 2011). Cette technologie s'est aujourd'hui généralisée à l'ensemble des tissus de l'embryon et on parle de « Zebrawow » (Pan *et al.*, 2013). Le développement des technologies d'imagerie permet même aujourd'hui par l'utilisation de techniques optiques de génération de seconde et troisième harmonique (SHG, THG) d'imager en temps réel et sans aucune manipulation génétique, la dynamique des divisions et mouvements cellulaires qui se déroulent pendant la phase de clivage pour ensuite proposer une modélisation informatique et mathématique des observations réalisées (Olivier *et al.*, 2010).

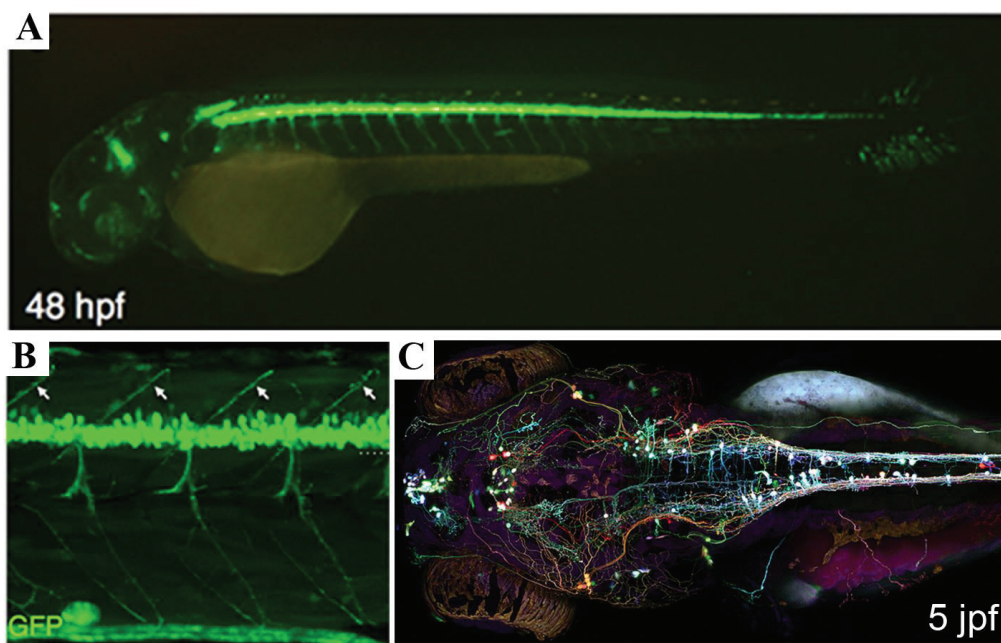


Figure 10. Le poisson zèbre est un puissant modèle d'imagerie *in vivo*

A-B Lignée transgénique exprimant la GFP au sein des motoneurones spinaux via un système de Gene TRAP Gal4-UASGFP. Vues latérales avec l'antérieur à gauche. Extrait de Asakawa *et al.*, 2013

C- Zebrafish « Brainbow ». Larve de 5 jpf exprimant la construction « Brainbow » sous le contrôle du promoteur neuronal Islet. Grâce à cette construction basée sur un système de recombinaison Cre-Lox, trois protéines fluorescentes (dT tomato, Cerulean et YFP) sont exprimées aléatoirement par des neurones différents offrant ainsi une palette d'une douzaine de couleurs permettant ainsi de suivre des trajets neuronaux complexes. Vue dorsale avec l'antérieur à gauche. Extrait de Pan *et al.*, 2011.

Enfin, suite à l'analyse de milliers de lignées dont des mutations perturbaient les processus développementaux basiques, un très grand nombre de données ont été collectées sur le développement des vertébrés. La possibilité de réaliser sur ce modèle une mutagenèse aléatoire à grande échelle, comme nous le détaillerons dans le paragraphe suivant, positionne le poisson zèbre comme un organisme vertébré modèle unique (**tableau 4**).

Organism	Size egg (mm)	Length adult	Number of offspring	Duration of embryogenesis	Generation time	Genome size [bp]	Number of genes
<i>Caenorhabditis elegans</i>	0.05	1 mm	300–350/life time	20 h	50 h	0.097×10^9	20000
<i>Drosophila melanogaster</i>	0.5	3 mm	50/day	24 h	9 days	0.18×10^9	13 600
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	0.7	5 cm	200/week	2 days	2–3 months	1.5×10^9	est. 30 000
<i>Xenopus laevis</i>	1–1.3	10–14 cm	300–1000/2–3 months	2–2.5 days	1–2 years	3.1×10^9	Unknown
<i>Xenopus tropicalis</i>	0.6–0.8	4–5 cm	1000–3000/2–3 months	2 days	3–4 months	1.7×10^9	Unknown
Chicken (<i>Gallus gallus</i>)	60–80	30 cm	1/1–2 days	6 days	9 months	1.1×10^9	Unknown
Mouse (<i>Mus musculus</i>)	0.1	6–10 cm	4–8/4–6 weeks	14 days	2 months	2.6×10^9	30000

Tableau 4. Comparaison des propriétés clés des organismes modèles

Extrait de Dahm *et al.*, 2005

C- Un modèle de génétique et de pathologies humaines

Le poisson zèbre possède un génome de 1,7 giga paires de bases (soit environ la moitié de la taille du génome humain) qui est réparti en 25 paires de chromosomes plus ou moins identifiables sur la base de critères morphologiques et que l'on appelle aussi des groupes de liaison génétiques ou LG pour « linkage group » (Lee *et al.*, 2009). Des études publiées récemment ont montré que le génome du poisson zèbre avait une grande similarité avec celui de l'homme en terme de contenu génique puisque 71 % des gènes humains possèdent un orthologue chez le poisson zèbre (Howe *et al.*, 2013). Toutefois, une différence majeure entre ces deux génomes réside dans la présence de nombreux gènes à l'état dupliqué dans le génome du poisson zèbre dû à une duplication supplémentaire du génome entier survenu chez l'ancêtre commun des poissons téléostéens. Le génome du poisson zèbre apparaît de ce fait plus complexe, certains des gènes dupliqués n'étant plus exprimés dans les mêmes tissus que les gènes ancestraux et/ou pouvant acquérir de nouvelles fonctions (Force *et al.*, 1999).

Les premières études de génétique réalisées dans les années 90 chez le poisson zèbre sont des études de génétique classique (génétique directe) allant du phénotype au génotype qui ont été conduites dans le but d'identifier les grandes familles de gènes impliqués dans le développement. Un large criblage réalisé sur des anomalies de développement induites par

mutagenèse aléatoire à l'ethyl-nitroso-urée (ENU), un agent mutagène qui induit des mutations ponctuelles, a été effectué par deux laboratoires de Boston et de Tubingen en 1996. Ce travail titanesque a permis de répertorier une collection de plus de 2000 mutants qui ont été classés en fonction de leur phénotypes morphologiques ou comportementaux. Ces résultats font l'objet d'une issue complète du journal « *Development* » (Granato et Nusslein Volhard, 1996). L'isolement des différentes mutations par clonage positionnel a ensuite permis d'identifier près de 400 gènes impliqués dans les phases de développement précoces et au cours la morphogenèse.

Par la suite, le séquençage et l'assemblage plus complet du génome (version actuelle : Zv9) réalisés depuis 2001 par l'institut SANGER (Cambridge, Grande Bretagne) ont favorisé le développement de nombreux outils de génétique inverse et de transgénèse visant à évaluer les conséquences phénotypiques de l'inactivation des gènes choisis.

Une stratégie antisens basée sur l'injection d'oligonucléotides modifiés par l'apport d'un groupement morpholine (appelés morpholinos) dans les embryons au stade 1-2 cellules, a largement été développée chez le poisson zèbre afin d'inhiber de manière transitoire l'expression de gènes cibles au cours du développement embryonnaire. Cette stratégie a massivement contribué au criblage fonctionnel de gènes chez le poisson zèbre ces 15 dernières années et restent aujourd'hui encore couramment utilisée (**Figure 11**) (Bill *et al.*, 2009 ; Bedell *et al.*, 2011). L'injection de morpholinos présente l'avantage d'être rapide et efficace pour évaluer la fonction d'un gène au cours du développement. Toutefois, la technique de « morpholinos knockdown » requiert de nombreux contrôles pour éviter des erreurs d'interprétation liées à de potentiels effets secondaires non visés (« off-targets ») des morpholinos. Par ailleurs, son efficacité sur l'extinction du gène est limitée dans le temps (environ 3-5 jours), ce qui limite l'utilisation de cette stratégie pour toute analyse fonctionnelle sur des stades plus tardifs et à l'âge adulte. Il est à noter dans ce dernier cas, que l'utilisation de *vivo*-morpholino par injection systémique ou intraveineuse, permet d'inhiber efficacement les gènes dans certains tissus tels que le muscle ou la nageoire caudale (Chablais et Jazwinska, 2010).

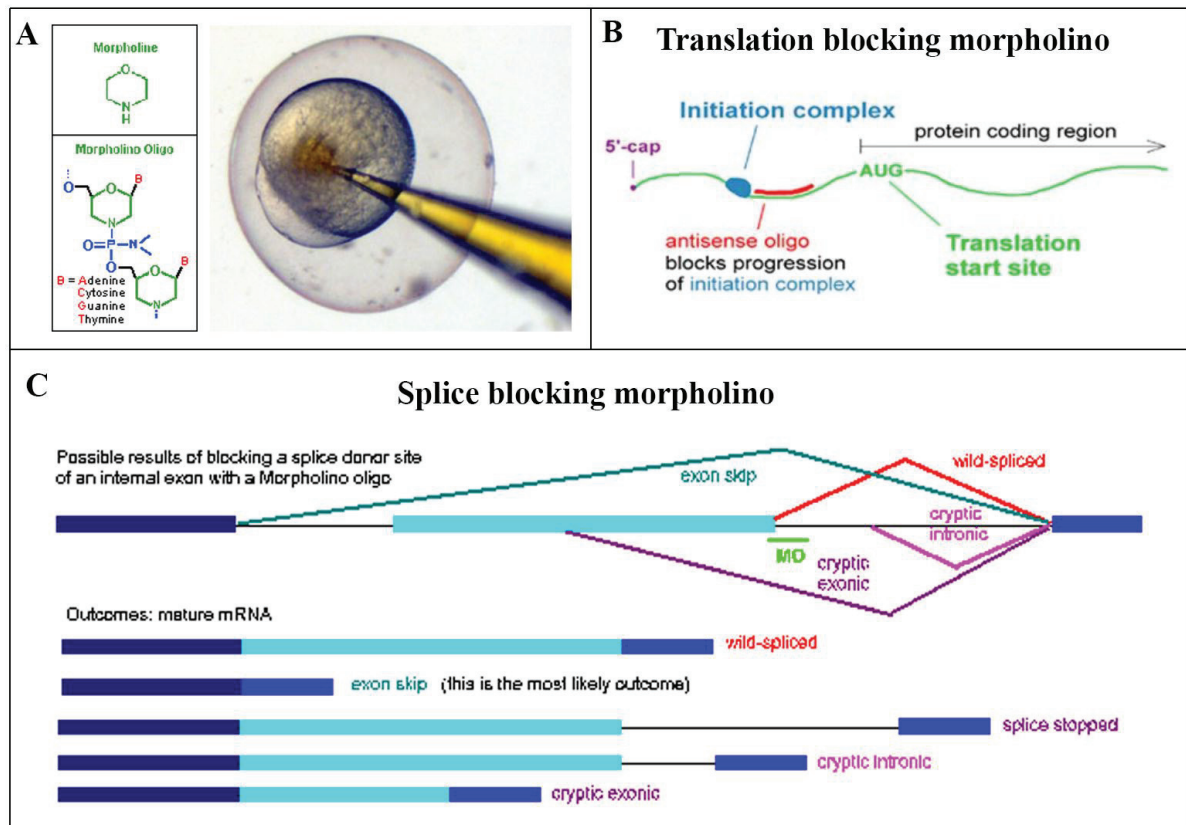


Figure 11. Stratégie antisens basée sur l'injection de morpholinos

A- Des oligonucléotides modifiés par la présence d'un groupement morpholine (morpholinos) spécifiquement dessinés pour être complémentaires d'une séquence d'ARN d'intérêt sont injectés dans le sac vitellin des embryons au stade 1 cellule. **B-C** Deux types de morpholinos qui diffèrent par la nature de leur séquence cible peuvent être injectés. La fixation d'un morpholino complémentaire d'une séquence en amont ou au niveau du site d'initiation de la traduction d'un ARNm (**B**) bloque l'assemblage ou la progression du complexe d'initiation de la traduction qui se traduit par l'absence de production de la protéine. La fixation d'un morpholino complémentaire du site donneur d'épissage d'un intron (**C**) empêche la reconnaissance de ce site lors du processus d'épissage du pré-ARNm générant un épissage anormal. Extraits du site de la compagnie Gene Tools (<http://www.gene-tools.com>).

Pour faire face à la difficulté de cultiver des cellules souches embryonnaires empêchant le développement de la technologie de knockout chez le poisson zèbre (Robles *et al.*, 2011), la méthode du TILLING (« Targeting Induced Local Lesion In Genomes ») initialement développée chez les plantes a été adaptée à ce modèle de vertébré. Cette méthode consiste à détecter et sélectionner des mutations dans des gènes d'intérêt par séquençage à grande échelle à partir de banque d'ADN génomique de poissons obtenus par la mutagenèse à l'ENU (**Figure 12**). A l'heure actuelle, dans le cadre du « Zebrafish mutation Project » on réalise plutôt un séquençage complet du génome de chaque individu grâce aux techniques de

séquencage à haut débit de type Illumina. Les mâles porteurs de mutation d'intérêt étant identifiés, on génère une lignée mutante par fécondation *in vitro*.

L'institut SANGER (Cambridge, Grande Bretagne) a ainsi lancé un projet de knockout de grande envergure basé sur cette technologie (Zebrafish mutation Project ; (https://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/zmp/)) dans le but de générer des allèles mutés dans chaque gène du génome du poisson zèbre codant pour une protéine (Kettelborough *et al.*, 2013). Pour l'instant, 45 % des gènes du poisson zèbre (11892 sur 24088) ont été mutés dans le cadre de ce projet.

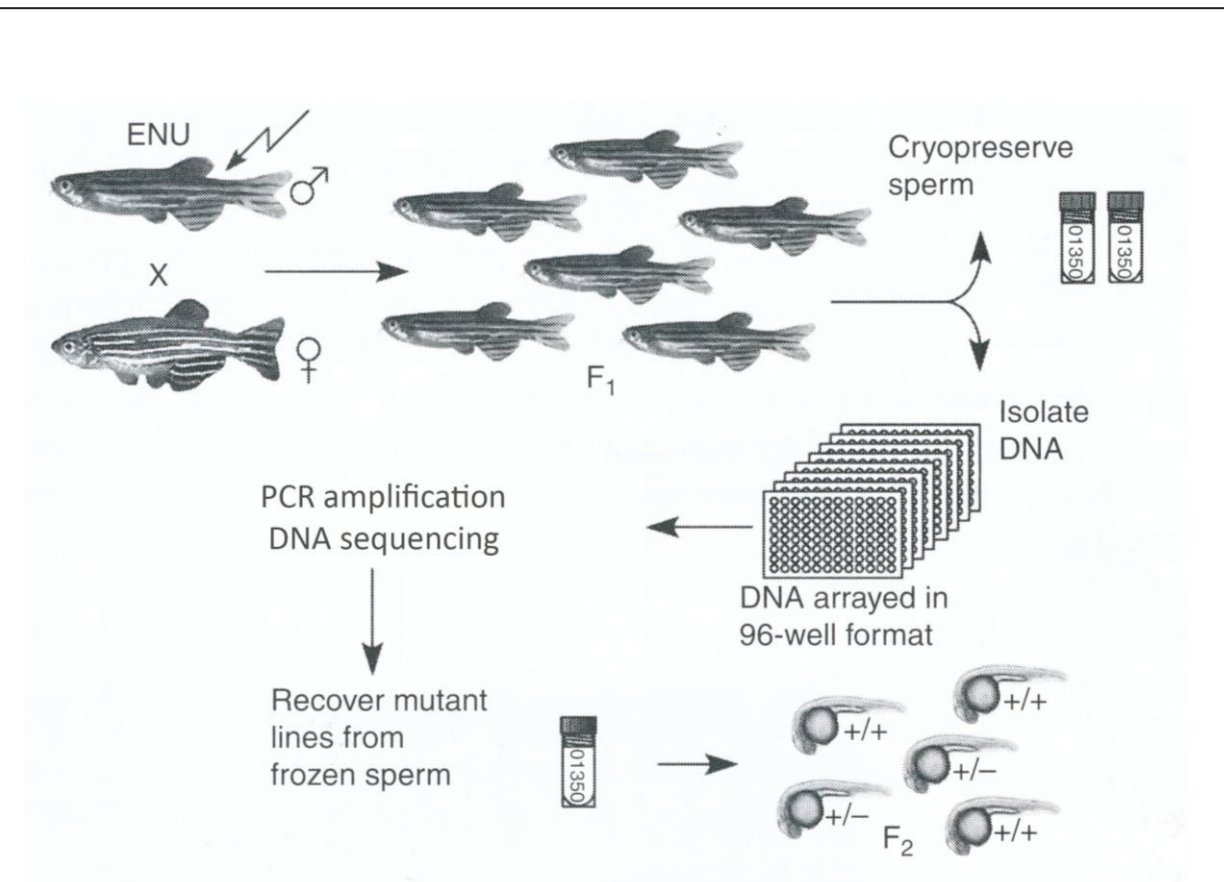


Figure 12. Génération de mutants pour un gène cible : la méthode du TILLING

Les mâles mutagénisés par l'ENU sont croisés avec des femelles sauvages afin de produire une descendance (F1) hétérozygote pour les mutations induites. Le sperme des mâles de cette banque de poissons F1 peut ensuite être cryopréservé. Puis, on isole l'ADN génomique de chaque donneur de sperme par « fin clip » et on amplifie l'ADN en utilisant des amorces spécifiques de notre gène d'intérêt. Le séquençage des amplicons permet de caractériser la mutation. Extrait modifié de Draper *et al.*, 2009.

Plus récemment, plusieurs technologies de « genome editing » ont été développées pour générer des allèles nuls pour des gènes cibles. La première technique développée, qui reste laborieuse et difficile à mettre en place dans un laboratoire classique, est celle des « Zinc Finger Nucleases » (ZFNs) ou nucléases à doigt de zinc (revue Ekker, 2008). Deux autres techniques, les TALENs (« Transcription Activator-Like Effector Nucleases») et le système CRISPR/Cas9 (« Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats RNA guided Cas9 nuclease») ont été développées plus récemment et sont en train d'émerger dans les laboratoires (Hwang *et al.*, 2013 ; Huang *et al.*, 2014). Ces trois technologies partagent le point commun de générer au moyen d'une endonucléase une cassure double brin au niveau de l'ADN génomique du gène d'intérêt qui sera réparée par des mécanismes de réparation endogène, de type NHEJ (« Non Homologous End Joining») entraînant des erreurs qui seront la cause de l'invalidation du gène d'intérêt. Les trois technologies diffèrent essentiellement sur la nature de l'endonucléase utilisée et sur le moyen de cibler cette endonucléase sur la séquence d'intérêt (Figure 13).

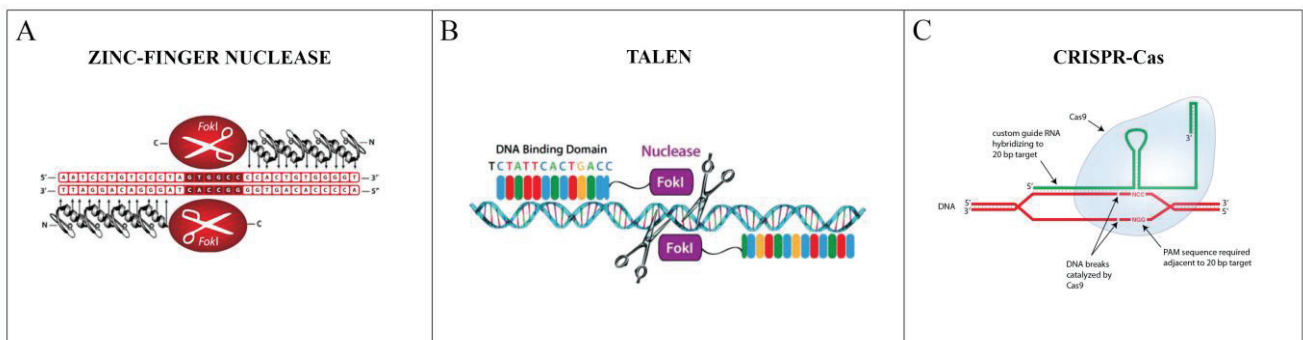


Figure 13. Stratégies de « genome editing » employées chez le poisson zèbre

- A- Zinc Finger Nuclease (ZFN) based genome editing.** Deux ARNs codant pour l'endonucléase Fok 1 fusionnée avec un domaine de liaison à l'ADN composé de 3 à 4 motifs en doigt de zinc sont injectés dans les embryons. Après reconnaissance des séquences cibles par les motifs à doigt de zinc, une dimérisation des deux domaines Fok 1, essentielle à l'activation de l'activité endonucléase de Fok1, s'effectue générant ainsi une cassure double brin de l'ADN génomique. La réparation de cette cassure par un mécanisme de réparation non homologue de type NHEJ engendre des insertions ou délétions dans la séquence cible. Extrait du site internet de la compagnie SIGMA-ALDRICH (<http://www.sigmaaldrich.com>).
- B- Transcription activator-like effector nucleases (TALEN) based genome editing.** Cette stratégie repose sur le même principe que les ZFNs si ce n'est que le domaine Fok1 est couplé à un domaine de liaison à l'ADN composé d'une série de motifs protéiques dit TALEs (répétitions de 35 acides aminés contenant deux acides aminés hypervariables capables de reconnaître une base de l'ADN). Extrait du site internet de la compagnie System Biosciences (<http://www.systembio.com>)
- C- Clustered regularly interspaced short palindromic repeats RNA guided Cas 9 nuclease (CRISPR-Cas) based genome editing.** Cette stratégie repose sur l'injection d'un ARN codant pour l'endonucléase Cas 9 et d'un ARN guide en partie complémentaire de la séquence à cibler permettant de diriger la Cas 9 sur le site à cliver. Extrait du site internet de « The Case Transgenic and Targeting Facility », Case Western Reserve University (<http://ko.cwru.edu/index.html>).

Les diverses techniques de génétique directe et inverse ont été initialement développées pour comprendre les mécanismes du développement (Driever *et al.*, 1994). Toutefois, les innombrables études fonctionnelles réalisées depuis dans ce modèle ont démontré que la fonction de nombreux gènes est conservée entre l'homme et le poisson zèbre faisant de cet organisme un modèle pertinent pour l'étude des pathologies humaines (Lieschke et Currie, 2007). A titre d'exemple, le mutant qui porte une mutation sur le gène qui code pour l'orthologue de la dystrophine humaine (mutant *sapje*) présente des défauts similaires à ceux décrits chez les patients atteints de Myopathie de Duchenne. Par ailleurs, le complexe d'ancrage des fibres musculaires associé à la dystrophine est identique chez le poisson zèbre et chez l'homme et comprend les mêmes acteurs moléculaires (Bassett et Currie, 2004).

III - Développement du muscle squelettique axial

Les muscles du tronc et de la queue, dit muscles axiaux, représentent la majeure partie des muscles squelettiques du poisson zèbre. La musculature axiale est divisée en unités segmentaires répétitives que sont les myotomes, séparés les uns des autres par des myoseptes verticaux, équivalent des tendons chez les amniotes, sur lesquels s'attachent chaque fibre musculaire et qui assurent la transmission des forces de contraction (Charvet *et al.*, 2011). Du point de vue embryologique, les unités myotomales dérivent des somites eux-même issus de la segmentation rostro-caudale du mésoderme. On distingue également dans ces structures, le sclérotome, le syndétome et le dermomyotome à l'origine respectivement, des os et du cartilage, des myoseptes et enfin du derme axial. Chez l'adulte, les fibres musculaires constitutives des myotomes peuvent être classées en deux catégories : les fibres musculaires lentes ou fibres rouges, spécialisées dans la nage lente et localisées à la surface latérale du myotome, et les fibres rapides, ou fibres blanches, utilisées pour des élans de nage rapide et situées dans la partie profonde du myotome (Devoto *et al.*, 1996).

Le premier myotome fonctionnel est observé à 24 hpf. Deux phases de croissance seront ensuite nécessaires pour générer le muscle adulte (Rescan, 2008). Etant donné que l'ensemble des fibres musculaires est déjà mis en place à 24 hpf nous focaliserons notre étude sur le développement de ce myotome primaire avant ce stade en nous intéressant plus particulièrement au développement des fibres lentes.

A- Myogenèse primaire du poisson zèbre : généralités

Le myotome embryonnaire est constitué de quatre types de fibres musculaires qui diffèrent par leur localisation, leur morphologie et l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques (Devoto *et al.*, 1996). On distingue les fibres lentes superficielles (SSFs), les fibres pionnières (MPs), les fibres rapides (FFs) et les fibres rapides médiales (MFFs) (Figure 14).

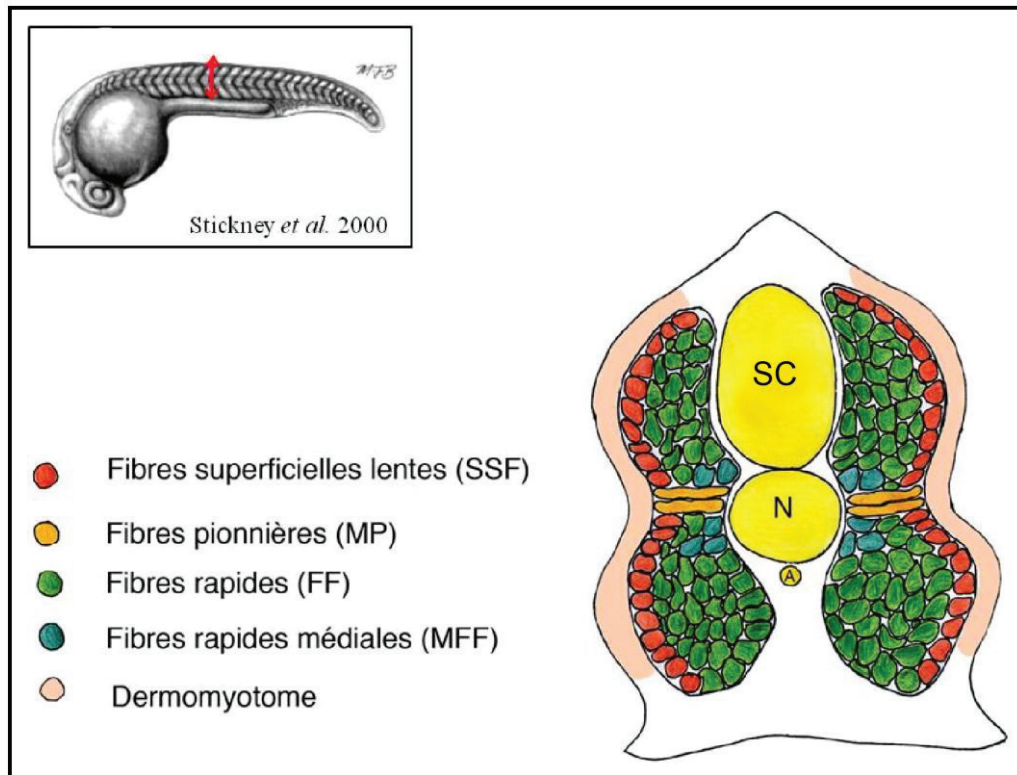


Figure 14. Représentation schématique du myotome primaire du poisson zèbre

Coupe transversale intrasomitique d'un embryon de poisson zèbre en fin de période de segmentation (24 hpf). Le myotome est alors constitué de quatre types de fibres musculaires. Les fibres superficielles lentes (SSFs) et les fibres pionnières (MPs) sont des fibres à contraction lente, alors que les fibres rapides (FFs) et les fibres rapides médiales (MFFs) sont des fibres à contraction rapide. SC = spinal cord (moelle épinière), N = notochorde, A = aorte.

Les SSFs représentent environ 20 fibres par hémisegment somitotique (moitié droite ou gauche d'un somite) qui sont organisées en une monocouche située à la périphérie du myotome, immédiatement sous le dermomyotome formé d'une couche de cellules épithéliales indifférenciées. Les SSFs sont des cellules fusiformes dont la majeure partie du cytoplasme est occupée par l'appareil contractile caractéristique des cellules musculaires striées. Elles possèdent un noyau unique situé au centre de la fibre, à la différence des cellules musculaires

striées squelettiques présentes chez les autres vertébrés supérieurs, qui sont des *syncytia* résultant de la fusion de myoblastes. Les SSFs sont caractérisées par l'expression d'isoformes spécifiques de plusieurs protéines de l'appareil contractile. La plus connue est « Slow myosin heavy chain 1 » (*Smyhc1*), une isoforme de la chaîne lourde de myosine spécifique du lignage lent, utilisée comme marqueur principal des fibres lentes.

Les MPs forment un groupe de 2 à 6 fibres lentes par hémisegment localisées médialement dans le somite (**Figure 14**). Elles se distinguent des SSFs par une forte expression de *engrailed 1* et *engrailed 2*, deux facteurs de transcription à homeobox de la famille *Engrailed* (*Eng*). Ces fibres ont été impliquées dans la formation du myosepte horizontal, une structure riche en matrice extracellulaire, qui subdivise le myotome en deux moitiés dorsales et ventrales et qui est responsable de la forme en chevron caractéristique du myotome (*Stickney et al., 2000*).

Les FFs constituent le cœur profond du myotome. A 24 hpf, elles sont environ 80 par hémisegment. Ce sont des fibres syncytiales classiques dont les noyaux multiples sont alignés dans le sens de la fibre, en périphérie de l'appareil contractile. Au niveau moléculaire, elles se caractérisent par l'expression d'isoformes rapides des chaînes lourdes (fMyHC) et légères (fMyLC) de myosine, communément ciblées comme marqueur du lignage rapide.

Les MFFs ont été décrites par Wolff *et al.* (2003) comme des fibres musculaires rapides *Eng*-positives. Elles sont au nombre de 2 à 6 par hémisegment. Localisées sur le pourtour des MPs, elles expriment les facteurs *Eng* en plus faible quantité que ces dernières. Aucune fonction ne leur est attribuée à ce jour dans la littérature.

B - Du mésoderme au myotome primaire : une dynamique complexe

La formation du myotome débute vers 8 hpf au moment de la gastrulation. Elle se termine aux environs de 24 hpf avec la fin de la segmentation. Il est important de préciser que si les événements décrits ci-après se produisent de façon similaire dans chaque somite, la datation ne s'applique qu'aux premiers somites compte-tenu de la progression antéro-postérieure de la somitogenèse.

1 - Myogenèse des fibres lentes

Au stade « shield » (6 hpf), les précurseurs des cellules du lignage lent se situent au niveau de la zone marginale dorsale de l'embryon (**Figure 15A**). Cependant, ils ne sont pas encore déterminés de façon irréversible puisqu'en les transplantant dans la zone marginale ventrale, territoire présomptif des précurseurs du lignage rapide, ces cellules changent aisément de destin donnant naissance à des fibres rapides (*Hirsinger et al., 2004*).

Les précurseurs lents subissent au moment de la formation des trois feuilletts embryonnaires des mouvements d'involution et de convergence-extension. Ils forment ainsi en fin de gastrulation (stade bourgeon caudal ou « tail bud »), au sein du mésoderme présomitique paraxial, une monocouche de cellules de type pseudo-épithéliale cubique dites cellules adaxiales en raison de leur localisation le long de la notochorde naissante. Au moment de la somitogénèse, ces cellules adaxiales qui sont déterminées au devenir lent, se répartissent en rangées de 4 fois 5 cellules par hémisegment (**Figure 15B**). Yin et Solnica-Krezel (2006) ont montré que des mouvements corrects de convergence-extension sont essentiels à une bonne réception de signaux en provenance de la notochorde et à la détermination ultérieure du nombre correct de cellules adaxiales dans le devenir lent.

L'induction du programme myogénique général débute dans les cellules adaxiales vers la fin de la gastrulation avec l'expression de deux facteurs régulateurs de la myogenèse (MRF) primaires, MyoD et Myf5 qui sont des marqueurs précoces du lignage musculaire. Ce sont des facteurs de transcription hélice-boucle-hélice qui vont activer de façon directe ou indirecte de nombreux gènes cibles, propres à la différenciation myogénique. Parmi ces « cibles » figurent les MRF secondaires comme la myogénine (*myoG*), gène clé de la différenciation musculaire (*Pownall et al., 2002*).

En début de segmentation, sous l'effet de signaux induits par la notochorde dont nous étudierons les modalités dans le chapitre suivant, les cellules adaxiales sont déterminées au devenir lent et se différencient progressivement en myoblastes lents. Ce processus de différenciation s'observe à deux niveaux :

- A l'échelle cellulaire, les cellules adaxiales subissent d'intenses modifications morphologiques ainsi qu'un réarrangement global de leur organisation (*Daggett et al., 2007*). Les cellules initialement cubiques, s'allongent progressivement en passant par plusieurs stades intermédiaires et finissent par s'intercaler dans le sens dorso-ventral (**Figure 15Ca**).

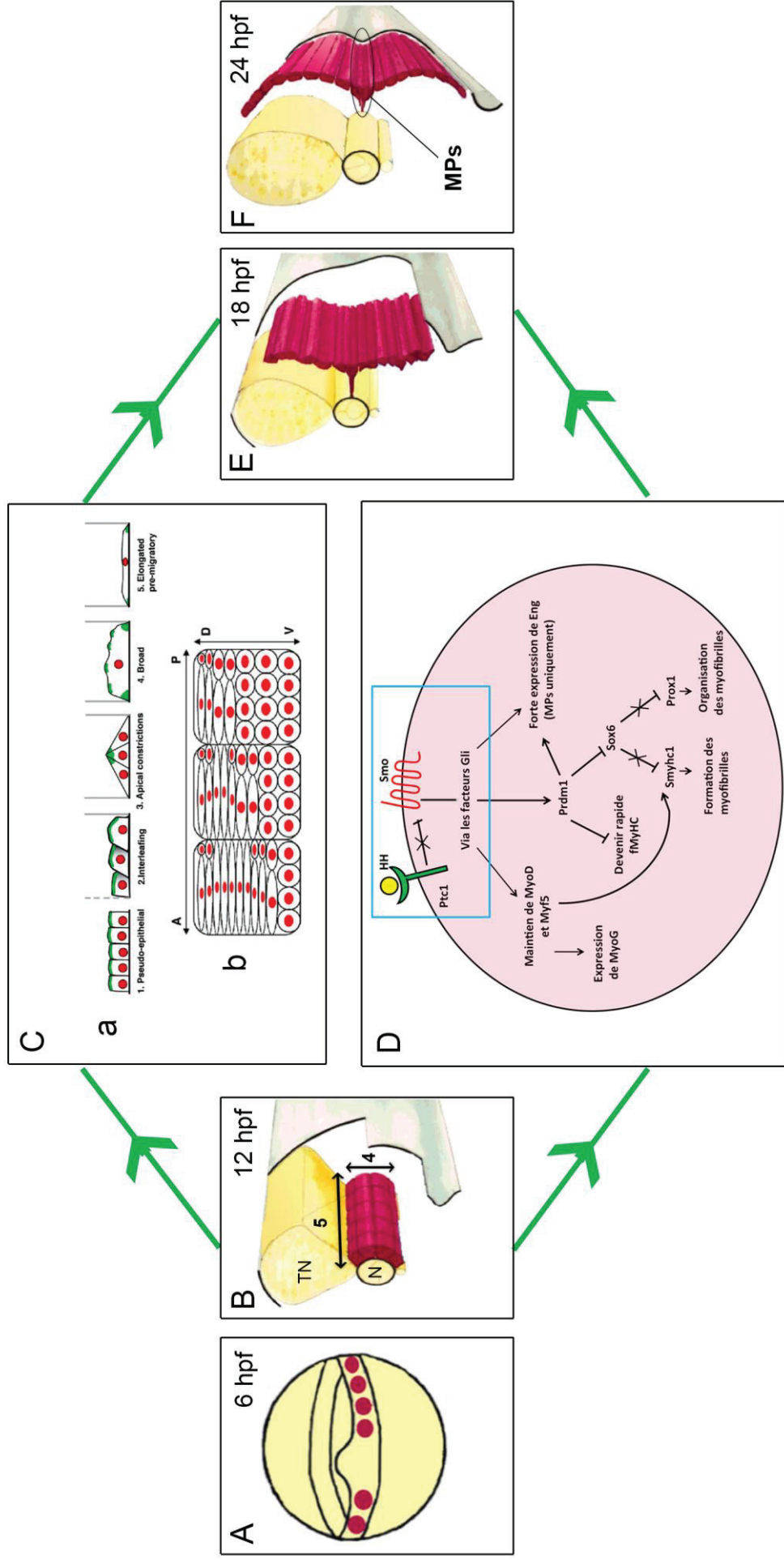


Figure 15. Les étapes majeures de la myogenèse lente

A- A 6 hpf, les précurseurs des SSFs et MPs sont localisés au niveau de la zone marginale dorsale (indiquée par les points roses). B- En début de segmentation, les cellules adaxiales forment une monocouche de cellules pseudo-épithéliales cubiques (roses) flanquant la notochorde (N). TN= tube neural. C- Entre 12 et 18 hpf, les cellules adaxiales subissent des changements morphologiques. a- Elles s'allongent progressivement en passant par 5 stades caractérisés par un enrichissement spécifique en actine corticale (vert). b- Ces changements progressent dorso-ventralement au sein d'un même somite. Notez la progression rostro-caudale du processus : alors que la majorité des cellules adaxiales des somites antérieurs sont déjà allongées, celles situées dans les somites postérieurs sont encore rondes, moins avancées dans leur différenciation. A= antérieur ; P= postérieur ; D= dorsal ; V= ventral. Tirés de Daggert *et al.* (2007) D - Représentation schématique de l'expression d'un programme lent spécifique qui se superpose au programme myogénique général en début de segmentation, sous l'induction de la voie de signalisation Hedgehog (encadré bleu). Les facteurs Hedgehog (HH) émanant de la notochorde se fixent sur le récepteur Patched 1 (Ptc1) levant ainsi l'inhibition de Smoothened (Smo). S'en suit une voie de signalisation intracellulaire médiée par les facteurs Gli. Ceci permet entre autre, le maintien des MRFs et l'activation de Prdm1, véritable pivot du switch vers le lignage lent. E- A 18hpf, les myoblastes lents s'organisent en une ligne dorso-ventrale. F- A 24 hpf, la myogenèse lente est achevée dans les premiers somites. Les SSFs sont positionnées à la périphérie du myotome et les MPs sont restées proches de la notochorde. BEF – Schémas modifiés d'après Stickney *et al.* (2000).

Ces changements morphologiques sont le reflet d'une réorganisation de l'actine F corticale et sont dépendants de l'activité de Cap1, un facteur régulant la polymérisation des filaments d'actine, spécifiquement enrichi dans les cellules adaxiales. Ces changements morphologiques progressent dans le sens dorso-ventral. Les cellules les plus dorsales ont déjà terminé leur élongation tandis que les cellules les plus ventrales restées cubiques amorcent leurs premiers changements (**Figure 15 Cb**). De ce fait, entre 12 et 18 hpf, on passe d'une organisation de 4 fois 5 cellules épithéliales de forme cubique à 20 myoblastes lents fusiformes organisés en une ligne dorso-ventrale (**Figure 15E**).

- A l'échelle moléculaire, cette différenciation se traduit par la mise en place d'un programme myogénique « lent » spécifique qui se superpose alors au programme myogénique général (**Figure 15D** ; revue Jackson et Ingham 2013). Cela se traduit notamment par l'expression de *smyhc1* au début de la segmentation et par la répression progressive de protéines spécifiques du lignage rapide telle que fMyHC (Roy *et al.*, 2001). Il apparaît donc que le devenir rapide est un devenir myogénique par défaut induit par les MRFs. En effet, si on bloque les signaux inducteurs en provenance de la notochorde, seules des fibres de type rapide sont formées (Wolff *et al.*, 2003). L'induction du programme « lent » est dirigée par le facteur Prdm1 qui est le véritable pivot du « switch » vers le lignage lent. Ainsi les mutants *u-boot* qui contiennent une mutation dans le gène *prdm1*, indiquent qu'en l'absence de Prdm1 les cellules adaxiales se différencient en fibres rapides (Roy *et al.*, 2001; Baxendale *et al.*, 2004). Von Ofsten *et al.* (2008), ont précisé que Prdm1 active indirectement l'expression de *smyhc1* en inhibant son répresseur transcriptionnel Sox6 et réprime directement l'expression de *fmyHC* en se fixant sur son promoteur. Il a par ailleurs été montré que les MRFs, Myf5 et MyoD activent aussi l'expression de *smyhc1* et que le maintien d'au moins un de ces facteurs est indispensable à la différenciation du lignage lent (Maves *et al.*, 2007 ; Hammond *et al.*, 2007). L'expression de *prdm1* n'étant pas sous la dépendance des MRFs et l'expression de *myoD* n'étant pas altérée chez les mutants *u-boot*, les deux voies fonctionneraient plutôt en synergie pour activer *smyhc1* spécifiquement dans le lignage lent (Roy *et al.*, 2001 ; Hinitz *et al.*, 2009).

Vers 18 hpf, les myoblastes lents qui donnent naissance aux SSFs migrent latéralement à travers le somite pour venir peupler la périphérie du myotome (**Figure 15F**). Sur un plan dynamique, le suivi de la migration de myoblastes lents individuels après injection de colorants vitaux a montré qu'au début de leur migration à travers le myotome, ils adoptent une forme triangulaire irrégulière tout en se rapprochant de la bordure antérieure du somite. Puis, les myoblastes subissent à mi-parcours une modification morphologique pour

terminer leur migration sous la forme d'une fibre allongée s'étendant entre deux bordures somitiques (Cortés *et al.*, 2003). Les myoblastes qui sont les plus proches de la notochorde ne migrent pas et restent en contact avec cette dernière pour donner naissance au MPs. Ces cellules se distinguent déjà à 14 hpf par une expression élevée des facteurs Eng (Devoto *et al.*, 1996).

Sur le plan structural, les monomères d'actine et de myosine « lente » se polymérisent pour former respectivement les myofilaments fins et épais. Ces myofilaments s'assemblent ensuite pour former dès 17 hpf, des myofibrilles primitives orientées aléatoirement dans les fibres musculaires naissantes. L'organisation correcte de ces myofibrilles, caractérisant le stade de différenciation terminal des fibres lentes, nécessite le facteur de transcription homéobox *prox1*. L'expression de ce facteur spécifique du lignage lent est induite en réponse à la levée de répression de *Sox6* par *Prdm1* (Roy *et al.*, 2001 ; Von Hofsten *et al.*, 2008). La myogenèse lente s'achève alors par une phase de maturation, caractérisée par l'assemblage progressif de l'appareil contractile. La dynamique de l'assemblage de l'appareil contractile chez le poisson zèbre a été caractérisée par des techniques d'imagerie en temps réel (Sanger *et al.*, 2009).

2 - Myogenèse des fibres rapides

Au stade « shield », les précurseurs des fibres rapides sont situés à l'opposé des précurseurs des fibres lentes, au niveau de la zone marginale ventrale de la blastula (**Figure 16A**). Après les mouvements de convergence-extension, ces précurseurs se retrouvent au niveau du mésoderme présomitique latéral (**Figure 16B**) (Ochi *et Westerfield*, 2007). La myogenèse rapide débutera également sous l'effet de facteurs externes (voir chapitre suivant) mais plus tardivement que celle des fibres lentes, au moment de la segmentation, dans la partie postérieure de chacun des somites laissant place à deux régions : la région antérieure constituée des cellules du futur dermomyotome exprimant *pax3* puis *pax7* et la région postérieure occupée par les myoblastes précoces (**Figure 16Ca**). Quatre à 5h après sa formation, l'ensemble du somite subit, avant le début de la migration des fibres lentes, une rotation horaire de 90° qui positionne les cellules Pax3/7 positives en position latérale par rapport aux myoblastes rapides (**Figure 16C, b et c**) (Hollway *et al.*, 2007).

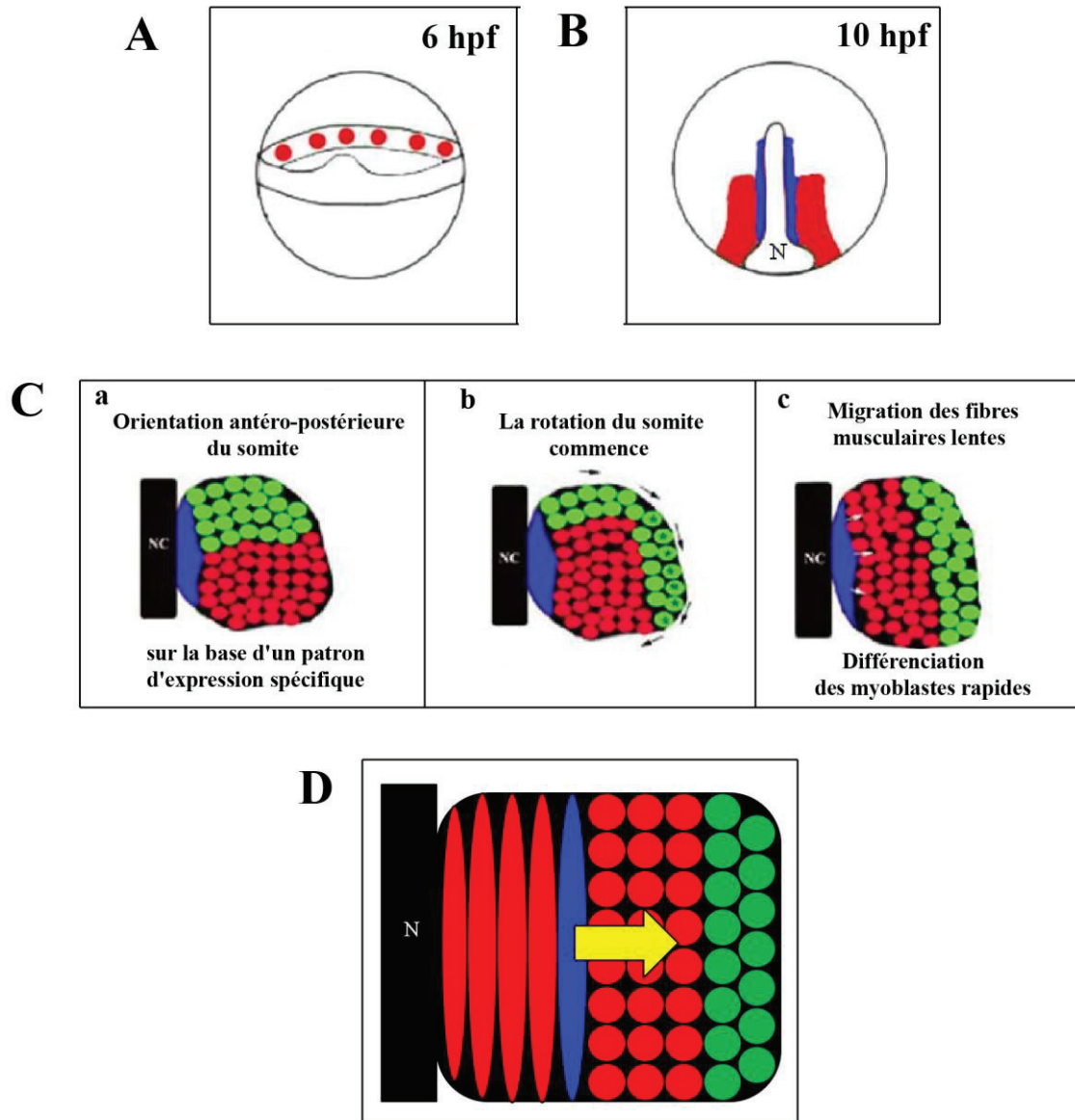


Figure 16. Dynamique de la myogenèse rapide

A- A 6hpf, les précurseurs des FFs et MFFs (points rouges) sont localisés au niveau de la zone marginale ventrale. **B-** Suite aux mouvements de convergence-extension, les précurseurs du lignage rapide se situent au niveau du mésoderme présomitique (rouge), en position latérale par rapport aux cellules adaxiales (bleues) qui flanquent la notochorde (N). Les figures A et B sont modifiées d'après Ochi et Westerfield (2007). **C- La rotation du somite génère deux compartiments.** **a -** Au début de sa formation, le somite présente une orientation antéro-postérieure sur la base d'un patron d'expression spécifique. **b -** Dans les 4 à 5h qui suivent le début de la somitogenèse, les cellules pax3/7 positives du compartiment antérieur migrent latéralement alors que les précurseurs myogéniques postérieurs migrent antérieurement. **c -** L'ensemble du somite a donc accompli une rotation de 90°, générant ainsi le dermomyotome (vert) qui se retrouve en position externe par rapport au myotome (rouge et bleu). Les fibres lentes commencent alors à migrer à travers le somite pour rejoindre la périphérie. Bleu = fibres lentes Vert = cellules pax3/7 positives. Rouge = myoblastes rapides précoces exprimant MyoD. NC = notochorde. Représentations schématiques en vue dorsale modifiées d'après Hollway *et al.* (2007). **D- L'élongation des fibres rapides est corrélée à la migration des fibres lentes.** Représentation schématique en vue dorsale. Ovale rouge : fibre musculaire rapide fusiforme. Ovale bleu avec flèche jaune : fibre lente en migration. Rond rouge : myoblaste rapide sphérique. Rond vert : cellule externe pax3/7 positive. N = notochorde.

Ce mouvement de rotation génère ainsi la formation de deux compartiments : le dermomyotome externe, composé de cellules Pax3/7 positives, et le compartiment myogénique à proprement parler, organisé dans le sens médio-latéral. Les myoblastes les plus proches de la notochorde donneront naissance aux MFFs alors que les myoblastes latéraux donneront naissance aux FFs.

Parallèlement à cette rotation, suite à l'action de MyoD, les myoblastes rapides se différencient et induisent l'expression de MyoG et de protéines structurales rapides comme fMyHC dont l'expression débute aux alentours de 17 hpf (Hinitz *et al.*, 2009). Les myoblastes à l'origine des MFFs expriment également les facteurs Eng, mais en faible quantité vers 18 hpf.

La différenciation des myoblastes se poursuit par une phase d'élongation et de fusion des myoblastes pour former des fibres rapides syncytiales. L'élongation des myoblastes en fibres rapides ne débutera qu'au moment de la migration des fibres lentes à travers le somite, soit vers 18hpf pour les premiers somites. Henry et Amacher (2004) ont observé que l'élongation des myoblastes rapides est corellée à la migration des fibres lentes puisque seuls les myoblastes rapides en aval du front de migration des fibres lentes ont une forme allongée. (**Figure 16 D**). Ils ont par ailleurs montré que la présence des fibres lentes est nécessaire et suffisante à l'élongation des myoblastes rapides bien que la nature du signal reste à ce jour une question en suspend. D'un point de vue dynamique, les études de time-lapse conduites par Snow *et al.* (2008b) ont montré que cette élongation se fait en trois temps bien distincts. Un stade initial où la cellule musculaire rapide de forme ronde présente une activité dynamique d'extension et de rétraction de petites protrusions membranaires sans subir de réels changements de forme globale. Il est suivi d'une phase d'élongation et d'intercalation progressive de la fibre en cours d'élongation entre les cellules voisines qui se fait par un enchainement de cycles d'extension et d'épaississement de protrusions. Enfin, il s'en suit une phase finale au cours de laquelle la fibre capture la bordure somitique et régularise son volume.

A l'élongation des cellules musculaires fait suite la fusion des myotubes, qui commence vers 19 hpf. Peu de choses sont connues sur ce processus dynamique si ce n'est que les facteurs Dock1 et Dock 5, deux membres de la famille des CDM (facteurs activateurs des petites GTPases dont Rac), ainsi que les protéines adaptatrices Crk, sont impliqués dans cette fusion (Moore *et al.*, 2007).

C- Les voies de signalisation régulant la formation du myotome primaire

La myogenèse axiale chez le poisson zèbre est sous la dépendance d'un réseau complexe de voies de signalisation telles que les voies Hedgehog, FGFs, Wnt/ β caténine, ou encore la voie induite par les facteurs de la famille du TGF- β dont font partie les facteurs BMPs. Seules les voies de signalisation majeures, qui sont aussi les mieux comprises sont détaillées dans ce chapitre.

1-Voie de signalisation Hedgehog

Sonic Hedgehog (SHH) est une glycoprotéine de signalisation qui appartient à la famille Hedgehog (HH). Comme tous les membres de cette famille, SHH est sécrétée et va diffuser dans les tissus ou elle est exprimée sous la forme d'un gradient. Chez le poisson zèbre, on distingue 3 membres de la famille HH dont l'expression au niveau du tronc est restreinte à la notochorde pour *ehh* (Echidna HH), à la plaque du plancher neural médian pour *twhh* (Twiggy winkle HH) tandis que l'on retrouve *shh* à la fois dans la notochorde et dans le plancher neural médian et latéral (Park *et al.*, 2004 ; Ingham et Kim, 2005). Ces 3 facteurs se fixent sur un récepteur de la famille Patched (Patched-1 (Ptc1) étant le plus connu) exprimé à la surface des précurseurs musculaires, et plus particulièrement des cellules adaxiales. La fixation des facteurs HH sur Ptc1 lève la répression qu'il exerce sur un autre récepteur membranaire, Smoothened (Smo). L'activation de Smo va induire une voie de signalisation conduisant à l'inhibition de l'activité de la protéine kinase A (PKA). Ceci permet la translocation dans le noyau des facteurs de transcription à doigt de zinc de la famille des Gli, sous leur forme activatrice, permettant la transcription de gènes cibles de la voie HH (**Figure 17**). La première cible transcriptionnelle de la voie HH est le récepteur Ptc1 lui-même dont l'expression est régulée positivement, participant ainsi au maintien du signal (Wolff *et al.*, 2003).

La plupart des mutants des membres de la voie HH montre un défaut de formation du myosepte horizontal conduisant à la perte de la forme en chevron. Cette forme caractéristique des somites adopte alors une conformation en U. L'observation plus poussée des mutants *smoothened* incapables de transduire la voie HH, révèle l'absence complète des cellules du lignage lent, des MFFs et une atteinte moindre des FFs, suggérant un rôle majeur de cette voie sur la myogenèse du poisson zèbre (Ingham et Kim, 2005).

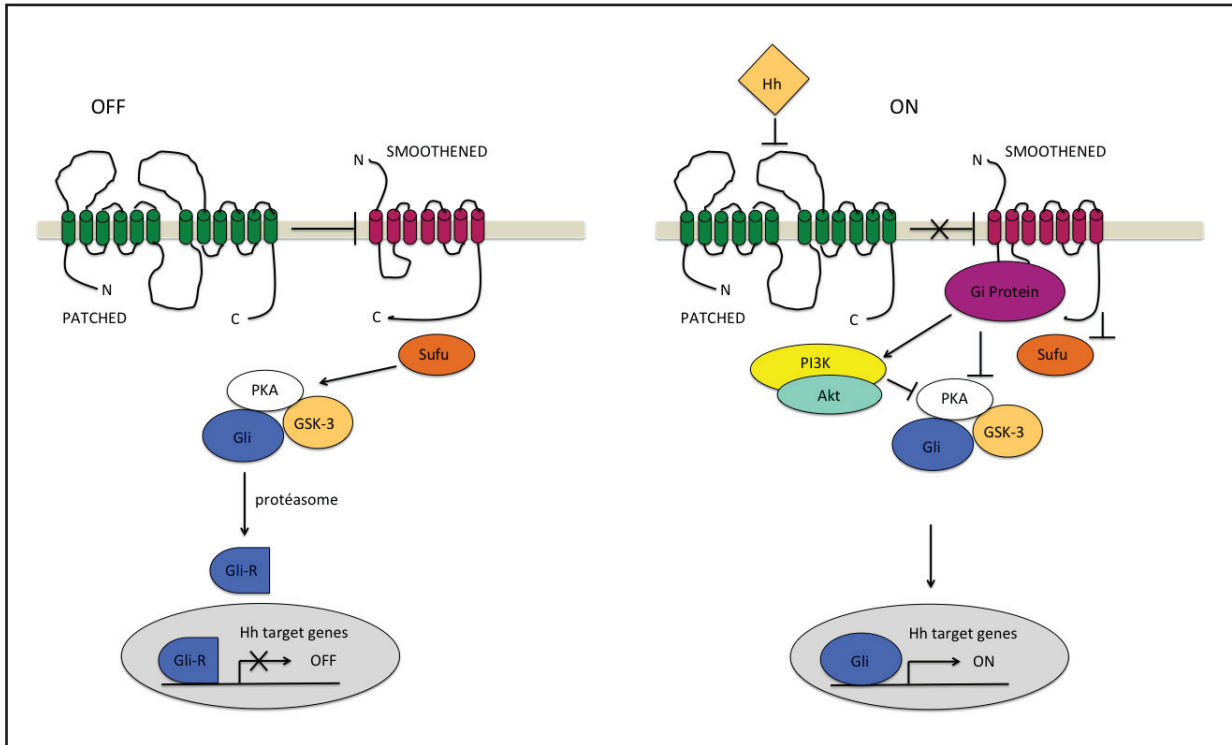


Figure 17. Schéma général de la voie de signalisation Hedgehog

En l'absence du ligand, le récepteur Patched inhibe l'activité de la protéine Smoothened permettant ainsi à Sufu (suppressor of Fused) de promouvoir la phosphorylation des facteurs de transcription Gli par la PKA. La phosphorylation des Gli par la PKA et GSK-3 conduit à la dégradation partielle de ces derniers par le protéasome générant ainsi des formes répressives des Gli (Gli-R) qui une fois translocuées dans le noyau inhibent les gènes cibles de la voie Hedgehog. La fixation d'un ligand de la famille Hedgehog sur le récepteur Patched entraîne une levée de la répression de Smoothened. Smoothened activé inhibe alors la protéine Sufu et recrute les protéines Gi. Ceci a pour conséquence d'inhiber la phosphorylation des Gli essentiellement par la PKA, permettant aux Gli sous leur forme entière d'entrer dans le noyau et d'activer les gènes cibles de la voie Hedgehog. Extrait modifié de Natalia A. Riobo, 2010).

Abbréviations : GSK 3 = glycogène synthase 3 ; PKA = c-AMP dépendant protein kinase ; PI3K = phosphoinositide 3 kinase.

Les travaux menés par Wolff *et al.* (2003) ont confirmé l'importance capitale de la voie HH dans la différenciation musculaire. En modulant cette voie par utilisation de doses croissantes de cyclopamine, un inhibiteur pharmacologique de Smo, ils ont montré que cette voie induit la différenciation de plusieurs cellules du lignage musculaire selon son niveau d'activité. En effet, un niveau maximal de l'activité de HH est requis pour la différenciation des MPs, alors qu'un niveau bien moindre est suffisant pour la différenciation des SSFs. Les MFFs montrent un statut intermédiaire, nécessitant seulement une activité dite submaximale de HH pour l'expression d'Eng. Seule la différenciation des FFs ne semble pas être dépendante de l'activité HH (Figure 18A).

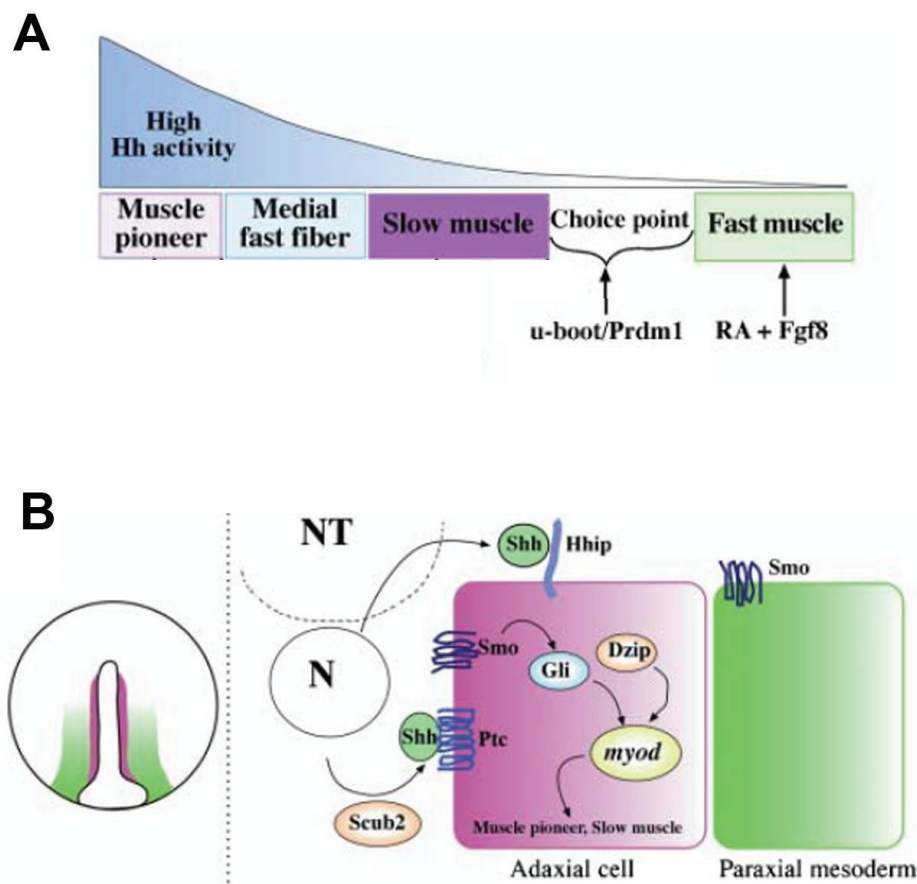


Figure 18. Régulation de la spécification des fibres musculaires par la voie Hedgehog

A- Différents niveaux d'activité HH sont requis pour la spécification de chaque type de cellule musculaire. Un niveau d'activation minimum (« choice point ») est nécessaire pour activer l'expression de *prdm1* et le devenir lent tandis qu'une activité submaximale ou maximale est requise pour l'expression des gènes *engrailed* dans les MPs et les MFFs. **B- Plusieurs acteurs moléculaires contribuent à établir le gradient médiolatéral d'activité HH.** Hhip permet la concentration des facteurs HH (essentiellement Shh) à la surface des cellules adaxiales, les empêchant de diffuser vers le mésoderme latéral. Scub 2 régule le transport extracellulaire des facteurs HH depuis la notochorde ainsi que leur stabilité. Dzip agit intracellulairement en régulant le transport des Gli du noyau vers le cytoplasme. N = notochorde NT = tube neural. Extrait modifié de Ochi et Westerfield., 2007

Par ailleurs, le blocage transitoire de cette voie par la cycloppamine, à des périodes précises du développement, a montré qu'en plus du taux d'HH, la fenêtre de temps et la durée d'exposition au signal HH sont également à considérer (Wolff *et al.*, 2003). En effet, la spécification des MPs requiert un signal HH précoce et continu, débutant avant le stade « shield ». En revanche, les MFFs, spécifiées plus tardivement lors de leur rapprochement vers la notochorde, ne dépendent pas du signal HH avant 18 hpf. Ainsi, on peut supposer que

le moment et la durée du signal vont conditionner la variabilité de réponse des cellules cibles au signal. Ceci permettrait d'expliquer pourquoi les précurseurs des MFFs, pourtant exposés à des doses supérieures en signal HH que celles requises pour la différenciation des SSFs, expriment seulement les facteurs Eng en faible quantité sans pour autant aller vers le lignage lent.

D'autres travaux ont montré que de nombreux niveaux de régulation impliquant divers acteurs moléculaires contribuent à la genèse du gradient d'activité de HH (**Figure 18 B**; revue de [Ochi and Westerfield, 2007](#)). Ils modulent par exemple la quantité de ligand disponible dans le milieu comme par exemple Scub 2 ([Ochi and Westerfield, 2007](#)), concentrent les facteurs HH à la surface des cellules adaxiales comme par exemple Hhip ou agissent en intracellulaire pour réguler l'activité d'effecteurs de la voie HH dans les cellules cibles comme par exemple Dzip ([Ochi and Westerfield, 2007](#)), miR-214 ([Flynt et al., 2007](#)) ou encore miR-30 ([Ketley et al., 2013](#)). L'ensemble de ces événements assure une régulation très fine permettant de contrôler avec précision, l'engagement d'un nombre exact de cellules dans chaque type musculaire, condition indispensable à la genèse d'un myotome fonctionnel.

Au niveau moléculaire, on peut se demander comment se traduisent concrètement les effets de la voie HH sur la différenciation musculaire. Il a été montré que cette voie n'est pas à l'origine de l'expression de *myoD* et de *myf5* mais nécessaire à leur maintien dans les cellules adaxiales ([Coutelle et al., 2001](#)). D'autre part, elle régule directement l'expression des facteurs Eng dans les MPs et est responsable de l'expression de *prdm1* qui, comme nous l'avons vu précédemment, représente un facteur de choix crucial dans l'engagement du lignage lent *versus* le lignage rapide. En effet, Prdm1 contrôle l'expression de *smyhc1* et de *prox1* et dans une moindre mesure, l'expression des facteurs Eng dans les MPs ([Roy et al., 2001](#) ; [Baxendale et al., 2004](#)). Par ailleurs, la série de modifications morphologiques que subissent les cellules adaxiales en début de segmentation est un processus directement lié à la voie HH ([Daggett et al., 2007](#)). En ce qui concerne le lignage rapide, il a été montré que cette voie est nécessaire à l'expression faible des facteurs Eng caractéristique des MFFs, sans pour autant jouer un rôle majeur sur l'induction du programme rapide dans les cellules du mésoderme présomitique latéral. Cependant, la voie HH agirait plus tardivement sur les cellules du dermomyotome en inhibant l'expression de *pax3/7* afin de promouvoir leur différenciation en cellules myogéniques ([Feng et al., 2006](#)).

2-Voies de signalisation des FGFs et des BMPs

La voie de signalisation induite par le FGF-8, dont l'expression est activée par l'acide rétinoïque, a été montrée comme inductrice de la myogenèse dans les cellules de la partie latérale des somites (Hamade *et al.*, 2005). D'autres travaux ont précisé que la voie du FGF-8 est nécessaire à l'induction de MyoD et à son maintien jusqu'à la différenciation terminale des FFs situées en position latérale, tandis que les FFs situées en position médiale, incluant les futures MFFs, sont totalement indépendantes de cette voie (Groves *et al.*, 2005).

La voie de signalisation induite par les BMPs interviendrait dans l'expression des facteurs Eng par les fibres MP et MFFs. Dolez *et al.* (2011) ont montré que l'absence d'activation de la voie des BMP dans la région centrale du somite est corrélée avec l'expression d'Eng dans les MPs et les MFFs. En effet, l'activation ectopique de la voie des BMPs dans les cellules de cette zone centrale se traduit par l'absence totale des cellules positives pour Eng (Dolez *et al.*, 2011).

Par ailleurs, une étude plus récente a démontré que si l'engagement des cellules adaxiales vers le lignage lent était le fait de la voie Hedhehog, la détermination du nombre de cellules adaxiales à se différencier par la suite en SSF *versus* MP dépendait d'un double gradient de signalisation FGF et BMP (Nguyen-Chi *et al.*, 2012). Les auteurs ont principalement montré que (1) l'activation de ces deux voies de signalisation inhibe l'expression d'Eng et donc le devenir MP et (2) qu'il existe un gradient antéro-postérieur de signalisation FGF et un gradient dorso-ventral de signalisation BMP dans le somite au moment de la formation des MPs. Ainsi, ces travaux ont permis d'établir le modèle selon lequel l'absence d'activation de la voie des FGFs dans la partie antérieure du somite et de la voie des BMPs dans la partie centrale du somite permettrait de définir une région antéro-centrale où la différenciation en MP est possible (**Figure 19**).

3- Le couple Sdf1/Cxcr4

La voie induite par la chimiokine Sdf1a et son récepteur Cxcr4a serait également impliquée dans la myogenèse rapide. Elle serait en partie responsable de l'induction d'expression des MRFs dans ces cellules (Chong *et al.*, 2007). Ce couple protéique a été avant tout décrit comme le moteur de la rotation du somite (Hollway *et al.*, 2007). En effet, en réponse à un changement d'expression antéro-latéral de *sdf1a*, les cellules de la région

antérieure du somite positives pour *pax7* et exprimant *cxcr4a*, migrent latéralement (**Figure 16**). L'origine du changement d'expression de *sdf1a* reste néanmoins indéterminée.

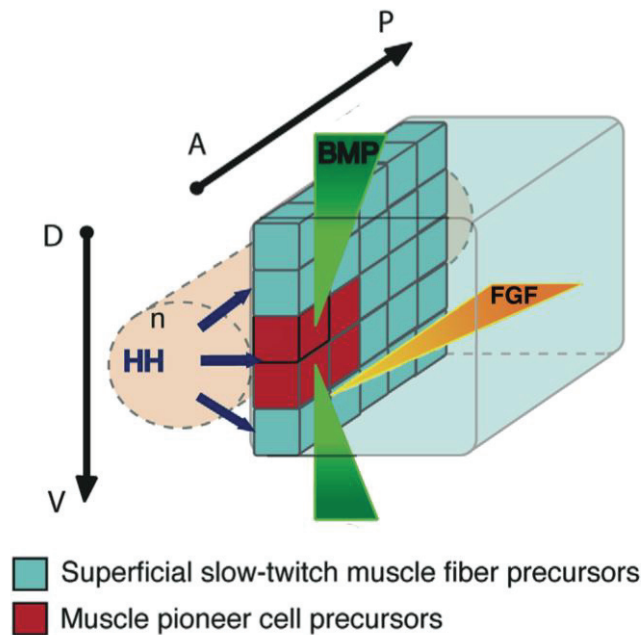


Figure 19. Un gradient antéro-postérieur de signalisation FGF et dorso-ventral de signalisation BMP détermine le nombre correct de cellules adaxiales qui se différencient en MPs. Modifié d'après Nguyen-Chi *et al.*, 2012

D- Implication des protéines d'adhérence et des molécules de la matrice dans la formation du myotome primaire

1 - Implication dans la dynamique cellulaire essentielle à la formation du myotome

Nous avons vu précédemment que la myogenèse des fibres lentes et rapides implique de nombreux changements morphologiques, des réarrangements positionnels et des événements de migration cellulaire notamment au moment de l'élongation des fibres rapides et la migration radiale des futures SSFs. Il est relativement bien admis que l'adhérence, la migration et les changements de formes cellulaires impliquent des interactions entre des récepteurs présents à la surface cellulaire et des molécules de la matrice extracellulaire. Pourtant peu de données à l'heure actuelle existent sur la contribution des molécules de la MEC dans la dynamique de formation du myotome primaire.

Cortés *et al.* (2003) ont montré que la migration radiale des myoblastes lents est corrélée à des changements d'expression des molécules d'adhésion N- et M-cadhérines au sein du myotome (**Figure 20**). Avant leur migration, les myoblastes lents expriment à leur surface la N- et la M-cadhérine alors que l'ensemble du mésoderme latéral exprime uniquement la N-cadhérine. Au cours de la migration des futures SSFs (à la surface desquelles la N- et M-cadhérines restent présentes), on observe dans le mésoderme latéral, en aval du front de migration, une expansion progressive de l'expression de la M-cadhérine au dépend de la N-cadhérine. Ces différentes vagues d'expression des N et M-cadhérines dans le myotome créent des environnements différents en aval et en amont du front de migration qui guident la migration des futures SSFs. Les cellules adaxiales qui se différencient en MPs perdent quant à elles l'expression de la M-cadhérine pour n'exprimer à leur surface que la N-cadhérine, ce qui peut expliquer leur absence de migration.

Concernant la myogenèse des fibres rapides, il a été montré que les laminines contribuent à l'élongation des fibres rapides. Les laminines présentes dans l'environnement des fibres rapides seraient essentielles à la stabilisation des protrusions émises au cours de la phase d'élongation (**Figure 20** ; Snow *et al.*, 2008b). Une étude ultérieure conduite par le même laboratoire a montré que l'élongation des fibres rapides dépend en réalité d'une coopération entre les laminines et les myoblastes lents en train de migrer dans le myotome (Peterson and Henry, 2010). En effet, l'absence de l'un ou l'autre des signaux entraîne une élongation retardée des fibres rapides tandis que l'absence des deux bloque toute élongation. Par ailleurs, la capture de la bordure somitique par la fibre en fin d'élongation serait également dépendante des laminines. En effet, des mutations dans les chaînes $\gamma 1$ ou $\beta 1$ des laminines, chez les mutants *wi390* et *grumpy* respectivement, se traduit par l'apparition de fibres géantes traversant plusieurs somites suggérant que les laminines présentes dans la bordure somitique fournissent un signal essentiel pour stopper l'élongation (**Figure 20** ; Snow *et al.*, 2008b). Un rôle similaire dans la capture de la bordure somitique a également été décrit pour la fibronectine (Snow *et al.*, 2008a).

Molécules	Processus	Modèle mécanique concernant son mode d'action
Cadhérines	Migration radiale des myoblastes lents	
Laminines	1 Elongation des myoblastes rapides 2 Capture de la bordure somitique	
	Spécification des cellules engrailed positives par modulation de la voie des BMPs	
Collagène XV-A	Spécification des MFFs par modulation de la voie HH	

Figure 20. Implication des molécules de la matrice extracellulaire dans la formation du myotome primaire. Figure de synthèse réalisée d'après les modèles présentés dans Cortés *et al.*, 2003 ; Snow *et al.*, 2008b ; Dolez *et al.*, 2011 ; Pagnon-Minot *et al.*, 2008.

2 - Régulation de voies de signalisation dans la différenciation musculaire

La spécification des différents types de fibres musculaires présentes dans le myotome repose sur l'établissement de gradients de signalisation précis (Hedgehog pour le contrôle du devenir lent *versus* rapide ; FGF et BMP dans la différenciation des MPs). Il est connu que les molécules de la MEC peuvent contribuer à l'établissement de ces gradients notamment par séquestration de facteurs diffusibles dans la MEC (Sarrazin *et al.*, 2011). Cependant, chez le

poisson zèbre, très peu de données existent concernant la contribution des molécules de la MEC dans la régulation des voies de signalisation orchestrant la formation du myotome.

Les travaux menés dans notre laboratoire ont montré que le collagène XV régulerait la diffusion de facteurs HH sécrétés par la notochorde (Pagnon-Minot *et al.* 2008)¹. La notochorde est entourée d'une matrice extracellulaire complexe structurée en un manchon périchordal dans lequel le collagène XV est fortement exprimé (détection des transcrits entre 10 et 24 hpf). L'effondrement de cet échafaudage matriciel à 10 hpf après inhibition du collagène XV dans l'embryon, provoque une dérégulation de la diffusion de SHH se traduisant par une augmentation du domaine d'expression de *ptc1* et du nombre de MFFs (**Figure 20**).

Par ailleurs, l'étude du mutant *sleepy (sly)* qui porte une mutation de la chaîne $\gamma 1$ des laminines a permis de montrer que les laminines participent à la spécification des MPs et des MFFs en permettant l'absence d'activation de la voie des BMPs dans la région centrale du somite (**Figure 20** Dolez *et al.*, 2011). En effet, chez le mutants *sly* une activation ectopique de la voie des BMPs dans le domaine central est observée et conduit à une absence totale de cellules positives pour Eng, soit les MPs et MFFs. Au niveau moléculaire, il a été démontré que les laminines, qui sont localisées au niveau du manchon périchordal et des lames basales entourant la moelle épinière et le myotome, modulent indirectement la voie des BMPs via les HSPGs (Dolez *et al.*, 2011). En effet, l'absence de la laminine $\gamma 1$ chez les mutants *sly* conduit à une absence totale des HSPGs dans le myotome et notamment dans le manchon périchordal où ils sont particulièrement enrichis. De plus, l'injection d'héparinase dans le myotome d'embryons sauvages de 6-10 somites a les mêmes conséquences phénotypiques que l'absence de la laminine $\gamma 1$ à la fois sur la formation des MPs et des MFFs et sur l'activation de la voie des BMPs dans la zone centrale.

Il semblerait par ailleurs que les HSPGs modulent les voies de signalisation qui ont des effets opposés sur l'expression d'Eng selon la fenêtre de temps considérée. Une autre étude a en effet montré que l'inhibition précoce de l'expression de l'héparane sulfate 6-O sulfotransférase, une enzyme intervenant dans la synthèse des héparanes sulfates, entraîne une augmentation du domaine d'expression d'Eng (Bink *et al.*, 2003). Cette étude indique également que les HSPGs participeraient plus largement à la myogenèse primaire en régulant l'expression de *myoD* dans le mésoderme latéral postérieur.

¹ Le collagène XV cité dans cette étude fait maintenant référence au collagène XV-A suite aux travaux de ma thèse (Bretaud *et al.*, 2011 ; Guillon *et al.*, résultats partie II)

Les CSPGs sont aussit fortement enrichis au sein du manchon périchordal et le long de la moelle épinière pendant la myogenèse primaire. Dolez *et al.*, (2011) ont montré qu'ils ne sont pour autant pas responsables de l'action des laminines sur la différenciation des cellules MPs et MFFs. Une autre étude a par ailleurs indiqué que l'inhibition de l'expression de la chondroïtine sulfate 4-O sulfotransférase, enzyme impliquée dans la synthèse des CS, ne perturbe pas le patron d'expression antéro-postérieur de *myoD* dans le mésoderme latéral mais entraîne en revanche le maintien anormal de l'expression de ce facteur jusqu'à 30 hpf (Mizumoto *et al.*, 2009). Par ailleurs, une courbure manifeste de la queue des embryons est observée témoignant de fortes altérations musculaires. Chez ces morphants, la morphologie générale de la notochorde est altérée. Elle présente un aspect ondulé alors que l'expression de *shha*, un marqueur de différenciation de la notochorde, n'est pas affecté.

IV - Mise en place de l'innervation motrice

A - Mise en place du patron d'innervation moteur chez le poisson zèbre : aspects descriptifs

Le système d'innervation motrice embryonnaire du poisson zèbre est un système relativement simple et très bien caractérisé. Il est composé de 2 types de neurones moteurs que l'on appelle les motoneurones primaires et les motoneurones secondaires qui diffèrent à la fois sur le plan anatomique, fonctionnel et développemental. Ce système d'innervation moteur à deux composantes mis en place au cours du développement perdure à l'âge adulte bien qu'il se complexifie de part l'augmentation progressive des ramifications formées par les motoneurones en réponse à l'évolution du myotome en croissance.

Les motoneurones primaires sont les premiers à se différencier au niveau du tube neural, à étendre des prolongements axonaux dans le myotome et à développer une activité électrique au cours du développement. D'un point de vue morphologique, ils présentent un corps cellulaire et un axone plus larges (environ 10 et 2 μm de diamètre respectivement) et une arborisation terminale plus complexe que les motoneurones secondaires. Ils produisent également des potentiels d'action de plaque motrice de plus grande amplitude. Les motoneurones primaires sont impliqués dans la nage à vitesse rapide et sont responsables des mouvements de grande ampleur comme ceux qui ont lieu dans le cadre d'un comportement de lutte ou aux prémices d'une fuite (startle escape response). Les motoneurones secondaires

sont quant à eux impliqués dans la nage lente et les mouvements de nage plus subtils (Liu et Westerfield, 1988 ; Westerfield et Eisen, 1988).

1 - Développement des motoneurones primaires

A 24 hpf, les muscles de chaque hémisegment sont innervés par 3 types de motoneurones primaires qui se distinguent par la position relative de leur corps cellulaire dans la moelle épinière et par leur territoire d'innervation au sein du myotome. Chaque motoneurone primaire exprime également une combinaison particulière de facteurs de transcription à homéodomaine de type LIM qui est uniquement dépendante de leur position dans la moelle épinière (Eisen, 1991 ; Appel *et al.*, 1995).

Le motoneurone primaire rostral (RoP) qui exprime les facteurs *islet1* et *lim3* et dont le corps cellulaire occupe la position la plus antérieure, innerve la partie centrale du myotome. Le motoneurone primaire caudal (CaP) qui exprime les facteurs *islet 2* et *lim3* et dont le corps cellulaire occupe la position la plus postérieure, innerve quant à lui la partie ventrale du myotome. Le motoneurone primaire médian (MiP) qui exprime les facteurs *islet1* et *lim3* et dont le corps cellulaire est situé entre celui du RoP et du CaP, innerve la partie dorsale du myotome (**Figure 21 A**). Ainsi, chaque fibre musculaire dans le myotome est innervée par un seul type de motoneurone primaire dont les territoires d'innervation ne se superposent pas.

La spécification des motoneurones primaires dans le tube neural débute vers la fin de la gastrulation (9 hpf). Ce n'est que vers 17-18 hpf, au moment de la migration des myoblastes lents dans le myotome, que les motoneurones primaires commencent à émettre un prolongement axonal sortant par une même racine ventrale de la moelle épinière située approximativement à la moitié antéro-postérieure de l'hémisegment. Dès lors les axones en croissance vont naviguer dans un environnement matriciel à l'interface entre les structures centrales (moelle épinière ou notochorde) et la surface médiale du myotome le long d'une étroite bande située à la moitié antéro-postérieure de l'hémisegment que l'on appellera par la suite le chemin axonal (Bernhardt *et al.*, 1998 ; Beattie, 2000). Les axones des 3 types de motoneurones suivent d'abord une trajectoire commune appelée chemin axonal commun, entre la moelle épinière et le myosepte horizontal. Arrivés au niveau du myosepte horizontal entre 19 et 22 hpf, les cônes de croissance des trois axones marquent une pause avant de poursuivre leur route. Cette zone du myosepte horizontal au niveau des MPs constitue une cible intermédiaire que l'on définit comme le point de choix à partir duquel les trois axones

divergent pour poursuivre leur chemin d'innervation respectif dans chaque partie du myotome.

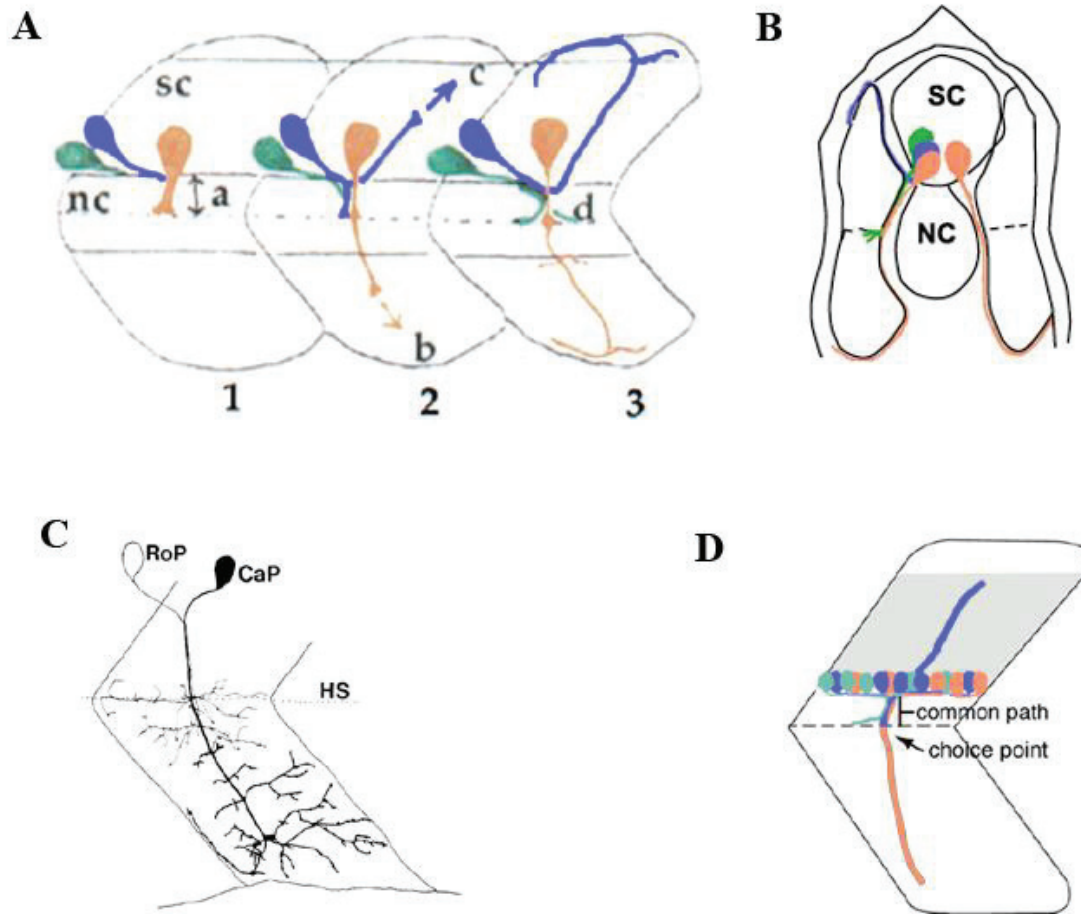


Figure 21. Développement des motoneurones primaires et secondaires

A- Diagramme schématique des trajectoires empruntées par les trois motoneurones primaires RoP (vert) MiP (bleu) et CaP (orange). Trois hémisegments sont ici représentés en vue latérale (antérieur à gauche). sc =spinal cord. Les trois axones quittent la moelle épinière par la même racine ventrale (1), traversent le « chemin axonal commun » (a) et divergent au niveau du myosepte horizontal qui constitue une cible intermédiaire (représenté par une ligne en pointillée) pour innerver différents territoires (2). L'axone du CaP s'étend ventralement (b) tandis que l'axone du MiP projette une seconde branche qui s'étend le long du myotome dorsal (c). A 26 hpf (3), Le MiP a rétracté sa branche le long du chemin commun et les axones du CaP et du MiP ont tourné latéralement. L'axone du RoP s'étend médio-latéralement à travers le myosepte horizontal. Modifié d'après Beattie *et al.*, 2000. **B-** Représentation schématique d'une coupe transversale réalisée au niveau du somite 3 en A et observée selon un angle de vue postérieur ce qui explique l'ordre de position inverse des motoneurones au niveau de la moelle épinière. Extrait de Rodino Kaplac et Beattie, 2004. **C-** Dessin d'observation composite d'une vue latérale (antérieure à gauche) de l'arborisation formée par l'axone du RoP (gris clair) et l'axone du CaP (noir) à 62 hpf après marquage individuel de ces deux motoneurones au DiI. Extrait de Liu et Westerfield, 1990. **D-** Schéma des motoneurones secondaires en vue latérale à 52 hpf. Les motoneurones secondaires se développent dans le trajet tracé par les motoneurones primaires en suivant le chemin axonal commun jusqu'au point de choix. A partir de là, les axones des motoneurones secondaires défasciculent pour former un nerf ventral équivalent du CaP (orange), un nerf dorsal équivalent du MiP (bleu) et un nerf médian équivalent du RoP (vert). Extrait modifié de Zeller *et al.*, 2002.

À partir de là, l'axone du CaP poursuit sa croissance le long de la surface médiale du myotome ventral, le MiP émet une nouvelle branche axonale en direction du myotome dorsal et l'axone du RoP croit médio-latéralement le long du myosepte horizontal. A 26 hpf, l'axone du CaP et du MiP ont atteint la partie la plus ventrale et la partie la plus dorsale de la surface médiale du myotome respectivement et ont tourné latéralement en direction de la périphérie du myotome (**Figure 21 B**). Le RoP a également terminé sa course le long du myosepte horizontal et atteint la surface du myotome. Par ailleurs, la branche formée par le MiP le long du trajet commun s'est rétractée. La croissance des motoneurones primaires se poursuit ensuite par une phase d'arborisation terminale qui dure au moins jusqu'à 170 hpf. Pendant cette phase, les trois motoneurones primaires étendent progressivement de nombreuses séries de ramifications latérales pour former une arborisation complexe qui innerve plus largement l'ensemble de la surface du myotome (**Figure 21 C**, [Liu et Westerfield , 1990](#)).

La plupart du temps on décrit uniquement ces trois types de motoneurones primaires dans la littérature. Toutefois, il faut souligner qu'il existe occasionnellement et transitoirement un quatrième type de motoneurone primaire en parallèle du CaP appelé motoneurone primaire variable (VaP). Similaire au CaP d'un point de vue développemental, le VaP croit en parallèle de ce dernier depuis la sortie de la moelle épinière jusqu'au point de choix. Puis, il reste bloqué à ce niveau avant de mourir vers 36 hpf tandis que l'axone du CaP poursuit son chemin en direction du myotome ventral ([Eisen et Melançon, 2001](#)).

2 - Développement des motoneurones secondaires

La spécification des motoneurones secondaires dans le tube neural débute plus tardivement pendant la segmentation (aux environs de 14-15 hpf). Il en résulte la formation d'une trentaine de motoneurones secondaires par hémisegment dont les corps cellulaires sont repartis sur l'ensemble de la longueur de la moelle épinière (**Figure 21 D**). Les axones des motoneurones secondaires entrent progressivement dans le myotome entre 26 hpf et 34 hpf par la même racine ventrale de la moelle épinière et suivent le trajet tracé par les motoneurones primaires à la surface médiale du myotome. Les cônes de croissance des motoneurones secondaires naviguent dans un premier temps selon un faisceau nerveux unique jusqu'au point de choix. À partir de là, les axones défasciculent dans trois directions pour donner naissance à un nerf ventral, un nerf dorsal, et un nerf médian qui empruntent respectivement les trajectoires spécifiques des axones du CaP, du MiP et du RoP ([Beattie, 2000](#)). La croissance des trois nerfs n'est pas synchronisée. A 52 hpf, le nerf ventral et le nerf

médian ont déjà atteint la partie la plus ventrale du myotome et la plus antérieure du myosepte horizontal tandis que le nerf dorsal atteint la partie la plus dorsale du myotome uniquement à 72 hpf. Par la suite, ces trois troncs nerveux principaux étendent des ramifications latérales pour progressivement innover l'ensemble fibres musculaires présentes au cœur du myotome.

B - Contrôle du développement axonal (axonogenèse)

Comme nous venons de le décrire, chaque motoneurone a une trajectoire clairement stéréotypée. Le CaP innerve toujours le myotome ventral alors que le MiP innerve toujours le myotome dorsal sans jamais changer de territoire d'innervation. Dès lors, comment expliquer une telle spécificité ? À la fin des années 80, à partir d'observations faites chez les autres vertébrés, Monte Westerfield et Judith Eisen proposent deux schémas développementaux pouvant conduire à une telle spécificité d'innervation ([Westerfield et Eisen, 1988](#)):

- (1) le motoneurone forme initialement plusieurs projections en direction de plusieurs cibles puis les projections inappropriées sont éliminées par la suite via un processus de sélection ou de compétition.
- (2) le motoneurone étend directement un unique axone vers la cible appropriée via un processus de croissance dirigée.

Les expériences de suivi individuel de motoneurones primaires conduites par la suite ont montré que les axones innervaient directement leur cible sans qu'il y ait de mort cellulaire ni de remodelage de l'arborisation axonale ([Westerfield et Eisen, 1988](#) ; [Liu et Westerfield 1990](#)). Chaque axone est ainsi capable de trouver son chemin par un processus de croissance dirigée sans jamais commettre d'erreur d'innervation. Dans la littérature, cela fait référence au concept de « pathfinding ».

Dès lors, on peut se demander quels sont les acteurs cellulaires et moléculaires qui contribuent au guidage des motoneurones primaires et secondaires?

Nous verrons dans ce chapitre que si les interactions entre les motoneurones peuvent contribuer à leur guidage mutuel, c'est avant tout le myotome qui assume un rôle particulièrement prépondérant dans le guidage des motoneurones, essentiellement parce qu'il

est en grande partie à l'origine de la composition de l'environnement moléculaire au sein duquel naviguent les cônes de croissance. Toutefois, il faut préciser que les informations à la fois à l'échelle cellulaire et moléculaire décrites dans ce chapitre concernent essentiellement le guidage des motoneurones primaires. Les molécules qui contrôlent spécifiquement le guidage des motoneurones secondaires sont en effet très peu documentées dans la littérature à ce jour.

1 - Interdépendance relative des motoneurones

L'axone du CaP est le premier à sortir de la moelle épinière et à atteindre les fibres MPs au niveau du myosepte horizontal. Il est ensuite suivi des axones du MiP et du RoP qui contactent étroitement l'axone du CaP dès leur sortie de la moelle épinière avant de suivre la même trajectoire commune. Ceci laisse penser que le CaP pourrait jouer un rôle essentiel dans le guidage du MiP et du RoP le long du trajet commun jusqu'au myosepte horizontal. Des expériences d'ablation du corps cellulaire du CaP ont cependant montré que les trajectoires axonales du MiP et du RoP ne sont pas perturbées en l'absence du CaP. De même, l'ablation du corps cellulaire du MiP et du CaP n'a aucune conséquence sur la croissance axonale du RoP (Eisen *et al.*, 1989). Ces expériences indiquent que chaque motoneurone primaire est capable de trouver son chemin indépendamment de la présence des autres motoneurones primaires.

La croissance des motoneurones secondaires semble dépendre quant à elle de la présence des motoneurones primaires. En effet, des expériences d'ablation des corps cellulaires des motoneurones primaires ont montré qu'en l'absence du MiP, la trajectoire du nerf dorsal est altérée tandis qu'en l'absence du CaP, la formation du nerf ventral est seulement retardée indiquant que les règles de guidage ne sont pas les mêmes en fonction des sous-populations de motoneurones (Pike *et al.*, 1992). Toutefois, il n'a pas été déterminé si le guidage des motoneurones secondaires dépendait d'interactions physiques avec les motoneurones primaires ou de modifications moléculaires du chemin de croissance induites par le passage des motoneurones primaires.

2 - Rôle du myotome dans le contrôle de l'axonogenèse

C'est l'étude du mutant *spadetail (spt)* qui a montré pour la première fois que le pathfinding des motoneurones primaires n'était pas un processus « cellule autonome », et que le myotome était la source des signaux indispensables au guidage des motoneurones primaires tout au long de leur trajectoire. *Spt* code pour un facteur de transcription de la famille T-box impliqué dans la formation du mésoderme (Amacher *et al.*, 2002). Les embryons *spt* se caractérisent par la présence de myotomes complètement désorganisés, déprivés de fibres pionnières. Ils présentent également de sévères défauts des motoneurones primaires tels qu'un retard de croissance, l'absence de projections après le point de choix, ou des projections erronées traversant la bordure somitique (Eisen et Pike, 1991). Des expériences de transplantation de motoneurones primaires provenant des mutants *spt* dans un myotome de fond génétique sauvage, ont indiqué que le défaut des motoneurones observé dans les mutants *spt* est la conséquence de la désorganisation du myotome puisque les motoneurones primaires transplantés se développent normalement (Eisen et Pike, 1991).

Des expériences de transplantation à l'échelle du myotome ont également démontré l'existence d'une régionalisation du myotome à l'origine de la spécificité de la croissance ventrale de l'axone du CaP. En effet, si on inverse le myotome ventral et dorsal vers 19 hpf, l'axone du CaP n'est pas capable de se développer dans le « nouveau » myotome ventral indiquant que les myotomes dorsaux et ventraux ne contiennent pas les mêmes informations au moment où l'axogenèse a commencé (Beattie *et al.*, 2000).

Le muscle lent joue un rôle particulièrement crucial dans la croissance des motoneurones primaires et secondaires. Chez les mutants *you-too (gli 2)* ne présentant pas de fibres musculaires lentes puisque la signalisation Hedgehog est abolie, les axones des motoneurones primaires et secondaires ne sortent pas de la moelle épinière bien que les motoneurones soient présents (Zeller *et al.*, 2002). Les MPs constituent une cible intermédiaire pour les axones en croissance. L'ablation laser des MPs a montré que ces cellules sont impliquées dans le contrôle de la croissance axonale en régulant notamment la formation de branchements le long de la trajectoire. Toutefois, elles ne sont pas déterminantes dans le choix de trajectoires spécifiques effectué par les axones du MiP et du CaP au niveau du point de choix (Melançon *et al.*, 1997). Les MPs participent néanmoins au processus de sélection qui a lieu entre le CaP et le VaP à ce niveau (Eisen et Melançon, 2001). Par ailleurs, les travaux menés par le laboratoire de Michael Granato, ont indiqué qu'un groupe de cellules adaxiales dorsales adjacentes au point de choix jouent un rôle instrumental à la fois dans la

croissance précoce des motoneurones primaires et dans le choix de trajectoire effectué par les axones du RoP et du CaP au niveau du point de choix (Zhang et Granato, 2000 ; Zeller et Granato, 1999). Comme nous le verrons par la suite, les cellules adaxiales sont en effet la source de nombreuses molécules impliquées dans le guidage des motoneurones primaires.

3 - Signaux moléculaires d'origine myotomale impliqués dans le guidage axonal des motoneurones primaires

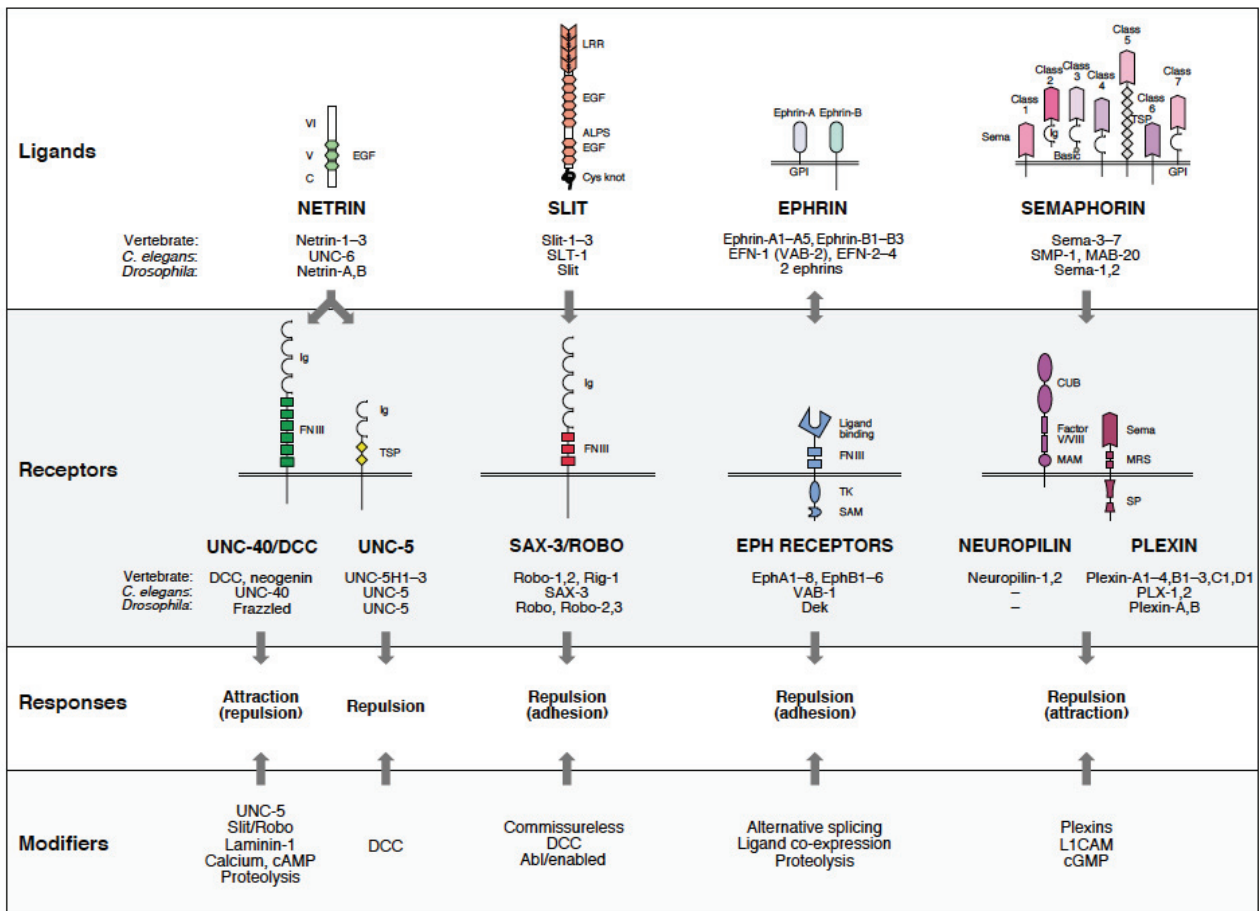
Au niveau moléculaire, le guidage axonal résulte de l'interaction entre des signaux moléculaires stimulants et/ou répulsifs présents dans l'environnement du cône de croissance et des récepteurs à la surface du cône de croissance qui conditionnent sa réceptivité à ces signaux (Tessier-Lavigne et Goodman, 1996).

Deux grandes catégories de signaux moléculaires produits par le myotome participent au guidage des motoneurones primaires :

- Des couples ligands-récepteurs classiquement impliqués dans le guidage axonal chez les autres vertébrés tels que les couples sémaphorine/complexe pléxine-neuropiline ou nétrine /DCC (**Figure 22**, Yu et Bargmann, 2001).
- Des molécules de la MEC qui agissent en tant que molécules de guidage ou contribuent à moduler l'environnement signalétique des motoneurones en croissance.

La croissance des axones des motoneurones primaires et secondaires se fait en trois étapes bien distinctes : la croissance le long de la trajectoire commune, la traversée des cibles intermédiaires, puis l'extension dans les trajectoires spécifiques le long du myotome ventral, dorsal et du myosepte horizontal. A chaque étape, les signaux du myotome sont régionalisés de façon à créer des environnements moléculaires tri-dimensionnels particuliers qui influencent finement la croissance axonale, dans le sens antéro-postérieur, médio-latéral et dorso-ventral. Une vue schématique des molécules qui sont présentes dans chaque région du myotome au moment du passage des motoneurones en croissance et que nous décrirons dans ce chapitre vous est présentée en **Figure 23**.

Il est important de préciser que les études présentées ci après se sont essentiellement focalisées sur les signaux moléculaires impliqués dans la croissance axonale du CaP dont la trajectoire est plus aisément observable que celle du MiP et du RoP, et que la plupart des signaux moléculaires présentés ont été identifiés à la suite d'un criblage génétique visant à découvrir de nouveaux gènes impliqués dans le guidage axonal (Beattie, 2000).



ALPS, agrin-laminin-perlecan-Slit domain; C, netrin C terminus; CUB, CI/Uegf/BMP-1 domain; DCC, deleted in colorectal cancer; EGF, epidermal growth factor; FNIII, fibronectin type III domain; GPI, glycosylphosphatidylinositol anchor; Ig, immunoglobulin domain; LRR, leucine-rich repeat; MAM, meprin/A5 antigen motif; MRS, Met tyrosine kinase-related sequence; RK, arginine/lysine-rich basic domain; SAM, sterile alpha motif; SP, 'sex and plexins' domain; TK, tyrosine kinase domain; TSP, thrombospondin domain; VI and V, homology to laminin domains VI and V, respectively.

Figure 22. Les grandes familles de couples ligands-récepteurs classiquement impliquées dans le guidage axonal. Les réponses de guidage typiques (ou alternatives entre parenthèses) et les modulateurs connus (modificateurs) associés à chaque voie de signalisation sont également renseignés. Extrait de Yu et Bargmann, 2001.

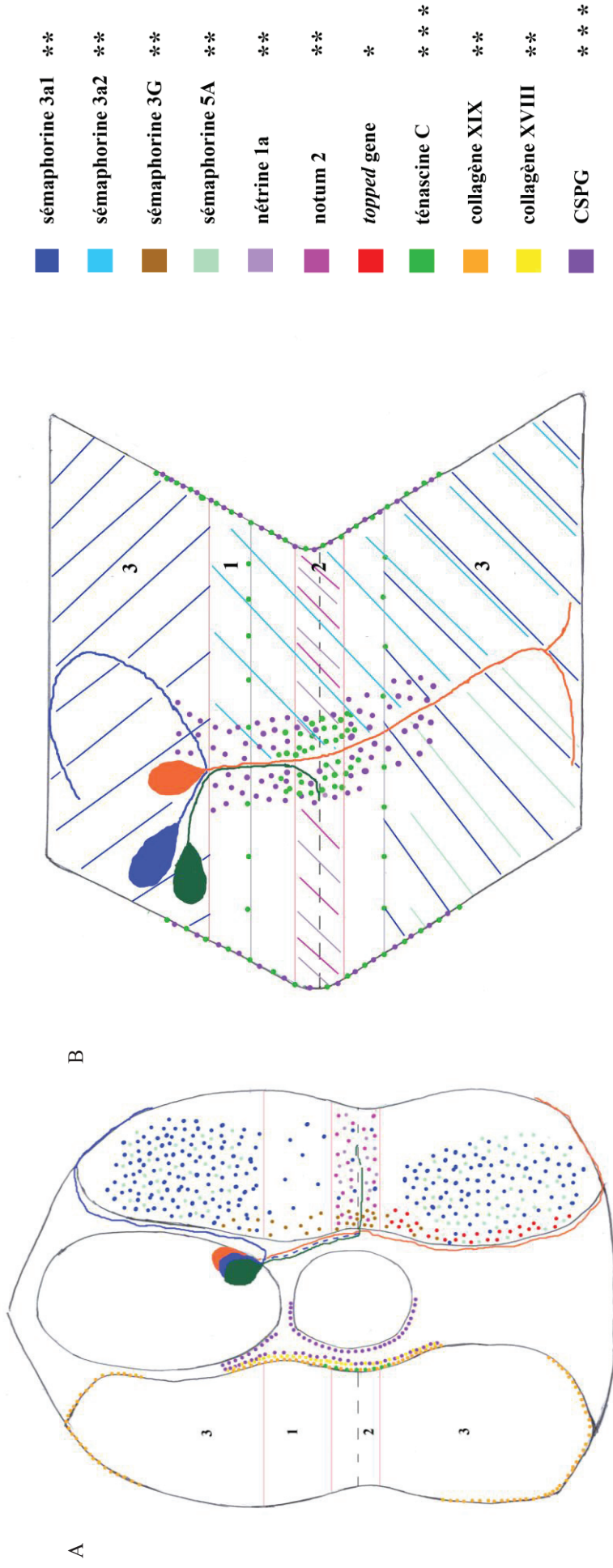


Figure 23. Environnement moléculaire des motoneurones primaires en croissance : régionalisation des signaux myotomaux

Représentations schématiques d'un somite en vue transversale (A) et en vue latérale (B) indiquant la position des signaux moléculaires qui conditionnent la croissance des motoneurones primaires à chaque phase de leur trajectoire. Sur la vue transversale, les molécules de la MEC présentes dans le chemin axonal sont représentées sur la moitié gauche du somite tandis que les molécules présentes dans le myotome sont représentées sur la moitié droite du somite. Les motoneurones primaires RoP, MiP et CaP sont respectivement représentés en vert, bleu (branche transitoire en pointillés) et orange. Les lignes roses délimitent les zones correspondant au chemin commun (1), au point de choix (2) et aux trajectoires spécifiques dorsales et ventrales (3). Le nombre d'étoiles figurant à côté de chaque molécule dans la légende est proportionnel au degré de certitude concernant la localisation exacte des molécules. *** = patron de localisation obtenu après immunomarquage de la protéine en question ; ** = position déduite d'après un patron d'expression génique obtenu en hybridation *in situ* ; * = position supposée d'après la complémentarité de phénotype mutant par transplantation de fibres musculaires sauvages. La vue latérale rend compte de la régionalisation antero-postérieure de certains signaux. Les lignes grises sur la vue latérale délimitent la notochorde. La ligne pointillée noire correspond au myosepte horizontal.

a - Signaux impliqués dans le guidage le long du chemin axonal commun

Plusieurs membres de la famille des sémaphorines contribuent à définir spatialement le chemin commun en créant des zones de répulsivité dans le myotome.

La **sémaphorine 3a1** est fortement exprimée à 22hpf dans les parties dorsales et ventrales du myotome tandis que peu présente dans la région centrale du myotome délimitant le chemin commun. Dans cette même région, on observe également un gradient d'expression médio-latéral de cette sémaphorine de sorte que les fibres musculaires immédiatement adjacentes à la notochorde ne l'expriment pas comparées aux fibres les plus latérales (Sato-Maeda *et al.*, 2006). Ainsi, ce patron d'expression particulier de la sémaphorine 3a1, délimite un véritable canal tridimensionnel dépourvu de sémaphorine 3a1 dans lequel se développent les 3 axones des motoneurones primaires jusqu'au myosepte horizontal. Lorsque l'expression de cette sémaphorine est inhibée, l'axone du CaP forme de nombreux branchements latéraux ectopiques le long du chemin commun et suit des trajectoires aberrantes. A l'inverse, l'expression ectopique de la sémaphorine 3a1 dans les cellules du myotome situées le long du chemin commun bloque la croissance de l'axone du CaP (Sato-Maeda *et al.*, 2006). Ainsi, la sémaphorine 3a1 présente dans les régions environnantes du chemin commun exercerait un effet répulsif restreignant la croissance axonale du CaP au chemin commun. La surexpression de la sémaphorine 3a1 n'a aucune conséquence sur la croissance du MiP et du RoP indiquant que seul l'axone du CaP est réceptif à cette sémaphorine. Au niveau moléculaire, les mêmes auteurs ont montré que cet effet répulsif de la sémaphorine 3a1 est dépendant du récepteur neuropiline 1a qui est spécifiquement exprimé par l'axone du CaP pendant sa croissance le long du chemin commun. Des interactions génétiques ont également indiqué que la sémaphorine 3a1 et la pléxine A3 interagissent fonctionnellement (Feldner *et al.*, 2007).

La **sémaphorine 3a2** (anciennement nommée sémaphorine Z1b) est quant à elle exprimée dans l'ensemble de la partie postérieure du somite (Roos *et al.*, 1999). La surexpression de cette sémaphorine bloque la croissance de l'axone du CaP dès sa sortie de la moelle épinière (Roos *et al.*, 1999). Par ailleurs des expériences d'interactions génétiques ont indiqué que la co-inhibition de la sémaphorine 3a2 et des récepteurs de type neuropiline 1a ou de la pléxine A3, induit à l'inverse un phénotype de branchements ectopiques ou de phénomène de sortie ectopique des axones du CaP depuis la moelle épinière (Feldner *et al.*, 2005 ; Feldner *et al.*, 2007). Ainsi, la sémaphorine 3a2 permettrait de définir une région de répulsivité qui empêcherait l'axone du CaP (1) de sortir de la moelle épinière en dehors de la

racine ventrale située à la moitié antéro-postérieure du somite et (2) de croître dans la partie postérieure du somite lorsqu'il navigue le long du chemin commun. Cet effet serait dépendant des récepteurs de type neuropiline 1a et pléxine A3.

Des analyses d'hybridation *in situ* ont montré que la **sémaphorine 3G** est exprimée par les cellules adaxiales. Il est donc possible que cette sémaphorine contribue au guidage des motoneurons primaires le long du chemin commun bien que pour le moment sa fonction dans un tel processus n'ait pas été évaluée (Stevens et Halloran, 2005).

Les molécules de la matrice extracellulaire présentes dans le chemin commun contribuent également au guidage des cônes de croissance.

En l'absence du **collagène XVIII**, les axones s'arrêtent précocement en cours de route entre la sortie de la moelle épinière et le myosepte horizontal indiquant un rôle pour ce collagène dans la croissance précoce des axones dès leur sortie de la moelle épinière (Schneider et Granato, 2006). *Coll8a1* étant exprimé par les cellules adaxiales uniquement avant leur migration radiale, il a été proposé que ce collagène serait déposé dans la matrice extracellulaire à la surface médiale des cellules adaxiales avant leur migration et servirait de guide moléculaire aux cônes de croissance naviguant ultérieurement dans le chemin commun. Concernant son mode d'action, les auteurs ont suggéré que le collagène XVIII interagirait avec les récepteurs de type RPTP (récepteurs à activité tyrosine phosphatase) présents à la surface des axones via des motifs glycosylés qu'il porterait à sa surface (Schneider et Granato, 2006).

Par ailleurs, les **CSPGs** sont fortement présents dans le chemin axonal à l'interface entre la notochorde et la surface médiale du myotome (Bernhardt *et al.*, 1998). L'étude des mutants *you too* a permis de prouver que ces CSPGs présents dans le chemin axonal sont produits par les cellules adaxiales (Zhang *et al.*, 2004). La digestion globale des groupements chondroïtine sulfate par des traitements chondroïtinase entraîne la formation de branches ectopiques de l'axone du CaP le long du chemin commun sans pour autant altérer la structure de la notochorde ou du muscle environnant. A l'inverse, l'injection ectopique de CS soluble inhibe la croissance de l'axone du CaP (Bernhardt et Schachner, 2000). Ceci suggère que d'une manière globale, la présence des CS dans le chemin axonal permet l'établissement d'une barrière répulsive inhibant la croissance de l'axone en dehors du chemin axonal. Dans cette étude, il est également mentionné que les CS n'interagiraient pas forcément directement avec les axones en tant que molécules de guidage à proprement parler mais contribueraient aussi à modifier l'environnement structural et signalétique des axones en croissance.

Toutefois la fonction des groupements CS ne semble pas si claire, puisque dans une autre étude, l'inhibition de l'expression de *Chsy1*, une enzyme clé de la biosynthèse des groupements CS n'a eu aucun effet sur la croissance axonale du CaP (*Zhang et al., 2004*).

b - Signaux impliqués dans le guidage au niveau du point de choix

Le gène *notum 2* est spécifiquement exprimé par les MPs entre 15 hpf et 24 hpf. Il code pour une alpha/beta hydrolase connue pour cliver les glypicans à ancre GPI qui peuvent lier et activer de nombreuses molécules de signalisation (*Cantu et al., 2013*). En l'absence de *notum 2*, la différenciation des MPs n'est pas affectée mais le cône de croissance du CaP reste bloqué au niveau de la cible intermédiaire. Cette croissance est restaurée quand on transplante des MPs sauvages (*Cantu et al., 2013*). De part la nature de son activité enzymatique, il a été proposé que *notum 2* permettrait à l'axone du CaP de poursuivre sa croissance dans le myotome ventral en altérant la sensibilité du cône de croissance du CaP à différents types de molécules de guidage présentes au niveau du point de choix.

La **nétrine 1a** est également exprimée par les MPs au moment où l'axone du CaP sort de la moelle épinière à 18 hpf suggérant que les cônes de croissance pourraient être attirés jusqu'aux MPs par la nétrine 1a (*Lauderdale et al., 1997*). Cependant, une étude plus récente a montré que la nétrine 1a n'est pas nécessaire à la croissance des motoneurons primaires le long du chemin commun, mais est responsable du processus de sélection qui a lieu entre le CaP et le VaP au niveau des cibles intermédiaires (*Hale et al., 2011*).

Comme nous l'avons vu précédemment, la **N-cadhérine** reste exprimée à la surface des MPs à 24 hpf tandis qu'elle est réprimée à la surface des myoblastes lent en cours de migration (*Cortés et al., 2003*). Une étude plus récente a également montré que la N-cadhérine est exprimée par les MPs et les motoneurons primaires au moment où les axones moteurs atteignent le myosepte horizontal (*Brusés, 2011*). En absence de cette protéine d'adhérence, les axones du CaP et du RoP se développent normalement jusqu'au myosepte horizontal, mais forment cependant des branchements ectopiques une fois arrivés à ce niveau. Leurs trajectoires respectives le long du myotome ventral et du myosepte horizontal ne semblent pour autant pas être affectées, bien que l'on observe également des branchements ectopiques le long de la trajectoire axonale ventrale du CaP (*Brusés, 2011*). Par ailleurs, aucun défaut du MiP n'a été observé en l'absence de N-cadhérine. Ainsi la N-cadhérine régulerait le phénomène de branching des axones du CaP et du RoP sans pour autant

participer au choix de trajectoire que les axones effectuent au niveau des cibles intermédiaires.

Les molécules de la matrice extracellulaire jouent également un rôle important dans le guidage des cônes de croissance au niveau du myosepte horizontal.

La ténascine C est exprimée par les cellules adaxiales dès 16 hpf et est présente dans le chemin axonal sous la forme d'un nuage autour du myosepte horizontal au moment de la croissance des motoneurones primaires dans le myotome (Schweitzer *et al.*, 2005). Des expériences de surexpression et d'inhibition d'expression de la ténascine C indiquent qu'elle exerce un effet répulsif sur la croissance axonale empêchant notamment la formation de branches latérales par l'axone du CaP au niveau du myosepte horizontal (Schweitzer *et al.*, 2005).

Coll19a1 est également exprimé par les cellules adaxiales à 19 hpf, pendant la croissance axonale. Chez les mutants *stumpy* qui sont des mutants de *coll19a1*, l'axone du CaP s'arrête systématiquement au point de choix pendant un temps anormalement long et poursuit rarement sa route en direction du myotome ventral. Ainsi, le collagène XIX semble être essentiel pour que le cône de croissance puisse quitter les cibles intermédiaires et s'étendre dans les régions distales (Beattie *et al.*, 2000 ; Hilario *et al.*, 2010).

c - Signaux impliqués dans le guidage le long des trajectoires spécifiques

La sémaphorine 5A est impliquée dans la croissance ventrale de l'axone du CaP (Hilario *et al.*, 2009). A la fois exprimée dans le myotome dorsal et le myotome antéro-ventral entre 18 hpf et 24 hpf, l'inhibition de l'expression de cette sémaphorine se traduit par un retard de croissance de l'axone du CaP dans le myotome ventral et par un phénomène de branching aberrant du CaP axone. Ainsi, la sémaphorine 5A est présentée comme une molécule bifonctionnelle qui stimule à la fois la croissance de l'axone du CaP dans la partie ventrale du myotome et exerce un effet répulsif dans l'environnement de l'axone afin qu'il puisse migrer dans son chemin bien défini. Au niveau moléculaire, cette bifonctionnalité de la sémaphorine 5A est due à la présence d'un domaine TSR (trombospondin repeat) responsable de son effet attractif sur la croissance de l'axone et d'un domaine sema responsable de son effet répulsif (Hilario *et al.*, 2009). D'autre part, des expériences d'interaction génétique par inhibition simultanée de l'expression de la sémaphorine 5A et des pléxines 3A, B1A, ou B1B, ont montré une interaction fonctionnelle uniquement avec la pléxine 3A suggérant que cette pléxine pourrait être un récepteur de la sémaphorine 5A (Hilario *et al.*, 2009). Toutefois, cette

interaction fonctionnelle entre la sémaphorine 5A et la pléxine 3A ne permettrait pas de contrôler le guidage axonal dans le myotome ventral, mais plutôt de définir les points de sortie des axones dans la moelle épinière.

Comme nous l'avons précédemment indiqué, **la sémaphorine 3a1** est également présente dans la partie ventrale du myotome de 19 hpf à 24 hpf. Cependant, l'absence de la sémaphorine 3a1 ne perturbe pas la croissance ventrale de l'axone du CaP, indiquant qu'il n'est plus réceptif à cette sémaphorine au moment où il arrive dans la partie ventrale du myotome (Sato-Maeda *et al.*, 2006). Cet exemple illustre bien le fait que le guidage axonal dépend à la fois de la présence de molécules de guidage et aussi de la réceptivité de l'axone par rapport à ces signaux.

L'étude du mutant *topped* a permis de mettre en évidence un autre gène impliqué dans la croissance de l'axone du CaP dans le myotome ventral (Rodino-Kaplan et Beattie, 2004). Les mutants *topped* se caractérisent par un retard de croissance de l'axone du CaP dans la partie ventrale du myotome ainsi qu'un retard de formation du nerf ventral, sans défaut de croissance du MiP. La complémentation du phénotype de retard de croissance ventrale du CaP par transplantation de fibres musculaires sauvages a montré que le gène *topped* est produit par des fibres musculaires rapides situées à proximité de la surface médiale du myotome ventral. Ceci est plutôt en faveur d'un rôle du gène *topped* dans la croissance ventrale du CaP axone plutôt qu'un rôle dans la traversée des cibles intermédiaires comme cela pouvait être le cas de *notum 2*. Pour l'instant, le gène *topped* n'a pas été identifié et deux hypothèses concernant son mode d'action sur le guidage de l'axone du CaP en ventral sont possibles : soit le gène *topped* est une molécule de guidage qui exerce une action directe sur le cône de croissance du CaP soit il exerce une action indirecte par modulation du réseau d'autres molécules impliquées dans le guidage du CaP en ventral.

A l'heure actuelle, il n'existe pas d'information concernant les signaux qui guident la croissance axonale du RoP le long du myosepte horizontal ou du MiP dans le myotome dorsal à l'exception du rôle joué par le collagène XIX dans la croissance de l'axone du MiP. En effet, *coll19a1* est exprimé au niveau des régions dorso-latérales et ventro-latérales au moment où le MiP et le CaP tournent latéralement. Chez les mutants *stumpy*, l'axone du MiP s'arrête au niveau de la bordure dorso-latérale du myotome au moment où il redescend en direction ventrale chez les embryons sauvages (Hilario *et al.*, 2010).

d- Modulation de l'environnement moléculaire présent dans le chemin axonal : activité des gènes *diwanka/lh3* et *unplugged /MuSK*

diwanka / lh3

Des études sur le mutant *diwanka* ont montré pour la première fois que des glycosylations de protéines de la MEC étaient indispensables à la croissance axonale précoce entre la moelle épinière et le myosepte horizontal. Chez les mutants *diwanka*, les axones des motoneurons primaires s'arrêtent systématiquement précocement le long du chemin commun, se ramifient anormalement au niveau du myosepte horizontal, ou ne sortent pas de la moelle épinière indiquant un rôle crucial de ce gène dans les étapes précoces de la croissance axonale. Par ailleurs, des expériences de complémentation de mutation ont montré que l'activité du gène *diwanka* est fournie par des cellules adaxiales prémigratoires situées en position dorsale du point de choix (Zeller et Granato, 1999).

Le clonage positionnel du gène *diwanka* a indiqué que ce gène code pour la LH3, une enzyme multifonctionnelle qui possède des domaines lysyl hydroxylase et glycosyltransférase (Schneider et Granato, 2006). La forte présence de motifs Gly-X-Y au sein des collagènes font de ces protéines matricielles des substrats majoritaires des enzymes de type LH qui catalysent l'addition de groupement hydroxyles sur les lysines présentes dans ce type de site consensus. Il a été montré que c'est le domaine glycosyltransférase qui est responsable du rôle de *diwanka/LH3* dans la croissance axonale précoce indiquant un rôle crucial des glycosylations dans ce processus (Schneider et Granato, 2006). Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que *lh3* et *coll8a1* sont exprimés en même temps par les cellules adaxiales prémigratoires. De plus, l'inhibition de l'expression de *coll8a1* qui se traduit par un phénotype d'arrêt de croissance précoce qui touche 10 % des axones du CaP, phénocopie partiellement le mutant *diwanka* (Schneider et Granato, 2006). Les auteurs proposent un modèle selon lequel le collagène XVIII serait un substrat de LH3. Des glycosylations du collagène XVIII dépendantes de l'activité glycosyltransférase de LH3 permettraient l'interaction de ce collagène avec des récepteurs de type RPTP à la surface de l'axone, nécessaire à sa croissance le long du chemin commun (Figure 24). Etant donné que l'inhibition de l'expression de *coll8a1* ne phénocopie que partiellement le mutant *diwanka*, ceci indique que *diwanka* possède des substrats supplémentaires qui n'ont pas encore été identifiés. Toutefois, il a été montré que les patrons de localisation de différents composants

du chemin axonal tels que les laminines, les groupements CS et HS ne sont pas altérés en l'absence de l'activité de la LH3 (Schneider et Granato, 2006).

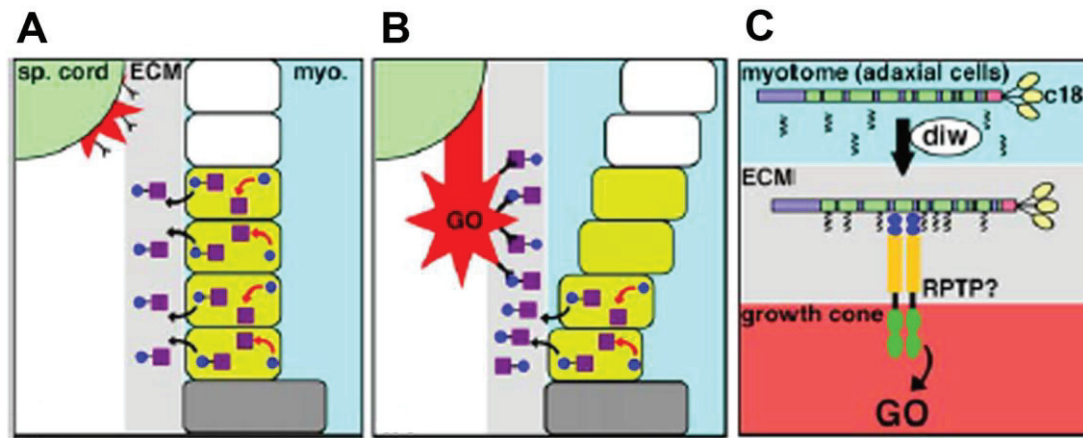


Figure 24. Modèle proposé concernant le mode d'action du gène *diwanka* dans la croissance des motoneurones primaires.

A-Avant la migration des cellules adaxiales (vert), et la croissance des motoneurones dans le myotome (rouge), Diwanka (LH3) catalyse l'ajout de motifs sucrés (cercles bleus) sur des substrats protéiques (carrés violets). Ces protéines modifiées par diwanka sont ensuite sécrétées dans le futur chemin axonal (ECM gris) B- Quand les cellules adaxiales commencent leur migration radiale, les protéines modifiées par Diwanka le long du chemin axonal signalent au cône de croissance de sortir de la moelle épinière et de croître en périphérie. C- Dans les cellules adaxiales, le collagène XVIII (c18) est glycosylé par diwanka et sécrété dans la MEC le long du chemin axonal. Des récepteurs présents à la surface du cône de croissance (possiblement des récepteurs de type RPTP) interagissent avec le collagène XVIII ce qui fournit un signal nécessaire à la progression du cône de croissance en direction du myosepte horizontal. Extrait de modifié de Schneider et Granato, 2006.

unplugged / MuSK

L'étude des mutants *unplugged* a montré que l'activité du gène *unplugged* est cruciale dans le choix effectué par le RoP et le CaP au niveau des cibles intermédiaires. En effet, chez les mutants *unplugged*, les axones du RoP et du CaP atteignent le point de choix mais l'axone du CaP reste bloqué au niveau du myosepte horizontal tandis que l'axone du RoP croît anormalement en direction du myotome ventral. La croissance axonale du MiP dans le myotome dorsal ne semble quant à elle pas dépendre d'*unplugged* indiquant une activité sélective de ce gène sur le guidage axonal des différents motoneurones (Zhang et Granato, 2000). Des expériences de complémentation de phénotype par transplantation de fibres musculaires sauvages ont par ailleurs indiqué que l'activité du gène *unplugged* est fournie par un groupe de cellules adaxiales prémigratoires situées en position dorsale du point de choix (Zhang et Granato, 2000).

Le clonage positionnel du gène *unplugged* a montré que ce gène code pour l'orthologue du récepteur MuSK (Muscle Specific Kinase) des vertébrés (Zhang *et al.*, 2004). Le récepteur MuSK présent à la surface des fibres musculaires squelettiques est connu pour médier les signaux de l'agrine, un HSPG produit par les motoneurones qui est essentiel dans la formation de la jonction neuromusculaire chez les vertébrés (Wu *et al.*, 2010). Chez le poisson zèbre, le gène *unplugged* code pour trois isoformes, mais seulement deux d'entre elles contiennent le domaine kinase responsable de son activité signalétique, domaine au niveau duquel sont retrouvées toutes les mutations *unplugged* répertoriées à ce jour (**Figure 25**) (Zhang *et al.*, 2004). L'isoforme FL (full length) qui contient à la fois le domaine kinase et le domaine extracellulaire de réponse à l'agrine est responsable du rôle d'*unplugged*/MuSK dans la formation de la jonction neuromusculaire (Lefebvre *et al.*, 2007). L'isoforme SV1 qui ne contient pas le domaine de réponse à l'agrine est quant à elle responsable de la fonction d'*unplugged*/MuSK dans le guidage axonal (Zhang *et al.*, 2004). Des analyses d'hybridation *in situ* ont indiqué que ces deux isoformes sont exprimées par les cellules adaxiales prémigratoires en accord avec les résultats de complémentation précédemment obtenus (Zhang *et al.*, 2004).

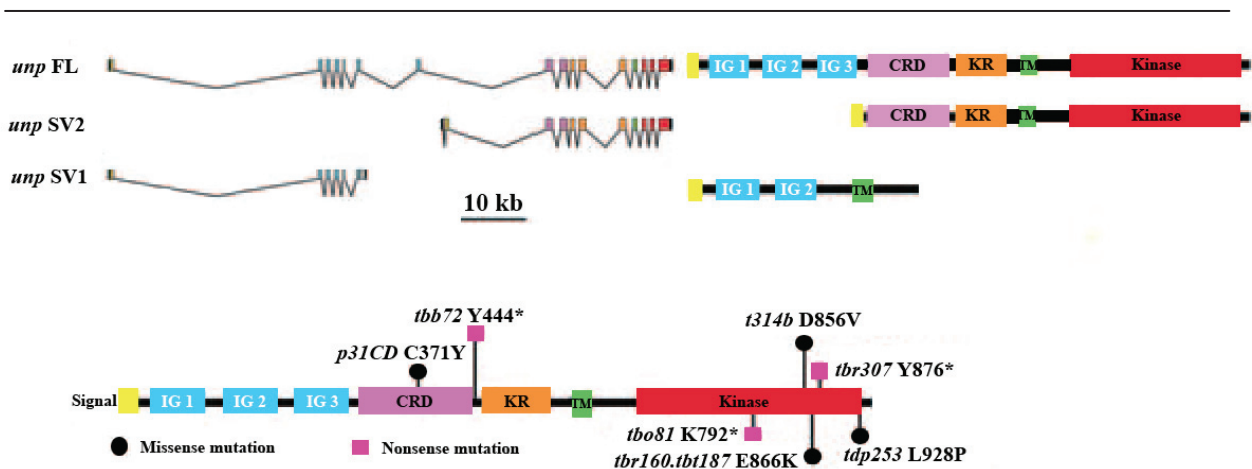


Figure 25. Structure des trois transcrits *unplugged* et de leurs protéines correspondantes avec la position des mutations présentes dans les différents allèles mutants de *unplugged*

Extrait modifié de Zhang *et al.*, 2004

Concernant le mode d'action à l'échelle moléculaire du gène *unplugged* sur le guidage axonal, on peut exclure l'hypothèse que *unplugged* soit une molécule de guidage pour les motoneurones. En effet, MuSK est un récepteur qui est exprimé à la surface des cellules adaxiales et qui n'est pas sécrété. Or, les cellules adaxiales migrent dans la partie latérale du

myotome au moment de la sortie du cône de croissance en périphérie ce qui semble exclure une interaction directe entre MuSK et le cône de croissance. L'absence notable de téna-scine C et de groupements CS dans le chemin axonal observée chez les mutants *unplugged* suggère plutôt que *unplugged* participerait au guidage axonal en générant avant la migration des cellules adaxiales un ensemble de modifications de la MEC présente dans le chemin axonal. Ces modifications seraient essentielles pour le choix effectué par la suite par le RoP et le CaP au niveau du myosepte horizontal (**Figure 26**) (Zhang *et al.*, 2004 ; Schweitzer *et al.*, 2005).

Par ailleurs de résultats récents indiquent que l'activité du gène *unplugged* sur le guidage axonal est sous le contrôle de la voie Wnt (Jing *et al.*, 2009).

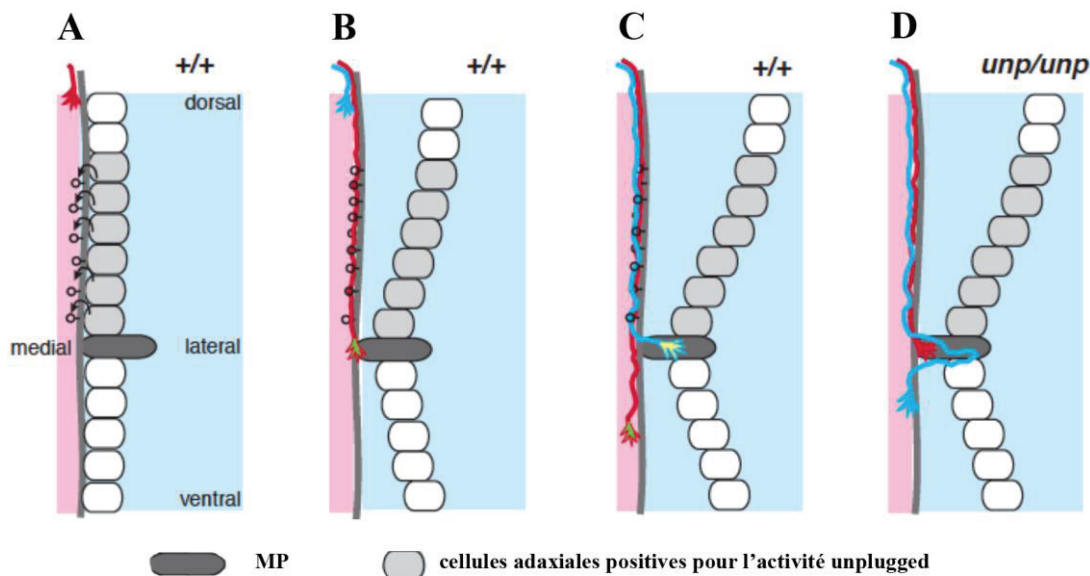


Figure 26. Modèle proposé concernant le mode d'action du gène *unplugged* dans la sélection au point de choix.

A- Avant leur migration, les cellules adaxiales dorsales adjacentes au point de choix exprimant *unplugged/MuSK* (grises) modifient l'environnement moléculaire du chemin axonal en y déposant des molécules de la MEC comme les CSPG ou la téna-scine C sous l'action d'*unplugged/MuSK*. **B-** Au moment où les cônes de croissance du CaP (rouge) suivi du RoP (bleu) entrent dans le chemin axonal, les cellules adaxiales migrent à la périphérie. **C-** Avant d'atteindre le point de choix, les cônes de croissance rencontrent les signaux moléculaires déposés par les cellules adaxiales dans le chemin axonal avant leur migration ce qui fournira aux axones du RoP et au CaP la compétence de sélectionner leur future trajectoire (indiqué par le changement de couleur des cônes de croissance). **D-** En l'absence de l'activité d'*unplugged (unp)*, les axones CaP et du RoP ne rencontrent pas dans le chemin axonal les signaux déposés par les cellules adaxiales aiguillant leur future prise de décision au niveau du point de choix. En conséquence, le CaP s'arrête au niveau du myosepte horizontal et le RoP projette dans la partie ventrale du myotome. Extrait modifié de Zhang et Granato, 2000.

4 - Signaux moléculaires impliqués dans le guidage des motoneurones secondaires

La majorité des études qui traitent des signaux moléculaires impliqués dans le guidage des motoneurones chez le poisson zèbre ce sont focalisés sur le guidage des motoneurones primaires et il existe très peu d'informations à ce jour concernant les signaux moléculaires qui contribuent au guidage des motoneurones secondaires.

L'analyse des motoneurones secondaires chez les mutant *you-too*, *diwanka*, et *unplugged* indique que le guidage des motoneurones primaires et secondaires dépend en partie des même signaux moléculaires d'origine myotomale. En effet, chez les mutants *you-too* les motoneurones secondaires ne projettent pas d'axone en dehors de la moelle épinière indiquant un rôle crucial des cellules adaxiales dans la croissance axonale des motoneurones secondaires (Zeller et Granato, 2002). Les mutants *diwanka* présentent des défauts multiples des motoneurones secondaires incluant des erreurs de guidage le long du chemin commun (formation de 2 à 3 nerfs par hémisegment sortant par des racines distinctes de la moelle épinière) et des erreurs de guidage au sein des trajectoires spécifiques (axones ventraux qui croisent la bordure somitique et qui projettent dans les somites voisins) indiquant que ce gène contrôle de multiples aspects de la croissance des motoneurones secondaires (Zeller et Granato, 2002). Chez les mutants *unplugged*, on observe des erreurs de trajectoire similaires à celles observées pour les axones du RoP et du CaP avec un nerf médian qui part en ventral et un nerf ventral qui s'arrête ou forme une branche aberrante au niveau du myosepte horizontal, indiquant qu'*unplugged* est également impliqué dans la décision prise par les motoneurones secondaires au niveau du point de choix. Il a également été observé sur certains hémisegments la présence d'un nerf supplémentaire sortant par une seconde racine ventrale indiquant également un rôle pour *unplugged* dans le guidage des axones des motoneurones secondaires dès leur sortie de la moelle épinière (Zhang et al., 2001).

On pourrait supposer que les défauts des motoneurones secondaires observés chez ces mutants pourraient être la conséquence indirecte d'un défaut de croissance des motoneurones primaires. Toutefois, les défauts des motoneurones secondaires observés dans ces mutants sont bien plus drastiques que ceux observés après ablation des motoneurones primaires (Pike et al., 1992) suggérant que le guidage des motoneurones secondaires dépend directement de signaux moléculaires faisant défauts chez ces mutants.

D'autre part, il a été montré que la **neuroline** (ou DM /GRASP) joue un rôle important dans la réception des signaux impliqués dans le guidage des motoneurones secondaires à

chaque étape de leur trajectoire (Ott *et al.*, 2001). La neuroline est une protéine transmembranaire possédant 5 domaines immunoglobulines extracellulaires qui est spécifiquement et transitoirement exprimée par les motoneurones secondaires. Lorsque l'on bloque la fonction de la neuroline avec des anticorps bloquants, les motoneurones secondaires forment des branches ectopiques le long du chemin commun. Par ailleurs, la formation du nerf médian est inhibée et le nerf dorsal est complètement désorganisé avec des axones soit qui vont en direction ventrale, soit qui forment un paquet diffus sans croître dans une direction précise mais qui dans tous les cas ne forment jamais de projection dorsale indiquant que les axones ne reçoivent plus les signaux appropriés pour la croissance dans cette direction.

C - Etablissement des contacts synaptiques : Formation de la jonction neuromusculaire

La mise en place d'un système neuromusculaire fonctionnel requiert l'établissement d'une communication entre le muscle et le motoneurone qui l'innerve. Cette communication se fait au niveau d'une synapse particulière que l'on appelle la jonction neuromusculaire (JNM) ou plaque motrice. Chez les vertébrés, la jonction neuromusculaire est une synapse chimique cholinergique qui est composée d'un élément présynaptique au niveau de la terminaison axonale et d'un élément post-synaptique à la surface de la fibre musculaire, tous deux séparés par une fente synaptique (Wu *et al.*, 2010). L'élément présynaptique est caractérisé par la présence de vésicules remplies d'acétylcholine que l'on peut mettre en évidence avec l'anticorps SV2. L'élément post-synaptique au niveau de la membrane plasmique de la cellule musculaire est caractérisé par la présence d'une grande concentration de récepteurs à acétylcholine (AChR) de type nicotinique qui sont regroupés sous la forme de clusters et que l'on peut visualiser à l'aide d'une drogue spécifique qui est l'alphabungarotoxine (Panzer *et al.*, 2005).

Chez le poisson zèbre, la mise en place des contacts synaptiques entre les motoneurones primaires et les fibres musculaires se fait en trois temps bien distincts:

1- la formation de clusters d'AChR aneuxaux ou « prepatterning » qui se forment à la surface des cellules adaxiales prémigratoires en l'absence d'innervation.

2- la formation de JNMs focalisées sur le plan équatorial que l'on appelle aussi des JNMs « en passant » qui se forment avec les fibres musculaires lorsque l'axone du motoneurone primaire croit le long de la surface médiale du myotome.

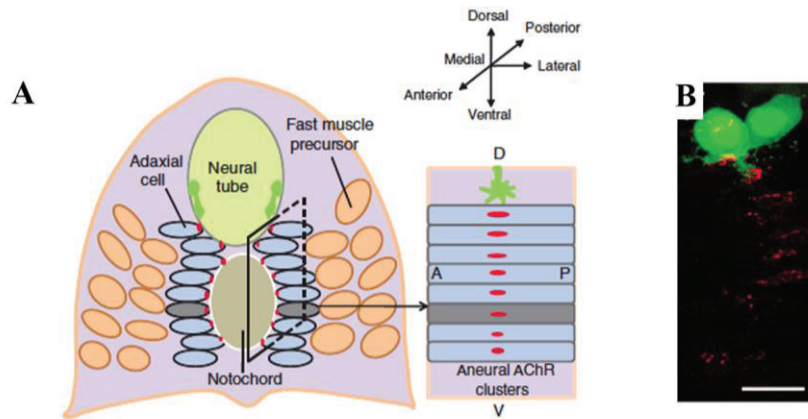
3- la formation de JNMs distribuées sur l'ensemble de la fibre musculaire que l'on appellera des JNMs éparses ou localisées au niveau du myosepte vertical que l'on définit comme des JNMs myoseptales. Ces deux types de JNM se forment quand les axones innervent plus largement le myotome.

Il est intéressant de noter que la plupart des JNM présentes chez les mammifères correspondent aux JNM « en passant » observées chez le poisson zèbre et qu'à l'inverse les JNMs éparses et myoseptales majoritairement observées chez le poisson zèbre représentent une faible proportion des JNMs des mammifères (Lefebvre *et al.*, 2007).

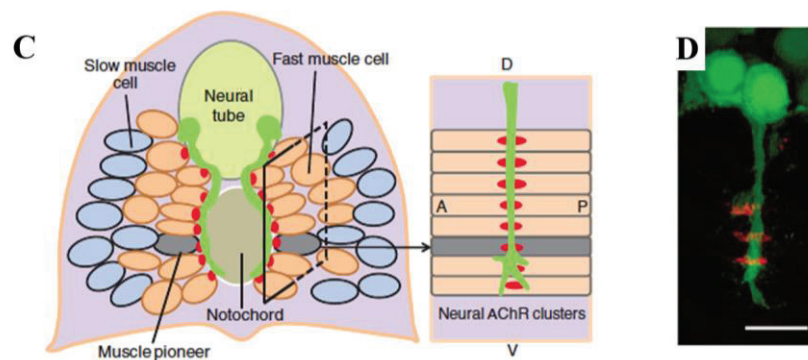
1 - Prepatterning

L'événement de « prepatterning » correspond à la formation de clusters d'AChR en l'absence de toute innervation que l'on définit comme des clusters d'AChR aneuxaux. Ces clusters aneuxaux se forment entre 14 hpf et 16 hpf et s'organisent en une large bande diffuse située à la surface médiale du centre de chacune des cellules adaxiales prémigratoires (**Figure 27 A-D**). Ces clusters transitoires se dispersent au moment de la migration des cellules adaxiales vers la périphérie à l'exception de ceux présents sur les MPs qui seront incorporés aux JNM formées au moment du contact avec les axones en croissance (Panzer *et al.*, 2005 ; Flanagan-Steet *et al.*, 2005). La fonction précise de cet événement du « prepatterning » reste peu connue à l'heure actuelle. Le « prepatterning » ne serait en tout cas pas indispensable à la formation des JNMs puisqu'il a été montré que les JNMs « en passant » sont capables de se former en l'absence des clusters aneuxaux chez les mutants *unplugged*. En revanche, les JNMs formées dans ces conditions ne sont pas confinées à la région centrale suggérant que le rôle du « prepatterning » serait plutôt de définir une région au centre de la fibre musculaire au niveau duquel la terminaison nerveuse établira un contact synaptique (Jing *et al.*, 2009 ; Wu *et al.*, 2010). La formation de ces clusters aneuxaux est sous la dépendance de l'activité du gène *unplugged/MuSK*, qui est contrôlé par la voie Wnt (Jing *et al.*, 2009 ; Gordon *et al.*, 2012).

Clusters d'AChR aneuxaux



« En passant » JNMs



JNMs éparses et myoseptales

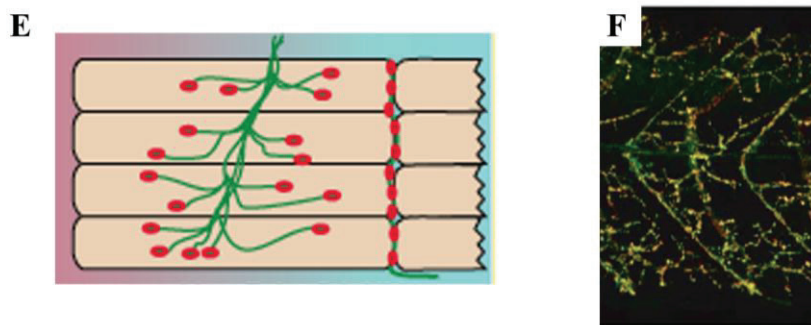


Figure 27. Dynamique de formation de la jonction neuromusculaire chez le poisson zèbre

A,C. Représentations schématiques d'un somite en coupe transversale et en vue latérale indiquant la position des clusters d'AChR aneuxaux (A, rouge) formés au centre de la face médiale des cellules adaxiales avant toute innervation et des clusters d'AChR neuraux (C, rouge) formés au centre de la face médiale fibres rapides et des MPs au contact du motoneurone primaire en croissance (futurs SSFs, bleu ; futurs MPs, gris ; fibres rapides, orange). Abréviations : A = antérieur , P= postérieur ; D = dorsal ; V = ventral. Extrait de Wu *et al.*, 2010. **B,D** Gros plan des clusters d'AChR correspondants aux schémas associés en A et C sur une vue latérale du tronc (en position postérieure (B) ou antérieure (D)) d'un embryon HB9 : GFP (visualisation des motoneurones primaires en vert) de 20 hpf après marquage des AChR avec l' α -bungarotoxine conjuguée (rouge). Extrait de Flanagan Steet *et al.*, 2010. **E.** Représentation schématique des jonctions neuromusculaires éparses et myoseptales (somite en vue latérale). Vert = motoneurone primaire. Rouge = Clusters d' AChR. Extrait de Lefebvre *et al.*, 2007. **F.** Jonctions neuromusculaires observées sur un embryon de 72 hpf après marquage des AChR avec l' α -bungarotoxine conjuguée (rouge) et des vésicules présynaptiques à l'aide d'un anticorps anti SV2 (vert). Extrait modifié de Panzer *et al.*, 2005.

2 – JNMs « en passant »

Lorsque les axones des motoneurones primaires progressent le long de la surface médiale du myotome, ils établissent des contacts synaptiques dans un premier temps avec les MPs puis dans un second temps avec les fibres rapides qui ont pris la place des cellules adaxiales et qui se retrouvent en position dorsale et ventrale des MPs. Ces contacts sont définis dans la littérature comme des JNMs « en passant » (**Figure 27 C-D** ; Panzer *et al.*, 2005 ; Flanagan-Steet *et al.*, 2005).

Du point de vue post-synaptique, ces JNMs « en passant » se caractérisent par la présence de clusters neuraux d'AChR à la surface des fibres musculaires, qui dans le cas des fibres rapides se forment exactement à l'endroit où étaient positionnés les clusters aneuxaux à la surface des cellules adaxiales. Les clusters neuraux d'AChR à la surface des MP résultent quand à eux de l'incorporation massive des clusters aneuxaux ce qui peut expliquer la différence morphologique observée entre les clusters neuraux présents à la surface des fibres rapides et des MPs. En effet les clusters des MPs qui sont larges et allongés, sont deux fois plus gros que ceux présents à la surface des fibres rapides (Flanagan-Steet *et al.*, 2005).

Du point de vue présynaptique, les JNMs « en passant » se caractérisent par la présence de varicosités au niveau de l'axone en croissance qui sont en apposition avec les clusters neuraux d'AChR à la surface des fibres musculaires. Ces varicosités sont également beaucoup plus larges au niveau des MPs qu'au niveau des fibres musculaires rapides signe d'un contact synaptique globalement plus étendu entre les MPs et l'axone en croissance (Flanagan-Steet *et al.*, 2005). La formation de ces JNMs « en passant » est sous la dépendance de la voie de signalisation *unplugged/MuSK* qui est activée par l'agrine sécrétée par les motoneurones, à l'exception de celles présentes au niveau des MPs qui sont indépendantes du signal fourni par l'agrine étant donné qu'elles proviennent de l'incorporation des clusters aneuxaux (Lefebvre *et al.* 2007 ; Kim *et al.*, 2007).

3 - Jonctions neuromusculaires éparses et myoseptales

Par la suite, lorsque les motoneurones primaires étendent des ramifications latérales pour innervier l'ensemble du myotome et le myosepte vertical, ils établissent de nombreux contacts synaptiques avec les fibres musculaires qui ne sont plus confinés à la région centrale mais sont distribués sur l'ensemble de la fibre et le long du myosepte vertical (**Figure 27 E-F**) (Panzer *et al.*, 2005). La formation de ces synapses éparses et myoseptales est sous la dépendance de la voie de signalisation du β -dystroglycan également activée par l'agrine sécrétée par le motoneurone (Lefebvre *et al.*, 2007).

V- Evaluation des conséquences physiologiques des altérations du système neuromusculaire : analyse des comportements locomoteurs

L'innervation progressive du myotome ainsi que la connexion du système d'innervation moteur aux différentes composantes du système nerveux cérébro-spinal se traduit par l'expression de trois différents comportements locomoteurs qui se succèdent au cours du développement. On distingue ainsi des contractions spontanées de l'embryon qui commencent à 17 hpf, des contractions en réponse à une stimulation tactile dès 21 hpf et des mouvements de nage qui ont lieu en réponse à une stimulation tactile dès 27 hpf et surviennent spontanément à partir du stade larvaire (**Figure 28**) (Saint Amant et Drapeau, 1998 ; Brustein *et al.*, 2003).

Des analyses de vidéomicroscopie ont permis de caractériser chaque type de comportement d'un point de vue quantitatif à la fois en terme de cinétique (ex : fréquence de contractions, vitesse de nage) et de dynamique (ex : amplitude des mouvements, distance parcourue, trajectoire de nage). L'origine nerveuse et musculaire de chaque type de comportement est également relativement bien connue. De ce fait, il est possible d'évaluer de manière quantitative des conséquences physiologiques d'un défaut de guidage axonal ou d'altération de fibres musculaires par l'analyse des paramètres associés à chacun de ces comportements locomoteurs.

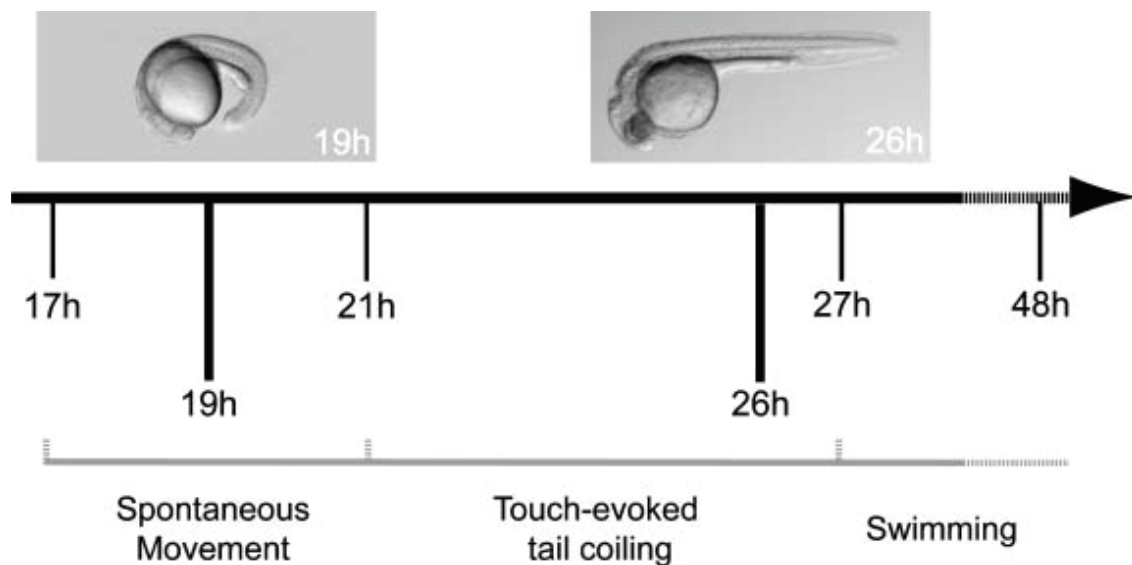


Figure 28. Trois types de comportements locomoteurs au cours du développement du poisson zèbre. Extrait de McKeown *et al.*, 2009. De 17 à 21 hpf les embryons présentent des contractions spontanées dont la fréquence atteint un pic à 19 hpf. A partir de 21 hpf, la stimulation tactile des embryons entraîne des mouvements de « tail coiling » dont la fréquence atteint un pic à 26 hpf. A partir de 27 hpf, les embryons adoptent un comportement de nage en réponse à une stimulation qui deviendra spontanée par la suite.

A - Contractions spontanées

Les premiers mouvements de l'embryon qui commencent précisément à 17 hpf correspondent à des contractions spontanées du tronc que l'on appelle des mouvements de « coiling ». Ce sont des contractions relativement lentes des somites antérieurs qui amènent l'extrémité de la queue à toucher la tête de l'embryon et qui ont lieu en alternance droite-gauche à la façon d'un métronome. La fréquence de ces mouvements de coiling spontanés atteint un pic à 19 hpf puis diminue progressivement pour atteindre une fréquence quasiment nulle vers 27 hpf (Saint Amant et Drapeau, 1998). La régularité de ces mouvements de coiling change également au cours du développement : un embryon de 18 à 23 hpf contracte continuellement alors que les embryons plus âgés (24 hpf) présentent des périodes de 3 à 5 contractions suivies de périodes d'inactivité qui peuvent durer jusqu'à 20 sec. Il a été montré que ces contractions spontanées qui se propagent de manière rostro-caudale ne sont pas des contractions autonomes du muscle mais dépendent bien de l'activité des motoneurons primaires et d'un certain nombre d'interneurones présents dans la moelle épinière (Saint Amant et Drapeau 2000). Les travaux de Melançon *et al.* (1997) indiquent qu'au moment du

pic de 19 hpf, ces contractions spontanées sont dues à des contractions des MPs qui sont les premières fibres à être contactées par l'axone du CaP en croissance, et à se contracter. Les travaux de [Flanagan-Steet et al., \(2005\)](#) indiquent par ailleurs qu'à 17 hpf, l'axone du CaP a déjà établi un contact synaptique avec les MPs au niveau des trois premiers somites en accord avec le fait que les MPs sont à l'origine de ces contractions spontanées et ce dès les premiers mouvements qui ont lieu à 17 hpf.

B - Contractions en réponse à un stimulus tactile

Dès 21 hpf, l'embryon commence à répondre à des stimulations tactiles réalisées au niveau de la tête ou de la queue par des contractions contralatérales (ex : vers la gauche si l'embryon est touché par la droite) ([Saint Amant et Drapeau, 1998](#)). Ce type de mouvement survient quand les motoneurones primaires de la moelle épinière sont activés à la fois par des neurones du cerveau postérieur (hindbrain) et par des neurones de la moelle épinière tels que les neurones sensoriels Rohon Beard ([Brustein et al., 2003](#)). Par ailleurs, il a été montré que ce sont des contractions des fibres musculaires lentes qui sont à l'origine de ces mouvements de coiling rapide ([Naganawa et al., 2011](#)).

Il est possible d'imager avec précision ces mouvements de coiling rapide à l'aide d'une caméra à haute vitesse d'acquisition ce qui permet d'extraire plusieurs paramètres tels que la direction, l'amplitude, la fréquence et la vitesse des mouvements et de quantifier ainsi des changements fins de ce type de comportement locomoteur. Ce genre d'analyse, qui est encore très peu utilisé à l'heure actuelle dans le cadre d'études fonctionnelles, a par exemple permis d'attribuer un rôle pour la connexine 39.9, composant des jonctions GAP, dans la contraction du muscle lent ([Hirata et al., 2012](#)).

C - Nage

A partir de 27 hpf, la stimulation tactile d'un embryon au niveau de la queue entraîne des mouvements de coiling partiels qui sont suivis d'un bref mouvement de nage en avant de l'embryon sur une distance équivalent environ à une fois son corps ([Brustein et al., 2003](#)). Ce mouvement de nage initialement lent correspond à une séquence de contractions alternées de faible amplitude du tronc et de la queue dont la fréquence augmente de manière linéaire au cours du développement ([Saint Amant et Drapeau, 1998](#)). Ce comportement requiert alors une

intégration de neurones du hindbrain, d'interneurones spinaux et des motoneurones secondaires (Brustein *et al.*, 2003).

A 48 hpf, un stimulus tactile engendre un mouvement de nage en avant relativement «explosif» d'une fréquence plus élevée qui dure plusieurs secondes et que l'on appelle le «burst swimming». Bien que les embryons soient plutôt inactifs à ce stade, des épisodes de «burst swimming» peuvent également survenir spontanément de manière occasionnelle (Drapeau *et al.*, 2002). Il a été montré que ce sont des contractions des fibres musculaires rapides qui sont responsables du «burst swimming» (Naganawa *et al.*, 2011).

A l'heure actuelle, l'analyse du burst swimming en réponse à une stimulation tactile est de plus en plus utilisée pour évaluer les conséquences physiologiques de défauts musculaires ou d'innervation motrice sur des embryons de 2 à 3 jpf. Ces analyses se basent généralement sur des tests simples qui mesurent par exemple le temps moyen que met un embryon à parcourir une distance fixée par l'expérimentateur (Goody *et al.*, 2012) ou qui analysent la trajectoire, la distance parcourue et la vitesse des embryons par tracking manuel ou automatique (Fassier *et al.*, 2010).

La nage se complexifie par la suite et la larve adopte un large répertoire de comportements locomoteurs qu'elle alterne afin d'évoluer dans son environnement, comportements que j'ai choisi de ne pas aborder dans le cadre de ce rapport mais qui ont été rapportés de manière détaillée par Wolmann et Granato (2012).

Matériel et Méthodes

MATERIEL ET METHODES

Ce chapitre matériel et méthodes contient l'intégralité des protocoles utilisés pour réaliser les expériences présentées dans les deux articles figurant dans le chapitre résultats ainsi que pour les expériences complémentaires qui vous seront présentées lors de la discussion générale.

Au-delà de fournir à tous ceux qui liront et/ou jugeront ce manuscrit les informations nécessaires à la bonne compréhension des expériences qui sont présentées par la suite, le matériel et méthodes est également destiné aux membres du laboratoire. Il est donc présenté sous la forme de fiches techniques plus adaptées à cet usage.

Liste des fiches techniques

- Fiche technique N°1: Conditions d'élevage en laboratoire d'embryons de poisson zèbre	103
- Fiche technique N°2: Profil d'expression de <i>coll5a1b</i> par RT-PCR	104
- Fiche technique N°3: Synthèse de sondes pour hybridation <i>in situ</i>	108
- Fiche technique N°4: Hybridation <i>in situ</i> sur embryons	111
- Fiche technique N°5: Traitement d'embryons à la cyclophamide	115
- Fiche technique N°6: Synthèse et injection d'ARN codant pour une forme dominante négative de la protéine kinase A (dnPKA)	116
- Fiche technique N°7: Production d'anticorps polyclonaux spécifiquement dirigés contre COLXV-B	118
- Fiche technique N°8: Production recombinante de COLXV-B en cellules HEK293	119
- Fiche technique N°9: Western blot COLXV-B	124
- Fiche technique N°10: Traitement collagénase sur surnageant de culture enrichi en COLXV-B	126
- Fiche technique N°11: Immunomarquages sur embryons de 0 à 24 hpf	128
- Fiche technique N°12: Immunomarquages sur embryons de 48 et 72 hpf	130
- Fiche technique N°13: Microinjection de morpholinos	132
- Fiche technique N°14: Test d'efficacité du morpholino sMO15b par RT-PCR	135
- Fiche technique N°15: Evaluation de la motilité des embryons	137
- Fiche technique N°16: Génotypage de mutants <i>unplugged</i>	138
- Fiche technique N°17: Immunomarquages fluorescents sur coupes cryostat	142

Fiche technique N°1

**CONDITIONS D'ELEVAGE EN LABORATOIRE
D'EMBRYONS DE POISSON ZEBRE**

Les embryons issus d'un accouplement naturel sont récoltés et élevés jusqu'au stade d'intérêt au sein d'un incubateur thermostaté maintenant une température constante de 28.5°C. Ils sont élevés en boîte de pétri 100 mm contenant environ 30 ml de milieu E3 1X additionné de bleu de méthylène (Biochemika Fluka 0.006 % final) à raison de 100 embryons maximum par boîte.

Composition du milieu E3 10X telle que définie dans le ZEBRAFISH BOOK (Westerfield, 2000)

	Quantités en g pour 1 litre
NaCl	2.87
KCl	0.13
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.48
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.82

Le milieu E3 10X est stocké à température ambiante.

Afin de maintenir la transparence optique des embryons, du Phenylthiourée (PTU, SIGMA) à concentration finale de 0.003 % est ajouté dans le milieu d'incubation des embryons dès 24 hpf. Cette drogue inhibe la mélanogenèse en bloquant les étapes de la synthèse de la mélanine dépendantes d'une activité tyrosinase (Karlsson *et al.*, 2001)

Fiche technique N°2

PROFIL D'EXPRESSION DE *Coll5a1b* par RT-PCR

Extraction des ARN au Trizol

- Transfert de 20 embryons déchorionnés ou non en fonction du stade de développement (pas de déchorionnement en dessous de 24hpf) dans un tube eppendorf de 1,5ml
- Retrait du milieu E3 et lavage rapide des embryons avec 200 µl d'H₂O DEPC
- Transfert des embryons dans un nouveau tube
- Retrait du maximum de liquide et lavage rapide des embryons avec 200 µl d'H₂O DEPC
- Retrait du maximum de liquide, ajout de 250 µl de Trizol sous hotte chimique (INVITROGEN, conservation à 4°C) et homogénéisation mécanique à l'aide une seringue sérologique de 1mL et d'une aiguille 23G (pipetage répété).

Remarque : les homogénats peuvent être conservés à cette étape pendant 1 mois à -80°C en cas de nécessité.

- Incubation 5 min à température ambiante
- Ajout de 50 µl de CHCl₃ (chloroforme) et homogénéisation par retournement manuel pendant 15 sec
- Incubation 3 min à température ambiante
- Centrifugation à 13000 g, 15 min à 4°C
- Récupération de la phase aqueuse supérieure (environ 100 µl) et transfert dans un nouveau tube
- Précipitation des ARNs par ajout de 83 µl d'isopropanol (150 µl si vous avez plutôt récupéré 125 µl de phase aqueuse) et homogénéisation douce par retournement manuel
- Incubation 10 min à température ambiante
- Centrifugation à 13000 g, 15 min à 4°C.
- Retrait du maximum de surnageant et lavage du culot par 250 µl de 75 % éthanol dilué en H₂O DEPC.
- Centrifugation à 7000 g, 5 min à 4°C
- Retrait du maximum d'éthanol suivi d'une centrifugation rapide pour permettre le retrait du reliquat d'éthanol

- Resuspension des ARNs totaux dans 15 µl d'H₂O DEPC (tube placé sur glace)
- Dosage au nanodrop pour évaluer la concentration
- Conservation à -80°C jusqu'à utilisation

Préparation des ADN complémentaires (ADNc) à partir d'ARNm précédemment extraits

Dénaturation des ARNs

Mélange réactionnel

Volume de réaction de 10 µl

- | | |
|---------------------------------|------|
| - ARN | 3 µg |
| - Oligo dT (Promega, 500 µg/mL) | 1 µl |
| - H ₂ O DEPC | QSP |

- Incubation 10 min à 70°C dans la machine PCR
- Dépôt immédiat sur glace

Reverse Transcription

Mélange réactionnel

Volume de réaction de 25 µl

- | | |
|---|-------|
| - Mélange réactionnel précédent | 10 µl |
| - Tampon de transcription 5X | 5 µl |
| - Mélange des 4 d NTP (Promega , stock à 10mM chacun) | 5 µl |
| - Rnase Inhibitor (Promega, 40U/ µl) | 1 µl |
| - Polymérase MMLV (Promega, 200 U/ µl) | 1 µl |
| - H ₂ O DEPC | QSP |

- Incubation 1H à 37°C dans la machine PCR
- Maintien à 15 °C en attendant la récupération des échantillons

- Conservation à -20°C jusqu'à utilisation

PCR

Amorces utilisées (SIGMA)

Les amorces sont resuspendues dans de l'H₂O milliQ et conservées à -20°C à la concentration stock de 100 µM

Nom	Séquence 5' 3'	Taille de l'amplicon
Primer col15bL	GATTTCGAGGGTTCTGGTGA	514 pb
Primer col15bR	ATACACCTGGCTCACCCCTTG	
Primer actin L	AAGCAGGAGTACGATGAGTCT	279 pb
Primer actin R	GGTAAACGCTTCTGGAATGAC	

L = left = amorce en 5' , R = right = amorce en 3'

Remarque : Nous avons amplifié le gène de la β actine qui nous a servi de gène de ménage.

Pré-mélange réactionnel pour PCR

Volume final de 9 µl par échantillon

- Tampon 10x associé à la Taq polymérase (Biolabs, thermoPol Buffer)	1 µl x n échantillons
- Mélange des 4 dNTP (stock à 10mM chacun)	0,2 µl x n échantillons
- Taq polymérase (Biolabs, 5U/ µl)	0,1 µl x n échantillons
- Amorce col15bL ou actin L (10 µM)	1 µl x n échantillons
- Amorce col15bR ou actin R (10 µM)	1 µl x n échantillons
- H ₂ O milliQ	QSP 9 µl x n échantillons

Mélange final pour PCR

Volume de réaction de 10 µl

- Pré-mélange réactionnel	9 µl
- ADNc	1 µl

Programme PCR

- 94°C 4 min
 - Dénaturation 30 sec à 94°C
 - Hybridation des primers 30 sec à 60°C
 - Elongation 1 min à 68°C
 - Elongation finale 7 min à 68°C
 - Maintien à 15°C en attendant la récupération des échantillons
 - Dépôt sur gel d'agarose 1% pour analyse
- Rétération de ce cycle 35 fois

Fiche technique N° 3

SYNTHESE DE SONDAS POUR HYBRIDATION *IN SITU*

Caractéristiques des constructions utilisées pour la synthèse des différentes sondes

Sonde	Plasmide	Résistance aux antibiotiques	Enzyme pour la linéarisation du plasmide / Polymérase de synthèse ARN pour la genèse de sonde antisens	Enzyme pour la linéarisation du plasmide / Polymerase de synthèse ARN pour la genèse de sonde sens	Provenance de la construction
<i>coll5a1b</i>	TOPO PCR4	Amp	Pst I / T7	NotI / T3	Aurélié Pagnon-Minot (TOPO cloning PCR)
<i>eng2a</i>	KS+	Amp	Xho I / T7	Xba I/T3	Estelle Hirsinger (Paris)
<i>myoD</i>	pBluescript	Amp	Bam HI /T7	KpnI / T3	
<i>ptcl</i>	Non communiqué	Amp	Bam HI / T7	Non communiqué	Collaboration avec Phillip Ingham (Singapour)
<i>smyhc1</i>	Non communiqué	Amp	Not I / Sp6	Non communiqué	Stone Elworthy (Sheffield,UK)

Toutes les enzymes de restriction et les ARN polymérases proviennent de Promega, excepté Xho I provenant de Biolabs

Amplification et purification des plasmides

- Transformation de bactéries compétentes XL1 Blue :
- Ajout de 200 ng de plasmide à 200 µl de bactéries compétentes
- Incubation 20 min sur la glace
- Choc thermique pendant 30 sec à 42°C
- Incubation immédiate sur glace
- Ajout de 1ml de milieu LB
- Incubation 1h à 37°C avec agitation 200 rpm
- Etalement de 50 et 100 µl sur 2 boîtes de LB-agar supplémentées d'ampicilline ou de carbenicilline (0,1mg/ml final)
- Incubation des boîtes 1 nuit à 37°C

- Lancement d'une culture bactérienne à 37°C sur la nuit après inoculation de 200 ml de milieu LB supplémenté en ampicilline ou carbenicilline (0,1mg/ml final) avec une colonie transformée.

- Vérification de la DO_{600nm} qui doit être à 2 pour un volume de 200 ml de culture bactérienne

- Préparation d'ADN plasmidique à l'aide du kit « NucleoBond Xtra Midi/Maxi » de Macherey Nagel

Remarque : la resuspension de l'ADN plasmidique se fait dans 200 µl à 300 µl d'H₂O MilliQ autoclavée en fonction de la taille du culot obtenu.

- Conservation à - 20°C jusqu'à utilisation

Linéarisation des plasmides et purification

Mélange réactionnel

Volume de réaction de 100 µl

- Préparation plasmidique purifiée	10 µg
- Enzyme de restriction	2 µl
- Tampon 10X associé à l'enzyme de restriction	10 µl
- BSA 100X	1 µl
- H ₂ O MilliQ autoclavée	QSP

- Incubation 2 heures à 37°C en bain marie

- Prélèvement de 0,5 µl pour dépôt sur gel d'agarose (vérification de la digestion)

- Purification des plasmides linéarisés à l'aide du kit « Nucleospin gel and PCR clean up » de Macherey Nagel

Remarque: L'élution finale se fait dans 30 µl de tampon d'élution NE (5mM Tris HCl, pH = 8,5)

- Conservation à - 20°C jusqu'à utilisation

Synthèse de la sonde (transcription)

Mélange réactionnel

Volume de réaction de 10 ou 20 µl en fonction de la concentration d'ADN linéarisé après purification

	Quantités pour 10 μ l
- Tampon de transcription 5X	2 μ l
- ARN polymerase (1/10 ème du volume final soit 1 unité)	1 μ l
- RNase inhibitor (Promega ; 1/20 ème du volume final soit 1 unité)	0,5 μ l
- ADN linéarisé et purifié	1 μ g
- DIG ou FITC RNA labelling mix (ROCHE ; 1/10 ème du volume final)	1 μ l
- H2O RNase free	QSP
- Incubation 2 heures à 37°C dans une étuve car la synthèse s'avère beaucoup plus efficace que dans le bain marie	
- Prélèvement de 1 μ l de milieu réactionnel pour dépôt sur gel d'agarose 1% (vérification de la synthèse)	
- Ajout de 2 μ l de DNase I (ROCHE) pour élimination de l'ADN plasmidique	
- Incubation 15 min à 37°C toujours en étuve	
- Ajout de 2,5 μ l de LiCl et 75 μ l d'éthanol 100% froid	
- Conservation à -20 °C pendant 1 H minimum (précipitation)	
- Centrifugation 3 min 4°C 15000 rpm	
- Lavage du culot par 200 μ l d'éthanol 70%	
- Centrifugation 5 min à 4°C 15000 rpm	
- Elimination du maximum de surnageant (essentiel pour une bonne resuspension de l'ARN et conditionne donc l'efficacité de la sonde)	
- Pulse centrifugation rapide pour élimination du reliquat de surnageant et séchage rapide du culot.	
- Ajout de 30 μ l d'H2O RNase free et de 70 μ l de formamide froid (resuspension de la sonde)	
- Conservation à -80°C jusqu'à utilisation	

Fiche technique N°4

HYBRIDATION *IN SITU* SUR EMBRYONS

- Fixation au stade d'intérêt des embryons préalablement déchorionnés sur la nuit à 4°C en PFA 4% (dissout dans du PBS 1X).

Remarque : pour des embryons de stades antérieurs à 24 hpf qui sont plus fragiles, la déchorionation se fait après la fixation dans un bain de PBS 1X.

- Transfert direct en 100 % méthanol et conservation des embryons à – 20 °C jusqu'à utilisation.

Remarque : Pour un résultat optimal, il vaudrait mieux éviter de mettre plus de 25 embryons par tube si on travaille en tube eppendorf 1,5 ml.

JOUR 1

Réhydratation (500 µl)

- 5 min en 75% méthanol dilué en PBT (PBS 1X , 0,1% Tween 20)

- 5 min en 50% méthanol dilué en PBT (PBS 1X , 0,1% Tween 20)

- 5 min en 25% méthanol dilué en PBT (PBS 1X , 0,1% Tween 20)

- 4 x 5 min en PBT

Perméabilisation (500µl)

- Traitement à la protéinase K (ROCHE , stock à 22 mg/ml) de durée et de dilution en PBT variable en fonction du stade de l'embryon :

12-14 somites : 2 min à 5 µg /µl

18 somites : 3 min 5 µg/µl

24 hpf : 5 min 5 µg/µl

48 hpf : 15 min 10 µg/µl

72 hpf : 30 min 10 µg/µl

Remarque : Pas de perméabilisation pour des embryons de stade inférieur à 8 somites

- 5 min en PBT

- Fixation de 20 min en PFA 4 % avec agitation

- 5 x 5 min en PBT

Préhybridation et hybridation des sondes (100 µl)

- Incubation 4 à 5H à 68°C (bain marie) dans du tampon d' Hybridation A (50% formamide , 5X SSC (stock 20X SSC = 3M NaCl, 0,3M Sodium citrate), 500 µg/ml torula yeast RNA purifié, 50ug/ml héparine, 0,1% Tween 20, pH ajusté à 6 avec de l'acide citrique 1M)

- Incubation sur la nuit à 68°C (bain marie) avec la sonde diluée dans du tampon d'hybridation A (HybA)

Pour la dilution de la sonde

Diluer 1 à 5 µl de solution stock de sonde dans 100 µl de Hyb A en fonction de la quantité d'ARN obtenue lors de la synthèse que l'on apprécie de visu par l'intensité de la bande obtenue lors du dépôt sur gel (voir fiche N°3 synthèse de sonde) sachant que plus on augmente la quantité de sonde plus on augmente la probabilité d'avoir du bruit de fond lors du marquage.

JOUR 2

Lavages à 68°C (250 µl)

Remarque : les solutions sont toutes préchauffées à 68°C pendant 5 min

- 10 min en 75% tampon hybridation B (Hyb B, même composition tampon d'hybridation A sans le torula yeast RNA dilué en SSC 2X

- 10 min en 50% tampon Hyb B dilué en SSC 2X

- 10 min en 25% tampon Hyb B dilué en SSC 2X

- 10 min en SSC 2X, 0,1% Tween 20

- 2 x 30 min en SSC 0,2X , 0,1% Tween 20

Lavages à température ambiante (250 µl)

- 5 min en 75% SSC 0,2 X dilué en PBT

- 5 min en 50% en SSC 0,2 X dilué en PBT

- 5 min en 25% SSC 0,2 X dilué en PBT

- 5 min en PBT

Saturation (400 µl)

Incubation des embryons entre 3H et 4H à température ambiante avec agitation en tampon de saturation (2mg/ ml BSA, 2% serum de mouton en PBT)

Incubation de l'anticorps couplé à la phosphatase alcaline (250 µl)

Incubation sur la nuit à 4°C avec agitation avec l'anticorps anti-digoxigénine ou anti-fluorescéine couplé à la phosphatase alcaline (ROCHE) dilué au 1/5000 ou au 1/2000 respectivement en tampon de saturation en fonction de la sonde utilisée.

JOUR 3

Lavages et équilibrage

- 8 x 20 min dans 400 µl de tampon de lavage (2mg/ml BSA en PBT)
- 3 x 5 min dans 500 µl de NTMT (0,1M NaCl ; 0,1 M Tris-HCl pH= 9,5; 50mM MgCl₂ ; 0,1 Tween 20)

Révélation

- Transfert en plaque 12 puits

Remarque : Ne pas utiliser de pipette pasteur en verre pour le transfert car le NTMT fait que les embryons restent collés à la paroi de la pipette

- Incubation à l'abri de la lumière dans 1mL de mélange de NBT et BCIP dilués dans du NTMT (4,5 µl de NBT et 3,5 µl de BCIP / ml de NTMT)

Remarque : La durée de l'incubation va dépendre de la sonde (5 min à une nuit). Donc, il faut vérifier régulièrement et arrêter la coloration quand le bruit de fond devient gênant et que l'on n'augmente plus le signal spécifique.

Traitements post-révélation pour conservation des échantillons avant observation (1ml)

- 3 x 5 min en PBT
- Fixation 20 min en PFA 4% en PBS 1X avec agitation

Remarque : en cas de nécessité, il est également possible de fixer les échantillons sur la nuit à 4°C sans agitation.

- 3 x 5 min en PBT
- Equilibration par bains de 10 min de concentrations croissantes de glycérol dilué en PBS 1X (25% ,50%, 75%)
- Conservation des échantillons à 4°C pour observation ultérieure

Montage et observation

Pour faciliter l'observation et notamment la prise de photos en position dorsale ou ventrale, il faut retirer proprement le sac vitellin en le grattant délicatement (un cil fixé au bout d'une pipette pasteur en verre fait un bon grattoir) jusqu'à n'avoir que quelques grains qui ne gênent pas l'observation.

Pour le montage, il faut éviter de mettre l'embryon directement entre lame et lamelle ce qui pourrait écraser les structures. Il faut donc faire une petite « loge » en fixant par exemple un morceau de scotch sur la lame au centre duquel on découpe une petite ouverture où l'on viendra placer l'embryon dans une goutte de glycérol 75%.

Coupes

Les coupes d'un somite d'épaisseur ont été réalisées manuellement à l'aide d'un rasoir et directement montées entre lame et lamelle dans une goutte de 100 % glycérol.

Fiche technique N°5

TRAITEMENT D'EMBRYONS A LA CYCLOPAMINE

Principe

La cyclopamine est une drogue permettant d'inhiber spécifiquement la voie de signalisation induite par les facteurs de la famille Hedgehog (voir schéma de la voie de signalisation Hedgehog en figure 17). Plus précisément, elle se lie à un domaine particulier de la protéine Smoothened (Chen *et al.* 2002) empêchant ainsi son activation malgré la présence du ligand.

Traitement

Les embryons en milieu E3 sont traités à partir du stade 75% épibolie jusqu'au moment de leur fixation (en l'occurrence 18 somites dans notre étude) avec 50 μ M de cyclopamine (SIGMA ; solution stock à 10 mM dissoute en DMSO). D'autres embryons sont traités en parallèle avec 0,5% de DMSO (équivalent à la concentration finale en DMSO présente dans le cadre du traitement cyclopamine), ce dernier traitement servant de condition contrôle.

Remarque : un traitement antérieur au stade 75% épibolie est à proscrire car il entraîne la mort des embryons.

Fiche technique N°6

SYNTHESE ET INJECTION D'ARN CODANT POUR UNE FORME DOMINANTE NEGATIVE DE LA PROTEINE KINASE A (dnPKA)

Principe

L'activation de la voie de signalisation Hedgehog se traduit par l'inhibition de l'activité de la protéine kinase A (voir schéma de la voie de signalisation Hedgehog en figure 17). Ainsi, dans le but de mimer une activation ectopique de la voie Hedgehog dans l'ensemble du myotome indépendamment de la liaison du ligand, nous avons injecté au stade une cellule un ARN codant pour une forme dominante négative constitutivement inactive de la protéine kinase A conformément à ce qui avait déjà été publié dans ce modèle par Concordet *et al.* (1996) et Du *et al.* (1997).

Caractéristiques de la construction dnPKA

Plasmide	Resistance	Enzyme pour la linéarisation	Polymérase pour la synthèse d'ARN	Provenance
pCS2+	Amp	Not I (Biolabs)	Sp6 ARN polymérase	Stone Elworthy (Sheffield, UK)

Amplification et purification du plasmide

Le protocole utilisé est identique à celui décrit dans fiche technique N° 3.

Linéarisation et purification du plasmide

Le protocole utilisé est identique à celui décrit dans fiche technique N°3 à la seule différence que le volume final de resuspension après purification est de 20 µl.

Synthèse de l'ARN

La synthèse de l'ARN coiffé est réalisée avec le kit Sp6 message machine d'Ambion.

Mélange réactionnel

Volume de réaction de 20 µl.

- Plasmide dnPKA linéarisé et purifié	1 µg
- Tampon de transcription 10X	2 µl
- NTP/CAP 2X	10 µl
- Sp6 ARN polymerase	2 µl

- H₂O fournie dans le kit

QSP

La synthèse se fait pendant 2H à 37°C dans un thermocycleur.

Purification de l'ARN

L'ARN est purifié en utilisant le kit « Nucleospin RNA clean up - XS » de Macherey Nagel.

Remarque : A la fin de la purification, l'ARN est resuspendu dans 10 µl d'H₂O nuclease free, dosé au nanodrop et une solution stock à 250 ng/µl est préparée et conservée à -20°C.

Microinjection

Injection des embryons au stade 1 cellule avec 1 nl d'une solution d'ARN dnPKA à 50 ng / µl (soit une quantité d'ARN injectée de 50 pg) additionnée de rouge de phenol dilué au 1/10 ème pour faciliter la visualisation lors de l'injection de la solution.

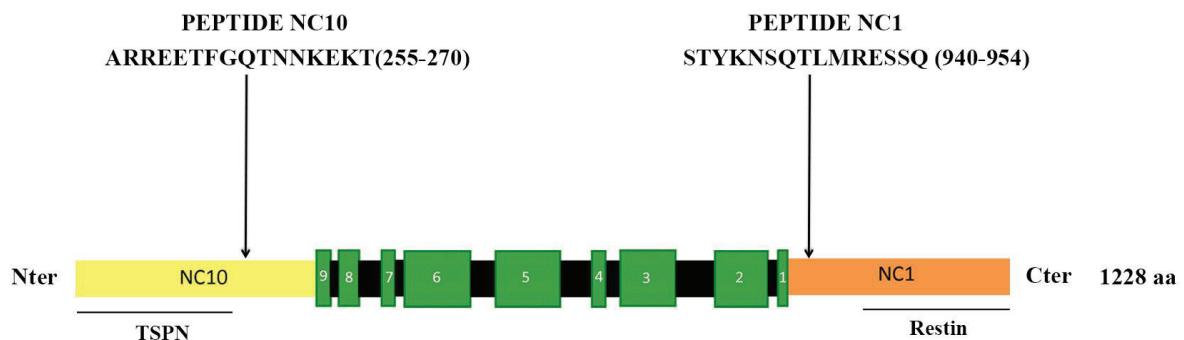
Fiche technique N°7

**PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX
DIRIGES CONTRE LA PROTEINE COLXV-B**

Nous souhaitons réaliser des anticorps capables de reconnaître spécifiquement la protéine COLXV-B. Pour cette raison, nous avons choisi de faire produire des anticorps dirigés contre des peptides synthétiques et non contre un domaine de COLXV-B produit de manière recombinante notamment afin d'éviter toute reconnaissance de son paralogue COLXVa en raison de l'homologie de structure entre les deux protéines. Le choix des peptides les plus appropriés à notre projet, leur synthèse ainsi que la production et la purification des sérums polyclonaux ont été réalisés par la compagnie Covalab (Villeurbanne).

Séquences et position des épitopes des anticorps utilisés contre COLXV-B

Afin de renforcer leur pouvoir immunogène, deux peptides synthétiques localisés au niveau du NC1 et du NC10 ont été co-injectés à des lapins. La séquence et la position des deux peptides synthétiques sur la chaîne $\alpha 1$ de COLXV-B sont renseignées sur le schéma ci dessous. Par la suite, les sérums produits ont été purifiés sur deux colonnes d'affinité (une pour chaque peptide) de manière à ce que nous ayons un serum polyclonal anti-NC1 purifié et un serum polyclonal anti-NC10 purifié.



Remarque : Les sérums purifiés et non purifiés ont été testés en immunofluorescence et en western blot. Il s'avère que les sérums polyclonaux purifiés sont beaucoup plus sensibles et génèrent moins de bruit de fond dans ces deux techniques.

Fiche technique N° 8

PRODUCTION RECOMBINANTE DE COLXV-B EN CELLULES HEK293

Clonage de la séquence codante de *coll5a1b* (*coll5a1b* cds) en pCS2+1- Amplification de *coll5a1b* cds par RT-PCR

La séquence codante de *coll5a1b* a été amplifiée par PCR à partir d'ADNc générés par reverse transcription d'ARNm extraits d'embryons de 3 jpf (fiche technique N° 2).

Amorces

Nom	Séquence 5' 3'	Taille de l'amplicon
BamHicol15bcdsL	CGCGGATCCGCCACCATGAAATTTTCGCCTCCTGTC	3751 pb
XbaIcol15bcdsR	GCCTAGACTAGTTCCTTCCAGGGTGCT	

Mélange réactionnel

Volume réactionnel de 100 µl

ADNc	3 µl
Mélange des 4 dNTP (stock à 10mM chacun)	2 µl
Tampon HF 5X Biolabs	20 µl
Phusion DNA Polymerase (Biolabs, 2,5 U/ µl)	1 µl
Primer BamHicol15bcdsL (10 µM)	5 µl
Primer XbaIcol15bcdsR (10 µM)	5 µl
H ₂ O milliQ	QSP

Répartition des 100 µl dans 5 tubes à PCR (20 µl dans chaque) pour une meilleure efficacité de PCR

Programme PCR

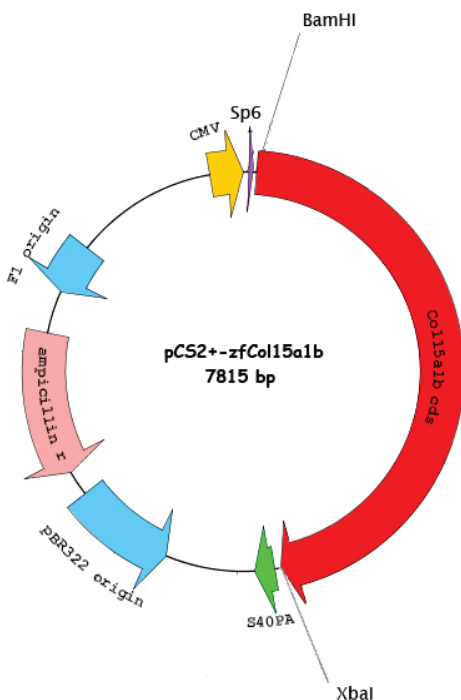
- 30 sec à 98°C
 - Dénaturation 10 sec à 98°C
 - Hybridation des primers 30 sec à 56°C
 - Elongation 1 min 45 sec à 72°C
 - Elongation finale 10 min à 72°C
 - Maintien à 15°C en attendant la récupération des échantillons
- Réitération de ce cycle 35 fois

Purification des produits PCR

- Dépôt du produit PCR sur gel d'agarose 1%
- Découpage de la bande d'intérêt
- Purification de la bande découpée à l'aide du kit « Nucleospin gel and PCR clean up » de Macherey Nagel.

Remarque: l'éluion finale se fait dans 20 µl de tampon d'éluion

2 - Clonage de *col15a1b* cds en PCS2+



Les amorces choisies pour la PCR permettent d'insérer dans l'amplicon des sites consensus des enzymes de restriction Bam HI et Xba I ce qui permet un clonage direct de la séquence amplifiée dans le site multiple de clonage du vecteur pCS2+ (voir illustration ci-contre). Une séquence kosak a également été insérée en amont du site d'initiation de la traduction grâce à l'amorce en 5'.

Digestion séparée de l'insert *col15a1b* et du plasmide pCS2+

Volume réactionnel de 100 µl

<i>col15a1b</i> cds purifié / vecteur PCS 2+	20 µl / 10 µg
Tampon Multicore 10X Promega	10 µl
BSA	1 µl
Bam HI	2 µl
Xba I	2 µl
H ₂ O milliQ	QSP

- Incubation 2H à 37°C

- Purification des produits de digestion à l'aide du kit « Nucleospin gel and PCR clean up » de Macherey Nagel après dépôt sur gel d'agarose et découpage des bandes d'intérêt.

Remarque : l'élution finale se fait dans 15 µl dans du tampon d'élution NE

Ligation

La ligation se fait utilisant les réactifs et en suivant les instructions du kit « Quick ligation Kit » de Biolabs pendant 5 min à température ambiante

Volume réactionnel de 10 µl

Vecteur pCS2+ digéré par BamHI/XbaI	0,5 µl
Col15a1b cds digéré par BamHI/XbaI	3,5 µl
Quick ligation reaction Buffer 2X (Biolabs)	5 µl
Quick Ligase (Biolabs)	1 µl

Transformation de bactéries compétentes TOP 10 avec les produits de ligation

- Ajout de 3 µl de produit de ligation à 50 µl de bactéries compétentes TOP 10 (life science)
- Incubation de 20 min sur la glace
- Choc thermique pendant 45 sec à 42°C
- Incubation immédiate dans la glace
- Ajout de 1ml de milieu SOC
- Incubation de 1h à 37°C sous agitation à 200 rpm
- Étalement de 100 et 200 µl sur 2 boîtes de LB-agar supplémentées d'ampicilline ou de carbenicilline (0,1mg/ml final)
- Incubation des boîtes 1 nuit à 37°C

Amplification et purification de la construction pCS2+ - col15a1b cds-

En dehors de l'étape de transformation de cellules compétentes décrite ci-dessus, la suite du protocole utilisé pour l'amplification et la purification du plasmide est identique à celui décrit dans fiche technique N°3.

Pour obtenir une meilleure purification du plasmide, une précipitation supplémentaire au NaO Acétate est néanmoins effectuée selon le protocole suivant :

- Ajout de NaO Acetate 3M pH = 4,5 (1/10 ème du volume de plasmide)
- Ajout de 2,5 volumes d'éthanol 100% froid
- Incubation pendant 1H à -20°C
- Centrifugation de 30 min à 4°C 15000 rpm
- Lavage avec 300 µl d'éthanol 70 %
- Centrifugation de 5 min à 4°C 15000 rpm
- Resuspension avec un volume d'H₂O stérile de manière à obtenir une concentration de plasmide d'environ 2 µg/µl

Transfection (phosphate de calcium) des cellules HEK293 avec la construction PCS2+ - *coll5a1b* cds- et récolte du surnageant enrichi en COLXV-B.

Jour 1

Ensemencement de 1,5 million de cellules HEK 293 dans une boîte de 100 mm (Milieu DMEM (SIGMA) contenant 10% serum de veau fœtal (SVF) et 50 mg/ml de gentamycine)

Jour 2

Transfection des cellules ensemencées la veille avec 20 µg de construction PCS2+ - *coll5a1b* cds- ou de plasmide CMV-GFP (qui sert de contrôle d'efficacité de transfection) en utilisant les réactifs et en suivant les instructions du kit « Calcium transfection phosphate kit » de Life Science :

- Préparation des solutions A (20 µg ADN ; 36 µl de CaCl₂; H₂O stérile QSP 300µl) et B (300 µl de Tampon Hepes 2X) pour la transfection
- Ajout de la solution A en goutte à goutte dans le tube contenant la solution B en veillant à constamment faire des bulles pour aérer la solution pendant 1 à 2 min
- Incubation du mélange pendant 30 min à température ambiante
- Ajout du précipité au goutte à goutte uniformément sur la boîte de cellules.

Remarque : l'intégralité des étapes du jour 2 est réalisée sous la hotte de culture

Jour 3

- Retrait du milieu
- 4 lavages au PBS 1X pour bien retirer tout le sérum qui contient énormément de BSA
- Ajout de 5ml d'un milieu DMEM vide additionné de gentamycine et enrichi en vitamine C pour favoriser la stabilité de la triple hélice collagénique (par hydroxylation des résidus lysine et proline).

Jour 4

- Contrôle de l'efficacité de la transfection (évaluation du pourcentage de cellules GFP positives dans la boîte contrôle)
- Récolte des 5 ml de surnageant enrichi en COLXV-B
- Centrifugation pendant 5 min à 1000 rpm pour éliminer les débris cellulaires
- Répartition du surnageant en volume de 1ml en tubes eppendorf
- Congélation des surnageants à - 80°C pour analyse ultérieure.

Fiche technique N°9

WESTERN BLOT COLXV-B

Préparation des échantillons protéiques (précipitation au TCA)

- Décongélation de 1 ml de surnageant de culture enrichi en COLXV-B obtenu comme décrit en fiche technique n°8)
- Ajout de 100 µl de Triton 1% dilué dans de l'H₂O et 140 µl d'acide trichloroacétique (TCA)
- Incubation pendant 2H dans la glace
- Centrifugation de 10 min à 15000 g à 4°C
- Retrait du surnageant
- Ajout de 1ml d'éthanol 100% froid
- Resuspension énergique du culot par pipetage et vortex
- Centrifugation pendant 5 min à 15000 g à 4°C
- Retrait du surnageant
- Ajout de 1mL d'acétone
- Resuspension énergique du culot par pipetage et vortex
- Centrifugation 5 min 15000 g 4°C
- Retrait du surnageant
- Séchage du culot à température ambiante
- Reprise du culot dans 20 µl de tampon Laemli 1X (62,5 mM Tris 0.5M pH=6,8 ; Glycérol 5% ; SDS 1% ; Bleu de bromophénol 0,1 %) + 10 mM DTT
- Incubation pendant 3 min à 95°C
- Conservation à -20°C en attendant le dépôt

Western Blot

- Dépôt des échantillons sur Gel SDS PAGE 6-8%
- Migration en tampon TG-SDS 1X (Tris 25mM ; Glycine 192mM ; SDS 0.1%)
- Transfert sur une membrane de PVDF sur la nuit à 4°C en ampérage constant 200 mA ou voltage constant de 60V en tampon CAPS 1X pH = 11.0, 10% éthanol
- 2 rinçages rapides à l'H₂O distillée
- Coloration de la membrane dans une solution de Rouge Ponceau (0,2% rouge ponceau ; 1% acide acétique) pour évaluer l'efficacité du transfert et positionner les marqueurs
- 2 rincages rapides à l'H₂O distillée
- Saturation de la membrane pendant 2H à température ambiante en 5% lait dilué en TBST (TBS 1X (Tris 20 mM ; NaCl 150mM pH = 7,2 – 7,4) ; 0,05 % Tween 20)
- Incubation de l'anticorps primaire Anti-NC1 purifié ou Anti-NC10 purifié pendant 2H à température ambiante dilués au 1/1000^{ème} en solution de saturation
- 5 x 5 min de lavage en TBST
- Incubation de l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'HRP (Biorad) pendant 1H à température ambiante dilué au 1/10000^{ème} en solution de saturation
- 5 x 10 min de lavage en TBST
- Révélation de la membrane à l'aide du kit « Clarity Western ECL Substrate » de Biorad

Déshybridation d'une membrane après Western Blot

Dans le cadre du test collagénase, la même membrane a dans un premier temps été hybridée avec l'anticorps anti-NC10 puis deshybridée selon le protocole décrit ci-dessous pour être hybridée dans un second temps avec l'anticorps anti-NC1.

- Incubation de la membrane pendant 20 min à 50°C avec agitation en solution de deshybridation (β mercapto-ethanol 100mM SDS 2% Tris 62,5mM pH= 7)
- 2 x 10 min de lavage en TBST

On reprend ensuite le protocole de western blot à partir de l'étape de saturation.

Remarque : il est également possible d'utiliser une solution commerciale de deshybridation « Antibody stripping Buffer » de chez Gene Bio Application que l'on applique 15 min sous agitation vigoureuse suivi de 5 rinçages de 5 min en H₂O distillée toujours avec agitation vigoureuse. On reprend ensuite le protocole de western blot à partir de l'étape de saturation.

Fiche technique N°10

TRAITEMENT COLLAGÉNASE SUR SURNAGEANT DE CULTURE ENRICHI EN COLXV-B

Principe

Afin de valider la capacité des anticorps produits à reconnaître spécifiquement COLXV-B, nous avons réalisé un traitement collagénase sur du surnageant de culture enrichi en COLXV-B. La collagénase est une enzyme qui digère spécifiquement les domaines collagéniques donc si la protéine reconnue dans le surnageant par les anticorps anti-NC10 et anti-NC1 est bien le collagène XVb, un fragment de taille correspondant au NC1 ou au NC10 devrait être reconnu respectivement par l'anticorps anti-NC1 ou anti NC10 après digestion des domaines collagéniques par la collagénase.

Précipitation des protéines au TCA et resuspension dans le tampon collagénase

- Décongélation de 3 tubes de 1 ml de surnageant de culture enrichi en COLXV-B
- 2 x 1ml de surnageant nécessaires pour le traitement collagénase sont précipités au TCA comme précédemment décrit dans la fiche technique N° 9 à la différence que l'on procède à deux lavages à l'éthanol et que les 2 culots sont rassemblés dans un même tube au moment du premier lavage à l'éthanol (le premier culot étant suspendu avec 2x 500 µl d'éthanol qui sont successivement transférés dans le second tube pour resuspendre le second culot).

Remarque : il est important ici de faire ce second lavage à l'éthanol pour bien éliminer toute trace d'acidité qui pourrait empêcher l'activité de la collagénase ultérieurement.

- Le culot final est ensuite resuspendu dans 50 µl de tampon collagénase (Tris 25mM ; NaCl 0,5M ; CaCl₂ 6mM pH= 7,4 ; supplémenté extemporanément en AEBSF (inhibiteur de protéases) à 1X final (stock 20X) puis séparé en deux échantillons de 25 µl.
- 1ml de surnageant qui servira de contrôle de production est précipité et resuspendu dans du tampon Laemli comme décrit dans la fiche technique N° 12 à la différence que l'on procède à deux lavages à l'éthanol pour se mettre dans les conditions des échantillons utilisés pour le traitement collagénase.

Digestion des échantillons avec la collagénase

- Ajout de 5 µl de collagénase (CLSPA, Worthington Biochemical Corporation stock à 2000 U/ml) ou de 5 µl de tampon collagénase (témoin négatif permettant de s'assurer que les protéines ne sont pas simplement dégradées par le temps d'incubation à 37°C dans le tampon collagénase)
- Incubation 2H à 37°C
- Arrêt de l'action de la collagénase par transfert sur glace et ajout de 6 µl de tampon Laemli 5X + 50 mM DTT
- Incubation 3 min à 95°C
- Dépôt des échantillons sur gel SDS PAGE 10% dans le but de réaliser un western blot avec les anticorps anti-NC1 ou anti-NC10 (voir fiche technique N° 9).

Fiche technique N° 11

IMMUNOMARQUAGES SUR EMBRYONS DE 0 A 24 HPF

Protocole utilisé pour les immunomarquages COLXV-B / β caténine / Collagène XII / F59/ znp1/ 4D9/ Prox1 et le marquage alpha bungarotoxin-TRITC

- Déchoriation manuelle (pinces) des embryons
- Transfert en tube eppendorf de 1,5 ml
- Fixation des embryons une nuit à 4°C sans agitation en 4% PFA dilué en PBS 1X.
- Transfert direct en 100 % méthanol et conservation des embryons à – 20 °C jusqu'à utilisation si nécessaire.

Remarque : une fixation de 2H à température ambiante avec agitation directement suivie du protocole d'immun marquage à partir de l'étape de perméabilisation s'est avérée plus efficace pour obtenir un immunomarquage optimal de COLXV-B.

Rehydratation (500 μ l)

- 5 min en 75% méthanol dilué en PBT (PBS 1X 0,1% Tween 20)
- 5 min en 50% méthanol dilué en PBT
- 5 min en 25% méthanol dilué en PBT
- 2 x 5 min en PBT

Perméabilisation (800 μ l)

- 5 x 10 min avec agitation en 1% Triton X -100 dilué en PBS-1X

Saturation (400 μ l)

- Incubation pendant 1H30 à température ambiante avec agitation en 10 % serum de mouton, 1% Triton X-100 dilué en PBS 1X

Incubation de l'anticorps primaire (250 μ l)

- Incubation avec l'anticorps primaire dilué en 1 % serum de mouton, 1% Triton X-100 dilué en PBS 1X sur la nuit à 4°C avec agitation (voir tableau ci-après pour les caractéristiques et la dilution de chaque anticorps utilisé)

Anticorps utilisé	Protéine ciblée	Espèce	Dilution
F59 (Hybridoma Bank)	Slow myosin heavy chain	Monoclonal Souris	1/10
Anti-Prox1(Millipore)	Prox 1	Polyclonal Lapin purifié	1/5000
4D9 (Hybridoma Bank)	Facteurs de transcription Engrailed	Monoclonal Souris	1/50
znp 1 (Hybridoma bank)	Synaptogamin 2	Monoclonal Souris	1/100
Anti - NC10	COLXV-B (extrémité N terminal)	Polyclonal Lapin purifié	1/100
Anti - COLXII	Collagène XII de poisson zèbre (domaine FN3)	Polyclonal Lapin purifié	1/250
Anti- β caténine (SIGMA)	β caténine	Monoclonal Souris	1/400

Lavages de l'anticorps primaire (800 μ l)

- 3x 10 min avec 1% Triton X-100 dilué en PBS 1X
- 3x 1H30 à 2H avec 1% Triton X-100 dilué en PBS 1X

Incubation de l'anticorps secondaire (250 μ l)

- Incubation sur la nuit à 4°C avec agitation et à l'abri de la lumière avec l'alpha bungarotoxin-TRITC diluée au 1/100 ème (Biolegend, stock à 1 mg/ml) et/ou l'anticorps secondaire d'espèce adéquat couplé au fluorochrome alexa 546 ou 488 (Invitrogen) dilué au 1/500 en 1 % serum de mouton, 1% Triton X-100 dilué en PBS 1X

Lavages de l'anticorps secondaire à l'abri de la lumière (800 μ l)

- 3 x 10 min avec 1% Triton X-100 dilué en PBS 1X
- 3 x 1H30 à 2H avec 1% Triton X-100 dilué en PBS 1X

Equilibration en glycérol à l'abri de la lumière (1ml)

- Transfert en plaques 12 puits

Remarque : cette étape n'est pas obligatoire mais préférable pour une manipulation plus aisée des embryons en glycérol lors de l'étape d'observation et/ou montage.

- 10 min en 25% glycérol en PBS 1X
- 10 min en 50 % glycérol en PBS 1X

Stock à 4°C à l'abri de la lumière pour observation et / ou montage ultérieurs.

Fiche technique N°12

IMMUNOMARQUAGES SUR EMBRYONS DE 48 et 72 HPF

Protocole utilisé pour l'immunomarquage zn8

- Déchoriation manuelle des embryons
- Transfert en tube eppendorf de 1,5 ml
- Fixation des embryons en 4% PFA dilué en PBS 1X une nuit à 4°C.
- Transfert direct en 100 % méthanol et conservation des embryons à – 20 °C jusqu'à utilisation si besoin.

Réhydratation (500 µl)

- 5 min en 75% méthanol dilué en PBS 1X
- 5 min en 50% méthanol dilué en PBS 1X
- 5 min en 25% méthanol dilué en PBS 1X
- 10 min en PBS 1X avec agitation

Perméabilisation (500 µl)

- 2 x 5 min en PBDTT (1% DMSO, 0,1% Tween 20 , 0,5% Triton X-100 en PBS 1X)
- 7 min en 100% acétone à -20°C
- 2 x 5 min en PBDTT
- 20 min en protéinase K diluée à 12 µg / ml final en PBDTT
- 2 x 5 min en PBDTT

Saturation (400 µl)

- 3 à 4 H d'incubation à température ambiante avec agitation en solution de saturation (2% serum de mouton, 2 mg / ml BSA en PBDTT)

Incubation de l'anticorps primaire (250 µl)

Incubation sur la nuit à 4°C avec agitation de l'anticorps primaire zn8 (Monoclonal souris, Hybridoma Bank) dilué au 1/400 ème en solution de saturation

Lavages de l'anticorps primaire (800µl)

- 4 x 30 min en PBDTT

Incubation de l'anticorps secondaire (250 µl)

Incubation sur la nuit à 4°C à l'abri de la lumière et avec agitation de l'anticorps secondaire anti - souris couplé à l'alexa 546 (Invitrogen) dilué au 1/500 ème en solution de saturation

Lavages de l'anticorps secondaire à l'abri de la lumière (800µl)

- 4 x 30 min en PBDTT

Equilibration en glycérol à l'abri de la lumière (1ml)

- Transfert des embryons en plaque 12 puits
- 10 min en 25% glycérol en PBS 1X
- 10 min en 50 % glycérol en PBS 1X
- Stock à 4°C à l'abri de la lumière pour observation et/ou montage ultérieurs

Remarque : pour les lavages de l'anticorps primaire et secondaire, 30 min est un temps d'incubation minimum, ne pas hésiter à faire des lavages de 1 à 2H si on a du temps devant soi.

Fiche technique N°13

MICROINJECTION DE MORPHOLINOS

Afin d'inhiber l'expression de *coll5a1b*, nous avons utilisé une stratégie antisens basée sur l'injection de morpholinos, stratégie couramment employée dans le modèle du poisson zèbre. Un morpholino est une petite séquence généralement composée de 20 à 25 nucléotides dessinés pour être complémentaire d'une séquence d'intérêt et modifiés par la présence d'un groupement morpholine qui leur confère une plus grande stabilité. A la différence des ARN interférents, ils n'agissent non pas par un mécanisme de dégradation de l'ARN messager mais par encombrement stérique empêchant l'accès de la séquence ciblée aux différents complexes protéiques qui la reconnaissent.

Afin de s'assurer de la spécificité des phénotypes induits par l'inhibition de l'expression de *coll5a1b*, les expériences ont été réalisées en parallèle avec deux morpholinos différents : un morpholino dirigé contre le site de traduction nommé ci après tMO15b et un morpholino dirigé contre un site donneur d'épissage nommé ci après sMO15b. Un morpholino standard dit ctl-MO fourni par Gene Tools a également été utilisé comme contrôle négatif. Les caractéristiques techniques de ces morpholinos, leurs modes d'action détaillés ainsi que les doses auxquelles ils ont été injectés vous sont décrites dans cette fiche technique.

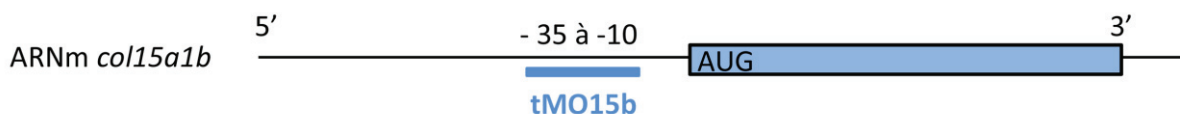
Morpholino bloquant la traduction de l'ARNm de *coll5a1b* (tMO15b)Caractéristiques techniques

Séquence 5' 3'	Masse moléculaire
AAAGTCCAAGCATGAGATTAGTGCA	8525 g/mol

Le morpholino est resuspendu dans de l'eau milliQ autoclavée de façon à obtenir une solution stock de 5mM puis stocké à -20°C sous forme d'aliquots de 10 µl. Les dilutions de ce stock utilisées pour l'injection se font également en H2O milliQ autoclavées et sont également stockées à -20°C.

Mode d'action

Le morpholino tMO15b est complémentaire de la séquence de l'ARNm de *coll5a1b* située entre les nucléotides - 35 à -10 en amont du codon initiateur de la traduction bloquant ainsi l'assemblage des sous unités ribosomiques sur le site d'initiation de la traduction de l'ARNm de *coll5a1b*.

Position du morpholino tMO15b

Micro-injection

12.5 ng de tMO15b (soit 0,5 nl d'une solution à 3 mM) sont injectés au stade une cellule avec du rouge de phénol dilué au 1/10 ème pour facilité la visualisation lors de l'injection.

Morpholino bloquant un site d'épissage du pré-ARNm de *coll5a1b* (sMO15b)Caractéristiques techniques

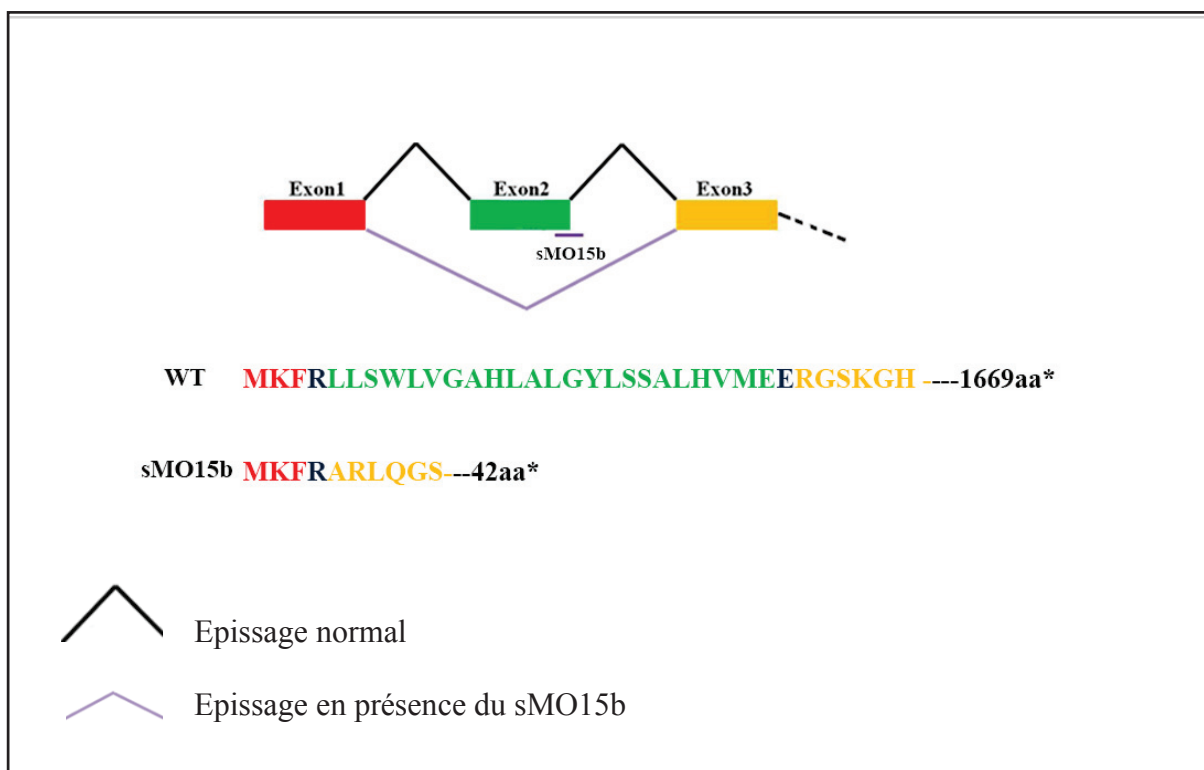
Séquence 5' 3'
agagtattcccctacCTTCCATGAC

Masse moléculaire
8839 g/mol

Le morpholino est resuspendu dans de l'eau milliQ autoclavée de façon à obtenir une solution stock de 5mM qui est stockée à -20°C sous forme d'aliqots de 10 µl. Les dilutions de ce stock utilisées pour l'injection se font également en H2O milliQ autoclavée et sont également stockées à -20°C.

Mode d'action

Le morpholino sMO15b est complémentaire d'une séquence à cheval entre la fin de l'exon 2 et le début de l'intron 2 contenant le site donneur d'épissage de l'intron 2 du pré-ARNm de *coll5a1b*. L'hybridation du morpholino bloque l'épissage de l'intron 2 engendrant un épissage anormal de l'exon 2. A l'échelle protéique, l'épissage de l'exon 2 provoque un décalage du cadre de lecture dès la fin de l'exon 1 et l'apparition d'un codon stop précoce. Il en résulte la synthèse d'une protéine tronquée de 42 aa dont la séquence diffère complètement de COLXV-B et qui ne peut être exportée en l'absence de la séquence correspondant au peptide signal (voir schéma ci dessous). Le mode d'action de ce morpholino à été confirmé par RT-PCR et séquençage.



Micro-injection

4,2 ng de sMO15b (soit 0,5 nl d'une solution à 1mM) sont injectés au stade une cellule avec du rouge de phénol dilué au 1/10 ème pour faciliter la visualisation lors de l'injection. En raison de la toxicité particulière de ce morpholino, le morpholino MO-p53 a été co-injecté avec le sMO15b à la dose de 1,7 ng (soit à une concentration de 0,4mM incluse dans la solution de sMO15b injectée). En effet, il a souvent été décrit que l'utilisation des morpholinos engendrait une activation aspécifique de p53 induisant des phénomènes de mort cellulaire. L'utilisation du morpholino contre p53 est dans ce cas conseillée pour réduire les phénomènes de mort cellulaire qui sont macroscopiquement visibles (Gerety et Wilson, 2011).

Séquence 5' 3' MO-p53 (Robu <i>et al.</i> , 2007)	Masse moléculaire
GACCTCCTCTCCACTAAACTACGAT	8308 g/mol

Morpholino standard (ctl-MO)Caractéristiques techniques

Séquence 5' 3'	Masse moléculaire
CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA	8817g/mol

Le morpholino est resuspendu dans de l'eau milliQ autoclavée de façon à obtenir une solution stock de 4 mM qui est stockée à -20°C sous forme d'aliqots de 10 µl. Les dilutions de ce stock utilisées pour l'injection se font également en H2O milliQ autoclavée et sont également stockées à -20°C. Notez que ce morpholino à été couplé à la fluorescéine lors de sa synthèse.

Mode d'action

Le morpholino standard est indiqué par Gene Tools comme un bon contrôle négatif d'injection de morpholinos et son utilisation chez le poisson zèbre est recommandée par Gerety et Wilson (2011). Ce morpholino n'a à priori pas de cible et aucune activité biologique réelle chez le poisson zèbre. En effet, il cible spécifiquement le pré-ARNm de la beta globine présent uniquement au niveau des réticulocytes de patients atteint la β thalassémie associée à une mutation en position 705 générant un épissage anormal. Dans ces cellules, le morpholino standard empêchera cet épissage générant ainsi un ARNm correctement épissé codant pour des chaines de β globine normales.

(http://www.gene-tools.com/custom_morpholinos_controls_end_modifications).

Micro-injection

4,4 ng de ctl-MO (soit 0,5 nl d'une solution à 1 mM) sont injectés au stade une cellule avec du rouge de phénol dilué au 1/10 ème pour faciliter la visualisation lors de l'injection.

Remarque : l'injection de ce morpholino à une concentration supérieure à 1mM s'est avérée toxique entraînant la mort des embryons.

Fiche technique N°14

TEST EFFICACITE DU MORPHOLINO sMO15b

Principe

Comme décrit dans la fiche technique N°13, l'injection du morpholino sMO15b entraîne à priori un saut de l'exon 2 lors de l'épissage du pré-ARNm de *coll5a1b*. Afin de s'assurer de l'efficacité de ce morpholino, nous avons donc choisi d'amplifier par RT-PCR et de séquencer un fragment d'ADNc correspondant à la fin de l'exon 1 jusqu'au début de l'exon 3 de l'ARNm de *coll5a1b*. La taille attendue de l'amplicon dans des embryons non injectés avec le sMO15b est de 227 pb. La taille de l'exon 2 étant de 71 pb, un produit PCR de 156 pb est donc attendu s'il y a bien épissage de l'exon 2 dans les embryons injectés avec le sMO15b.

Extraction d'ARN au trizol et réparation des ADN complémentaires (ADNc) à partir d'ARNm issus d'embryons injectés par le sMO15b

L'extraction des ARN et la préparation des ADNc sur des embryons de 24 hpf ont été réalisées en suivant les protocoles décrits dans la fiche technique N°2.

PCRAmorces utilisées

Nom	Séquence 5' 3'	Taille de l'amplicon
Amorce coll5bex1L	TGGGTGACAACACTCTGGAA	227 pb
Amorce coll5bex3R	TGAAGGACACAGATGGTGGA	
Amorce actin L	AAGCAGGAGTACGATGAGTCT	279 pb
Amorce actin R	GGTAAACGCTTCTGGAATGAC	

Remarque : Nous avons amplifié le gène de la β actine qui nous a servi de gène de ménage contrôle lors de ce test d'efficacité.

Pre mélange réactionnel

Les concentrations des produits utilisés pour réaliser le pré-mélange réactionnel de PCR sont identiques à celles utilisées dans la fiche technique n°2

Mélange réactionnel

Volume de réaction de 20 μ l

- Pre- mélange réactionnel	19 μ l
- ADNc	1 μ l

Programme PCR

Le programme PCR est identique à celui décrit dans la fiche technique n° 2

Séquençage de l'amplicon col15bex1L - col15bex3L chez les morphants sMO15b

Afin d'augmenter la quantité de produits de PCR, l'amplification précédemment décrite à été faite en 4 réplicats qui seront « poolés » lors de la purification. Cela s'est avéré plus efficace que de faire une seule réaction en augmentant la quantité d'ADNc et le volume final de PCR.

- Dépôt des produits de PCR sur gel d'agarose 2,5%
- Découpe des bandes de produits de PCR
- Purification des bandes découpées à l'aide du kit « Nucleospin gel and PCR clean up » de Macherey Nagel en « poolant » les 4 échantillons au moment du chargement de l'ADN sur la colonne.

Remarque : l'éluion finale en fin de purification se fait dans 30 µl de tampon d'éluion NE.

- Dosage au nanodrop des produits de PCR purifiés
- Envoi à GATC (Compagnie privée, Allemagne) de l'échantillon à séquençer dilué dans de l'H₂O milliQ (concentration finale comprise entre 30 et 50 ng/µl) avec les primers col15bex1L et col15bex3L (à concentration de 10 µM) comme amorces de séquençage pour un séquençage de l'amplicon dans les deux sens.

Fiche technique N°15

EVALUATION DE LA MOTILITE DES EMBRYONS

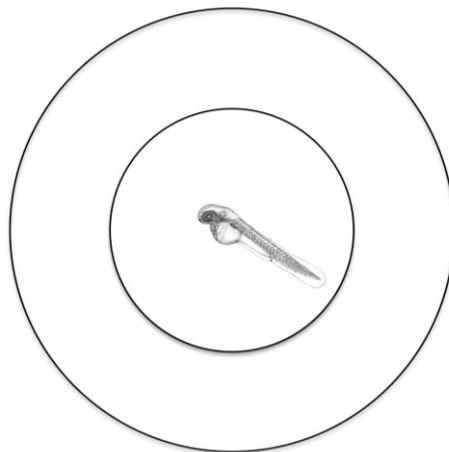
Ce test a été réalisé à partir du protocole décrit dans Goody *et al.* (2012).

- Les embryons de 2 jpf sont déchorionnés et transférés dans une boîte de pétri de 60 mm une heure environ avant le test.

- Au moment de l'analyse l'embryon est placé seul dans une boîte de pétri de 60mm qui est placée au préalable sur la plateforme de l'Axiozoom (Leica) munie d'une base chauffée à 28°C le temps de l'expérience.

Remarque : les embryons en attente d'analyse sont également maintenus à 28°C en attendant leur analyse pour éviter tout biais de comportement dûs à des écarts de température.

- Un transparent sur lequel sont imprimés deux cercles concentriques d'un rayon de 2,5 et 5 mm est alors disposé sous la boîte de pétri de façon à ce que le centre de la vésicule vitelline de l'embryon se retrouve toujours au centre du cercle avant la stimulation (voir schéma ci dessous).



- Une acquisition en streaming est alors lancée (une image étant prise toutes les 70 ms) et l'embryon est immédiatement stimulé à l'aide d'une pince fine (pince pour microscopie) au niveau de la partie caudale du tronc (moitié se situant en regard de la fin du prolongement du sac vitellin) le nombre de fois nécessaire à la mise en mouvement de l'embryon et nous arrêtons l'acquisition quand l'embryon est entièrement sorti du second cercle. Si l'embryon s'arrête alors qu'il n'est pas sorti du cercle il est de nouveau stimulé jusqu'à ce que ce soit le cas.

- Ensuite nous mesurons le temps qu'il faut à l'embryon pour sortir de la zone ce qui correspond en pratique à la somme des intervalles de temps durant lequel l'embryon se trouve en mouvement depuis la première stimulation jusqu'à sa sortie définitive du second cercle.

Fiche technique N°16

GENOTYPAGE DE MUTANTS *UNPLUGGED*

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé des embryons de 18hpf issus d'un croisement de poissons hétérozygotes pour l'allèle mutant *tbb72* du gène *unplugged* qui nous ont été fournis gracieusement par Michael Granato (Pennsylvanie ; Etats-Unis). Les embryons ont dans un premier temps subi un immunomarquage selon le protocole décrit fiche technique N° 11 afin d'analyser la présence relative de COLXV-B dans le trajet des motoneurones. Ils ont ensuite été génotypés pour la présence de la mutation *tbb72*.

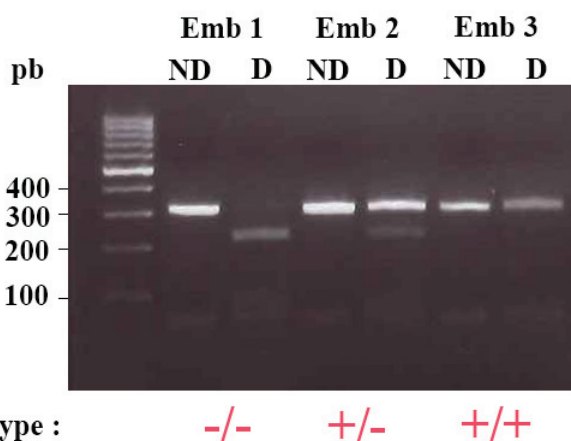
Informations sur les mutants *unplugged* utilisés dans notre étude

Le gène *unplugged* est l'orthologue poisson zèbre du gène codant pour le récepteur MuSK chez les mammifères (Zhang *et al.*, 2004). Le gène *unplugged* génère trois transcrits donnant naissance à une isoforme longue dite unpFL et deux isoformes courtes dite unpSV1 et unpSV2. Sur la base d'un screening de mutants affectant la motilité, plusieurs allèles mutants de ce gène ont été caractérisés et concernent uniquement les formes FL et SV1 (voir figure 25).

La mutation *tbb72* est une mutation d'une thymine en adénine en position 1339 du transcrit *unp* FL qui change la tyrosine en position 444 en codon stop. Cette mutation génère ainsi des formes de unp SV1 et unp FL tronquées avant le domaine kinase intracellulaire essentiel pour la transduction du signal. Ce mutant n'est pas viable à l'état homozygote et les embryons présentent une absence totale de jonction neuromusculaire et de prepatterning ainsi que des défauts de guidage des motoneurones primaires et secondaires.

Principe du génotypage

La présence de la mutation génère l'apparition d'un site de restriction pour l'enzyme AflII. De ce fait, il est possible de génotyper les embryons par simple amplification du fragment contenant la mutation suivi d'une digestion enzymatique de l'amplicon par AflII. Néanmoins, nous avons dû séquencer plusieurs échantillons pour lesquels la digestion enzymatique ne nous a pas permis de déterminer avec certitude le génotype de l'individu.

Exemple de résultat obtenu pour chaque génotype

ND = Produit PCR non digéré par AflII

D= Produit PCR digéré par AflII

Préparation des embryons pour extraction d'ADN génomique après analyse de l'immunomarquage de COLXV-B

- Transfert de l'embryon dans un tube PCR contenant du Glycérol 50% dilué en PBS
- Incubation de 10 min à RT
- Retrait du glycérol 50% en PBS 1X
- Incubation de 10 min à RT en 25% glycérol en PBS 1X
- Retrait du glycérol 25% en PBS 1X
- Incubation de 10 min à RT en PBS 1X

Extraction d'ADN génomique à la soude

- Retrait du maximum de PBS 1X
- Ajout de 20 µl de NaOH 50mM
- Incubation de 10 min à 95°C dans un thermocycleur
- Dépôt immédiat sur glace
- Ajout de 2 µl de Tris-HCl 1M pH= 8
- Congélation à -20°C jusqu'à utilisation

Amplification par PCR de la séquence contenant la mutation tbb72

Amorces

Les séquences des amorces utilisées pour amplifier l'allèle tbb72 nous ont également été fournies par le laboratoire de Michael Granato qui pratique ce génotypage en routine.

	Séquence 5' 3'	Masse moléculaire
BB72 L	TGGCTTTCAACACATCACTCTCC	6898 g/mol
BB72 R	GGTCCGCTGTCATCACATTCC	6336 g/mol

Séquence amplifiée (5' 3')

TGGCTTTCAACACATCACTCTCCCAGAATGCACTTCTCTACCCAGCCAACAAGCA
GATCCATCCTCCTGTACAGCGGTTCTTAT/AGTTGgtaagagtgacacgcattttcctgtgggctgctg

tttgctacatctttgttagttgtgatatttggggctgatgttcataaagcatccgtcccctgaaaacaatgggtgtagcggaaaaacgc
cacgcatgtttttgccaggacaatgctgtagggtttttgtttatgtgaaatgctctgtgaggaatgtgatgacagcggacc

Position de la mutation *tbb72*

Pré-mélange réactionnel pour PCR

Volume final de 28 µl par échantillon

- Tampon 10x associé à la Taq polymérase (Biolabs, thermoPol Buffer)	3 µl x n échantillons
- Mélange des 4 dNTP (stock à 10mM chacun)	0,6 µl x n échantillons
- Taq polymérase (Biolabs, 5U/ µl)	0,3 µl x n échantillons
- Amorces BB72 L (10 µM stock)	1,5 µl x n échantillons
- Amorces BB72 R (10 µM stock)	1,5 µl x n échantillons
- H ₂ O milliQ	QSP 28 µl x n échantillons

Mélange final pour PCR

Volume de réaction de 30 µl

- Pre- mélange réactionnel	28 µl
- ADN génomique	2 µl

Programme PCR

Le programme PCR est identique à celui de la fiche technique N°2 excepté la température d'hybridation des amorces qui est de 62°C.

Purification des produits de PCR

Afin de pouvoir effectuer la digestion enzymatique, une purification des produits PCR a été réalisée en suivant les instructions du kit « Nucleospin gel and PCR clean up » de Macherey Nagel

Remarque : l'élution finale se fait dans 20 µl de tampon d'élution NE et 10 µl sont gardés pour dépôt sur gel comme témoin de PCR.

Digestion enzymatique des produits de PCR

Mélange réactionnel

Volume de réaction 20 μ l

Produit de PCR purifié	10 μ l
Tampon 10X NEB 4 (Biolabs)	2 μ l
Enzyme de restriction AFIII	0,5 μ l
H ₂ O milliQ	QSP

- Incubation de 2H en bain marie à 37°C

- Dépôt des produits de PCR digérés et du restant de produit PCR non digéré sur gel d'agarose à 2% pour analyse

Génotypage par séquençage

Les produits de PCR purifiés (concentration finale comprise entre 30 et 50 ng/ μ l) sont envoyés à la compagnie GATC (Allemagne) pour séquençage avec l'amorce BB72R (à la concentration de 10 μ M).

Fiche technique N°17

IMMUNOMARQUAGES FLUORESCENTS SUR COUPES CRYOSTAT

Protocole utilisé pour le triple marquage phalloïdine-TRITC / β caténine/ Hoechst ainsi que pour le triple marquage COLXV-B / MAb473 HD/ Hoechst

Fixation des embryons

- Fixation sur la nuit à 4°C des embryons préalablement déchorionés en PFA 4% sans agitation

Inclusion des embryons en agarose/sucrose

- Rinçage rapide en PBS 1X
- Inclusion des embryons en bloc d'agarose 1,5% sucrose 5% qui permettra de pouvoir manipuler plus aisément les embryons et de mieux les orienter lors de l'inclusion en OCT.
- Taille du bloc avec une lame de rasoir en forme de pavé droit au plus proche des contours de l'embryon
- Incubation des blocs sur la nuit à 4°C dans une solution de sucrose 30% dilué en PBS 1X

Inclusion des blocs en milieu de congélation

- Immersion du bloc d'agarose/sucrose dans un moule contenant du « Tissue Tek OCT compound » (Electron Microscopy Science) en veillant à bien orienter le bloc en adéquation avec le sens de la coupe souhaitée.
- Immersion du moule dans un récipient contenant de l'isopentane froid (conservé à -80°C la veille) et maintenu à basse température sur carboglace le temps de la congélation du bloc.
- Conservation du bloc à - 80°C jusqu'au moment de la découpe.

Coupes au cryostat

- Réalisation de coupes à froid de 20 μ m d'épaisseur avec un cryostat CM3050 Leica sur des lames superfrost ultraplus.
- Conservation des lames à -20°C jusqu'au moment de l'immunomarquage

Remarque : Pour l'immunomarquage de COLXV-B, les lames sont incubées 2H dans un thermobloc à 40°C afin de favoriser le démasquage des épitopes avant d'être conservées à -20°C.

Préparation des lames avant saturation

- Ramener les coupes à température ambiante (10 min)
- Délimiter la zone d'immunomarquage avec un crayon à dépôt hydrophobe insoluble (pap-pen, SIGMA)
- Réhydratation 5 min en PBS 1X

Saturation (300 µl)

- 30 min en solution de saturation (1% BSA ; 3% serum de mouton en PBS 1X)

Incubation avec l'anticorps primaire (150 µl)

- Incubation de 1H à température ambiante ou d'une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué en solution de saturation (voir tableau ci dessous pour les caractéristiques et la dilution de chaque anticorps utilisé).

Anticorps utilisé	Protéine ciblée	Espèce	Dilution
Anti β caténine	β caténine	Monoclonal Souris	1/400
Anti - NC10	COLXV-B (extrémité N terminal)	Polyclonal Lapin purifié	1/100
MAb 473 HD (Don de Andreas Faissner)	Structure DSD 1 glycosaminoglycane	Monoclonal Rat	1/100

Lavage de l'anticorps primaire

- 4 x 5 min en PBS 1X

Incubation anticorps secondaire et/ou phalloïdine TRITC (400 µl)

- Incubation de 1H à température ambiante avec la phalloïdine-TRITC (SIGMA resuspendue à 0,5 mg/ml) dilué au 1/100 ème et l'anticorps secondaire d'espèce adéquat dilué au 1/500 ème (anti-IgG de souris et anti-IgG de lapin couplés à l'alexa 546 ou 488, Invitrogen) ou au 1/200 ème (anti- IgG de rat couplé à l'alexa 488, Invitrogen) en solution de saturation.

Lavage de l'anticorps secondaire

- 2 x 5 min en PBS 1X

Marquage des noyaux au Hoechst (400 µl)

- 7 min en Hoechst 33342 (SIGMA, solution stock à 5mg/ml en PBS 1X) dilué au 1/4000 ème en solution de saturation ou en PBS 1X

- 5 min en PBS 1X

Montage et observation

- Montage entre lame et lamelle en 50% glycérol dilué en PBS 1X.
- Conservation des lames à 4°C à l'abri de la lumière

Résultats

RESULTATS

Ce chapitre est scindé en deux parties correspondant aux deux temps forts de mes travaux de thèse. Chaque partie contient l'exemplaire de la publication acceptée ou en cours de soumission, accompagné d'un synopsis en français qui reprend les résultats majeurs figurant dans la publication et replace ma contribution dans les travaux effectués.

Axe I - Caractérisation de l'expression de *coll5a1b* au cours de la myogenèse primaire

A mon arrivée au laboratoire, un second gène codant pour le collagène XV avait été identifié sur le chromosome 2 du génome du poisson zèbre, nommé *coll5a1b*. Le projet a consisté à caractériser ce second paralogue et à établir un patron d'expression complet de ce gène dans le développement du poisson zèbre.

Les premiers résultats ont indiqué que la structure de COLXV-B composée d'une région collagénique centrale (composée de 9 domaines collagéniques et 8 interruptions) et de deux grands domaines non-collagéniques aux extrémités de la molécule était globalement similaire à celle de COLXV-A et de la protéine humaine. La séquence protéique déduite de COLXV-B a montré un degré d'identité avec la protéine humaine légèrement plus élevé que ne l'était celle de COLXV-A. De plus, contrairement à *coll5a1a*, *coll5a1b* a été retrouvé dans le même groupe synthénique que *COL15A1*. L'expression de *coll5a1b* est similaire à celle des orthologues humain et murin. L'expression de *coll5a1b* débute à 13 hpf (stade 8 somites) dans les précurseurs du muscle lent. Au cours des 72 premières heures de développement, les transcrits *coll5a1b* sont également trouvés dans les tissus nerveux, le cœur, la vésicule otique, les yeux et les arcs aortiques. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que ce paralogue serait plus proche fonctionnellement du collagène XV des mammifères que ne l'était COLXV-A.

C'est à ce stade de l'étude que mon projet de thèse a débuté. On m'a confié dans un premier temps la caractérisation de l'expression de *coll5a1b* au cours de la myogenèse primaire afin de finaliser la publication en cours. J'ai donc réalisé des co-marquages de *coll5a1b* avec le marqueur musculaire général *myoD* et un marqueur spécifique du muscle lent, *smyhcl*. J'ai également bloqué la différenciation des cellules adaxiales en inhibant la voie de signalisation Hedgehog par des traitements à la cyclopamine et analysé l'expression de *coll5a1b* dans ces conditions. Ces expériences ont permis de montrer que *coll5a1b* est spécifiquement exprimé par les cellules adaxiales tout au long de leur différenciation, depuis leur spécification vers le lignage lent jusqu'aux stades tardifs de leur différenciation au moment de leur migration radiale vers la périphérie du myotome. Elles ont également confirmé que *coll5a1b* n'est pas exprimé par les précurseurs du muscle rapide localisés dans le mésoderme latéral.



Characterization of spatial and temporal expression pattern of *Col15a1b* during zebrafish development

Sandrine Bretaud¹, Aurélie Pagnon-Minot¹, Emilie Guillon, Florence Ruggiero, Dominique Le Guellec^{*}

Institut de Biologie et Chimie des Protéines, CNRS UMR 5086, IFR 128, Université de Lyon, Université Lyon 1, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 07, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2010

Received in revised form 19 October 2010

Accepted 22 October 2010

Available online 31 October 2010

Keywords:

Zebrafish

Teleost

Danio rerio

In situ hybridization

Expression pattern

Extracellular matrix

Multiplexins

Collagen XV

Muscle

Adaxial cells

Otic vesicle

Eye

Telencephalon

Hindbrain

Aortic arches

ABSTRACT

In mammals, collagen XV is primarily expressed in skeletal and cardiac muscles, and loss of its expression in mice results in a mild skeletal myopathy. We recently identified *Col15a1a*, a zebrafish ortholog of the human collagen XV gene which expression was restricted to notochord in embryos. *Col15a1a* knockdown led to defects in muscle maintenance via Shh signaling. Here we report that zebrafish express a second ortholog *Col15a1b*. The identification of its complete primary sequence showed that the overall structure of collagen XV is well conserved between vertebrates. Whole mount *in situ* hybridization and RT-PCR analysis revealed that at 12 hpf *Col15a1b* is mainly expressed in slow muscle cell lineage and in nervous tissues, and, at later stages transcripts are detected in eyes, otic placodes and aortic arches. Based on the expression pattern of *col15a1b*, sequence alignments and synteny comparisons, we conclude that, contrary to collagen XVa, the zebrafish collagen XVb likely displays the same or similar function than the mammalian orthologs.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Results and discussion

Collagen XV forms with collagen XVIII a distinct subgroup among the collagen superfamily called Multiplexin for Multiple triple helix domains with interruptions. Both proteins are characterized by a central, highly interrupted triple helical domain (COL domains) flanked by large N- and C-terminal non-collagenous domains (NC domains). Both collagens XV and XVIII include a conserved thrombospondin N-terminal-like domain (TSPN) at their N-terminal ends and contain a C-terminal antiangiogenic fragment, restin and endostatin, respectively (for review see, Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). Whereas collagen XVIII carries heparan sulfate chains, collagen XV has been shown to primary anchor chondroitin sulfate chains. In mammals, collagen XV transcripts are mainly expressed in heart and skeletal muscle (Hägg

et al., 1997b) and *Col15a1* inactivation in mice causes skeletal myopathy and cardiovascular defects (Eklund et al., 2001).

In zebrafish, two orthologs of the human *COL15A1* gene have been characterized, called *Col15a1a* (GenBank accession number **AM259122**) and *Col15a1b* (accession number **FN432724**). In a previous study (Pagnon-Minot et al., 2008), we showed that expression of *Col15a1a* is mainly detected in the notochord and that its protein product is deposited exclusively in the peri-notochordal basement membrane. Morpholino-mediated knockdown indicated that collagen XVa is required for notochord differentiation and muscle development in zebrafish embryos and that it interplays with Shh signaling. In this study, the complete spatial and temporal expression of the second collagen XV gene, *Col15a1b* during zebrafish development have been characterized. Moreover, sequence alignments and synteny-based comparisons have been carried out.

1.1. Structure of zebrafish collagen XVb

Col15a1b corresponds to a partial cDNA (DW248793) previously found to be expressed in the marginal zone of the eyes and named mz98 (Pujic et al., 2006). The full length nucleotide sequence en-

* Corresponding author. Tel.: +33 4 72 72 26 60; fax: +33 4 72 72 26 04.

E-mail address: d.leguellec@ibcp.fr (D. Le Guellec).

¹ These authors contributed equally to this work.

codes a protein of 1169 residues that is 45% identical to human collagen XV (AS:NM001855) and 46% identical to zebrafish collagen XVa. The structure of collagen XVb is similar to the human protein structure. Hence, the molecule comprises amino-(NC10) and carboxy-(NC1) terminal non-collagenous domains that flank a central highly interrupted collagenous domain (COL) which is composed of nine well-conserved collagenous domains, COL1–COL9 separated by eight short non-collagenous domains NC2 to NC9 (Table 1 and Fig. 1). The NC1 domain contains the typical restin domain of 181 amino acid residues including four conserved cysteine residues. The restin fragment sequence presents higher identity to the human ortholog (61%) than to the collagen XVa zebrafish paralog (47%). A high degree of homology also exists between the zebrafish collagen XV restin sequence and the endostatin sequence of human and zebrafish collagen XVIII (57% identity). Several potential glycosylation sites were also identified (not shown).

The collagen XV zebrafish paralogs were found in two different linkage groups, LG24 and LG2 for *Col15a1a* and *Col15a1b*, respectively. Human *COL15A1* gene has been previously mapped to chromosome 9 region q21–q22 (Huebner et al., 1992). Higher degrees of conserved synteny were observed between human chromosome (Hsa) 9 and LG24 than with LG2 (Woods et al., 2005). Nevertheless, using ensembl for *in silico* chromosome mapping analysis, the orthologous gene pair *COL15A1/TGFBR1* and *Col15a1b/tgfr1* was found in Hsa9 and LG2, respectively. No conserved synteny was observed in the chromosomal region (LG24) containing *Col15a1a*.

1.2. Expression of *Col15a1b* during zebrafish development

The temporal expression pattern of *Col15a1b* was determined by RT-PCR (Fig. 2) and confirmed by whole-mount *in situ* hybridizations (Figs. 3 and 4). Expression was first detected at 12 h post-fertilization (hpf) and was maintained until 72 hpf, the latest stage examined in the present study (Fig. 2).

1.2.1. Expression of *Col15a1b* in developing skeletal muscle

At 13 hpf, *Col15a1b* was homogeneously expressed in adaxial cells, which lie on each side of the notochord, as shown in dorsal view (Fig. 3A) and caudal cross-section (Fig. 3B). At 15 hpf, when the differentiation of adaxial cells towards slow muscle lineage is engaged, *Col15a1b* expression was progressively restricted to two anterior and posterior regions of adaxial cells (Fig. 3C). At 18 hpf, the expression of *Col15a1b* differed along the anterior–posterior axis according to the anterior-to-posterior wave of somite formation. At this stage, when radial migration of adaxial cells starts in the most anterior somites, the restricted expression of *Col15a1b* was clearly observed in posterior somites whereas its expression extended to the lateral mesoderm in anterior somites (Fig. 3D–F). Simultaneous detections of *Col15a1b* and *myoD* (Fig. 3G–I) or *smhc*

Table 1
Comparison of the different domains between the zebrafish and human Collagen XV proteins. Numbers represent the percentage of identity (% Id) obtained from alignments using ClustalW. Hum: human Collagen XV.

Domains	% Id ColXVa/b	% Id ColXVa/hum	% Id ColXVb/hum
Full length	46	41	45
TSPN	54	54	54
COL9	76	52	52
COL8	69	61	53
COL7	86	60	50
COL6	54	48	46
COL5	65	50	49
COL4	63	40	46
COL3	64	55	50
COL2	59	67	65
COL1	83	75	73
Restin	46	47	61

(*slow myosin heavy chain*) (Fig. 3J–L) were performed to monitor *Col15a1b* expression at 18 hpf, when slow and fast muscles differentiate. Double *in situ* hybridization with *Col15a1b* and *myoD* antisense riboprobes (Fig. 3G–I) revealed that *Col15a1b* was expressed in all the eighteen somites, whereas *myoD* was exclusively expressed in the ten posterior somites as previously reported (Weinberg et al., 1996). In the posterior developing somites, the *myoD* muscle marker was expressed in adaxial cells and paraxial mesoderm that contains the fast muscle precursors (Fig. 3H). *Col15a1b* only co-localized with *myoD* in adaxial cells as shown in dorsal view (Fig. 3H) and transverse sections (Fig. 3I). Double *in situ* hybridization with the antisense riboprobes for *Col15a1b* and the slow fiber differentiation marker *smhc*, showed that *Col15a1b* is expressed in all *smhc*-positive cells (Fig. 3J–L). At 19 hpf, *Col15a1b* expression decreased in differentiated adaxial cells (data not shown) and at 24 hpf signal was restricted to somites of the posterior part of the tail (Fig. 3O).

Commitment of adaxial cells to slow muscle lineage depends on Hedgehog signaling (Hirsinger et al., 2004). In absence of Hedgehog signaling pathway, adaxial cells still form but differentiate into fast muscle fibers. To demonstrate that *Col15a1b* was exclusively expressed in slow muscle cells precursors, embryos were treated from 5.3 hpf to 18 hpf with cyclopamine, a specific inhibitor of Hedgehog signaling and processed for *in situ* hybridization with the *Col15a1b* probe. No signal was observed in these somites of cyclopamine-treated embryos (Fig. 3M and N). Note that the signal located in rhombomere 5 was not affected by the drug treatment.

1.2.2. Expression of *Col15a1b* in other tissues

Col15a1b was also expressed in several other tissues. A *Col15a1b* labeling was detected in nervous tissues from 12 hpf to 72 hpf, the latest stage examined in this study, and in eyes, otic placode and aortic arches from 18 hpf to 72 hpf (Fig. 4).

A strong expression of *Col15a1b* was found in the medial region of the developing otic vesicles of 24 hpf embryos (Fig. 4A). At 30 hpf, the expression was restricted to the ventro-medial epithelial cells surrounding the central cavity (Fig. 4B). At 48 hpf, only epithelial cells located in the posterior region of the otic vesicle were labeled (Fig. 4C).

At 24 hpf, the optic cup is well developed and the lens detaches from the overlying epidermis (Schmitt and Downling, 1999). The undifferentiated retina is constituted by the retinal pigmented epithelium and by the primordium of the neural retina, in which *Col15a1b* expression was observed (Fig. 4D). At 48 hpf and 72 hpf (Fig. 4E and F), a strong *Col15a1b* expression was detected in the ciliary marginal zone containing neuroepithelial cells, as previously reported (Pujic et al., 2006).

The aortic arch system consists of six pairs of vessels, including the vestigial arch 2 that connect the ventral aorta to the lateral dorsal aorta (Isogai et al., 2001). They are located within the corresponding branchial arches. At 48 hpf and 72 hpf, aortic arches 1, 3, 4, 5 and 6 expressed *Col15a1b* (Fig. 4G–I). Consistent with *Col15a1* expression in mammals, zebrafish *Col15a1b* transcripts were detected in the heart at 72 hpf (Fig. 4H).

Col15a1b was also expressed in the developing brain (Fig. 4H–J). In 24 hpf embryos, a weak signal was detected in the medial part of the midbrain–hindbrain boundary and in rhombomere 5 (Fig. 4J). At 72 hpf, a labeling was additionally detected in the dorsal telencephalon area closed to the diencephalon (Fig. 4H). Finally, *Col15a1b* transcripts were also detected in primary mouth (Fig. 4K).

1.3. Conclusion

The expression pattern of the second zebrafish collagen XV gene described here (*Col15a1b*) does not overlap with the one previously

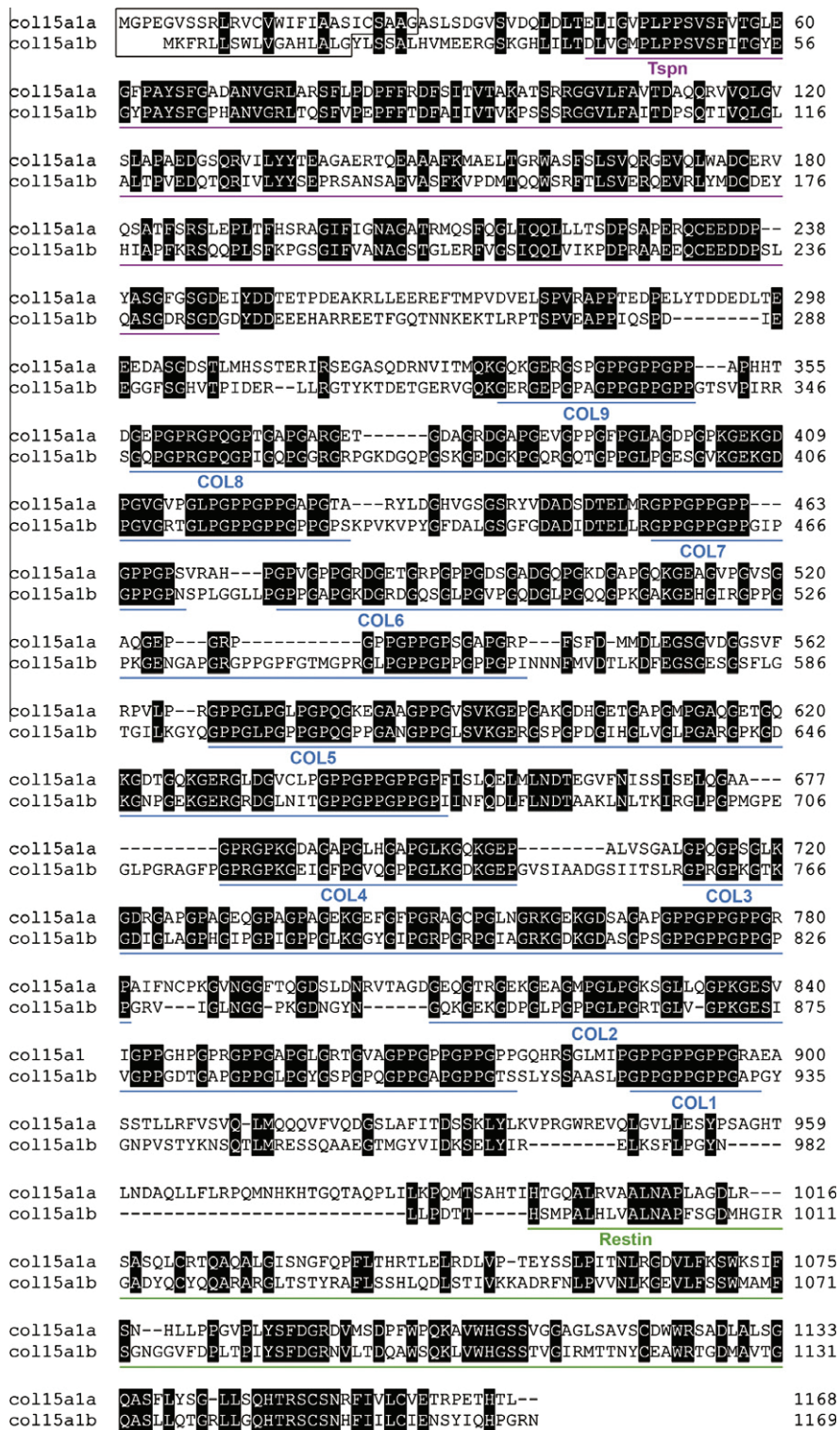


Fig. 1. Deduced amino acid sequence of full-length zebrafish collagen XVb aligned with zebrafish collagen XVa sequence using ClustalW. Black boxes represent identical amino acids. TSPN, collagenous (COL) and restin domains are indicated. Predicted peptide signals using PrediSi server (<http://www.predisi.de>) are boxed.

reported for the collagen XV gene (Pagnon-Minot et al., 2008) and renamed here *Col15a1a*, which expression was exclusively detected in the notochord. *Col15a1b* is primarily expressed in skeletal muscle cells as in mammals (Kivirikko et al., 1995; Hägg et al., 1997a,b) suggesting that the function of the zebrafish collagen XVb is likely more similar to the mammalian protein than the zebrafish paralog collagen XVa. Along this line, conserved synteny with the human and mouse orthologs was only found for *Col15a1b*.

2. Experimental procedure

2.1. Cloning of *Col15a1b*

A zebrafish genomic clone (GenBank accession number CK93671) showing high homology with the sequence of the restin domain of mammalian *Col15a1* was used to screen expressed sequence tag in databases (EST banks with Basic Local Alignment

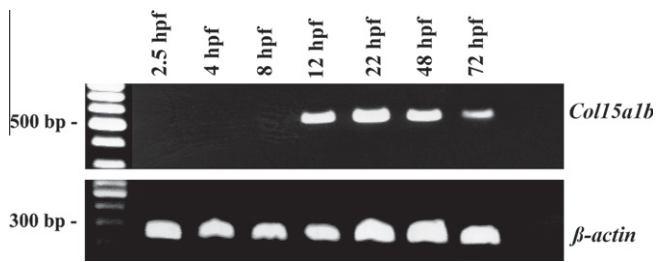


Fig. 2. Temporal expression pattern of zebrafish *Col15a1b* gene. RT-PCR was performed using RNA isolated from wild type embryos from 2.5 hpf to 72 hpf. RT-PCR for β -actin was used as positive control.

Search tool at NCBI. In this way, a 526 bp clone (accession number BU808689) has been isolated. Using the *Danio rerio* blast server of

Sanger website, the sequence of the whole *Col15a1b* starting from the TSPN domain was also found in a genomic clone of 134,883 bp (accession number BX511097.21). To determine the 5' missing region containing the signal peptide, a 5' RACE amplification was performed on RNA extracts from 24 hpf embryos using a primer present in the TSPN domain (5'CAATGTGGTATTTCATCACA-3'). A RT-PCR was performed on 48 hpf embryo RNA extracts using the forward primer from the 5'UTR region of *Col15a1b* (5'-ACAC TCTGGAAGTGTGATATC-3') and the reverse primer designed within the TSPN domain sequence (5'GTCTGGCACTTAAAAAGACGCA-3'). The sequence of the 5'UTR region and of the initiation translation site were confirmed by sequencing the PCR product. The complete cDNA was named *Col15a1b* cDNA clone in accordance with collagen and zebrafish nomenclature. The DDBJ, EMBL, and GenBank accession number for the nucleotide sequence is FN432724.

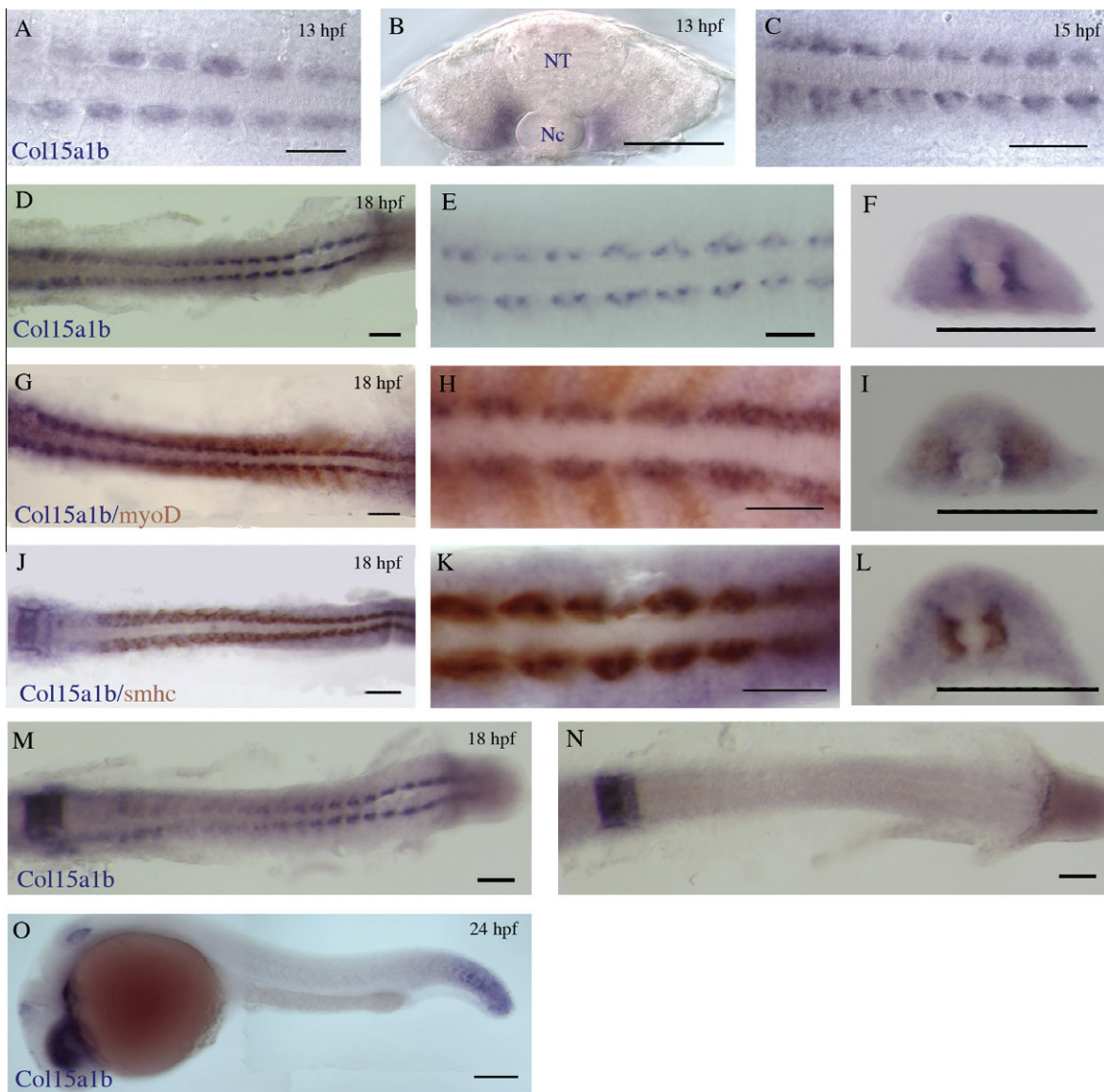


Fig. 3. *In situ* hybridization of *Col15a1b* antisense RNA probe on whole-mount zebrafish embryos at 13 hpf (8-somite), 15 hpf (12-somite); 18 hpf (18-somite stage), and 24 hpf. (A and C–E) Dorsal views of the trunk region of embryos hybridized with the *Col15a1b* probe at 13 hpf, 15 hpf and 18 hpf. (B and F) Cross-sections in the trunk region of 8 hpf and 18 hpf-hybridized embryos (Nc: notochord; NT: neural tube). (G and H) Dorsal views and (I) cross-section in the trunk region of an 18 hpf embryo double hybridized with *Col15a1b* and *myoD* probes. (J and K) Dorsal views and (L) cross-section in the trunk region of an 18 hpf embryo double hybridized with *Col15a1b* and *smhc* probes. (M and N) Dorsal views of 18 hpf embryos hybridized with *Col15a1b* probe after (N) or not (M) cyclopamine exposure. (O) Lateral view of a 24 hpf embryo hybridized with *Col15a1b* probe. Scale bar = 100 μ m for C, D, F, G, I, J, L, M–O, and 50 μ m for A, B, E, H, and K.

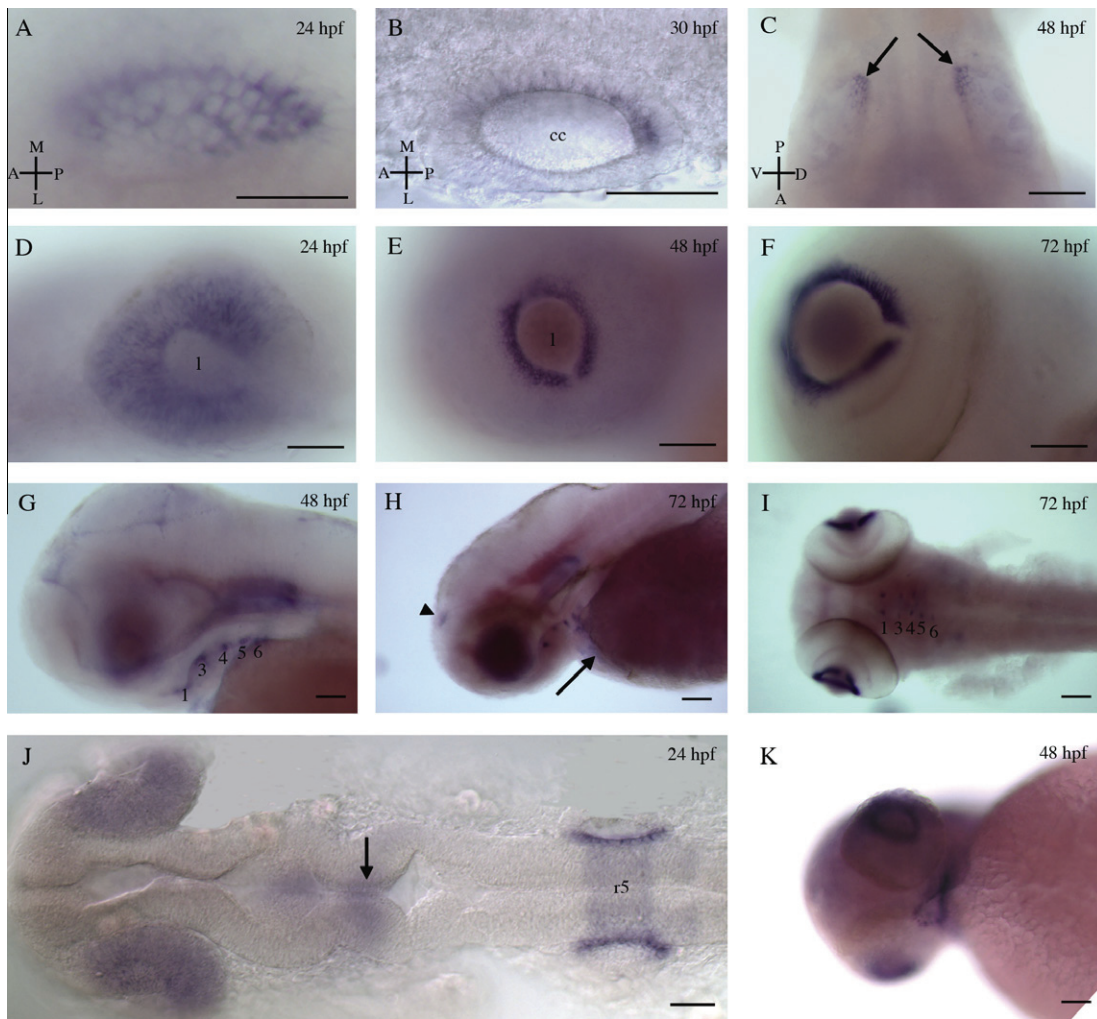


Fig. 4. *In situ* hybridization of *Col15a1b* antisense RNA probe on whole-mount zebrafish embryos at 24 hpf, 30 hpf, 48 hpf, and 72 hpf. (A and B) Lateral views of the otic vesicle of 24 hpf and 30 hpf embryos (cc: central cavity of the otic vesicle). (C) Dorsal view of the otic vesicles of a 48 hpf embryo. Arrows indicate the labeling in the posterior region of otic vesicles. (D–F) Lateral views of the left eye of 24 hpf and 48 hpf embryos, and 72 hpf larvae (l: lens). (G and H) Lateral and (I) dorsal views of the head region of 48 hpf embryos and 72 hpf larvae. Numbers indicate aortic arches 1–6. Arrow and arrowhead indicate the labeling in the heart and in the telencephalon, respectively. (J) Dorsal view of the head region of a 24 hpf embryo. Arrow indicates the midbrain–hinbrain boundary (r5: rhombomer 5). (K) Ventral view of the head region showing signal in the primary mouth. Scale bars = 50 μ m for A–G and J, and 80 μ m for H, I and K.

2.2. Animal maintenance

General maintenance, collection and staging of embryos were carried out at the PRECI zebrafish facility of IFR 128, Biosciences-Gerland (Lyon, France). Wild type (AB/TU) strain were reared and maintained at a constant temperature of 28 °C in a 14-h light cycle in compliance with French Government guidelines. Phenylthiourea (PTU) was added in all raising medium at 0.021 M to avoid pigmentation.

2.3. RT-PCR

Total RNA was extracted from whole embryos at different stages of development using Trizol reagent (Invitrogen, France). Three microgrammes of total RNA were used to synthesize a first strand cDNA by reverse transcription (M-MLV reverse transcriptase, Promega). For PCR amplification of *Col15a1b*, 2 μ l of cDNA were added to the following primers 5'-GATTCGAGGGTCTGGTGA-3' (forward) and 5'-ATACACCTGGCTCACCTTG-3' (reverse). β -Actin was amplified as a positive control using the following primers: 5'-AAGCAGGAGTACGATGAGTCTG-3' (forward) and 5'-GGTAAACCTTCTGGAATGAC-3' (reverse).

2.4. Cyclopamine treatment

5.3 hpf embryos were treated with 50 μ M cyclopamine (Sigma) dissolved in 0.5% DMSO in E3 medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.27 mM CaCl₂, and 0.33 mM MgSO₄). They were then fixed at 18 hpf with 4% paraformaldehyde.

2.5. Whole mount *in situ* hybridization

Whole mount *in situ* hybridization was carried out as previously described (Pagnon-Minot et al., 2008). A fragment encoding a part of TSPN domain (465 bp) of zebrafish *Col15a1b* served as a template for synthesis of DIG labeled RNA probes. A sense RNA probe complementary to the specific zebrafish *Col15a1b* probe was prepared as negative control. *MyoD* probe was generated according to Weinberg et al. (1996) and *smhc1* according to Elworthy et al. (2008). Transverse sections of one somite thickness were performed in whole mount embryo trunk region around the 14th somite, using a razor blade. Embryos were observed with Leica stereomicroscope or light microscope equipped with a Nikon digital camera.

Acknowledgements

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM) to D.L.G., a BQR grant from the University Lyon 1 to S.B., CNRS and ARC to F.R. A.P.-M. was a recipient of the AFM. We thank Laure Bernard and Jean Sauboua (PRECI zebrafish facility, IFR128 Bioscience-Gerland, Lyon, France) for zebrafish breeding and mating.

References

- Eklund, L., Piuhola, J., Komulainen, J., Sormunen, R., Ongvarrasopone, C., Fässler, R., Muona, A., Ilves, M., Ruskoaho, H., Takala, T.E.S., Pihlajaniemi, T., 2001. Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1194–1199.
- Elworthy, S., Hargrave, M., Knight, R., Mebus, K., Ingham, P.W., 2008. Expression of multiple slow myosin heavy chain genes reveals a diversity of zebrafish slow twitch muscle fibres with differing requirements for Hedgehog and Prdm1 activity. *Development* 135, 2115–2126.
- Hägg, P.M., Hägg, P.O., Peltonen, S., Autio-Harmanen, H., Pihlajaniemi, T., 1997a. Location of type XV collagen in human tissues and its accumulation in the interstitial matrix of the fibrotic kidney. *Am. J. Pathol.* 150, 2075–2086.
- Hägg, P.M., Horelli-Kuitunen, N., Eklund, L., Palotie, A., Pihlajaniemi, T., 1997b. Cloning of mouse type XV collagen sequences and mapping of the corresponding gene to 4B1-3. *Genomics* 45, 31–41.
- Hirsinger, E., Stellabotte, F., Devoto, S.H., Westerfield, M., 2004. Hedgehog signalling is required for commitment but not initial induction of slow muscle precursors. *Dev. Biol.* 275, 143–157.
- Huebner, K., Cannizaro, L.A., Jabs, E.W., Kivirikko, S., Manzone, H., Pihlajaniemi, T., Myers, J.C., 1992. Chromosomal assignment of a gene encoding a new collagen type (COL15A1) to 9q21 → q22. *Genomics* 14, 220–224.
- Isogai, S., Horiguchi, M., Weinstein, B., 2001. The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development. *Dev. Biol.* 230, 278–301.
- Kivirikko, S., Saarela, J., Myers, J.C., Autio-Harmanen, H., Pihlajaniemi, T., 1995. Distribution of type XV collagen transcripts in human tissue and their production by muscle cells and fibroblasts. *Am. J. Pathol.* 147, 1500–1509.
- Pagnon-Minot, A., Malbouyre, S.M., Haftek-Terreau, Z., Kim, R., Sasaki, T., Thisse, C., Thisse, B., Ingham, P.W., Ruggiero, F., Le Guellec, D., 2008. Collagen XV, a novel factor in zebrafish notochord differentiation and muscle development. *Dev. Biol.* 316, 21–35.
- Pujic, Z., Omori, Y., Tsujikawa, M., Thisse, B., Thisse, C., Malicki, J., 2006. Reverse genetic analysis of neurogenesis in the zebrafish retina. *Dev. Biol.* 293, 330–347.
- Ricard-Blum, S., Ruggiero, F., 2005. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol. Biol.* 53, 430 (422).
- Schmitt, E.A., Downling, J.E., 1999. Early retinal development in the zebrafish, *Danio rerio*: light and electron microscopic analyses. *J. Comp. Neurol.* 404, 515–536.
- Weinberg, E.S., Allende, M.L., Kelly, C.S., Abdelhamid, A., Murakami, T., Andermann, P., Doerre, O.G., Grunwald, D.J., Rigleman, B., 1996. Developmental regulation of zebrafish *MyoD* in wild-type, no tail and spadetail embryos. *Development* 122, 271–280.
- Woods, I.G., Wilson, C., Friedlander, B., Chang, P., Reyes, D.K., Nix, R., Kelly, P.D., Chu, F., Postlethwait, J.H., Talbot, W.S., 2005. The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 9, 1307–1314.

Axe II - Détermination du patron de localisation du collagène XV-B au cours de la myogenèse primaire et étude de son rôle dans la mise en place du système neuromusculaire

Après avoir caractérisé l'expression de *coll5a1b* pendant la myogénèse primaire, le deuxième objectif de mon projet de thèse était de déterminer la fonction du collagène XV-B (COLXV-B) dans la formation du muscle axial. L'ensemble des résultats que j'ai obtenus au cours de cette deuxième phase d'investigation fait l'objet d'une publication prête à être soumise, publication dont les résultats sont résumés ci-après.

Afin d'analyser la fonction de ce deuxième paralogue COLXV-B, complètement inconnue au début de cette étude, il nous est apparu essentiel de déterminer dans un premier temps sa localisation dans le myotome en cours de formation. En effet, COLXV-B étant une protéine de la matrice extracellulaire, il était difficile de prédire sa localisation en se basant uniquement sur celle des transcrits. Nous avons donc produit des anticorps dirigés contre deux peptides respectivement présents dans le domaine NC1 et le domaine NC10 de COLXV-B. Après avoir caractérisé la spécificité de ces anticorps, j'ai établi le patron de localisation de COLXV-B entre 13 hpf et 24 hpf. Ces immuno-marquages fluorescents ont permis de montrer que COLXV-B est déposé par les cellules adaxiales pré-migratoires dans une région restreinte de la matrice extracellulaire qui correspond au futur trajet des axones des motoneurones primaires. COLXV-B est aussi déposé dans le myosepte vertical, sur le trajet des cellules adaxiales pendant leur migration. Des co-marquages avec un marqueur des motoneurones primaires et les récepteurs à l'acétylcholine ont révélé que COLXV-B pave régulièrement la trajectoire de l'axone CaP selon un patron qui se superpose aux contacts synaptiques.

Puis, pour étudier la fonction de ce collagène, l'expression de *coll5a1b* a été inhibée par une stratégie anti-sens conventionnelle basée sur l'injection de morpholinos. *Coll5a1b* étant exprimé pendant la différenciation des cellules adaxiales, l'effet de l'inhibition de *coll5a1b* sur la différenciation de ces précurseurs a dans un premier temps été analysé. Les résultats obtenus indiquent que l'engagement des cellules adaxiales vers le lignage lent, de leur élongation à leur migration radiale ne sont pas modifiés en l'absence de COLXV-B. Cependant, l'absence de COLXV-B conduit à une augmentation du nombre de MPs au dépend du nombre de SSFs, cet effet étant, selon nos résultats, indépendant d'une dérégulation de la voie Hedgehog. J'ai ensuite étudié l'impact de l'absence de COLXV-B sur le développement des motoneurones primaires et secondaires ainsi que sur la mise en place de

la jonction neuromusculaire. COLXV-B s'est avéré être impliqué dans la croissance des axones des motoneurons primaires et secondaires sans pour autant avoir de rôle dans la formation de la jonction neuromusculaire ou le pre patterning des récepteurs à l'acétylcholine. Une analyse comportementale réalisée à deux jours de développement a également indiqué que les altérations causées par l'absence de COLXV-B avaient des conséquences physiologiques sur la motilité des embryons qui montrent une nage plus lente et plus erratique comparée à celle des embryons contrôles.

Afin de compléter cette étude, nous avons souhaité mieux comprendre la nature des signaux moléculaires qui contrôlent (1) l'expression de *coll5a1b* dans les cellules adaxiales, et (2) la localisation particulière de COLXV-B dans le trajet des axones moteurs.

L'absence d'expression de *coll5a1b* lorsque les embryons sont traités à la cyclopatamine (Bretaud *et al.*, 2011) nous laissait penser que *coll5a1b* faisait partie intégrante du programme génétique activé dans les cellules adaxiales par la voie Hedgehog. Afin de tester cette hypothèse, nous avons activé de façon ectopique la voie Hedgehog dans l'ensemble du myotome par surexpression d'une forme dominante négative de la protéine kinase A et analysé l'expression de *coll5a1b* dans ces conditions. La présence des transcrits et de la protéine COLXV-B généralisée à l'ensemble du myotome dans ces conditions nous a permis de confirmer que l'induction de *coll5a1b* était effectivement sous la dépendance de cette voie de signalisation.

Des analyses bibliographiques m'ont amenée à proposer l'hypothèse selon laquelle la voie de signalisation induite par le récepteur unplugged/MuSK pouvait contrôler l'organisation de COLXV-B dans le trajet des axones. En effet, plusieurs études montrent que ce récepteur, impliqué dans le guidage axonal, contrôle l'organisation d'autres protéines de la matrice extracellulaire dans cette même région. J'ai donc réalisé un immunomarquage de COLXV-B sur des embryons de 18 hpf, mutants pour le gène *unplugged/MuSK* qui nous ont été fournis par le Dr. Granato. Cette expérience a confirmé que la présence de COLXV-B dans le trajet des axones était dépendante de l'activité de *unplugged/MuSK* et m'a permis par la même occasion de montrer que COLXV-B constitue une nouvelle protéine matricielle dont la fonction dans le guidage axonal est dépendante de l'activité de *unplugged*.

L'ensemble de ces travaux indiquent que COLXV-B est un nouveau composant de la matrice extracellulaire présente dans le trajet des axones moteurs, produit par les cellules adaxiales sous la dépendance des voies de signalisation Hedgehog et unplugged/MuSK, et contribuant à la fois à la différenciation des cellules adaxiales et à la croissance des axones moteurs chez le poisson zèbre.

Zebrafish collagen XV-B is a Novel Myotome-derived Cue that Paves the Axonal Motor Path and Provides Contact Guidance for Axons at the Choice Point

Emilie Guillon, Sandrine Bretaud and Florence Ruggiero

Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, ENS de Lyon, UMR CNRS 5242, Université Lyon 1, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France.

Author for correspondence:

Dr Florence Ruggiero

IGFL, UMR CNRS 5242

ENS de Lyon – Site Monod

46, Allée d'Italie

F-69364 Lyon Cedex 07

Phone number: +33 426 731 358

Fax number: +33 426 731 373

e-mail: florence.ruggiero@ens-lyon.fr

Running title: zebrafish *coll5a1b* controls motor axon navigation

Abstract

After exiting the spinal cord, motor axons follow a stereotyped path toward their muscle target guided by multiple directional cues. Besides classic guidance molecules, the extracellular matrix provides positional information to guide motoneuron axons along their appropriate paths. Recent evidence shows that collagens play important roles in neuromuscular development. Collagen XV (COLXV) is a basement membrane associated component that is encoded by two paralogs in zebrafish. We reported that *coll5a1a* expression was restricted to notochord whereas *coll5a1b* was expressed by slow fiber precursors, the adaxial cells that represent an important source of the extracellular matrix path. Therefore we decided to interrogate the function of the second paralog *coll5a1b* in developing zebrafish. Immunofluorescence co-staining with newly generated antibodies to COLXV-B and cell-type specific markers indicated that COLXV-B paves the initial common trajectory of motor axons prior to axonal extension and persisted there by the time of axon progression. Overexpression of dominant-negative PKA in wild-type embryos and immunodetection of COLXV-B in *unplugged* mutants showed that *coll5a1b* expression depends on Hedgehog signaling whereas the critical organization of COLXV-B at the motor path depends upon *unplugged/MuSK* gene activity. Pertinent to its expression in adaxial cells and location at the common path, morpholino-based knockdown of *coll5a1b* compromised adaxial cell differentiation by increasing the number of muscle pioneers and caused primary motoneuron axons to stall abnormally at the choice point where specific pathway selection takes place. Absence of the protein in the common path later provoked secondary axon truncation or pathfinding errors at the choice point. As a consequence of disrupted muscle innervation, *coll5a1b*-morphants exhibited significant muscle fiber atrophy and compromised swimming behavior in response to touch stimulation. Our data identified an unexpected role for COLXV-B as an *unplugged/MuSK*-dependent cue that paves the axonal motor path to guide the decision of axons at the choice point.

Introduction

Establishment of a functional neuromuscular system in vertebrates is a complex and multi-step process that requires a finely tuned communication between muscle and innervating motoneurons. From their exit from spinal cord, motor axons are guided by an intricate balance of attractive and repulsive cues along a stereotyped path and navigate with a remarkable precision to their muscle target to form neuromuscular junctions (NMJ). Notwithstanding the general mechanism underlying development of the neuromuscular system has been well documented, the molecular signaling networks that orchestrate motoneuron pathfinding including axon growth, pausing, turning at places of intermediate targets and branching are not completely understood (Bonanomi and Pfaff, 2010).

Zebrafish have proven to be a highly effective model for the understanding of both normal and abnormal neuromuscular development due in large part to its small size, the simplicity and experimental accessibility of the spinal motor system and its highly stereotypical trajectory of axons that can be observed directly in living embryos (Beattie et al, 2000). The motor neurons from trunk develop in two waves in zebrafish. At 26 hours post-fertilization (hpf), each somitic hemisegment is innervated by three individually identifiable primary motoneurons (pMN): the caudal primary (CaP), the middle primary (MiP) and the rostral primary (RoP) motoneurons. The axons of the three pMNs exit ventrally through the same mid segmental root at 17-18 hpf to navigate along the medial surface of the somite following a common path, approximately midway along the anterior-posterior extent of each somite (Beattie et al, 2000). When they reach the nascent horizontal myoseptum that separates dorsal from ventral body muscles, axons stop extending. This constitutes the first intermediate target or choice point before axon trajectories diverge: CaP axon continues parallel to the vertical myosepta to innervate the ventral part of the myotome, while MiP axon retracts to innervate dorsal myotome and RoP innervate the middle muscle territory. From 28 hpf, approximately thirty secondary motoneuron axons exit progressively from the same spinal root and follow the path pioneered by primary motoneurons. Extending as a single nerve along the common path, axons then divide at the choice point to form a CaP-like nerve that project into the ventral myotome while a MiP and a RoP-like nerve innervate the dorsal and medial myotome respectively.

Specialized cells and extracellular environments provide guidance cues that control axonal pathfinding. Transplant experiments showed that the precise patterning of primary and secondary motor innervation in zebrafish is not cell autonomous and that the myotome is crucial for the control of motoneuron guidance by providing positional information to guide

motoneurons in the appropriate path (Eisen and Pike, 1991; reviewed in Beattie, 2000). Zebrafish primary myotome is composed of slow and fast twitch fibers arising from the differentiation of two types of spatially segregated cell precursors. The slow muscle progenitors, also called adaxial cells, that are originally located along the notochord give rise to (1) the Slow Superficial Fibers (SSFs) that arrange as a monolayer at the periphery of the myotome and (2) the Muscle Pioneer (MPs), a subset of *Engrailed*-expressing slow muscle cells that flank the horizontal myoseptum. The fast muscle precursors that lie in the lateral mesoderm, mainly differentiate into Fast Fibers (FFs) but also give rise to a subset of cells known as Medial Fast Fibers (MFFs). The MFF also express *Engrailed* proteins but at lower levels than MPs (Devoto et al., 1996; Stickney et al., 2000). Several studies have highlighted the critical role of slow muscles in motoneuron development. MP cells are the first cells that are in contact with primary motoneurons and they have been shown to constitute an intermediate target. Laser ablation experiments showed that MP cells are involved in axonal extension without affecting target choice (Melançon et al., 1997). In addition, *spadetail* mutant that display axons pathfinding defects also lacks MP (Eisen et al., 1991). More recently, it has been reported that MP cells provide molecular signals that guide CaP axon through intermediate target (Cantu et al., 2013). In addition, a subset of dorsal adaxial cells that are adjacent to the choice point were shown to instruct proper pathway of CaP and RoP axons and secondary motoneurons (Zhang and Granato, 2000).

Adaxial cells represent an important source of various extracellular matrix (ECM) components that are believed to play a critical role in the control of motor axon guidance. Analyses of unplugged mutants revealed that upon unplugged/MuSK signaling, adaxial cells deposit in the motor path ECM proteins with important role on motor axon guidance, the ECM glycoprotein tenascin-C and chondroitine sulfate proteoglycans (CSPGs) (Zhang et al., 2004; Schweitzer et al., 2005). Tenascin-C was shown to concentrate at the choice point at the time of axon growth where it exerts repulsive activity that prevents ectopic branching of the CaP axon (Schweitzer et al., 2005). CSPGs were shown to localize along the motor path and at the choice point suggestive of a role in axon navigation in zebrafish (Bernhardt et al., 1998). However their exact role in motor axon guidance remains unclear. Morpholino-mediated knockdown of the enzyme involved in biosynthesis of CS chains had no effect on motor axon growth (Zhang et al., 2004). On the other hand, removal of chondroitin sulfate chains at the surface of CSPG by enzymatic digestion prior to motor axon outgrowth provoked severe ectopic branching indicative of a repulsive activity of CS chains (Bernhardt et Schachner, 2000).

At the time of axon growth, adaxial cells also express genes encoding for two members of the collagen superfamily with important role in motor axon guidance. The zebrafish *coll9a1* gene encoding collagen XIX, a component basement membrane zone, was shown to be expressed by adaxial cells during pMN pathfinding. Analysis of the *stumpy* mutants that correspond to a mutation in the *coll9a1* revealed a crucial role of this unconventional collagen at intermediate targets (Hilario et al., 2010). *Coll8a1* encoding the heparan sulfate collagen XVIII was shown to be expressed in adaxial cells and other cell types (Hafték et al, 2003). Morpholino-mediated knockdown of *coll8a1* expression provoked early outgrowth defects of CaP axon and partially phenocopied the *diwanka/lh3* mutant. In accordance with previous results showing that the heparan sulfate could function as a ligand for neuronal signaling receptors (Aricescu et al, 2002), it has been proposed that the lack of myotomal LH3 glycosyltransferase activity in *diwanka/LH3* mutant could act on motoneuron guidance through improper glycosylation of collagen XVIII (Schneider and Granato, 2006).

Collagen XV share several structural similarities with collagen XVIII as they both belong to the multiplexin (multiple triple helix interruptions) subset of the collagen superfamily (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005) characterized by multiple interruptions in the triple helix domain, a conserved thrombospondin N-terminal-like (TSPN) domain at the N-terminus of the trimeric molecule and a the C-terminal domain restin that shares some homology and function with the collagen XVIII anti-angiogenic endostatin domain (John et al, 2005). As collagen XVIII, collagen XV carries glycosaminoglycan chains making members of this collagen subset, collagen/proteoglycan hybrid molecules. However, whereas collagen XVIII carries heparan sulfate chains whereas collagen XV principally harbors chondroitin sulfate chains (Amenta et al., 2005). Both collagens are integral components of basement membrane zones and exhibit both common and different expression profiles. As often reported for members of the collagen superfamily that have a modular organization (Ricard-Blum Ruggiero, 2005), collagen XV might fulfill various biological functions. Collagen XV is mainly present in cardiac and skeletal muscle (Hägg et al., 1997) and knockout of *Coll5a1* in mice resulted in mild skeletal myopathy (Eklund et al., 2001). Recent findings also revealed defects in myelination of peripheral nerve in the mutant mice (Rasi et al., 2010a). In addition, collagen XV was shown to interfere with epithelio-mesenchymal transition during initial steps of tumorigenesis and was proposed to act as a tumor suppressor independently of the restin domain (Clementz and Harris, 2013). Finally, cell-matrix interaction assays with recombinant human collagen XV indicated that cells might change the structure and function of the surrounding ECM by modulating the expression of collagen XV (Hurskainen et al, 2010).

We have identified two paralogs of the human collagen XV gene, named *coll5a1a* and *coll5a1b* in the zebrafish genome. The zebrafish *coll5a1a* and *coll5a1b* paralogs showed distinct expression patterns. In the developing trunk, *coll5a1a* expression was restricted to notochord whereas *coll5a1b* was transiently expressed in adaxial cells (Pagnon-Minot et al., 2008; Bretaud et al., 2011). Differences evidenced by gene expression profiling suggest that *coll5a1* paralogs have diversified to play distinct functions in zebrafish. We showed that morpholino-knockdown of *coll5a1a* provokes defects in notochord differentiation and in the perichordal sheath structure resulting in improper Shh signal diffusion and subsequent defects in muscle differentiation (Pagnon-Minot et al., 2008). The specific and transient expression of *coll5a1b* in adaxial cells suggests a role for this paralog in motor neuron guidance.

Here we used newly generated specific antibodies to zebrafish collagen XV-B (COLXV-B) to determine the spatio-temporal expression profile of the *coll5a1b* gene protein product and performed morpholino-based knockdown to interrogate its function during neuromuscular development. Our data demonstrate that COLXV-B is a novel component of the specialized extracellular matrix produced by adaxial cells upon Hedgehog and unpugged/MuSK signaling that influences motor axon growth in zebrafish.

Results

COLXV-B is early deposited in the future axonal motor path and in vertical myosepta

We have previously shown that *coll5a1b* is transiently and specifically expressed in the precursors of slow muscle, the adaxial cells from the time of their commitment to slow muscle lineage and that expression persisted when adaxial cells underwent radial migration to reach the somite periphery (Bretaud et al., 2011). Gene expression profiles are often interpreted in terms of protein expression but collagens are very stable proteins with a high turnover in tissues and protein can be still present at the secretion site after cells have migrated or gene expression has ceased. For these reasons we conducted a comprehensive spatio-temporal localization pattern of the collagen XV-B (COLXV-B) during primary myotome formation. We thus raised polyclonal antibodies against two synthetic peptides designed to be specific of the zebrafish COLXV-B sequence: one encompassing residues 255-270 of the NC10 domain and the other residues 940-954 of the NC1 domain (Figure S1A). The specificity of the antigen affinity purified antibodies was assessed by western blot using conditioned media of HEK-293 cells transfected with a construct containing the full-length cDNA of the zebrafish *coll5a1b* sequence (Figure S1B). A single band of the expected size (>200 kDa) was detected with antibodies to NC1 peptide (called anti-NC1) and to NC10

(called anti-NC10) (Figure S1B) corresponding to the size of the core protein. This indicated that recombinant COLXV-B does not carry chondroitin chain as previously described for the recombinant human collagen XV (Hurskainen et al, 2010). To further characterize our antibodies, conditioned media were treated with collagenase that digests specifically triple helix domains while leaving intact the non-collagenous domains. Western blot analysis of the collagenase digestion products with anti-NC1 and anti-NC10 revealed the apparition of a band that migrates at the position expected for the non-collagenous domains NC10 and NC1 respectively (Hurskainen et al, 2010), attesting to their specificity (Figure S1B). Both antibodies worked for wholemount immunofluorescence (data not shown). In the present study, all staining of COLXV-B were performed with anti-NC10 that give less background.

Wholemount embryos at key stages of adaxial cell differentiation were co-stained with our COLXV-B antibodies and with β -catenin to delineate cell shape (Figure 1A-I) or F59 to reveal slow muscle fibers (J-M). The adaxial cells adjacent to the notochord are the first muscle precursors to be specified. Adaxial cells that are initially arranged as a sheet of pseudoepithelial cuboid cells undergo a series of morphological changes and positional rearrangement as they differentiate into slow muscle fibers at early segmentation, to ultimately form a dorso-ventral stack of elongated slow myoblasts extending from one somite boundary to the other (Daggett et al., 2007). Next, the majority of slow myoblasts undertake a radial migration through the lateral somite, to populate the superficial layer of slow-twitch muscle of the mature myotome. However a subset of cells does not migrate and differentiates into MPs that are located at the region of the horizontal myoseptum and span the entire somite from its medial to its lateral surface. At 8-10 somite stage, COLXV-B immunoreactivity was present in the five most mature rostral somites when adaxial cells are elongated (Fig1A). COLXV-B staining sharply delineated the outer surface of the medial pole of adaxial cells adjacent to the notochord but only in the half posterior part of the somite (Figure 1A). Staining progressively expanded toward the anterior border in the more mature somites further anterior (Fig 1A). Orthogonal views of different regions of the tail (marked in Figure 1A as 1 and 2) indicated that COLXV-B deposition starts at the dorsoventral midpoint (Figure 1B, region 1) and further expands dorso-ventrally along the notochord (Figure 1C, region 2). The first adaxial cells to be elongated were shown to localize at the dorsoventral midpoint where they differentiate into MPs (Nguyen-Chi et al., 2012). This suggests that COLXV-B deposition in the extracellular space occurs after adaxial cells have elongated. Although we have previously shown that *coll5a1b* transcripts are detected in the posterior somites at this stage (Bretaud et al., 2011), COLXV-B protein was not detected in these immature somites

and in presomitic mesoderm when adaxial cells exhibit earlier features of their morphological transition (Daggett et al., 2007): interleaving cells (Figure 1D, asterisk) and pseudo-epithelial morphology (Figure 1D, arrow). We thus conclude that COLXV-B deposition sharply correlates with the adaxial cell elongation process.

At 18 hpf, COLXV-B immunoreactivity persisted in the medial surface of the myotome along the notochord and extended to the ventral part of spinal cord (Figure 1E,F). This specialized ECM region that was identified as the future outgrowth territory of motor axons (Bernhardt et al., 1998) will be referred hereafter as to the motor path ECM. In this region, COLXV-B deposits were not continuous but occurred at regular spaces in a ladder fashion (Figure 1I). At that time, slow myoblasts initiate radial migration to the periphery as confirmed by F59 staining (Figure 1J) and progressively deposit COLXV-B along the vertical myosepta as they migrate (Fig1.E,J, arrowheads). In accordance to the antero-posterior progression of somitogenesis, COLXV-B pattern in posterior trunk of 18 hpf embryos is identical to that observed in the anterior trunk at 8-10 somite stages (Figure 1 G,H,K).

At 24 hpf, migrating slow myoblasts have reached their final destination (Figure 1M). At this stage *coll5a1b* transcripts have ceased to be expressed (Bretaud et al., 2011) but COLXV-B persists in the motor path ECM (Figure 1L,M) and in central part of the vertical myosepta (Figure 1L). MPs cells remained in close contact with COLXV-B where they presumably attach to a junctional specialized extracellular matrix juxtaposed to the notochord (Figure 1M, arrowhead). Chondroitin sulfate immunoreactivity was observed in the motor path ECM (Bernhardt et al, 1998). Human collagen XV was reported as a fulltime collagen/proteoglycan bearing chondroitin sulfate alone or in combination with heparan sulfate chains and it has been suggested that CS chains could be responsible for collagen XV biological functions (Myers et al, 2007). Potential Ser-Gly GAG attachment sites are present in the COLXV-B zebrafish sequence in the N-terminal domain as described for the human sequence (Bretaud et al, 2011, Myers et al, 2007). Co-immunostaining with mAb 473HD that recognized chondroitin-6-sulfate (Bernhardt et al, 1998) and anti-NC10 on 24 hpf embryo cross sections showed a merge between the 2 signals along the notochord and the spinal cord indicating that COLXV-B might also be expressed as a chondroitin sulfate collagen/proteoglycan in the motor path ECM (Fig S2, A-C). In all, we showed that COLXV-B is deposited in the motor path ECM prior to adaxial cell migration and motor axon extension in the myotome and remains there when axonal growth process occurs.

COLXV-B paves the trajectory of CaP axon and concentrates at aneural clusters of acetylcholine receptors

COLXV-B immunolocalization was indicative of a role of this collagen in motor axon navigation. We thus decided to detail the localization of COLXV-B deposition in the path taken by CaP axon by performing double immunofluorescence staining of 18 hpf and 24 hpf embryos with NC10 antibodies and the *znp1* monoclonal antibody to label primary motor axons. At 18 hpf, CaP axon that is the first to exit from the spinal cord, extended into the ventral myotome and reached the horizontal myoseptum in the most anterior somites. COLXV-B paved CaP axon trajectory at regular intervals (Figure 2A and B, arrowheads) along the axonal varicosities where CaP axons established local synaptic contacts with MPs cells and fast fibers (Flanagan-Steet *et al.*, 2005). At 24 hpf, CaP axons have nearly reached the ventral edge of the myotome (Fig 2C). At this stage, COLXV-B immunoreactivity coincided with the stereotypical CaP axon trajectory but exclusively at the level of varicosities (Figure 2C,D, arrowheads). Interestingly, COLXV-B was highly enriched along the common path and at the choice point (Fig 2D, brackets) but was not detected in the ventral end of CaP axon trajectory. Dorsal views of 24 hpf embryos (Figure 2E,F) and cross sections in the most rostral segments (Figure 2 H,I) clearly showed that COLXV-B lined the myotomal side of the CaP axon. COLXV-B immunoreactivity in the motor path ECM confirmed the particular organization of the protein deposit in a ladder-like structure (Figure 2 B,D,I). The detection of COLXV-B in the motor path ECM along the notochord in the posterior part of the 24 hpf embryo trunk (that corresponds to the most immature somites) where *znp1* staining was not yet observable confirmed the fact that COLXV-B is deposited in the axon trajectory prior to the arrival of CaP axonal growth cone (Figure 2G).

Formation of a functional neuromuscular junction (NMJ) is a complex phenomenon whose initiation is notably characterized by acetylcholine receptors (AChR) clustering at the surface of the post-synaptic muscle cell (Huh and Fuhrer, 2002). Because COLXV-B seemed to be precisely located at the site of nascent NMJ, we next investigated whether COLXV-B marks the position of NMJ by co-staining 24 hpf embryos with COLXV-B antibodies and fluorescent alpha-bungarotoxin conjugates to label AChRs. Two types of AChR clusters were described in zebrafish, the aneural and neural AChR clusters (Wu *et al.*, 2010). The aneural AChR clusters also called presynaptic clusters form on the medial surface of adaxial cells before primary motor neurons extend axons in the myotome. Then aneural clusters disperse as the neural clusters form on the surface of fast fibers, a process triggered by nerve contact. Consistent with our immunostaining with the neuronal marker *znp1* (Figure 2A-I), COLXV-B

decorated the region where neural clusters have formed and was particularly enriched at the choice point where fluorescent alpha-bungarotoxin conjugates revealed large AChR clusters (Figure 2J,K). In the most caudal somites, aneural AChR clusters visualized with fluorescent alpha-bungarotoxin conjugates were closely surrounded by COLXV-B staining (Figure 2L,M). In conclusion, COLXV-B deposits mark out the position of aneural clusters at the center of the cell before the formation of neural clusters and persists in this region at the time of neural cluster formation. We thus propose that COLXV-B can serve as a positional mark for neural clustering when aneural clusters have dispersed.

***Coll5a1b* expression depends on Hedgehog signaling and the deposition of its protein product COLXV-B in the motor path is controlled by MuSK/unplugged signaling**

We next wanted to determine what are the molecular signals that control *coll5a1b* expression in the developing myotome and the deposition of its protein product COLXV-B in the extracellular space. In zebrafish, the specification of the different muscle cell types is mainly controlled by Hedgehog (HH), which acts as a gradient morphogen diffusing from the notochord (Wolff et al., 2003; Hirsinger et al., 2004). High levels of HH factors are required to induce adaxial cell commitment to slow muscle whereas lateral mesoderm that is exposed to low levels of HH factors differentiates into fast muscle. We previously showed that *coll5a1b* is specifically expressed by adaxial cells once they are committed to slow muscle lineage and that early cyclopamine treatment blocking HH signaling resulted in a complete loss of *coll5a1b* expression in somites at 18 hpf (Bretaud et al., 2011) suggestive of a role of HH in the control of *coll5a1b* expression in adaxial cells. To evaluate the direct induction of *coll5a1b* expression by HH signaling, we injected in single-cell stage embryos mRNA encoding the dominant negative protein kinase A (dnPKA) that mimics activation of Hedgehog signaling pathway in cells expressing the construct, even in absence of the ligand. This results in ectopic activation of HH signaling pathway throughout all myotome and causes all somitic cells to develop into slow muscle fibers (Concordet et al., 1996; Du et al., 1997). Injection of dnPKA provoked a substantial increase of *coll5a1b* expression domain at 18 hpf (Figure 3B-D) compared to uninjected embryos (Figure 3A-C). We then performed co-immunostaining of 24 hpf dnPKA-injected and uninjected embryos with F59 to label slow muscle cells and anti-NC10 to reveal COLXV-B deposits. A fluorescent signal was expectedly found at the outer surface of adaxial cells adjacent to the notochord as in uninjected control embryos (Fig 3F compared to E, arrows). However, consistent with *in situ* hybridization data, an additional strong fluorescent signal corresponding to COLXV-B

deposits was also observed close to ectopic slow muscle fibers throughout the entire myotome (Figure 3F). In all, our data indicated that *coll5a1b* participates to the slow muscle genetic program as a direct target of HH effectors in adaxial cells.

Our data suggested that additional signals are required for organized COLXV-B deposition in the ECM path: (i) a delay was observed between *coll5a1b* expression and COLXV-B secretion in the extracellular space, (ii) a specific pattern of COLXV-B distribution was observed in the future motor path ECM. As *unplugged/MuSK* signaling was shown to mediate growth cone guidance by organizing ECM deposition in the motor path (Zhang et al., 2004), we thus hypothesized that *unplugged/MuSK* signaling might be responsible for COLXV-B deposition and organization in motor path ECM. To test this hypothesis, 18 hpf embryos derived from incrossed *unp* heterozygotes in HB9:GFP background to label motoneurons were used to perform immunostaining with COLXV-B antibodies. COLXV-B immunoreactivity in wildtype and *unp/+* heterozygous clutch mates (n_embryo=40) was identical and it was not possible to distinguish them based on COLXV-B immunoreactivity (Figure 3G). In contrast, whereas COLXV-B immunoreactivity was still positive in the vertical myosepta (Figure 3H, asterisk), COLXV-B was totally absent from the axonal motor path in *unp* homozygous embryos (n_embryos=15) (Figure 3I, arrow). We conclude that the precise deposition of COLXV-B in the motor path ECM specifically depends upon *unplugged* gene activity.

COLXV-B contributes to the regulation of muscle pioneer cell fate

In a previous study, we conducted morpholino-based gene knockdown to investigate the function of the zebrafish *coll5a1b* paralog, *coll5a1a*, in developing embryo (Pagnon-Minot et al, 2008). The spatio-temporal expression profiles of the two paralogs, *coll5a1a* and *coll5a1b*, are distinct indicative of non-redundant functions in zebrafish (Bretaud et al, 2011). Thus, to assess the role of the second paralog *coll5a1b* in zebrafish development, we designed two distinct morpholinos, one targeting the ATG start site (tMO15b) and one directed at exon 2 donor splice site (sMO15b). sMO15b was systematically co-injected with morpholino against p53 (p53MO) to suppress off-target apoptosis effects (Gerety and Wilkinson, 2011). The efficacy of sMO15b was assessed by RT-PCR on 24 hpf-injected embryo RNA extracts (Fig 4A). PCR product analysis revealed a band slightly shorter than the full-length product that lacks exon 2 as confirmed by sequencing and results in a frameshift predicting a 42-residue truncated protein. In addition, injection of sMO15b or tMO15b in 1-2 cell stage embryos resulted in complete absence of COLXV-B

immunoreactivity in the trunk at 24 hpf (Figure 4D,E) compared to the staining observed in uninjected embryos (Figure 4B) and embryos injected with standard control morpholino (ctl-MO) (Figure 4C). These results attest for the efficiency and specificity of both *coll5a1b* morpholinos. Embryos injected with sMO15b or tMO15b were viable and did not provoke gross morphological defects or developmental delay compared to uninjected or ctl-MO-injected embryos at 24 hpf (not shown) and 48 hpf (Figure 4F-I). No differences in the phenotypical traits were observed in embryos injected with sMO15b or tMO15b. However, experiments were all performed with tMO15b and sMO15b-injected embryos except when indicated. Embryos injected with morpholinos against *coll5a1b* will be referred as MO15b condition except for statistical analyses.

Because *coll5a1b* was expressed specifically in differentiating slow muscle progenitors, we reasoned that lack of COLXV-B expression in developing embryos might perturb adaxial cell differentiation into slow muscle fibers. We thus performed wholemount co-immunostaining of 24 hpf MO15b-injected embryos with F59 antibody and collagen XII (COLXII) antibodies, a marker of vertical myosepta (Bader et al, 2009) to which the elongated slow muscle fibers attach. No overt differences in slow muscle fiber differentiation, morphology and attachment were observed in MO15b-injected embryos (Figure 5B) compared to controls (Figure 5A). In addition, the corresponding orthogonal views of the confocal stacks indicated that slow myoblasts have migrated properly as SSFs were correctly positioned at the periphery of the myotome.

Because COLXV-B was first deposited in the horizontal myoseptum region where MPs are specified and remained in contact with MPs when the primary myotome forms (Figure 1B,M), we next questioned whether *coll5a1b* knockdown affects MP formation. To address this question, we performed *in situ* hybridization to examine expression of *engrailed2a* (*eng2a*) the marker of differentiated MP in 18 hpf MO15b-injected and control embryos (Figure 5 C-F). MO15b-injected embryos showed a broader *eng2a* expression than that observed in the control embryos (Figure 5F compared to E) suggestive of an increased number of MP cells in *coll5a1b*-morphants. To determine the number of differentiated MP cells, double immunofluorescence staining was then performed at 24 hpf with 4D9 antibody that recognizes Engrailed transcription factors (medial fast fibers MFF also express Engrailed but at lower levels than MPs) and Prox1 (slow muscle specific marker) antibodies. Consistent with the enlarged expression domain of *eng2a* observed in 18 hpf morphants, a significant increase in Prox1/Engrailed (4D9)-positive cell number was observed in *coll5a1b*-morphants

(Figure 5 G-I). The total number of Prox1-positive slow muscle cells was not affected indicating that the increase in MP number occurs at the expense of SSFs (Fig 5I).

Hedgehog (HH) signaling controls slow muscle fate in developing zebrafish. Adaxial cells that receive high levels of HH signaling differentiate into MPs. Moreover, we previously reported that the COLXV-A, the protein product of the *coll5a1a* paralog, localizes in the peri-notochordal basement membrane where it interplays with HH signaling to regulate medial fast fibers differentiation (Pagnon-Minot *et al*, 2008). We thus analyzed the expression of the HH receptor *ptc1* that reflect the activation of HH signaling in cells in 18 hpf MO15b- and uninjected embryos. No change in *ptc1* expression domain was observed in morphants embryos compared to controls (Figure 5J-M), indicating that knockdown of *coll5a1b* did not affect HH signaling. Together our data indicated that COLXV-B is not necessary for the differentiation of adaxial cell into slow muscle fiber, but it contributes to the regulation of MPs versus SSFs identity independently of Hedgehog signaling.

***Coll5a1b* knockdown alters primary motoneuron development without affecting NMJ formation and AChR prepatterning**

The presence of COLXV-B along the ventral motor path and its enrichment in the path adjacent to the choice point at the time of axonal growth (Fig 2) strongly suggest a role for COLXV-B in axonal pathfinding. To address this question, we labeled 27 hpf *coll5a1b*-morphants and control embryos with *znp1* antibody and examined 10 somitic hemisegments at the level of yolk extension per embryo for CaP motoneuron pathfinding errors. At that stage, control embryos showed stereotyped trajectory of CaP axons (Figure 6A). *Coll5a1b* knockdown provoked significant truncation of CaP axons in more than 10% of hemisegments (tMO15b 12% n_embryo=70; sMO15b 27.5% n_embryo=63) (Figure 6B-D, and quantification in E). Abnormal CaP axons stalled at the choice point and did not extend beyond this point (Figure 6B, arrow) or branched abnormally from this point (Figure 6C arrows). Occasionally CaP axons failed to exit from spinal cord (Figure 6D, arrow). We concluded that COLXV-B directs primary motoneuron axon decision at the choice point.

Evidence for COLXV-B immunoreactivity in the environment of AChR presynaptic clusters and later in the environment of the nascent NMJ (Figure 2) was suggestive of a role in the prepatterning event or in the establishment of synaptic contacts between motor axon and target muscle cells. To address this question, we performed a co-staining of 24 hpf *coll5a1b* morphants and control embryos with *znp1* antibody and fluorescent conjugated-*a* bungarotoxin taking advantage of the rostro-caudal progression of somitogenesis to analyze

neuromuscular junction formation and presynaptic AChR cluster at the same developmental stage. Neural clusters of AChR formed normally in apposition with motor axons although their size seemed slightly reduced compared to uninjected (not shown) and *ctl*-MO injected embryos controls (Figure 6G compared to F). As expected, when motoneuron axons are truncated or misrouted and did not reach their muscle target (Figure 6G asterisks), neural AChR clusters were not observed. In addition, knockdown of *coll5a1b* did not affect AChR pre patterning as observed in the most posterior somites (Fig 6 H-I, bracket). We concluded that despite its location at presynaptic clusters and NMJ, COLXV-B appeared dispensable for AChR pre patterning and is not required for neuromuscular junction formation.

***Coll5a1b* knockdown compromises secondary motoneuron development and results in impaired swimming performance**

The development of secondary motoneurons was shown to recapitulate the development of the primary motoneurons (Beattie, 2000). We thus stained 52 hpf control and morphants embryos with zn8 antibody (Figure 7B-D) to trace specifically axonal trajectories of secondary motoneurons. At that stage, the CaP-like and RoP-like nerves have already extended toward their respective targets (Figure 7A,B) and COLXV-B immunoreactivity persisted along the common path (not shown). *Coll5a1b* knockdown drastically altered RoP-like nerve development. We found that more than 65% of hemisegments analyzed in 52 hpf *coll5a1b* morphants (85% for tMO15b n_embryo=51; 68% for sMO15b n_embryo=47) lacked RoP-like nerve (Figure 7 C,D compared to control B; Table 1). Most axons navigated after the choice point as a single nerve in the ventral direction (Figure 7C). In some cases, RoP-like nerve formation was initiated but axons were then misrouted and projected ventrally (Figure 7D, asterisks). Some axons defasciculated but instead of dividing properly in a medial and a ventral nerve at the choice point, they extended in aberrant directions and stopped short after the choice point (Figure 7D, arrowhead). All these observations indicated that RoP-like axonal pathfinding at choice point is severely disrupted in absence of COLXV-B. In contrast, no drastic alteration of CaP-like nerve was observed in 52 hpf MO15-injected embryos although some failed to project ventrally (Figure 7D, arrow). To visualize the MiP-nerves that could not be analyzed at 52 hpf and to examine whether the RoP nerves display further pathfinding errors in absence of COLXV-B, we next analyzed secondary motor axons in 72 hpf control and *coll5a1b*-morphants (Figure 7F-H). At that stage, MiP-like nerves have extended into the dorsal myotome of control embryos (Figure 7E,F) whereas about 40 to 60 % of *coll5a1b*-morphants hemisegments lacked MiP-like nerve dorsal projection (Figure 7 G-H,

Table 1). Additionally, *coll5a1b*-morphants significantly lacked RoP-like nerves (Figure 7H, arrowhead; Table 1) though the occurrence of this defect was less frequent than in 52 hpf *coll5a1b*-morphants since only about 30% of hemisegments were affected. Pathfinding errors such as ventral projection (Figure 7G, asterisk) or abnormal ventral branching (Figure 7G, arrowhead) of RoP-like nerves were observed in about 2 to 10% of *coll5a1b*-morphant hemisegments (Table 1). These observations are in agreement with the guidance deficiency of RoP-like axons at the choice point observed at 52 hpf in absence of COLXV-B (Figure 7C,D). Furthermore, extra-branching along the common path was observed in 5 to 6% of *coll5a1b*-morphants hemisegments (Figure 7G, arrow). More occasionally, lack of COLXV-B caused abnormal caudal projection of RoP-like nerve (Figure 7H, arrow) and multiple nerve exits (Figure 7H, asterisk) although these alterations were not statistically significant (data not shown). Finally, as observed in 52 hpf *coll5a1b*-morphants, ventral nerves were not dramatically altered although their absence was observed in about 3-5% of *coll5a1b* morphant hemisegments (Table 1). We conclude that COLXV-B influences RoP-like and MiP-like secondary axon pathway selection at the choice point.

As muscle homeostasis depends on proper innervation, we reasoned that the defects in axon pathfinding observed in *coll5a1b*-morphants could result in defective muscle stimulation and eventually muscle atrophy. To address this question, we decided to measure the size of fast muscle fibers in MO15b-injected embryos and uninjected embryos at 3 dpf (day post-fertilization). With this aim, we performed co-staining with phalloidin-rhodamin on trunk cross sections to reveal myofibril content and with antibodies to b-catenin to delineate sarcolemma (Fig S3 A-D). We observed a substantial decrease in fast fiber size associated with visible reduction of the myofibril content in MO15b-injected embryos (Figure S3C,D) compared to uninjected embryos (Figure S3A,B). Measurements indicated a significant reduction of fast fiber size in MO15b-injected embryos compared to control (Figure S3G). In addition, slow superficial fibers which identity was confirmed by *in situ* hybridization with slow myosin heavy chain (*smyhc1*) (Figure S3E,F) displayed an abnormal shape (Figure S3D compared to B, arrows). The overall reduction of fast fiber size and myofibril content might reduce physical constraint at the periphery of the myotome that might explain the broader shape of SFFs.

These observations prompted us to examine whether axon pathfinding defects affect embryonic motility. With this aim, we conducted motility assays on 2 dpf embryos as recently described (Goody *et al.*, 2012). We thus measured the average time it takes to *coll5a1b* morphants, uninjected and ctl-MO injected embryos to swim over a predetermined distance

following touch stimulus. After stimulation at the tip tail, uninjected and *ctl*-MO injected embryos (Figure 8A, Movies S1 and S2 respectively) went all fast and straight away from the stimulus source, to reach out from the circle. Whereas *coll5alb*-morphants (injected with either tMO15b or sMO15b as indicated in Figure 8A) eventually exited from the circle after touch stimulation (Figure 8A), their movement and trajectory were abnormally slower, erratic and intermittent (Movie S3, Movie S4). Repeated stimulations were often necessary to induce a swimming movement long enough for *coll5alb*-morphants to be able to reach out of the circle. More strikingly, 2 dpf MO15b-injected embryos escape time was significantly 3 to 4 times longer than control embryos (Figure 8B). All together we showed that COLXV-B-specific defects in motoneuron axon pathfinding correlate with pronounced impairment of embryo motility. The proposed scenario is that COLXV-B deficit results in defective motoneuron axon pathfinding making axons unable to reach their appropriate muscle targets. The ensuing reduction of muscle excitation leads to muscle atrophy and eventually impaired swimming performance.

Discussion

Growing motor axons encounter multiple molecular cues that provide appropriate positional instructions to guide them along specific trajectories. Extracellular matrix molecules, in particular glycoproteins and proteoglycans, have long been recognized as important short-range guidance cues for axon outgrowth in vertebrates (Eisen, 1991). However, the role of collagens in nervous system development and more specifically in axon growth has only recently received attention (Fox, 2008; Hubert et al, 2009). Zebrafish has been particularly instrumental in identifying collagen genes critical for motor axon pathfinding. These collagen mediated-guidance cues are unconventional members of the collagen superfamily, collagen XVIII (Schneider and Granato, 2006) and collagen XIX (Hilario et al., 2010). Here, we show that the zebrafish collagen XV-B acts as a novel myotomal-derived cue that specifically localizes along the common motor axon path and serves as a guidance cue for primary and secondary motor neuron axons during development. In addition, we describe a novel mechanism for the tight control of collagen *coll5alb* expression and COLXV-B deposition in the common motor path involving two independent signaling pathways.

Biosynthesis of COLXV-B in adaxial cells is dependent on two distinct signaling pathways

Collagen biosynthesis requires a complex orchestration of intracellular and extracellular events from the regulation of gene expression in specific cell types to the assembly of the secreted protein in the extracellular space and its integration into the extracellular matrix network (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). However, contrary to the classical fibril-forming collagens, very little is known about the mechanisms involved in the biosynthesis of unconventional non-fibrillar collagens. We previously reported that *coll5a1b* expression was limited to slow muscle (adaxial) progenitor cells in developing zebrafish trunk. It is now well established that HH signaling is required for the commitment of muscle precursors to the slow muscle fate in zebrafish (Jackson and Ingham, 2013). We previously reported that *coll5a1b* expression in adaxial cells is abolished upon cyclopamine treatment (Bretaud et al, 2011). Although compromising Hedgehog signaling with high doses of cyclopamine eliminated all slow muscle fibers, adaxial cells can initially form independently of Hedgehog function (Hirsinger et al, 2004). Nevertheless, adaxial cells that do not receive HH signal at the right time were shown to further dedifferentiate into fast muscle (Hirsinger et al., 2004). This raised the question whether *coll5a1b* was a target of HH signaling or lack of *coll5a1b* expression was a consequence of the lack of adaxial cell differentiation in cyclopamine-treated embryos. By activating ectopic HH pathway we confirmed that *coll5a1b* is a direct target of HH effectors in adaxial cells during early somitogenesis and as such it participates to the slow muscle genetic program. The Gli transcription factors are effectors of the hedgehog signal and bind to the consensus sequence GACCACCCA with high affinity (Milla et al, 2012). In favor of a direct transcriptional target of hedgehog signaling, we have located a cluster of six consensus Gli binding core sites, GACCAC, about 10-kb upstream of *coll5a1b* transcription start site. Post-translational modifications also play a critical role in collagen secretion (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). The positional cloning of the *diwanka* mutants showed that it encodes the lysyl-hydroxylase LH3 with lysyl-hydroxylase and glycosyltransferase activity. The analysis of *diwanka/lh3* mutants suggested that glycosyltransferase-mediated modification of collagen XVIII by the lysyl-hydroxylase LH3 is required for secretion of this protein in the motor path (Schneider and Granato, 2006). Morpholino-knockdown of *coll8a1* resulted in a less severe phenotype than the one found in *diwanka/lh3* mutants suggesting the existence of additional LH3 substrate in the motor path. The *diwanka (lh3)* gene is transiently expressed in adaxial cells and collagen XV and XVIII share structural features in particular they both carry glycosaminoglycans chains (review in

Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). Our data suggest that COLXV-B can represent a substrate of LH3 and further studies are needed to demonstrate conclusively the role of *diwanka/lh3* in COLXV-B secretion.

The generation of specific antibodies to the zebrafish COLXV-B has provided a major breakthrough for functional analysis of this collagen during somitogenesis. In amniotes, collagen XV was found to localize primarily at the outer surface of basement membrane in various tissues including skeletal muscles (Myers et al, 1996; Amenta et al, 2005). In agreement with our *in situ* hybridizations showing that adaxial cells specifically express *coll15a1b* during early somitogenesis (Bretaud et al, 2011), we have demonstrated in the present study that COLXV-B is deposited specifically in a region identified as the motor axon path according to previous work (Bernardt et al., 1998). From analyses of the *unp* mutants, the unplugged/MuSK signaling was shown to be responsible for the organization of the specialized and complex extracellular matrix of the motor path. Abnormal extracellular matrix was observed in the motor path of the zebrafish mutant that results from a mutation in the muscle specific kinase (*MuSK*) gene (Zhang et al, 2004). The glycoprotein tenascin-C was found to be markedly reduced in *unp* mutants, although not considered as primary targets of unplugged/MuSK (Schweitzer et al., 2005). Like tenascin-C (Chiquet-Ehrisman and Chiquet, 2003), the control of spatial and timely expression of collagen XV might modify the local organization of ECM and impact on its function (Hurskainen et al, 2010). We showed here that COLXV-B immunoreactivity was absent in the motor path of *unp* mutants, but present in the vertical myosepta, indicating that unplugged/MuSK signaling is additionally responsible for the deposition of an extracellular matrix protein COLXV-B in the motor path. Like for tenascin-C, COLXV-B immunoreactivity was unchanged in vertical myosepta of *unp* mutants indicative of a specific role of unplugged/MuSK signaling in the organization of adaxial cells derived cues in the common motor path. Interestingly, chondroitin sulfate immunoreactivity was also shown to be reduced in *unp* mutants (Zhang et al, 2004). As collagen XV was reported to be associated with chondroitin sulfate chains in mammals (Myers et al, 2000) and chondroitin sulfate immunoreactivity was shown to co-localize with COLXV-B in our double immunostaining (Figure S2), it could be assumed that the reduction of chondroitin sulfate immunoreactivity was due to reduction of COLXV-B deposition in *unp* mutants. In contrast distribution of laminin and heparan sulfate was unchanged in *unp* mutants (Zhang et al, 2004) suggesting that unplugged/MuSK signaling is responsible for organization of a limited set of extracellular matrix components that are probably interacting partners of a same matrix network. Along this line, tenascin-C distribution coincides with COLXV-B albeit tenascin-C

formed a “cloud” in the region of the horizontal myoseptum (Schweitzer et al., 2005) and we showed that COLXV-B is confined to the future position of aneural clusters. In all, we have described a novel mechanism involving two distinct signaling pathways responsible for specific expression and organization of COLXV-B in the motor path (Figure 9A, B).

COLXV-B functions as a novel contact-guidance cue for motor axon pathfinding

A pioneer study explored the role of extracellular matrix in motor axon pathfinding by examining the distribution and composition of extracellular matrix in axon trajectory in developing zebrafish. As primary motoneuron growth cones grew, they appeared to contact with laminin-rich areas and to avoid fibronectin-rich areas preventing axons to grow out their trajectory (Westerfield, 1987). COLXV-B signal was shown to persist in the motor path long after the adaxial cells have migrated to populate the periphery of the myotome and knockdown of *coll5a1b* resulted in aberrant primary and secondary axon growth indicating that COLXV-B provides a contact guidance cue critical for axon navigation toward their target muscles. The axonal trajectory of primary and secondary motoneurons both critically depends on extrinsic cues produced by adaxial cells (Zeller *et al.*, 2002, Zhang et al, 2004). When they moved away from the motor path, adaxial cells left behind extracellular matrix cues that are used by axons as adhesive and non-adhesive substrates for growth cones to navigate toward their target muscles. During the last decade, genetic and phenotypic analyses of *diwanka*, *unplugged* and *stumpy* mutants combined with the establishment of temporal and spatial expression patterns of myotomal ECM genes, have now been extended the extracellular matrix cues that function in axon guidance that include the glycoprotein tenascin-C (Schweitzer et al., 2005), chondroitine sulfate proteoglycans (Mizumoto et al, 2009; Bernardt and Schachner, 2000) and two other collagens, collagen XVIII (Haftek et al, 2003; Schneider et Granato, 2006) and collagen XIX (Beattie et al, 2000; Hilario et al, 2010). Establishment of precise motor innervation pattern in zebrafish is the result of combined processes including notably guidance along the common path and specific trajectories, pathway selection at the choice point and control of axonal branching. Our immunostaining revealed that COLXV-B is present along the common path (Figure 9) but absent in the specific dorsal and ventral trajectory. Consistent with the spatial and temporal distribution pattern of COLXV-B in developing zebrafish trunk, *coll5a1b* knockdown primary resulted in primary motor axon stalling at the choice point. Less frequently, motor axon failed to exit from spinal cord. When combined these data suggest that COLXV-B acts instructively to direct early motor guidance but is not critical for motor axon to extend beyond the choice

point. Similar defects in motor navigation albeit more severe was revealed by the analysis of the *stumpy/coll19a1* mutant demonstrating the direct and specific role of another collagen in motor axon guidance at intermediate targets (Hilario et al, 2010). These are important findings since collagens were long believed to have no role in the development of neurons.

Such alterations in the early steps of motoneuron outgrowth are typical outgrowth defects described in *diwanka/lh3* mutant and *unp/MuSK* mutants and were both attributed to compromised deposition and organization of ECM proteins in motor path. In *diwanka/lh3* mutant, the proposed scenario suggested that defective LH3 glycosyltransferase activity prevents hydroxylysine glycosylation of collagen XVIII and its subsequent secretion and deposition in the motor path (Shneider and Granato 2006). In *unp/MuSK* mutants, lack of *unp/MuSK* activity at the cell membrane compromised tenascin-C deposition in the motor path through a mechanism that is not yet fully clarified (Schweitzer et al, 2005). In these studies, the existence of additional as-yet unidentified positional cues whose biosynthesis depends on the activity of LH3 or MuSK cannot be excluded. Here we showed that COLXV-B is a novel unplugged/MuSK-dependent cue that paves the axonal motor path to guide the decision of axons at the choice point. Collagen XVIII and collagen XV that belong to the multiplexin subfamily of collagens share structural and functional homology. *Coll15a1b* (Bretaud et al, 2011) and *diwanka* (Shneider and Granato 2006) are timely and spatially expressed in developing adaxial cells. It will be thus interesting to investigate whether COLXV-B secretion and deposition is dependent on *diwanka/lh3* activity as suggested for collagen XVIII. Notably, the identification of a novel substrate of *diwanka/lh3* gene activity could explain why *coll18a1* knockdown only partially phenocopied *diwanka/lh3* mutant (Shneider and Granato 2006).

Primary and secondary motoneurons take the same route when they exit from the spinal cord and lack of COLXV-B critically compromised the secondary motor axon pathfinding. Whereas morpholino-knockdown of *coll15a1b* affected only 12% of primary motor axon growth at 24 hpf, secondary motoneuron growth exhibited growth defects in nearly all hemisegments at 52 hpf consistent with the concept that primary and secondary motoneurons respond to the same myotomal cues albeit with different sensitivity (Zeller et al., 2002). As primary motoneuron axon pioneer the path of the second wave of motor axons (Pike et al., 1992), one possible explanation is that COLXV-B is not a master guidance cue for primary motor axon growth, but its absence in the common path prevents growing primary axons to deposit additional signals or to modify the existing ECM that are critical for secondary motoneuron pathfinding. As we did not observe multiple ectopic branching of primary axons

in *coll5a1b*-morphants, we can reasonably exclude repulsive activity of COLXV-B along the common path as well as a role in the control of primary axonal branching. The fact that CaP axons significantly stall at the choice point rather suggested that COLXV-B influences pathway selection at the choice point. This was clearly demonstrated for secondary motor axons. Systematic failure of RoP-like nerve to extend rostrally with the presence of characteristic meshed structure at the choice point and occasional ventral projections pointed out a role for COLXV-B in pathway selection at the choice point during secondary motor axon growth.

Although COLXV-B was found closely apposed to aneural and neural AChR clusters in particular those located at the choice point, neural synaptogenesis appeared to occur normally in absence of COLXV-B. However we showed that its absence reduced significantly embryo motility in response to touch. As truncated and misrouted primary and secondary axons in *coll5a1b*-morphants, we speculated that these defects might secondary result in a reduced number of neural AChR clusters and thus subsequent formation of neuromuscular synapses. Consistent with our behavior assays, for the majority of the identified mutants in neuromuscular synaptogenesis, reduced number of neuromuscular synapses was associated with motility defects ranging from very severe phenotype (progressive paralysis) to moderate phenotype (reduced amplitude of tail flip) (Granato et al, 1996; Panzer et al, 2005) by showing that a significant reduction in myofibril content was secondary to, or occurred in parallel with, reduced embryo motility. Consistent with our data, *unp* mutant that was first identified from a screen through a collection of mutants with defects in locomotion behavior was reported to exhibit decreased motility that subsequently recovers (Granato et al, 1996).

How COLXV-B guides axons along their path?

Fundamentally, our data emphasize the critical role of adaxial cells in the control of motor growth, by leaving behind extracellular matrix cues that are later important for axon navigation toward their target. Based on the structure and biological function already known for collagens (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005), several hypotheses can be postulated. COLXV-B could act on motoneuron guidance either directly by interacting with growing axons through specific membrane receptors or indirectly by modulating interactions with other ECM molecules or by sequestering other guidance cues in the motor path.

One hypothesis is that COLXV-B interacts with ECM molecules to modulate their function. In collaboration with colleagues we previously showed that the organization and function of the surrounding ECM can be modified by modulating the expression of collagen XV. This

effect was notably mediated through physical interactions with fibronectin and laminin (Hurskainen et al, 2010), two components involved in motor axonal pathfinding (Frost and Westerfield, 1986; Westerfield and Eisen, 1988). A second hypothesis is that COLXV-B functions through its CS/HS chains since glycosaminoglycan have been implicated in axon guidance (Bandtlow and Zimmermann, 2000). The human collagen XV was described as a fulltime CSPG that can also carry HS chains (Li et al., 2000; Myers et al., 2007). As for collagen XV-A (Pagnon-Minot et al, 2008), we found, mainly in its TSPN domain, several consensus sites for CS/HS chain attachment (Bretaud et al, 2011; data not shown). As we showed that COLXV-B distribution coincides with CS immunoreactivity, we thus reasoned that COLXV-B could be the as yet unidentified CSPG involved in motor axon pathfinding though the phenotype observed in *coll5a1b*-morphants did not entirely recapitulate the effect of complete removal of CS by enzymatic digestion (Bernhardt and Schachner, 2000). Another interesting hypothesis is that COLXV-B functions in axon guidance by interacting directly with a receptor expressed by the growth cone. Collagen XVIII and collagen XIX were suggested to exert their function through binding to the membrane receptors such as RPTP and integrins, respectively (Shneider and Granato 2006; Hilario et al, 2010). Along this line, collagen XV was recently shown to interact with the collagen discoidin domain receptor DDR1 (Clementz et al, 2013) that has been involved in axon extension in developing cerebellum (Bhatt et al, 2000). It is thus tempting to suggest that COLXV-B could signal the growth cone to extend past the choice point by binding to DDR1.

The myotome-derived *coll5a1b* influences slow muscle lineage specification.

In *coll5a1b*-morphants, adaxial cells properly committed to the slow muscle lineage, elongated and migrated to populate the periphery of the myotome. However, we showed that expression of *coll5a1b* by adaxial cells influences the specification of muscle pioneers but not the commitment to slow muscle lineage. Lack of COLXV-B led to a slight increase in MP number at the expense of superficial slow muscle. Increased HH signaling throughout the whole myotome at a specific time window led to increased number of MPs (Wolff et al., 2003). In a previous study we showed that *coll5a1a* paralog expressed in notochord is involved in muscle development by interplaying with Hedgehog signaling through the control of its diffusion from the notochord (Pagnon-Minot et al., 2008). However, HH signaling was not modified in *coll5a1b* morphants refuting the possibility that *coll5a1b* plays a similar role than *coll5a1a* in muscle differentiation. Recent work showed that MP specification *versus* SSF fate resulted from integration of FGF and BMP signaling (Nguyen-Chi et al., 2012).

Interestingly, at 8-10 somite stage when MP specification occurs, COLXV-B deposition is restricted in the posterior part of the somite. Thus one possible mechanism explaining the increase of MP in *coll5a1b* morphant is that COLXV-B contributes to the establishment of the antero-posterior FGF gradient by optimizing, through its glycosaminoglycan chains, FGF signaling activity in the posterior part of the somite. HS sulfate chains are known to function as co-receptor of FGF ligand and have been involved in FGF signaling in zebrafish (Norton et al., 2005; Sarrazin et al., 2011). Moreover, knockdown of heparan sulfotransferase, an enzyme involved in HS chain synthesis, resulted in an increase of Engrailed expression, a marker of MP (Bink et al., 2003). Interestingly, the glycosaminoglycan chains of the fly homologue of the vertebrate collagens XV/XVIII, the multiplexin Mp, were suggested to establish Wingless signaling area by modulating ligand diffusion (Momota et al., 2011). Several lines of evidence showed that MPs are intermediate targets that provide information necessary for CaP axon to proceed past this region (Melançon et al, 1997; Cantu et al., 2013). This raised the question of whether an increase in MP number may participate to the primary motor axon phenotype in *coll5a1b*-morphants. This cannot be excluded and remains to be investigated.

Despite its presence in skeletal muscle and motor nerve basement membranes (Muona et al., 2002) very little is known about the function of collagen XV in mammalian neuromuscular system. The analysis of *coll5a1^{-/-}* mice revealed that collagen XV functions as a structural component required to stabilize skeletal muscle cells and blood vessels and its absence caused a skeletal myopathy and cardiomyopathy (Eklund et al, 2001; Rasi et al, 2010b) and that it also contributed to peripheral nerve maturation (Rasi et al, 2010a). Here we provide the first evidence that zebrafish collagen XV functions as a molecular cue in motoneuron pathfinding. Such a role in axonal guidance was demonstrated for the collagen XV/XVIII homologue CLE-1 in *C. elegans* (Ackley et al., 2001) and for the multiplexin Mp in flies (Meyer and Moussian, 2009) suggesting a conserved role for multiplexins during evolution. Contrary to *COL18A1* for which mutations were shown to be responsible for Knobloch syndrome (Sertié et al, 2000), no human disease was associated to mutations in *COL15A1* gene so far. Most of molecular cues and signaling pathways of neuromuscular system are common to human and zebrafish confirming that *COL15A1* represents a candidate gene for orphan neuromuscular disorders as it has been suggested (Rasi et al., 2010a).

MATERIAL AND METHODS

Fish strains and maintenance

AB/TU wild-type maintenance and embryo collection were carried out at the zebrafish PRECI facility (UMS CNRS 3444 Lyon Biosciences Gerland) in compliance with French Government guidelines. Embryos obtained from natural spawning were raised following standard conditions (Westerfield, 2000). The developmental stages are given in hour post-fertilization (hpf) and day post-fertilization (dpf) at 28.5°C, according to morphological criteria (Kimmel et al., 1995). To prevent pigmentation, embryos used for experiments from 24 hpf were treated with 0.21mM phenylthiourea (PTU, Sigma). A batch of 18 hpf fixed embryos derived from an heterozygous incross of *tbb72 unplugged* allele (Zhang *et al.*, 2004) that were outcrossed with the HB9-GFP line (Flanagan *et al.*, 2005) were kindly provided by Michael Granato (city Pennsylvania, USA) and genotyped after imaging as described below.

Genotyping of unplugged/HB9:GFP embryos

Genomic DNA was grossly extracted by 10 min incubation at 95°C in NaOH 50mM and pH subsequently adjusted with 1M Tris HCl pH= 8 (1:10 final dilution). PCR on 2µl genomic DNA was performed at the annealing temperature of 62°C with 5'-TGGCTTTCAACACATCACTCTCC -3' (BB72GTF1) and 5'-GGTCCGCTGTCATCACATTCC -3' (BB72GTR1) primers to amplify *tbb72* allele. Identification of the mutant amplicons was then performed by enzymatic digestion of purified PCR products with AflIII (Biolabs) that cuts once in the mutant amplicon and confirmed by sequencing.

Zebrafish *coll5a1b* cloning and recombinant production of COLXV-B

In order to clone the full-length coding sequence of *coll5a1b* (accession number FN432724), RT-PCR was performed on 2 dpf embryos. The following primers 5'-GCCACCATGAAATTTGCCTCCTGTC-3' (forward) and 5'-CTAGTTCCTTCCAGGGTGCT-3' (reverse) containing respectively the sequences for the BamHI and XbaI restriction sites at the 5' end were used for the amplification allowing a direct cloning into pCS2+ expression vector. For COLXV-B rich supernatant production, HEK293T cells cultured in DMEM (supplemented with 10% FBS and 50 µg/ml gentamycin) were transfected with pCS2+*-coll5a1b* construct using Calcium Phosphate transfection Kit (Invitrogen) according to manufacturer instructions. Next day, routine medium was replaced by

FBS-free medium supplemented with 50µg/ml ascorbic acid. Media were then collected 24 h later and stored at -80°C until use.

Production and purification of antibodies against zebrafish COLXV-B

Polyclonal antibodies recognizing specifically zebrafish COLXV-B were raised in rabbits against two synthetic peptides: ARREETFGQTNNKEKT corresponding to the NC10 255-270 sequence and STYKNSQTLMRESSQ corresponding to the NC1 940-954 sequence (Figure S1). The antisera were then affinity purified for each peptide to obtain purified polyclonal antibodies specific for NC10 (anti-NC10) and NC1 (anti-NC1) COLXV-B domains. Peptide synthesis, antibodies production and purification were from Covalab (Villeurbanne, France).

Western Blot analysis

For western blot analysis of COLXV-B produced in HEK293T cells, 1mL of culture supernatant was classically precipitated with 10% trichloroacetic acid and pellets were resuspended in Laemli buffer 1X (62,5 mM Tris pH 6.8, 1% SDS, 5% glycerol, 0,1% bromophenol blue, 10 mM DTT). Proteins were separated on SDS-PAGE and transferred into PVDF membrane. Western blot analysis was then performed with affinity-purified polyclonal rabbit anti-NC1 or anti-NC10 COLXV-B antibodies (dilution 1:1000) depending on the experiment followed by an incubation with goat HRP-conjugated secondary antibodies (Biorad ; dilution 1:10000), using Immun-Star WesternC (Biorad) as a chemiluminescence substrate.

Collagenase digestion

For collagenase assay on culture supernatants of HEK293T cells, 2mL of culture supernatant was precipitated as described above. Pellet was then resuspended in 50 µl collagenase buffer (25 mM Tris-HCl pH= 7.4, 6 mM CaCl₂, 0.5 M NaCl, 1 mM AEBSF). Suspension was then divided in two samples of equal volume that were incubated for 2 h at 37°C with or without 333 U/ ml of collagenase. Enzymatic reaction was stopped with Laemli buffer 1X (final concentration) and heated samples were then stored at -80°C or directly loaded on SDS-PAGE for Western blot analysis as described above.

Wholemount Immunostaining

For immunostaining, embryos between 13 and 72 hpf were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS and transferred in 100% methanol for storage at -20°C until

use or fixed for 2 h at room temperature (RT) when immunostaining was performed immediately. Embryos stored in methanol were progressively rehydrated in decreasing concentrations of methanol in PBT (PBS, 0,1% tween). All embryos were then permeabilized in PBS-T (1% Triton X-100 in PBS). For 52 hpf and 72 hpf additional treatments were performed. Embryos were treated with frozen acetone (for 7 min at -20°C) and incubated with Proteinase K (Roche, 12µg/ml final concentration in PBS 1X) for 20 min. Embryos were then incubated in blocking buffer (10% sheep serum in PBS-T). Incubation with primary antibodies was performed overnight at 4 °C. After washing with PBS-T, embryos were incubated overnight at 4 °C with fluorochrome-coupled secondary antibodies or alpha-bungarotoxin drug. Finally, after washing with PBS-T, embryos were stored at 4 °C until observation.

Primary and secondary antibodies and alpha-bungarotoxin drug were used at indicated dilution in 1% sheep serum in PBS-T: rabbit polyclonal anti-NC10 COLXV-B (1:100); rabbit polyclonal COLXII (Bader et al., 2009 1:250); mouse monoclonal F59 antibody (1:10, Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)); mouse monoclonal znp1 antibody (1:100, DSHB); mouse monoclonal zn8 antibody (1:400, DSHB); mouse monoclonal 4D9 antibody (1:50, DSHB); rabbit polyclonal Prox1 antibodies (1:5000, Millipore); alpha-bungarotoxin TRITC (10 µg/ml, Biolegend); goat anti-mouse or anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 546 (1:500, Invitrogen).

Preparation and immunostaining of frozen tissue sections

For immunostaining of frozen sections, embryos were fixed overnight in 4% PFA, quickly washed with PBS and embedded in blocks containing 1.5% agarose, 5% sucrose. Blocks were incubated overnight at 4°C in 30% sucrose in PBS, embedded in OCT freezing medium, snap frozen in cold isopentane and 20 µm cryosections were performed with Leica cryostat and stored at -80°C until use. To perform immunostaining, frozen sections were rehydrated for 5 min in PBS and incubated 30 min in blocking buffer (1% BSA, 3% sheep serum in PBS). Primary antibodies were then incubated for 1 h at RT. After quick washes in PBS, secondary antibodies or phalloidin drug were incubated for 1 h at RT. After a rapid wash in PBS, nuclei were stained for 5 min with Hoechst 33258 (SIGMA). Samples were washed and mounted in 50% glycerol:PBS and stored at 4°C until imaging. Primaries and secondary antibodies and phalloidin drug were used at indicated dilutions in blocking buffer: mouse monoclonal anti-β-catenin antibody (1:400; SIGMA); rat monoclonal anti-C-6-S antibody (1 :100; Mab 473HD antibody, from Andreas Faissner, Germany) ; rabbit anti-NC10 collagen XV-B antibodies

(1:100); goat anti-mouse or anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor-488 or Alexa fluor 546 (1:500; Invitrogen) ; goat anti-rat IgG coupled to Alexa Fluor-488 (1/200; Invitrogen) and phalloidin-TRITC (1:100; Sigma-Aldrich).

Morpholino design and morpholino-knockdown

Morpholino (MO) antisense strategy was performed following the recommendations of Gerety and Wilkinson (Gerety and Wilkinson, 2011). Morpholino antisense oligonucleotides (MOs) complementary to the translation start site of *Coll5a1b* mRNA (tMO15b) and to the exon2 - intron2 boundary of *Coll5a1b* pre mRNA (sMO15b) were designed and synthesized by Gene Tools (USA). The 5'-3' sequences were: tMO15b AAAGTCCAA GCATGAGATTAGTGCA ; sMO15b AGAGTATCCCCTACCTTCCATGAC. 0.5 nL of each MO was injected into the vitellus of 1-2 cell stage embryos at a dose of 12.8 ng for tMO15b and 4.2 ng for sMO15b. The latter was co-injected with 1.7 ng of p53MO (Robu et al., 2007) to decrease off-target toxicity. Standard control MO (ctl-MO) provided by Gene Tools was used as a negative control in our experiments. To evaluate efficacy of sMO15b, total RNA from 24 hpf-injected embryos (n=20 embryos per condition) was isolated according to the TRIZOL method (Invitrogen). Reverse transcription was performed during 1 h at 37°C with 3µg of RNA using oligodT, dNTP and MMLV Reverse transcriptase (from Promega). PCR reaction was performed on 1µl cDNA with DNA polymerase from Biolabs and the following primers (Sigma) at the annealing temperature of 60°C: 5'-TGGGTGACAACACTCTGGAA-3' (*Coll5a1b*exon1 forward); 5'-TGAAGGACACAGA-TGGTGGA-3' (*Coll5a1b*exon3 reverse). PCR reactions were analyzed with 2.5% agarose gel electrophoresis. For sequencing, PCR product was gel purified using Nucleospin Extract II kit (Macherey Nagel).

Dominant negative PKA forced-expression

To mimic activation of Hedgehog pathway in the overall myotome, 50 pg of mRNA encoding dominant negative form of PKA (dnPKA) was injected at 1 cell stage as previously done (Du *et al*, 1997). Capped mRNA was *in vitro* synthesized using message machine SP6 kit (Ambion) from PCS2+-dnPKA (Gift from Elworthy Stone, Sheffield) linearized by Not I.

Wholemout RNA *in situ* hybridization

The following DIG-labelled probes were synthesized with promega RNA polymerase as previously described: *coll5a1b* (Bretaud et al., 2011), *eng2a* (Ekker et al., 1992), and *ptcl*

(Concordet et al., 1996), *smyhc1* (Elworthy et al., 2008). Wholemount *in situ* hybridization was performed according to (Thisse and Thisse, 2008) with the subsequent modifications : hybridization mix contained total RNA from torula yeast (Sigma) purified with phenol chloroform method; hybridization was performed at 69°C ; anti-DIG-AP (Roche) antibody was diluted at 1:5000 ; excess of anti-DIG antibody was removed with several washes in PBT containing 2 mg/ml BSA ; Staining reaction was stopped with PBT followed by 20 min postfixation in 4% PFA; embryos were equilibrated in increasing concentrations of glycerol in PBS for observation in 75 % glycerol. Transverse sections of one somite thickness were performed in wholemount embryo trunk region using a razor blade at appropriate levels depending on the experiment.

Motility assay

Responses to touch stimulus was performed on 48 hpf embryos as described (Goody et al., 2012). Briefly, embryos were placed individually in a 60 mm petri dish in the center of a circle of 10mm of diameter. Time-lapse acquisitions were performed with an axiozoom microscope (Zeiss). After touching embryos at the end of the tail, the time needed to escape out of the circle was calculated. A total of 45 embryos from 3 independent injections were observed for each condition.

Imaging

Embryos after wholemount *in situ* hybridization were observed and imaged with Leica stereomicroscope MZ16 or light microscope LEICA DM/4000B equipped with a Nikon digital camera. Immunostainings were imaged with inverted confocal microscopes (LSM 510 and LSM 780, Zeiss) or spectral confocal detection microscope SP5 (Leica) available at PLATIM facility (Lyon, France) and IGFL (Lyon, France). Except when indicated, immunostaining pictures are Z projection of confocal Z stacks. Image processing was performed with ImageJ software.

Statistical analyses

Significant effects were assessed with a two-tailed Student's test using Excel software. Data represent the mean \pm standard error of the mean. Mann-Whitney test (Graphpad prism software) was used for quantification of fast fiber areas that showed non normal distribution.

Acknowledgments

We are grateful to Andreas Faissner for sending us C-6-S antibodies, Estelle Hirsinger for *eng2a* probe, Stone Elworthy for *dnPKA* and *smyhcl* constructs, Michael Granato for *unplugged/MuSK* embryos. We thank Laure Bernard (PRECI) for care of the fish and the imaging platform and (PLATIM) for technical assistance, both from the SFR Lyon-Gerland Biosciences, UMS3444, UCBL-Gerland, Lyon, France and Dominique Le Guellec for his help with ISH. We are grateful to Marilyne Malbouyres and Elisabeth Vaganay for expert technical assistance with imaging and recombinant production of COLXV-B respectively. We thank Jamilé Hazan for sharing protocols and for helpful discussions.

Funding

This work was supported by the CNRS (<http://www.cnrs.fr/>), the University of Lyon (<http://www.univ-lyon1>), the ENS-Lyon (<http://www.ens-lyon.eu/>) and grants from the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR) (10BLAN121901) (<http://www.agence-nationale-recherche.fr/>) and “Association Française contre les Myopathies” (AFM) (MNM1-2010) (<http://www.afm-telethon.com>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist

Author Contributions

EG, SB and FR conceived and designed the experiments. EG and SB performed the experiments : EG and SB performed IHS, IF, morpholino-knockdown and MO validation, antibodies characterization , quantification and statistics ; EG performed confocal imaging and genotyping; SB performed full lenght *coll5a1b* cloning the timelapse videomicroscopy. Wrote the paper : EG and FR.

References

- Ackley BD, Crew JR, Elamaa H, Pihlajaniemi T, Kuo CJ, et al. (2001) The NC1/endostatin domain of Caenorhabditis elegans type XVIII collagen affects cell migration and axon guidance. *J Cell Biol* 152: 1219–1232.
- Amenta PS, Scivoletti NA, Newman MD, Sciancalepore JP, Li D, et al. (2005) Proteoglycan-collagen XV in human tissues is seen linking banded collagen fibers subjacent to the basement membrane. *J Histochem Cytochem* 53: 165–176. doi:10.1369/jhc.4A6376.2005.
- Bader HL, Keene DR, Charvet B, Veit G, Driever W, et al. (2009) Zebrafish collagen XII is present in embryonic connective tissue sheaths (fascia) and basement membranes. *Matrix Biol* 28: 32–43. doi:10.1016/j.matbio.2008.09.580.
- Bandtlow CE, Zimmermann DR (2000) Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 80: 1267–1290.
- Beattie CE (2000) Control of motor axon guidance in the zebrafish embryo. *Brain Res Bull* 53: 489–500.
- Bernhardt RR, Goerlinger S, Roos M, Schachner M (1998) Anterior-posterior subdivision of the somite in embryonic zebrafish: implications for motor axon guidance. *Dev Dyn* 213: 334–347. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199811)213:3<334::AID-AJA9>3.0.CO;2-4.
- Bernhardt RR, Schachner M (2000) Chondroitin sulfates affect the formation of the segmental motor nerves in zebrafish embryos. *Dev Biol* 221: 206–219. doi:10.1006/dbio.2000.9673.
- Bhatt RS, Tomoda T, Fang Y, Hatten ME (2000) Discoidin domain receptor 1 functions in axon extension of cerebellar granule neurons. *Genes Dev* 14: 2216–2228.
- Bink RJ, Habuchi H, Lele Z, Dolk E, Joore J, et al. (2003) Heparan sulfate 6-o-sulfotransferase is essential for muscle development in zebrafish. *J Biol Chem* 278: 31118–31127. doi:10.1074/jbc.M213124200.
- Bonanomi D, Pfaff SL (2010) Motor axon pathfinding. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001735. doi:10.1101/cshperspect.a001735.
- Bretau S, Pagnon-Minot A, Guillon E, Ruggiero F, Le Guellec D (2011) Characterization of spatial and temporal expression pattern of Col15a1b during zebrafish development. *Gene Expr Patterns* 11: 129–134. doi:10.1016/j.gep.2010.10.004.
- Cantu JA, Flowers GP, Topczewski J (2013) Notum homolog plays a novel role in primary motor innervation. *J Neurosci* 33: 2177–2187. doi:10.1523/JNEUROSCI.3694-12.2013.
- Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M (2003) Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol* 200: 488–499. doi:10.1002/path.1415.

Clementz AG, Mutolo MJ, Leir S-H, Morris KJ, Kucybala K, et al. (2013) Collagen XV inhibits epithelial to mesenchymal transition in pancreatic adenocarcinoma cells. *PLoS ONE* 8: e72250. doi:10.1371/journal.pone.0072250.

Clementz AG, Harris A (2013) Collagen XV: exploring its structure and role within the tumor microenvironment. *Mol Cancer Res* 11: 1481–1486. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0662.

Concordet JP, Lewis KE, Moore JW, Goodrich LV, Johnson RL, et al. (1996) Spatial regulation of a zebrafish patched homologue reflects the roles of sonic hedgehog and protein kinase A in neural tube and somite patterning. *Development* 122: 2835–2846.

Daggett DF, Domingo CR, Currie PD, Amacher SL (2007) Control of morphogenetic cell movements in the early zebrafish myotome. *Dev Biol* 309: 169–179. doi:10.1016/j.ydbio.2007.06.008.

Devoto SH, Melançon E, Eisen JS, Westerfield M (1996) Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development* 122: 3371–3380.

Du SJ, Devoto SH, Westerfield M, Moon RT (1997) Positive and negative regulation of muscle cell identity by members of the hedgehog and TGF-beta gene families. *J Cell Biol* 139: 145–156.

Eisen JS (1991) Developmental neurobiology of the zebrafish. *J Neurosci* 11: 311–317.

Eisen JS, Pike SH (1991) The *spt-1* mutation alters segmental arrangement and axonal development of identified neurons in the spinal cord of the embryonic zebrafish. *Neuron* 6: 767–776.

Ekker M, Wegner J, Akimenko MA, Westerfield M (1992) Coordinate embryonic expression of three zebrafish engrailed genes. *Development* 116: 1001–1010.

Eklund L, Piuhola J, Komulainen J, Sormunen R, Ongvarrasopone C, et al. (2001) Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1194–1199. doi:10.1073/pnas.031444798.

Elworthy S, Hargrave M, Knight R, Mebus K, Ingham PW (2008) Expression of multiple slow myosin heavy chain genes reveals a diversity of zebrafish slow twitch muscle fibres with differing requirements for Hedgehog and *Prdm1* activity. *Development* 135: 2115–2126. doi:10.1242/dev.015719.

Flanagan-Steet H, Fox MA, Meyer D, Sanes JR (2005) Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development* 132: 4471–4481. doi:10.1242/dev.02044.

Fox MA (2008) Novel roles for collagens in wiring the vertebrate nervous system. *Curr Opin Cell Biol* 20: 508–513. doi:10.1016/j.ceb.2008.05.003.

Gerety SS, Wilkinson DG (2011) Morpholino artifacts provide pitfalls and reveal a novel role for pro-apoptotic genes in hindbrain boundary development. *Dev Biol* 350: 279–289. doi:10.1016/j.ydbio.2010.11.030.

Goody MF, Kelly MW, Reynolds CJ, Khalil A, Crawford BD, et al. (2012) NAD⁺ biosynthesis ameliorates a zebrafish model of muscular dystrophy. *PLoS Biol* 10: e1001409. doi:10.1371/journal.pbio.1001409.

Granato M, van Eeden FJ, Schach U, Trowe T, Brand M, et al. (1996) Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. *Development* 123: 399–413.

Hafték Z, Morvan-Dubois G, Thisse B, Thisse C, Garrone R, et al. (2003) Sequence and embryonic expression of collagen XVIII NC1 domain (endostatin) in the zebrafish. *Gene Expr Patterns* 3: 351–354.

Hägg PM, Hägg PO, Peltonen S, Autio-Harminen H, Pihlajaniemi T (1997) Location of type XV collagen in human tissues and its accumulation in the interstitial matrix of the fibrotic kidney. *Am J Pathol* 150: 2075–2086.

Hilario JD, Wang C, Beattie CE (2010) Collagen XIXa1 is crucial for motor axon navigation at intermediate targets. *Development* 137: 4261–4269. doi:10.1242/dev.051730.

Hirsinger E, Stellabotte F, Devoto SH, Westerfield M (2004) Hedgehog signaling is required for commitment but not initial induction of slow muscle precursors. *Dev Biol* 275: 143–157. doi:10.1016/j.ydbio.2004.07.030.

34.

Hubert T, Grimal S, Carroll P, Fichard-Carroll A (2009) Collagens in the developing and diseased nervous system. *Cell Mol Life Sci* 66: 1223–1238. doi:10.1007/s00018-008-8561-9.

Huh K-H, Fuhrer C (2002) Clustering of nicotinic acetylcholine receptors: from the neuromuscular junction to interneuronal synapses. *Mol Neurobiol* 25: 79–112. doi:10.1385/MN:25:1:079.

Hurskainen M, Ruggiero F, Hägg P, Pihlajaniemi T, Huhtala P (2010) Recombinant human collagen XV regulates cell adhesion and migration. *J Biol Chem* 285: 5258–5265. doi:10.1074/jbc.M109.033787.

Jackson HE, Ingham PW (2013) Control of muscle fibre-type diversity during embryonic development: the zebrafish paradigm. *Mech Dev* 130: 447–457. doi:10.1016/j.mod.2013.06.001.

John H, Radtke K, Ständker L, Forssmann W-G (2005) Identification and characterization of novel endogenous proteolytic forms of the human angiogenesis inhibitors restin and endostatin. *Biochim Biophys Acta* 1747: 161–170. doi:10.1016/j.bbapap.2004.10.013.

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203: 253–310. doi:10.1002/aja.1002030302.

Li D, Clark CC, Myers JC (2000) Basement membrane zone type XV collagen is a disulfide-bonded chondroitin sulfate proteoglycan in human tissues and cultured cells. *J Biol Chem* 275: 22339–22347. doi:10.1074/jbc.M000519200.

Melançon E, Liu DW, Westerfield M, Eisen JS (1997) Pathfinding by identified zebrafish motoneurons in the absence of muscle pioneers. *J Neurosci* 17: 7796–7804.

Meyer F, Moussian B (2009) *Drosophila* multiplexin (Dmp) modulates motor axon pathfinding accuracy. *Dev Growth Differ* 51: 483–498. doi:10.1111/j.1440-169X.2009.01111.x.

Milla LA, Cortés CR, Hodar C, Oñate MG, Cambiazo V, et al. (2012) Yeast-based assay identifies novel Shh/Gli target genes in vertebrate development. *BMC Genomics* 13: 2. doi:10.1186/1471-2164-13-2.

sulfotransferase-1 is required for somitic muscle development and motor axon guidance in zebrafish. *Biochem J* 419: 387–399. doi:10.1042/BJ20081639.

Momota R, Naito I, Ninomiya Y, Ohtsuka A (2011) *Drosophila* type XV/XVIII collagen, Mp, is involved in Wingless distribution. *Matrix Biol* 30: 258–266. doi:10.1016/j.matbio.2011.03.008.

Muona A, Eklund L, Väisänen T, Pihlajaniemi T (2002) Developmentally regulated expression of type XV collagen correlates with abnormalities in Col15a1(-/-) mice. *Matrix Biol* 21: 89–102.

47.

Myers JC, Dion AS, Abraham V, Amenta PS (1996) Type XV collagen exhibits a widespread distribution in human tissues but a distinct localization in basement membrane zones. *Cell Tissue Res* 286: 493–505.

Myers JC, Amenta PS, Dion AS, Sciancalepore JP, Nagaswami C, et al. (2007) The molecular structure of human tissue type XV presents a unique conformation among the collagens. *Biochem J* 404: 535–544. doi:10.1042/BJ20070201.

Nguyen-Chi ME, Bryson-Richardson R, Sonntag C, Hall TE, Gibson A, et al. (2012) Morphogenesis and cell fate determination within the adaxial cell equivalence group of the zebrafish myotome. *PLoS Genet* 8: e1003014. doi:10.1371/journal.pgen.1003014.

Norton WHJ, Ledin J, Grandel H, Neumann CJ (2005) HSPG synthesis by zebrafish Ext2 and Extl3 is required for Fgf10 signalling during limb development. *Development* 132: 4963–4973. doi:10.1242/dev.02084.

Pagnon-Minot A, Malbouyres M, Haftek-Terreau Z, Kim HR, Sasaki T, et al. (2008) Collagen XV, a novel factor in zebrafish notochord differentiation and muscle development. *Dev Biol* 316: 21–35. doi:10.1016/j.ydbio.2007.12.033.

Panzer JA, Gibbs SM, Dosch R, Wagner D, Mullins MC, et al. (2005) Neuromuscular synaptogenesis in wild-type and mutant zebrafish. *Dev Biol* 285: 340–357. doi:10.1016/j.ydbio.2005.06.027.

Pike SH, Melancon EF, Eisen JS (1992) Pathfinding by zebrafish motoneurons in the absence of normal pioneer axons. *Development* 114: 825–831.

- Rasi K, Hurskainen M, Kallio M, Stavén S, Sormunen R, et al. (2010a) Lack of collagen XV impairs peripheral nerve maturation and, when combined with laminin-411 deficiency, leads to basement membrane abnormalities and sensorimotor dysfunction. *J Neurosci* 30: 14490–14501. doi:10.1523/JNEUROSCI.2644-10.2010.
- Rasi K, Piuhola J, Czabanka M, Sormunen R, Ilves M, et al. (2010b) Collagen XV is necessary for modeling of the extracellular matrix and its deficiency predisposes to cardiomyopathy. *Circ Res* 107: 1241–1252. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.222133.
- Ricard-Blum S, Ruggiero F (2005) The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol* 53: 430–442. doi:10.1016/j.patbio.2004.12.024.
- Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, et al. (2007) p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet* 3: e78. doi:10.1371/journal.pgen.0030078.
- Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD (2011) Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3. doi:10.1101/cshperspect.a004952.
- Schneider VA, Granato M (2006) The myotomal diwanka (lh3) glycosyltransferase and type XVIII collagen are critical for motor growth cone migration. *Neuron* 50: 683–695. doi:10.1016/j.neuron.2006.04.024.
- Schweitzer J, Becker T, Lefebvre J, Granato M, Schachner M, et al. (2005) Tenascin-C is involved in motor axon outgrowth in the trunk of developing zebrafish. *Dev Dyn* 234: 550–566. doi:10.1002/dvdy.20525.
- Sertié AL, Sossi V, Camargo AA, Zatz M, Brahe C, et al. (2000) Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome). *Hum Mol Genet* 9: 2051–2058.
- Stickney HL, Barresi MJ, Devoto SH (2000) Somite development in zebrafish. *Dev Dyn* 219: 287–303. doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1065>3.0.CO;2-A.
- Thisse C, Thisse B (2008) High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc* 3: 59–69. doi:10.1038/nprot.2007.514.
- Westerfield M (1987) Substrate interactions affecting motor growth cone guidance during development and regeneration. *J Exp Biol* 132: 161–175.
- Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene. *Hardcopies of the 4th edition of The Zebrafish Book can be obtained for a nominal fee from the Zebrafish International Resource Center, 5274 University of Oregon, Eugene, OR 97403 USA; fax: 541-346-6151.*
- Wolff C, Roy S, Ingham PW (2003) Multiple muscle cell identities induced by distinct levels and timing of hedgehog activity in the zebrafish embryo. *Curr Biol* 13: 1169–1181.

Wu H, Xiong WC, Mei L (2010) To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* 137: 1017–1033. doi:10.1242/dev.038711.

Zeller J, Schneider V, Malayaman S, Higashijima S, Okamoto H, et al. (2002) Migration of zebrafish spinal motor nerves into the periphery requires multiple myotome-derived cues. *Dev Biol* 252: 241–256.

Zhang J, Granato M (2000) The zebrafish unplugged gene controls motor axon pathway selection. *Development* 127: 2099–2111.

Zhang J, Lefebvre JL, Zhao S, Granato M (2004) Zebrafish unplugged reveals a role for muscle-specific kinase homologs in axonal pathway choice. *Nat Neurosci* 7: 1303–1309. doi:10.1038/nn1350.

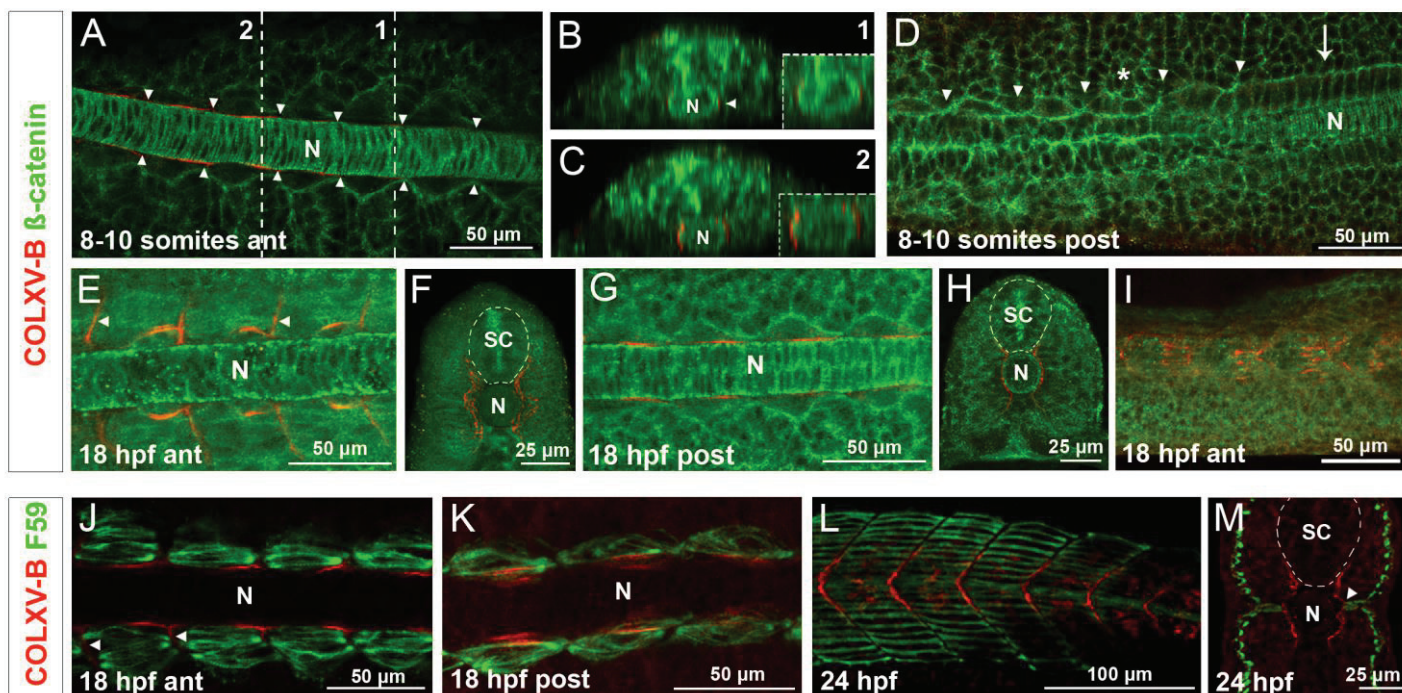


Figure 1.

COLXV-B immunoreactivity during primary myogenesis

Wholemout confocal immunofluorescence co-staining of embryos at 8-10 somites (A-D), 18 hpf (E-K) and 24 hpf (L-M) with COLXV-B antibodies (anti-NC10, red) and anti- β -catenin (green) to delineate cell shape (A-I) or F59 (green) to mark slow fibers (J-M). (A-D) anti- β -catenin (green) reveals the successive morphological changes and positional rearrangement of adaxial cells in the trunk of the same embryo from the most mature anterior somites (A) to the newly formed posterior somites (D). Arrowheads indicate somite boundaries. COLXV-B is detected as a thin signal juxtaposed to the notochord (N) in the most anterior somites where adaxial cells exhibit a broad shape (A, dorsal view) while no COLXV-B signal is present in the posterior part of the trunk (D, dorsal view) where adaxial cells show their initial cuboid shape (arrow) or cell interleaving step (asterisk). Dorsal view (A) also indicates that COLXV-B deposit is restricted to the half posterior part of the somites. B (arrowhead) and C, orthogonal views of region 1 and 2 as indicated in A show the posterior to anterior progression of COLXV-B deposition in the dorso-ventral axis. (E-I) At 18 hpf, in the most anterior somites COLXV-B is also detected in the vertical myosepta (E, dorsal view, arrowheads) and the signal along the notochord expands dorso-ventrally coinciding with the location of the motor path (F, cross-section) whereas in the most immature posterior somites (G, dorsal view; H, cross-section) COLXV-B staining is identical to that observed in the anterior part of the trunk at 8-10 somites (A). Lateral view of the anterior trunk (I) shows that COLXV-B is enriched in the postero-central region and organized like the rungs of a ladder. J-M F59 staining indicates that 18 hpf adaxial cells of the anterior trunk have elongated and initiate their migration toward the myotome periphery. COLXV-B is clearly detected in the vertical myosepta of the anterior trunk (J, arrowheads) but not in the posterior trunk (K). (L, M) At 24 hpf adaxial cells have differentiated into slow superficial fibers and muscle pioneers (F59 staining). The ladder-like deposition of COLXV-B persists in the motor path as a dashed line and concentrates in the central part of vertical myosepta (L, lateral view). Cross section at the level of yolk extension shows a close contact between COLXV-B and muscle pioneers adjacent to the notochord (M, arrowhead). N, notochord; SC, spinal cord; ant, anterior mid-trunk; post, posterior mid-trunk. For lateral and dorsal views, anterior is left.

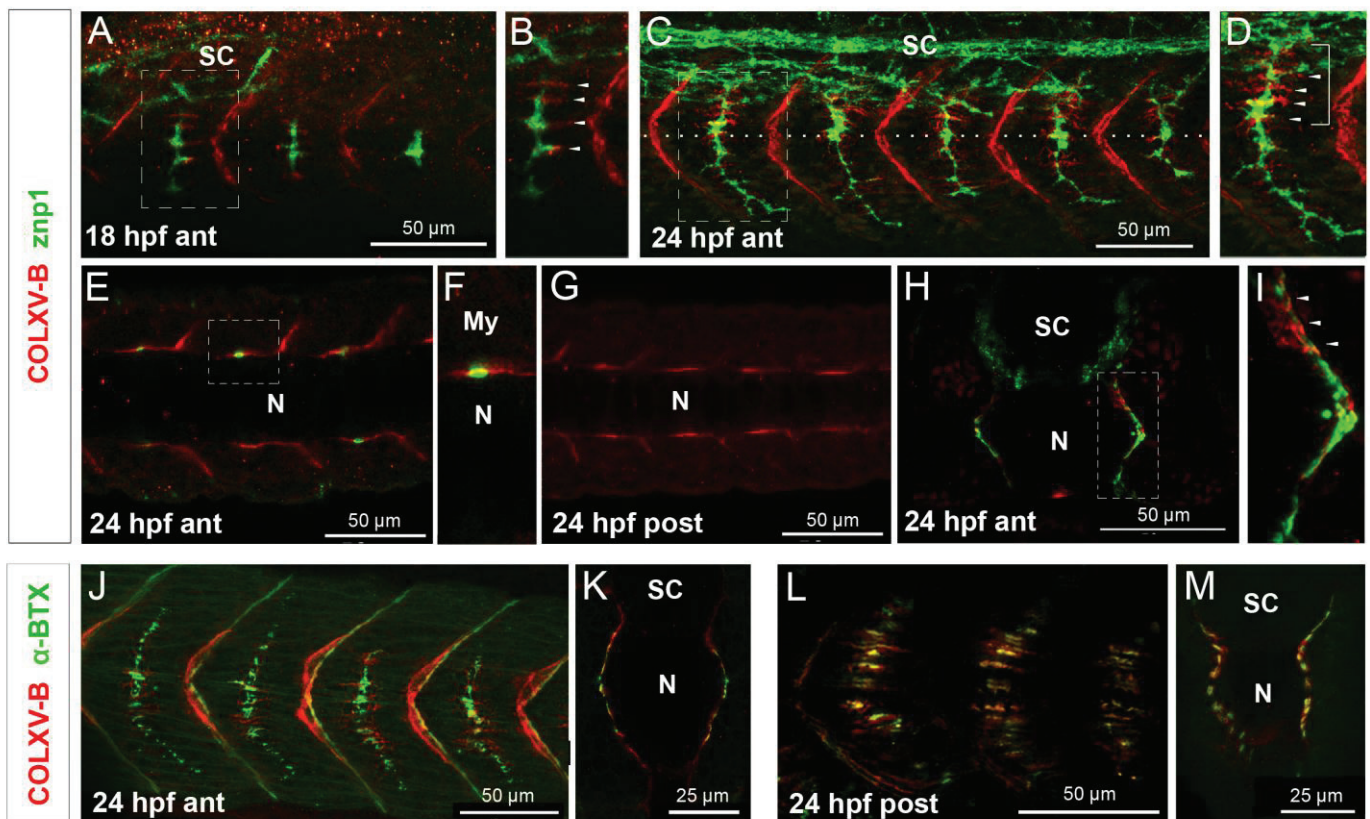


Figure 2.

COLXV-B immunoreactivity is present in the pathway of motor axons and coincides with the distribution of aneural AChR clusters

Wholemout confocal immunofluorescence co-staining of 18 hpf (A,B) and 24 hpf (C-M) embryos with COLXV-B antibodies (anti-NC10, red) and *znp1* antibody (green) to label motoneurons (A-I) or conjugated α -bungarotoxin (α BTX, green) to stain acetylcholine receptors (J-M). **A-D** Strong COLXV-B immunoreactivity is present in vertical myosepta and in the ventral motor path at 18 hpf when CaP axons have reached the horizontal myoseptum (A,B) and remains present in this region at 24 hpf when axons have passed the horizontal myoseptum (C, D). A-D are lateral views of anterior mid-trunk with anterior to the left (the boxed areas in A and C are shown at higher magnification in B and D respectively). Arrowheads in B and D point to COLXV-B deposition in a ladder-like manner along the motor path that coincides with axon varicosities. COLXV-B signal is enriched in the common path and the horizontal myoseptum (D, bracket) and weaker past this structure (C, D). The dashed lines indicate the position of the horizontal myoseptum. **E-G** Dorsal views of anterior (E, F; ant) and posterior (G, post) trunk indicate that COLXV-B is present in the motor path prior to the arrival of CaP axons. F is a higher magnification of the boxed area in E showing that COLXV-B deposit embraces CaP motoneuron axon. **H-I**, Strong COLXV-B signal is observed along the common path (arrowheads) wrapping around motoneuron axons. (H, cross section in the anterior mid-trunk and **I**, higher magnification of boxed area in H). **J-M**, COLXV-B signal coincides with neural (lateral views and cross section of the anterior part of the trunk J, K) and aneural AChR clusters (lateral views and cross section of the posterior part of the trunk L, M). N, notochord; SC, spinal cord; My, myotome; ant, anterior mid-trunk; post, posterior mid-trunk. For lateral and dorsal views, anterior is to the left.

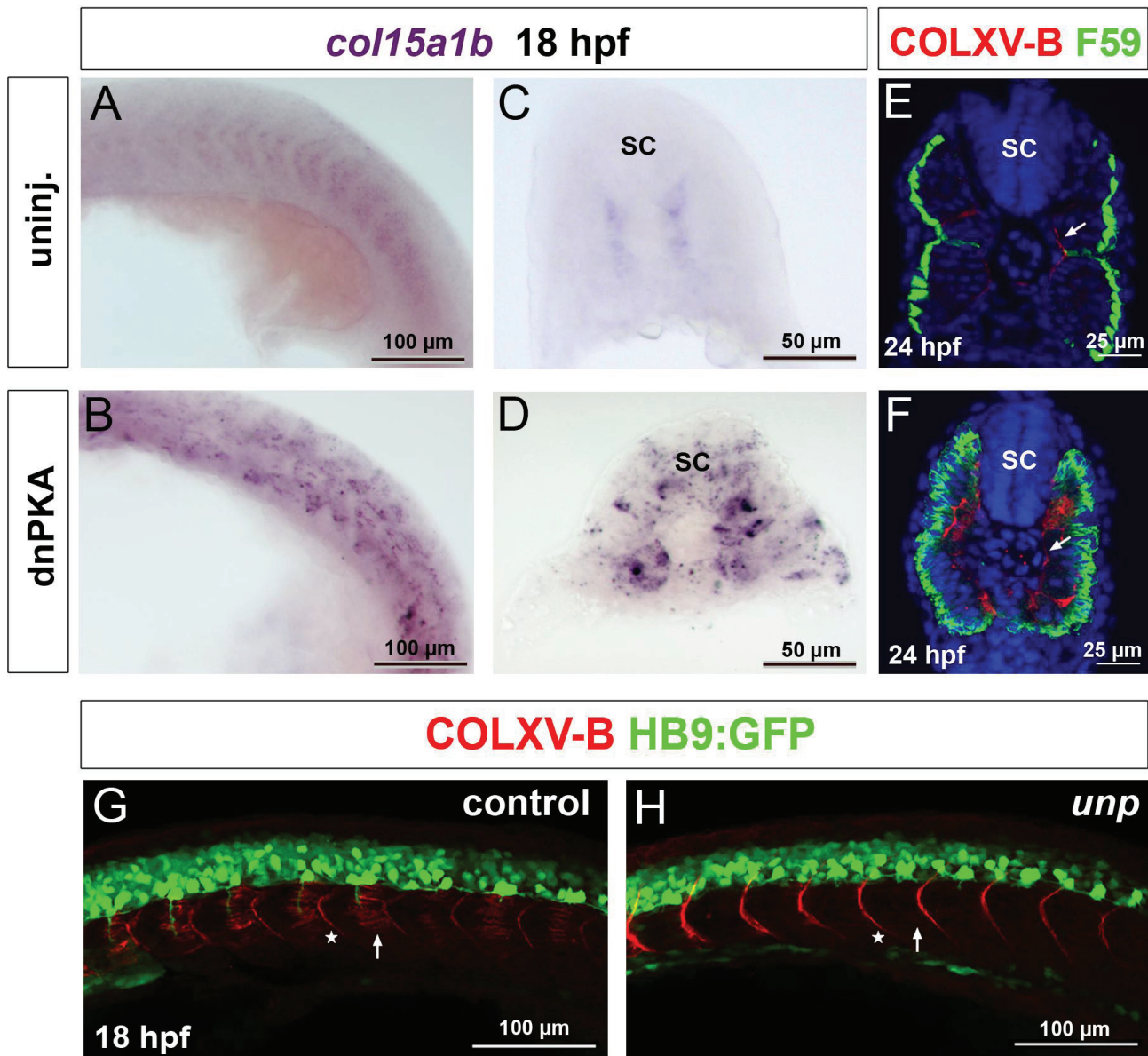


Figure 3.

Hedgehog signaling drives *col15a1b* expression and *unplug*/MuSK signaling organizes COLXV-B deposition

A-D Lateral views (A,B) and cross sections (C,D) of 18 hpf uninjected embryo (A,C) or injected with dnPKA mRNA (B,D) following wholemount *in situ* hybridization with *col15a1b* antisense riboprobe. Ectopic activation of Hedgehog signaling induces *col15a1b* overexpression and the expansion of its expression domain to the entire myotome. E-F Cross sections at the level of yolk extension of 24 hpf uninjected embryo (E) or injected with dnPKA mRNA (F) co-stained with COLXV-B antibodies (anti-NC10, red), F59 (green) and Hoechst to reveal nuclei (blue). Ectopic F59-positive slow fibers coincide with ectopic deposition of COLXV-B (F compared with E). Arrows point to regular COLXV-B deposition (E, F). G-H COLXV-B immunofluorescence staining (anti-NC10, red) of 18 hpf heterozygous (G, control) and homozygous *unplug* (H, *unplug*) clutch mate embryos in HB9:GFP background (green). Lack of *unplug*/Musk activity in homozygous embryos results in the absence of COLXV-B immunoreactivity along the motor path (H compared with control G, arrows) but not at vertical myosepta (asterisks). SC, spinal cord. Lateral views are anterior to the left

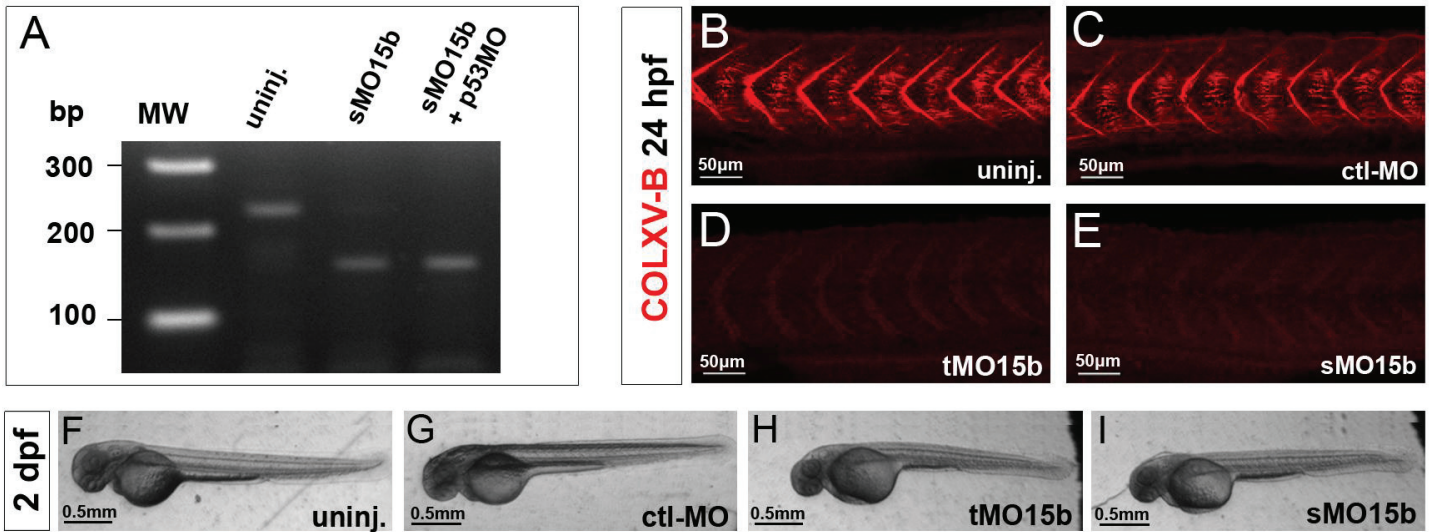


Figure 4.

***col15a1b* morpholino-knockdown efficiency**

A splice-blocking morpholino (sMO15b) and a morpholino targeted to the translation start codon (tMO15b) are used to knockdown *col15a1b* expression. **A-** Analysis of *col15a1b* transcripts by RT-PCR in 24 hpf uninjected and injected embryos with sMO15b alone or in combination with p53MO. Note the complete shift in size of the PCR product corresponding to exon 2 skipping in sMO15b alone or in combination with p53MO. In all the study, the sMO15b is always used in combination with p53MO to avoid non specific effects. **B-E** COLXV-B immunostaining with anti-NC10 antibodies on 24 hpf uninjected embryos (B), embryos injected with standard morpholino (C, ctl-MO), tMO15b (D) or with sMO15b (E). A complete lack of COLXV immunoreactivity is observed in embryos injected with tMO15b or sMO15b. Pictures are acquired with identical confocal settings and are equally post-treated with Image J to respect differences in signal intensity. Lateral views, anterior to left. **F-I** Brightfield of 2 dpf embryos showing no gross phenotypical traits in embryos injected with tMO15b (H) or sMO15b (I) compared with uninjected (F) and ctlMO-injected (G) embryos.

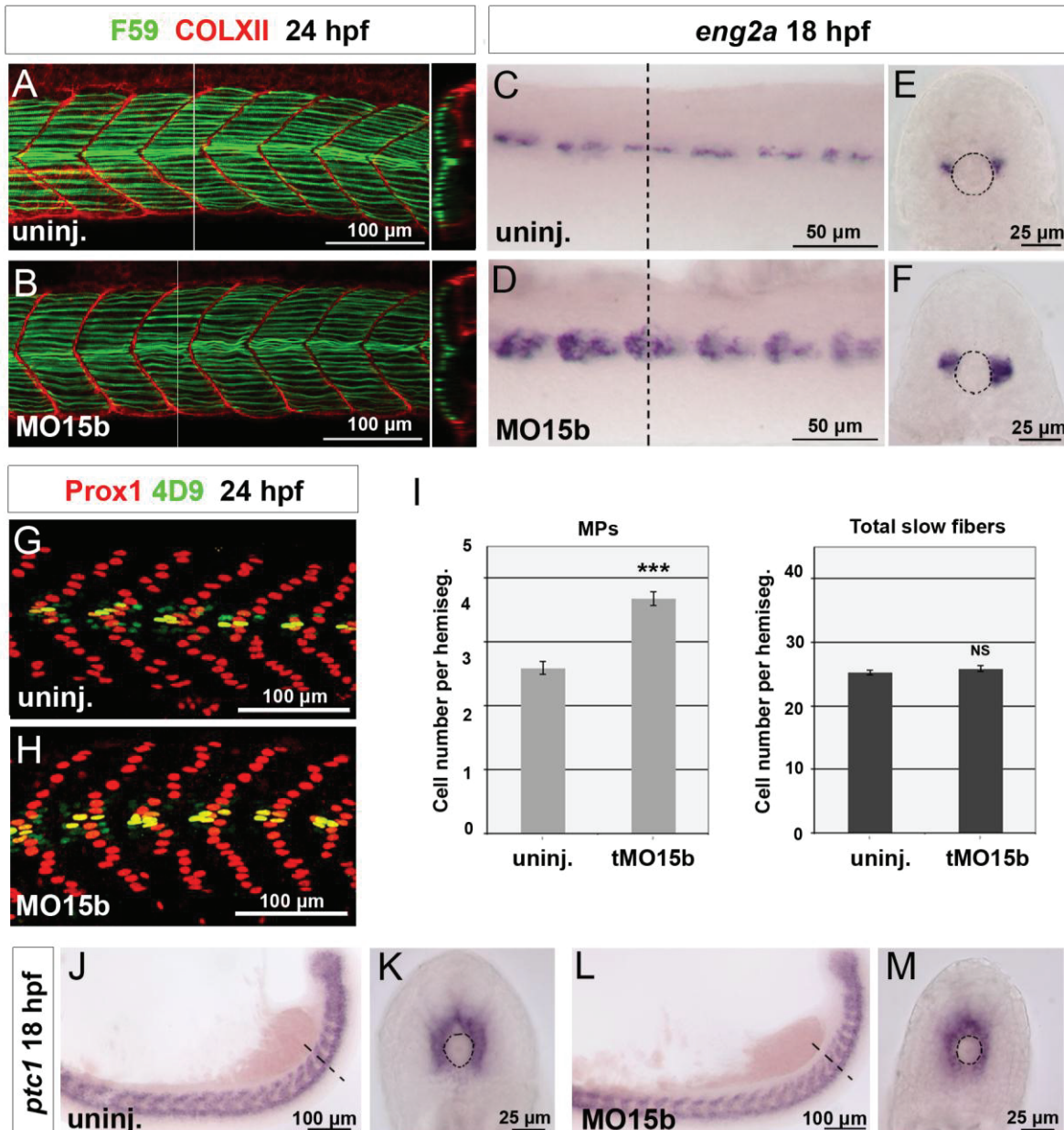


Figure 5.

COLXV-B influences MP fate specification independently of Hedgehog signaling

A-B Fluorescence immunostaining of 24 hpf uninjected (A) and MO15b-injected (B) embryos with F59 (green) and collagen XII antibodies that stain vertical myosepta (COLXII, red). Right panels are orthogonal views at the level of the white line in A and B indicating that absence of COLXV-B does not affect adaxial cell migration at the periphery of the myotome. **C-F** Wholemount *in situ* hybridization of 18 hpf uninjected (C, E) and MO15b-injected (D, F) embryos with *eng2a* antisense riboprobe. *eng2a* expression domain is abnormally enlarged in MO15b-injected embryos (D,F). **G-H** Double immunostaining of 24 hpf uninjected (G) and MO15b-injected embryos (H) with antibodies against Prox1 (red) and engrailed (4D9 antibody, green) that reveal MFFs (green), SSFs (red) and MPs (yellow) nuclei. **I**, Quantification of the number of MPs and total number of slow muscle cells per somite in 24 hpf tMO15b-injected and uninjected embryos shows that the increase in MPs induced in *coll5a1b* morphant as observed in the immunofluorescence staining, occurs as the expense of SSFs (n= 59 and 56 hemisegments for uninjected and tMO15b embryos respectively). NS, non significant; ***p < 0.001; Student's t test. **J-M** Wholemount *in situ* hybridization with *ptc1* antisense riboprobe of 18 hpf uninjected (J, K) and MO15b-injected (L, M) embryos. Lack of COLXV-B does not affect Hedgehog signaling.

A-D, G, H, Lateral views with anterior to the left; E, F, K, M cross sections at position indicated by the dashed line in the corresponding lateral view.

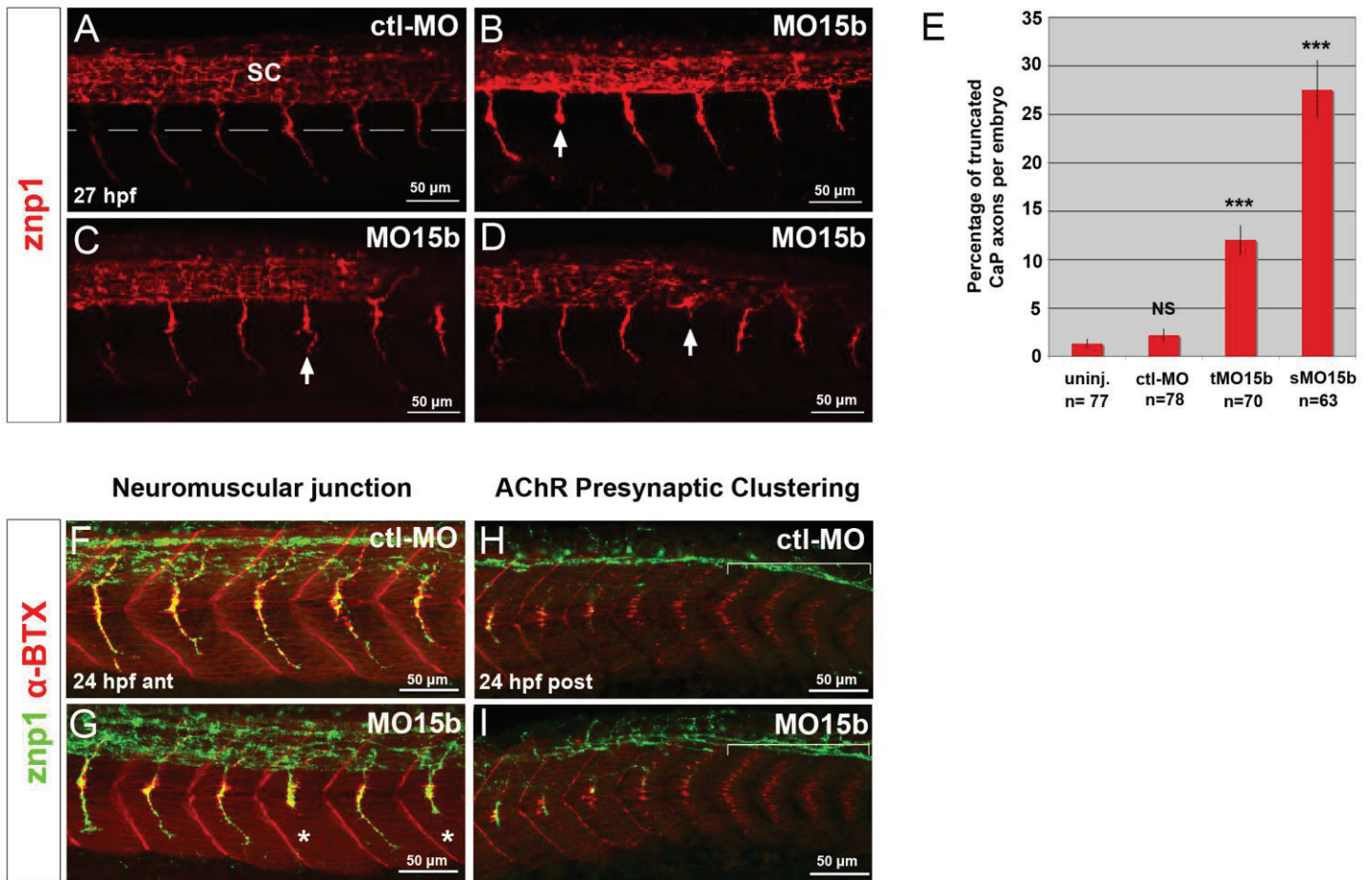


Figure 6.

Lack of COLXV-B disrupts primary motor axon growth but not AChR pre-patterning

A-D Immunostaining of primary motoneurons (*znp1*) in 27 hpf *ctl-MO* (A) and *MO15b*-injected (B-D) embryos. A, primary axon growth is nearly achieved and CaP axon have reached the ventral edge of the myotome in control morphants. Dashed line indicates the level of horizontal myoseptum. B-D, In *coll5a1b* morphants, some CaP axons stall at the choice point (B, arrow), directly branch at this level (C, arrow) or occasionally do not exit from spinal cord (D, arrow). E, Analysis of the percentage of truncated CaP axon in the different conditions. Results correspond to the mean frequencies of truncated CaP axons \pm SEM (n = number of embryos analysed for 10 hemisegments each; NS non significant, *** $p < 0.001$; Student's t test). **F-I** Double staining of 24 hpf *ctl-MO* (F, H) and *MO15b*-injected (G, I) embryos with α -bungarotoxin (red) and *znp1* (green), imaged at the anterior (F, G) and posterior (H, I) trunk level. Neuromuscular junction forms properly in *MO15b*-injected embryos (G compared to control F) except when truncated axons have not reached their target (G, asterisk). Prepatterned AChR clusters assemble normally in *MO15b*-injected embryos (I compared to control H, bracket). A-D and F-I, lateral views with anterior to the left. SC, spinal cord.

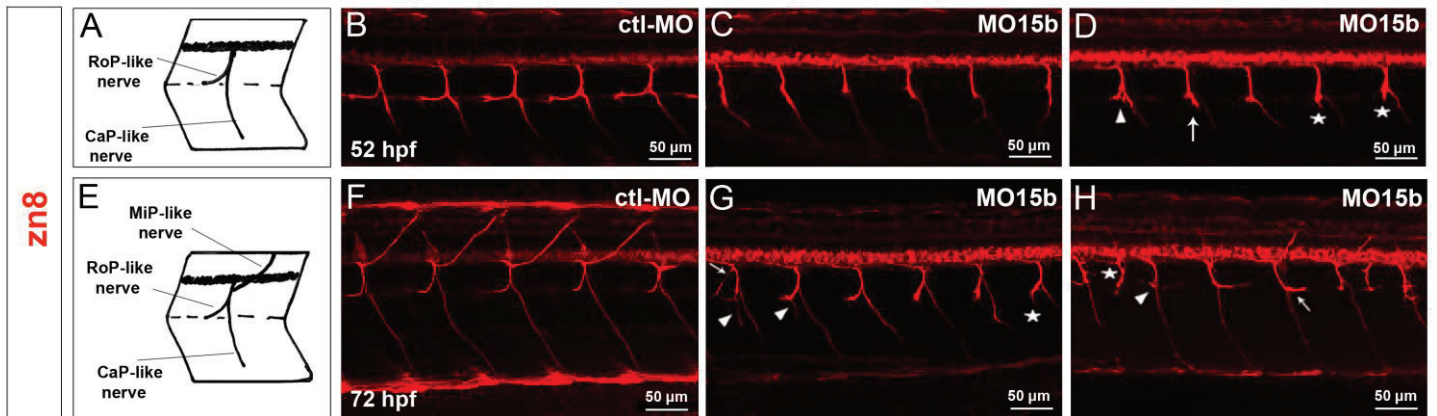


Figure 7.

COLXV-B is required for proper pathfinding of secondary motor axons

A-H Immunostaining of secondary motor axons of *ctl-MO* (B, F) and *MO15b*-injected (C, D, G, H) embryos at 52 hpf (B-D) and 72 hpf (F-H) with *zn8* antibody. At 52 hpf, RoP and CaP like nerve start to project rostrally and ventrally respectively (A, B). In *MO15b*-injected embryos, RoP-like nerves generally fail to form (C, D). In some cases, RoP-like nerves extend abnormally ventrally (D, asterisk) or axons fail to separate properly at the choice point and form a mesh-like structure (D, arrowhead). Occasionally CaP-like nerves are absent (D, arrow). At 72 hpf, the dorsal projection of MiP-like nerve is now clearly visible in control embryos (E, F). In *MO15b*-injected embryos, MiP-like nerves are mostly absent (G, H). RoP-like nerves are absent (H, arrowhead) or show defective projections : abnormal ventral (G, asterisk) or caudal (H, arrow) projections and additional ventral branching (G, arrow). Ectopic nerve exit from the spinal cord is also observed (H, asterisk). B-D, F-H, lateral views, anterior to the left.

Table 1

Table 1
Motor nerves defects in *col15a1b* morphants

	52 hpf		72 hpf						
	RoP-like nerve		RoP-like nerve		MiP-like nerve	CaP-like nerve	Common nerve		
	Total embryos	Absence	Total embryos	Absence	Ventral projection	Branching	Absence	Absence	Branching
uninj.	49	19.59 ± 4.04	44	15.45 ± 2.92	0.45 ± 0.32	0.23 ± 0.23	0.68 ± 0.38	0	0.23 ± 0.23
<i>ctl-MO</i>	50	12.85 ± 2.31 NS	47	6.80 ± 1.58 NS	0.43 ± 0.29 NS	0.43 ± 0.30 NS	1.48 ± 0.6 NS	0.21 ± 0.21 NS	3.40 ± 1.15 **
<i>tMO15b</i>	51	85.88 ± 3.79 ***	52	27.5 ± 3.73 *	9.03 ± 2.0 ***	11.35 ± 2.18 ***	59.04 ± 6.08 ***	5.19 ± 2.1 *	6.35 ± 1.40 ***
<i>sMO15b</i>	47	68.94 ± 5.07 ***	44	29.32 ± 4.12 **	2.05 ± 0.62 *	2.95 ± 0.90 **	39.09 ± 5.90 ***	3.18 ± 1.48 *	5.23 ± 1.36 ***

Quantitative analysis of motor nerves defects per embryo in the different conditions. Results are expressed as mean frequencies of affected hemisegments per embryo ± SEM; ten hemisegments per embryo are examined (NS non significant; *p<0.05 ; **p <0.01 ; ***p< 0.001; Student's t test).

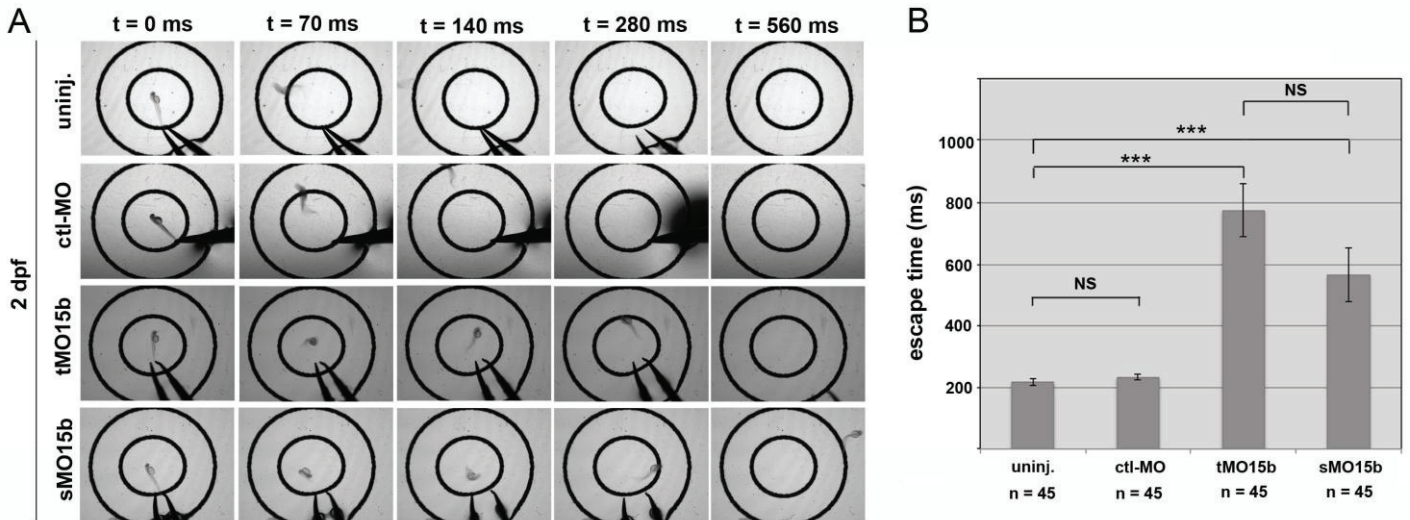


Figure 8.

***coll5a1b* knockdown impairs embryo motility**

A Single frame from videos showing a behavior response upon tactile stimulus of 48 hpf dechorionated embryo uninjected or injected with MO15b (time in millisecond). **B** Quantification of the escape response of the 48 hpf stimulated embryos expressed as the time in movement it takes for the embryo to reach out of the larger circle. Embryos were either uninjected (uninj.), injected with standard morpholino (ctl-MO) and morpholinos targeted to *coll5a1b* mRNA (tMO15b and sMO15b). Results are expressed as the mean of escape time \pm SEM. (NS non significant ; *** $p < 0.001$; Student's t test).

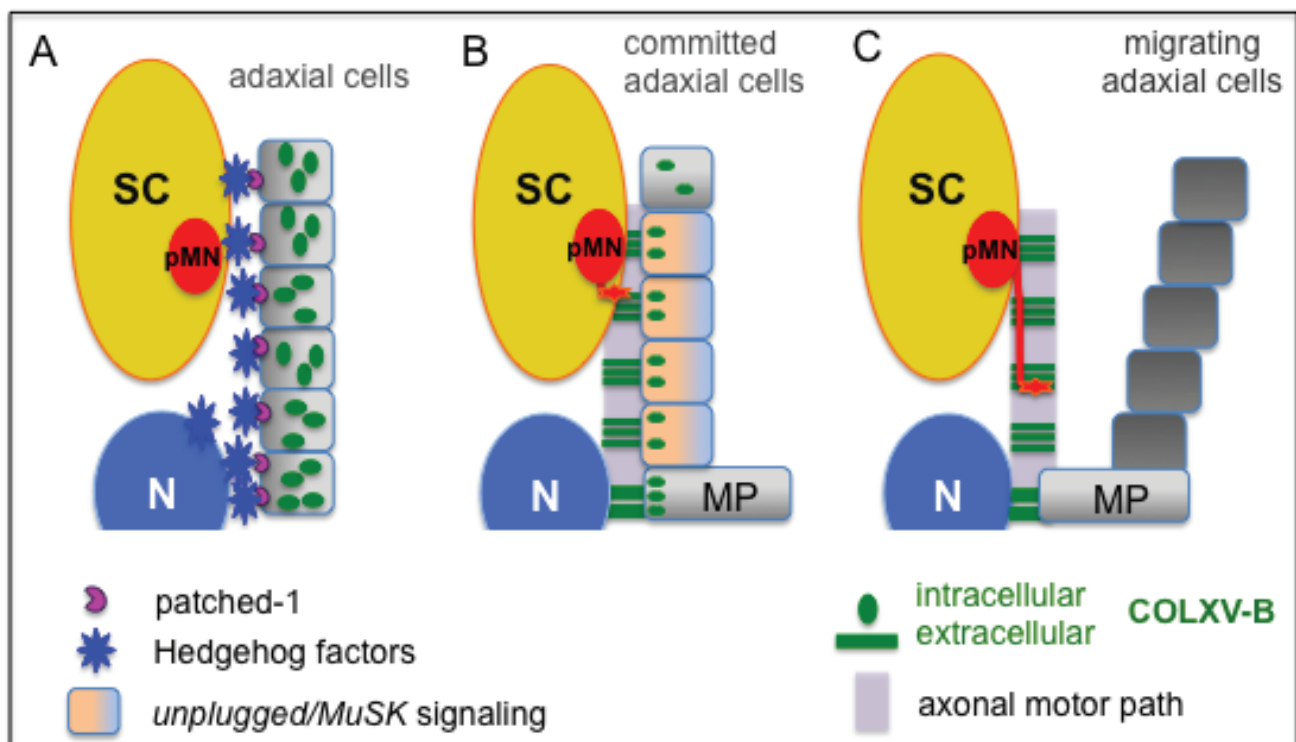


Figure 9.

Model of the control of COLXV-B deposition in the axon common path during somitogenesis and its role in motor axon navigation.

Expression of *coll5a1b* in adaxial cells depends on Hedgehog signaling (A) and the deposition and organization of its protein product COLXV-B in the common motor path extracellular matrix is controlled by MuSK/unplugged signaling (B). COLXV-B is present in the common path before axon exit from the spinal chord (B) and provides a precise instructional cue that orient axons toward intermediate targets (C).

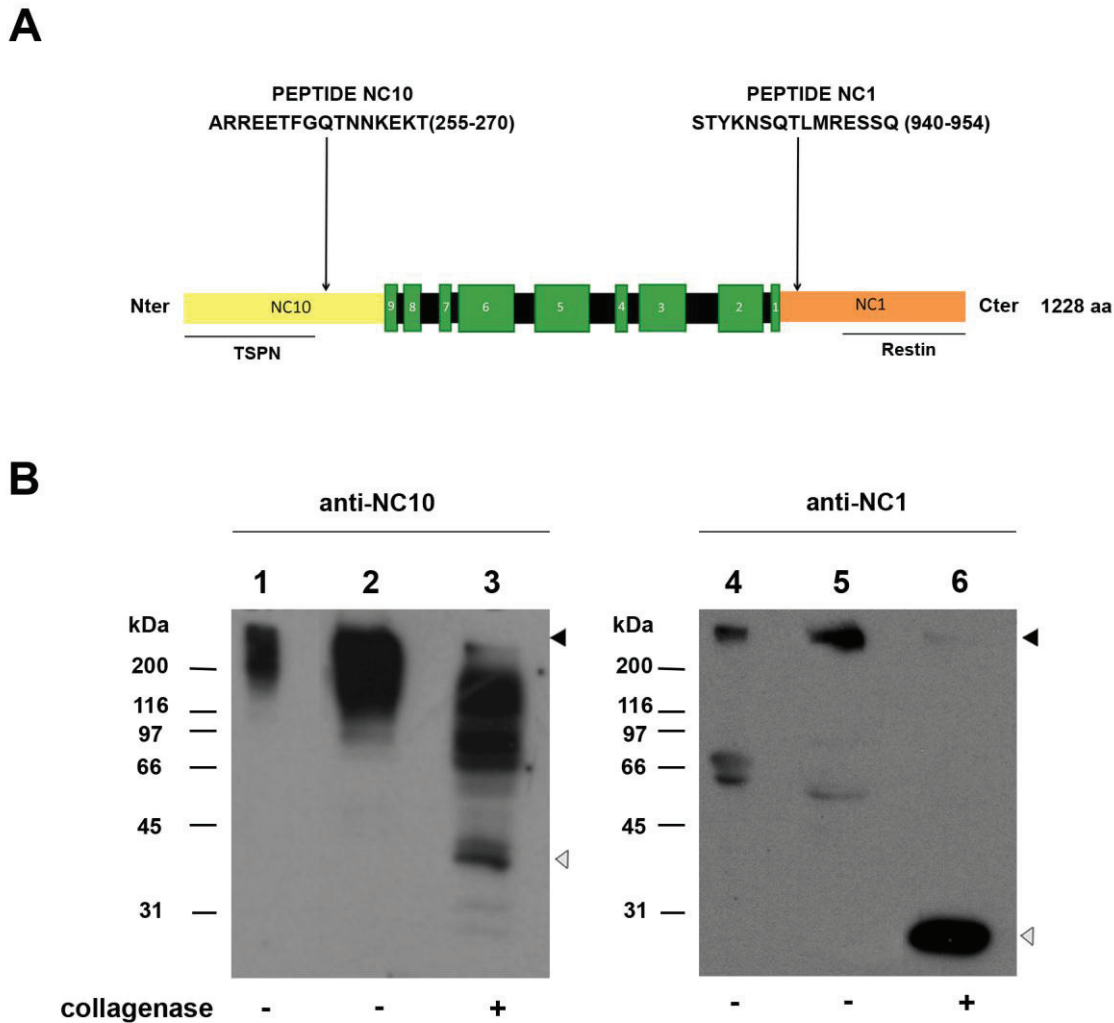


Figure S1.

Production and characterization of polyclonal antibodies against zebrafish COLXV-B.

A Schematic representation of the domain structure of the zebrafish COLXV-B a1 chain and location of the NC10 (residues 255-270) and NC1 (residues 940-954) epitopes. Synthetic peptides encompassing these sequences have been used to immunize the rabbits. Collagenous domains (green) are numbered from the C-terminus, non-collagenous linker domains are in black. NC10 domain contains a TSPN (thrombospondin N-terminal like domain) domain and the NC1 the restin domain. **B** Western blotting with antibodies against NC10 (left) and NC1 (right) of conditioned media of HEK293 cell transfected with zebrafish *coll5a1b* full-length cDNA incubated with (+) or without (-) collagenase. Lanes 1, 4: no treatment; lanes 2, 3, 5, 6: incubated at 37°C without collagenase (lanes 2,5) and with (lanes 3,6) collagenase. Membrane probed with anti-NC10 is de-hybridized and re-probed with anti-NC1. The COLXV-B a1 chain is detected by both antibodies as an immunoreactive band migrating above 200 kDa (black arrowhead) in undigested samples incubated (lanes 2, 5) or not (lanes 1, 4) at 37°C. After collagenase digestion, the band corresponding to COLXV-B a1 chain has disappeared (black arrowhead) and a unique collagenase digestion product is observed at the expected size for NC10 and NC1 domains when probed with the corresponding antibodies (grey arrowheads).

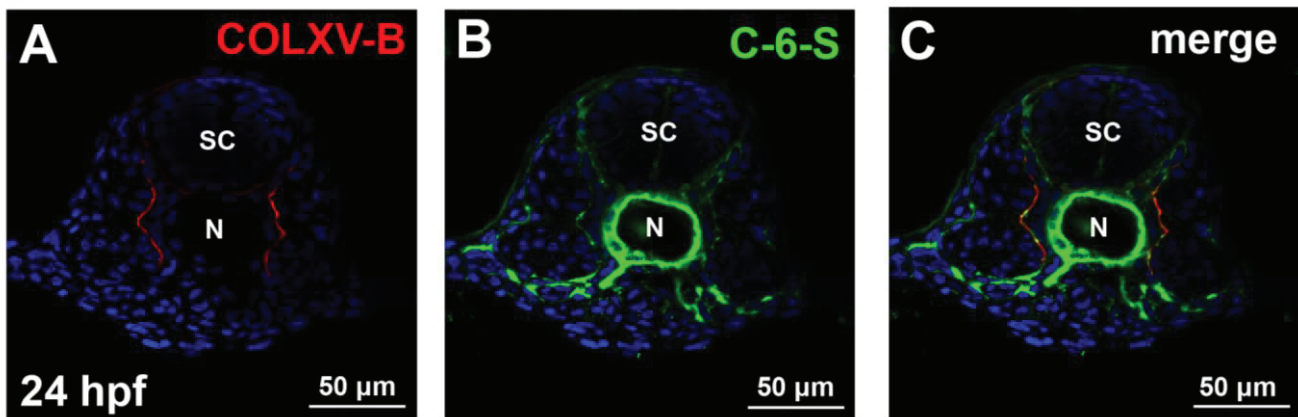


Figure S2.

COLXV-B immunoreactivity coincides with chondroitin sulfate signal in the motor path.

A-C Single confocal plane of immunofluorescence staining of 24 hpf embryo cross section with antibodies to COLXV-B (A, red) and C-6-S (B, green) and with overlap in the merge image (C). SC, spinal cord, Hoechst solution was used to reveal nuclei.

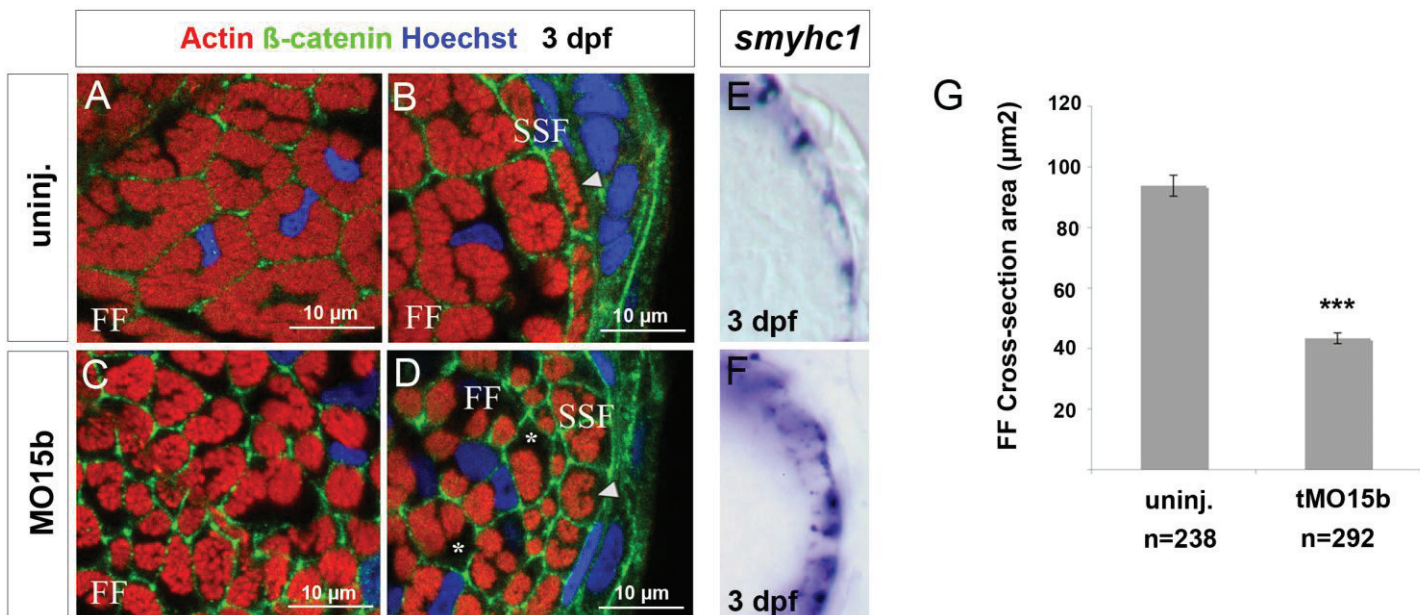


Figure S3.

Knockdown of *coll5a1b* results in skeletal muscle atrophy

(A-D) Triple fluorescence staining with conjugated-phalloidin to visualize actin (red), β -catenin antibody to label cell membrane (green), and Hoechst solution to stain nuclei (blue) of 3 dpf uninjected (A, B) and tMO15b-injected embryos (C, D). Trunk cross sections show the center (A, C) and the periphery (B, D) of the myotome. tMO15b-injected embryos show drastic reduction of myofibril content (C, D, asterisks compared to control in A, B), a significant decrease in fast fibers (FF) size and an abnormal shape of slow superficial fibers (SSF) (D compared to control in B). (E, F) Cross sections of wholemount in situ hybridization of 3 dpf uninjected (E) and MO15b-injected (F) embryo probed with the slow fiber marker *smyhc* indicating. G, Quantification of cross section areas of individual fast fibers from 1/4 of the total myotome surface in uninjected and tMO15b-injected embryos (n= number of cells from 5 separate embryos; ***p< 0.001 Mann-Whitney's test). Cross sections at the level of the yolk extension; dorsal to the top.

Discussion Générale et Perspectives

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les multiplexines, sous-groupe de la super famille des collagènes, ne comprennent à ce jour que 2 membres : les collagènes XV et XVIII. De structure et de distribution très proches, leur fonction a longtemps été associée et restreinte à leur domaine C-terminal, dont les propriétés anti-angiogéniques remarquables (la restine pour le collagène XV mais surtout l'endostatine pour le collagène XVIII) ont fait la une des journaux à la fin du siècle dernier. Cet engouement pour l'endostatine/restine a quelque peu été contrarié par les études fonctionnelles *in vivo* de ces collagènes qui ont révélé d'autres facettes de leur rôle au cours du développement et réservé l'activité anti-angiogénique à des phénotypes discrets chez la souris. L'étude fonctionnelle du collagène XV que j'ai réalisée chez le poisson zèbre révèle une autre facette de ce collagène, démontrant encore une fois que sa fonction ne s'arrête pas à son domaine C-terminal.

I - Les collagènes XV dans la spécification des cellules musculaires et contrôle de leur expression par des molécules de signalisation

Chez les mammifères, le collagène XV est majoritairement exprimé par les cellules musculaires et est déposé dans la basale qui les entourent aussi bien pendant le développement que plus tard à l'âge adulte. Les souris *Coll5a1*^{-/-} présentent une myopathie légère. Celle-ci est caractérisée par une dégénérescence des fibres musculaires qui est augmentée par l'exercice physique. Ce travail a permis d'établir un rôle structural pour le collagène XV. Le collagène XV, constituant localisé à l'interface de la lame basale de la fibre et de la matrice extracellulaire du tissu musculaire, permettrait aux fibres musculaires de préserver leur intégrité et de résister aux forces générées par les contractions musculaires (Eklund *et al.*, 2001).

Les travaux conduits dans le laboratoire ont identifié deux orthologues de *COL15A1* chez le poisson zèbre, respectivement nommés *coll5a1a* et *coll5a1b*. Ces 2 gènes sont tous deux transitoirement exprimés au moment de la segmentation et contribuent à la régulation de la spécification des différents types de cellules musculaires composant le myotome primaire embryonnaire (Pagnon-Minot *et al.*, 2008 ; Bretau *et al.*, 2011, Guillon *et al.*, résultats partie II).

Coll5a1a est exprimé par la notochorde et la protéine COLXV-A est déposée dans le manchon périchordal. En l'absence de COLXV-A, la structure de la matrice extracellulaire

qui constitue le manchon péri-chordal est désorganisée, on observe alors une augmentation de l'activité de la voie Hedgehog dans le myotome qui conduit à une augmentation du nombre d'un sous-type de fibres rapides particulier au poisson zèbre, les MFFs. Ainsi, il a été proposé un modèle selon lequel cet orthologue participerait indirectement à la formation des MFFs en contrôlant la diffusion des facteurs Hedgehog en provenance de la notochorde en lieu et place du processus de spécification de ces cellules (Pagnon-Minot *et al.*, 2008). Toutefois le mécanisme par lequel COLXV-A régulerait la diffusion de facteurs Hedgehog reste indéterminé. En effet, on ne sait pas (1) si la dérégulation de la voie Hedgehog observée en l'absence de COLXV-A résulte directement des modifications structurales du manchon péri-chordal observées en microscopie électronique à transmission, rendant cette structure plus lâche et donc permissive, ou bien, (2) si COLXV-A régule activement la biodisponibilité de facteurs Hedgehog émanant de la notochorde en interagissant physiquement avec ces facteurs.

Coll5a1b est exprimé par les cellules adaxiales qui sont les précurseurs des muscles lents. En cela, le patron d'expression de *coll5a1b* coïncide plus avec l'expression de *COL15A1/Coll5a1* chez les mammifères qui est essentiellement retrouvée dans les tissus musculaires. Toutefois, la production d'anticorps spécifiques de COLXV-B réalisée au cours de ma thèse a permis de montrer que la protéine COLXV-B est déposée exclusivement à la surface médiale du myotome et n'entoure pas les cellules adaxiales, comme on pourrait s'y attendre pour un composant des lames basales. J'ai montré au cours de ma thèse qu'en l'absence de COLXV-B, une augmentation de la différenciation des cellules adaxiales en MPs indiquant un rôle pour cet orthologue dans la spécification des MPs. Nos résultats ont par ailleurs révélé que l'augmentation des MPs observées chez les animaux déficients en COLXV-B était indépendante d'une dérégulation de la voie Hedgehog contrairement à ce qui avait été observé pour le paralogue *coll5a1a*.

Les voies des FGFs et des BMPs ont récemment été impliquées dans la spécification des cellules MPs dans un très joli travail de l'équipe de Peter Currie (Nguyen-Chi *et al.*, 2012). Un gradient de signalisation antéro-postérieur de la voie des FGFs et dorso-ventral de la voie des BMPs contribuerait à spécifier une région antéro-centrale où le devenir MPs est autorisé au sein du pool de cellules adaxiales déterminées au lignage lent (Nguyen-Chi *et al.*, 2012). De manière intéressante, COLXV-B est spécifiquement déposé dans la partie postérieure du somite au moment de la spécification des MPs c'est-à-dire au stade 10 somites. Il est ainsi possible aujourd'hui d'imaginer un modèle selon lequel COLXV-B participerait à l'établissement du gradient antéro-postérieur de signalisation FGF en promouvant cette voie de signalisation dans la partie postérieure du somite. Ceci pourrait se faire par l'intermédiaire

des chaînes glycosaminoglycanes que porte la protéine cœur du collagène XV. Il est en effet connu que les chaînes d'HS servent de co-récepteurs pour les FGFs et sont indispensables pour une activité optimale du ligand sur son récepteur (Sarrazin *et al.*, 2011). De plus, les HS ont récemment été impliquées dans la régulation de la voie du FGF chez le poisson zèbre (Norton *et al.*, 2005). Enfin, l'inhibition précoce chez le poisson zèbre de l'héparane sulfotransférase, une enzyme clé dans la biosynthèse des HS, se traduit par une augmentation du domaine d'expression des facteurs Engrailed selon un gradient antéro-postérieur (Bink *et al.*, 2003). Toutefois, il est important de signaler que le blocage tardif de la voie des FGFs par traitement au SU5402 sur des embryons de 10 somites n'a aucune incidence sur la formation des MPs dans les 5-6 premiers somites indiquant que l'action de FGF sur la spécification des MPs a déjà eu lieu à ce stade (Nguyen-Chi *et al.*, 2012). Or, nous avons montré qu'à 10 somites COLXV-B commence seulement à être déposé dans la MEC au niveau des 5 premiers somites, donc à priori après la fenêtre de temps où FGF agit sur la spécification des MPs. Ce point pourrait invalider l'hypothèse du rôle de COLXV-B dans la présentation de FGF à son récepteur. Afin de statuer définitivement sur ce point, il faudra dans un premier temps rechercher l'incidence de l'absence d'expression de COLXV-B chez les morphants à 10 somites, sur le domaine d'expression antéro-postérieur d'*eng2a* par hybridation *in situ*. Si une telle modification a lieu, nous analyserons chez des morphants *coll5alb* à un même stade développemental le patron d'expression antéro-postérieur de *pea3*, une cible directe de la voie des FGFs.

Par ailleurs, les immunomarquages que nous avons effectués ont montré que COLXV-B était localisé au niveau de la région centrale du somite en regard de la notochorde et il n'est pas retrouvé dans les parties les plus ventrales et les plus dorsales du somite. Il est donc possible que COLXV-B contribue à la spécification des MPs en participant à l'établissement du gradient dorso-ventral d'activation de la voie des BMPs, en concentrant par exemple un inhibiteur de la voie des BMPs dans la région centrale. Il serait donc également intéressant d'évaluer une modulation d'activation de la voie des BMPs chez les morphants *coll5alb* en réalisant un immunomarquage de la forme phosphorylée de Smad 5 (P-smad 5) dont la présence reflète l'activation de cette voie de signalisation.

Dans l'ensemble, ces travaux ont montré que chez le poisson zèbre, les collagènes de type XV ne sont pas présents autour des fibres musculaires au cours du développement embryonnaire, suggérant un rôle différent de celui évoqué pour le collagène XV des mammifères c'est-à-dire un rôle structural permettant l'ancrage des fibres musculaires au

tissu conjonctif. De part leur position stratégique au sein du manchon périchordal et à la surface médiale du myotome, ils contribuent chez le poisson zèbre à la différenciation des fibres musculaires lors de la formation du myotome primaire. Idéalement situés à l'interface entre la source de signaux diffusibles et les cellules musculaires qui reçoivent ces signaux, ils peuvent en effet contribuer à la régulation de voies de signalisation essentielles dans la spécification des cellules musculaires comme la voie Hedgehog. Toutefois, nous n'avons pas examiné en détail le rôle possible de COLXV-B dans l'ancrage des MPs au tissu matriciel entourant la notochorde, point d'ancrage où le COLXV-B est particulièrement enrichi. Il serait intéressant de stimuler électriquement les embryons (Charvet *et al.*, 2013) pour solliciter les points d'attache et observer un éventuel détachement des MPs après une série de stimulations.

Les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse nous apportent également des informations précieuses quant aux voies de signalisation qui peuvent contrôler l'expression du collagène XV dans le tissu musculaire. Nous avons montré que *coll5a1b* était spécifiquement exprimé par les cellules adaxiales sous la dépendance de la voie de signalisation Hedgehog qui est le véritable chef d'orchestre de la spécification musculaire chez le poisson zèbre (Wolff *et al.*, 2003). Une question qui reste cependant en suspend est de savoir si *coll5a1b* est une cible directe de la voie Hedgehog ou s'il fait simplement partie du « programme myogénique lent » activé dans les cellules adaxiales sous la dépendance de *prdm1*. De manière intéressante, *coll5a1b* est localisé sur le chromosome 2 tout comme le gène *ptc1* qui est connu pour être la première cible transcriptionnelle de la voie de signalisation HH suggérant que ces deux gènes pourraient être sous la dépendance de régulateurs transcriptionnels similaires. Les facteurs de transcription qui régulent l'expression de gènes cibles de la voie HH sont de la famille des protéines Gli. L'analyse bioinformatique de la région promotrice putative de *coll5a1b* indique la présence de 6 séquences de type GACCAC, 10 kb en amont du site d'initiation de la traduction de *coll5a1b*. Ces séquences correspondent au cœur du motif conservé (GACCACCCA) chez les cibles authentiques de la voie HH, permettant la fixation des facteurs Gli et nommé GBS pour « Gli Binding Site » (Figure 29 ; Milla *et al.*, 2012). Ces données suggèrent donc que *coll5a1b* pourrait être une cible directe de la voie de signalisation HH. Nous proposons d'effectuer une analyse de type gène rapporteur, telle qu'il a pu être réalisée récemment (Schwend *et al.*, 2010), consistant en l'injection dans des embryons d'une construction contenant la séquence de la GFP sous le contrôle de la séquence promotrice putative d'intérêt de *coll5a1b*. L'effet de l'expression

transitoire de la GFP dans un contexte normal et d'inhibition de la voie HH (embryons sauvages ou traités à la cyclopamine) permettra de déterminer si les séquences GACCAC sont effectivement des GBS et de prouver que le gène *coll5a1b* est régulé directement de manière transcriptionnelle par la voie HH.

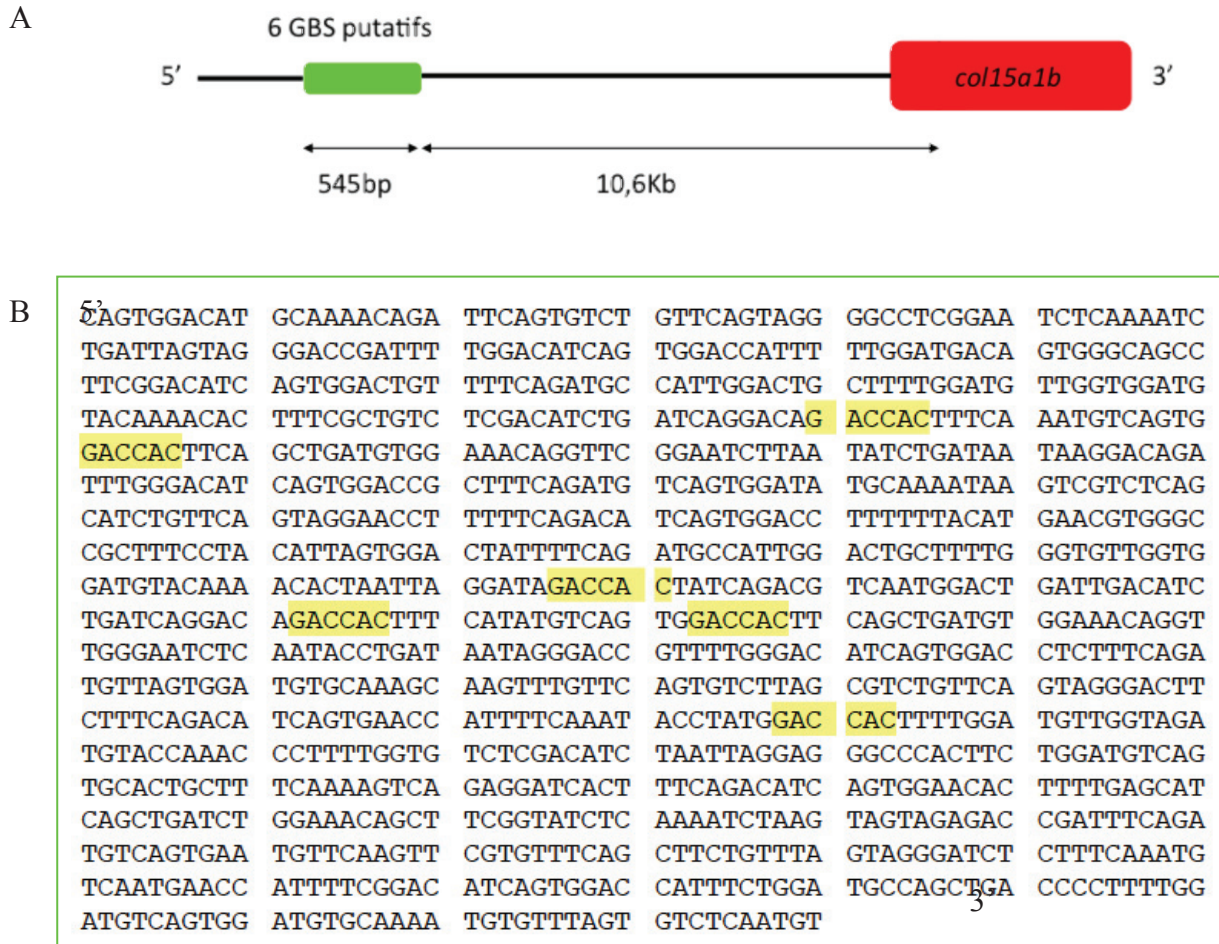


Figure 29. Présence de séquences « GACCAC » correspondant au motif cœur du site de fixation des facteurs Gli (GBS) dans la région promotrice putative en amont de *coll5a1b*.

A-Position relative de la région contenant les sites GBS putatifs (vert) vis-à-vis du gène *coll5a1b* (rouge) sur la région génomique LG2. B- Séquence de la région génomique contenant les sites GBS putatifs indiquant la position exacte des séquences GACCAC (jaune).

Les voies de signalisation qui conduisent à l'activation de l'expression de *coll5a1a* dans la notochorde n'ont pas été étudiées. Il serait également intéressant d'analyser l'expression de *coll5a1a* après modulation de la voie HH afin d'évaluer si l'expression de *coll5a1a* est également dépendante de cette voie de signalisation et ainsi déterminer si le

contrôle de l'expression par la voie HH est une signature commune aux deux gènes du collagène XV chez le poisson zèbre. Dans le cas du COLXV-A, ce serait une démonstration d'une double relation mutuelle originale de cette protéine dans la voie HH au cours de la différenciation musculaire dont l'activation du gène serait sous la dépendance de ces facteurs alors que la biodisponibilité des facteurs HH serait contrôlée par la protéine.

Mais avant d'aller plus loin sur cette question, d'autres questions se posent : qu'en est-il des signaux qui contrôlent l'expression musculaire du collagène XV chez les mammifères ? Est-elle sous la dépendance de la voie de signalisation Hedgehog comme c'est le cas de *coll5a1b*?

Une étude du promoteur a initialement été réalisée chez l'Homme et la souris (Hagg *et al.*, 1998 ; Eklund *et al.*, 2000). Dans le cas du collagène XV humain, après analyse bioinformatique, il est ressorti un domaine contenant plusieurs répétitions de séquence consensus de fixation pour divers facteurs de transcription proche du site d'initiation de la transcription. Cependant, aucun site de fixation des facteurs Gli n'a été retrouvé (Hagg *et al.*, 1998). Nous n'avons pu trouver dans cette région promotrice humaine qu'une séquence cœur du motif GBS, identique à celle trouvée dans la région promotrice putative de *coll5a1b*. Cette séquence à elle seule ne semblerait pas suffisante pour permettre un contrôle par la voie HH puisque dans la majorité des gènes cibles de la voie HH, plusieurs motifs GBS (de 5 à 11) sont retrouvés (Milla *et al.*, 2012). Cela suggérerait que le contrôle de l'expression de *coll5a1b* par la voie Hedgehog serait une adaptation spécifique au poisson zèbre.

Il est intéressant de noter que chez la souris, *Coll5a1* est exprimé au moment de la transition entre la myogenèse embryonnaire et la myogenèse fœtale. Son expression serait donc associée au changement de programme d'expression génique qui a lieu au sein des myoblastes au moment de cette transition. En transposant le modèle observé concernant l'expression de *coll5a1b* chez le poisson zèbre au gène *Coll5a1* chez la souris, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'expression de *Coll5a1* est activée par un facteur de transcription qui dicte la transition entre la myogenèse embryonnaire et la myogenèse fœtale. Cette transition est dépendante des voies de signalisation induites par le TGF β , BMPs et la β -caténine (Murphy et Kardon, 2011) et est sous le contrôle transcriptionnel de Nfix qui est un facteur de transcription spécifiquement exprimé par les myoblastes fœtaux (Messina *et al.*, 2010). Il est donc possible que l'expression de *Coll5a1* soit sous la dépendance du facteur Nfix ce qui rappellerait le mécanisme du contrôle de l'expression de *coll5a1b* chez le poisson.

II- Quelle fonction pour le collagène XV dans les tissus nerveux ?

A- Fonction dans le guidage des axones moteurs

Les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse montrent une localisation et une fonction originale pour COLXV-B dans le développement de l'innervation motrice chez le poisson zèbre.

- *Coll5a1b* étant produit par les progéniteurs musculaires que sont les cellules adaxiales nous nous attendions à ce que COLXV-B soit localisé dans la lame basale autour de ces cellules tout comme c'est le cas pour les myoblastes fœtaux chez la souris. Cependant, le patron de localisation que nous avons effectué a révélé que les cellules adaxiales déposent COLXV-B bien avant le début de leur migration. De plus, j'ai montré qu'il était déposé dans une matrice extracellulaire spécialisée à la surface médiale du myotome qui correspond au futur trajet des axones moteurs en croissance sous une forme originale en barreau d'échelle pavant le chemin axonal matriciel. De façon intéressante, ce collagène perdure dans cette région au moment de la croissance des axones des motoneurones primaires et secondaires alors que l'activité transcriptionnelle du gène a complètement cessé et que ses cellules productrices ne sont plus présentes à cet endroit. Ceci peut paraître étonnant pour des protéines de signalisation extracellulaires mais pas pour un collagène dont on sait que le turnover peut être extrêmement lent. Cette étude a donc permis d'identifier un nouveau composant de l'environnement moléculaire des axones moteurs en croissance et qui se retrouve particulièrement enrichi le long du chemin de navigation commun et au niveau du point de choix. Les cellules adaxiales sont connues comme source d'un grand nombre de composants matriciels constitutifs du chemin de navigation, dont notamment les CSPGs et la ténascine-C (Zhang *et al.*, 2004 ; Schweitzer *et al.*, 2005). C'est sous l'activation de la voie de signalisation unplugged/MuSK, que ces protéines matricielles s'organiseraient en une matrice extracellulaire fonctionnelle responsable du guidage axonal par contact avec les axones. L'immunomarquage de COLXV-B que nous avons réalisé chez les mutants *unplugged* a montré l'absence de COLXV-B dans la matrice extracellulaire du chemin axonal. Ainsi, nous avons identifié une nouvelle molécule matricielle dépendante de l'activité du gène *unplugged/MuSK*. Les modalités du contrôle de la sécrétion de COLXV-B par la voie unplugged/MuSK restent toutefois une question ouverte.

L'internalisation d'unplugged/MuSK permet sa présence dans des endosomes de recyclage (positifs au marqueur Rab11), ce qui est nécessaire à la formation des clusters aneuxaux d'AChR au niveau de la région centrale des cellules adaxiales, (Gordon *et al.*, 2012). Nous avons par ailleurs montré que COLXV-B entoure les clusters aneuxaux d'AChR sans pour autant être impliqué dans leur formation. Il est donc probable que dans un même micro-environnement, l'endocytose d'unplugged provoque la clusterisation des AChR et le dépôt de COLXV-B en cet endroit précis.

- L'analyse fonctionnelle que nous avons conduite dans un second temps a principalement montré que la présence de COLXV-B dans le chemin axonal commun était nécessaire au au guidage correct des axones des motoneurones primaires et secondaires.

En l'absence de COLXV-B dans le chemin de guidage, l'axone du CaP s'arrête précocement le plus souvent au niveau du point de choix indiquant un rôle majeur pour COLXV-B dans la croissance précoce et/ou dans le guidage des axones des motoneurones primaires au niveau du point de choix. Toutefois, l'analyse des motoneurones primaires utilisant le marqueur *znp1* ne permet pas de déterminer l'impact réel de l'absence de COLXV-B sur la croissance axonale pour chaque type de motoneurone primaire. En particulier, il est difficile d'analyser les trajectoires individuelles du RoP et du MiP avec ce marqueur. Un suivi par vidéomicroscopie de la croissance axonale de chaque type de motoneurone primaire en l'absence de COLXV-B serait donc nécessaire pour déterminer (1) la contribution relative de COLXV-B au guidage des axones du RoP, du MiP et du CaP et (2) pour discriminer entre un rôle de COLXV-B dans la croissance précoce et/ou dans la prise de décision des motoneurones primaires au point de choix. Il serait ainsi nécessaire de suivre entre 17 hpf et 24 hpf la croissance des axones en effectuant au préalable un marquage individuel des motoneurones primaires par injection de colorants vitaux fluorescents selon la méthode décrite par Eisen et Melançon (2001). Pour cela, la possibilité d'obtenir une lignée mutante *coll5alb* serait un atout par rapport à l'injection de morpholinos qui risque d'être doublement traumatisante dans ce contexte et entraînerait une plus grande variabilité dans les résultats. Deux lignées (mutation dans un site d'épissage et mutation non sens) ont ainsi été identifiées par la technique du TILLING par l'institut SANGER dans le cadre du « zebrafish mutation Project ». Ces lignées devraient être disponibles au laboratoire d'ici quelques mois.

Les résultats que nous avons obtenus démontrent toutefois un rôle particulièrement déterminant pour COLXV-B dans la prise de décision des axones des motoneurones secondaires rostraux et dorsaux au niveau du point de choix. Nos résultats indiquent que les

modalités de guidage sont différentes selon les types de motoneurones secondaires, la croissance du nerf ventral étant relativement peu affectée en l'absence de COLXV-B. Peu de données existent concernant la nature moléculaire des signaux qui contribuent au guidage des motoneurones secondaires. Il a principalement été montré que les motoneurones secondaires dépendent de signaux produits par le myotome sous le contrôle de *diwanka* et d'*unplugged* (Zhang *et al.*, 2001 ; Zeller *et al.*, 2002). Au cours de ma thèse, j'ai ainsi identifié un nouveau signal d'origine myotomale qui influence le guidage des motoneurones secondaires.

Est-il possible que les défauts des motoneurones primaires chez les morphants *coll5a1b* soient en partie à l'origine des défauts de guidage des nerfs dorsaux et rostraux observés en l'absence de COLXV-B ? Il a été montré que le pathfinding correct du nerf dorsal dépendait de la présence du MiP (Pike *et al.*, 1992). Toutefois en l'absence du MiP, bien que des erreurs de trajectoires soient observées, le nerf dorsal croît sur une longueur similaire à celle observée chez des embryons contrôles dès 60 hpf (Pike *et al.*, 1992). Nous observons un effet beaucoup plus drastique en l'absence de COLXV-B : une absence complète du nerf dorsal sur 60% des hémisegments analysés chez les morphants *coll5a1b* à 72 hpf. Ceci indique que les défauts du nerf dorsal que nous avons observés sont indépendants d'une altération potentielle de l'axone du MiP. La croissance du nerf médian en l'absence du RoP n'ayant pas été étudiée, nous n'avons aucun point de comparaison qui nous permettrait d'exclure l'hypothèse que les défauts du nerf médian soient en partie dépendants d'un défaut de croissance et/ou de guidage de l'axone du RoP.

Enfin, il est intéressant de noter que nous n'avons globalement pas observé de phénotype de branchements ectopiques latéraux des motoneurones primaires en l'absence de COLXV-B, ce qui semble a priori exclure une fonction de barrière répulsive pour cette molécule comme ce peut être le cas de la ténascine-C (Schweitzer *et al.*, 2005). Sur 6% des hémisegments analysés chez les morphants *coll5a1b*, nous avons cependant observé un phénomène de dé-fasciculation précoce des axones des motoneurones secondaires avec formation d'une branche ectopique le long du chemin commun indiquant encore une fois que la « réceptivité » des axones des motoneurones primaires et secondaires à COLXV-B semble être différente.

- Une question qui reste en suspend est la question du mécanisme moléculaire par lequel COLXV-B contribue au guidage de ces axones.

COLXV-B est en étroit contact avec les axones des motoneurones primaires en croissance suggérant qu'il s'agit d'une molécule authentique de signalisation qui guide les

axones via un contact direct avec des récepteurs présents à leur surface. Le collagène de type XV humain est majoritairement un CSPG qui peut également porter des groupements HS (Myers *et al.*, 2007). Les CSPGs ont été largement impliqués dans la croissance axonale bien qu'un rôle controversé (majoritairement inhibiteur mais aussi activateur) soit présenté (Bandtlow et Zimmermann, 2000). Un des modes d'action est qu'ils pourraient se lier à des récepteurs à la membrane des axones en croissance (Carulli *et al.*, 2005). Chez le poisson zèbre, les groupements de type CS sont localisés dans la trajectoire des axones moteurs (Bernhardt *et al.*, 1998). La fonction globale de ces groupements dans le guidage des motoneurons primaires chez le poisson zèbre reste peu claire à l'heure actuelle. L'inhibition d'une enzyme clé (Chsy-1) impliquée dans la biosynthèse des CS n'a aucun effet sur le guidage axonal (Zhang *et al.*, 2004) tandis que la dégradation des CS par digestion enzymatique conduit à l'apparition de branchements axonaux ectopiques (Bernhardt et Schachner, 2000). Toutefois il est important d'indiquer que chez les mammifères, plusieurs glycosyltransférases ont des propriétés redondantes (Mikami et Kitagawa, 2013) ce qui pourrait expliquer le peu d'effets observés après inhibition de l'enzyme Chsy-1 chez le poisson zèbre. Nous avons montré que COLXV-B co-localise dans le chemin commun de navigation avec les chaînes CS de type C-6-S. Des sites consensus d'ancrage ont été identifiés sur la séquence des COLXV-A et B (Pagnon-Minot *et al.*, 2008; Bretaud *et al.*, 2011, et résultats non publiés). COLXV-B pourrait donc porter à sa surface des chaînes CS grâce auxquelles la protéine-cœur pourrait directement agir sur le guidage axonal.

Un autre argument en faveur de cette hypothèse est l'étude des mutants *diwanka*. En effet, l'étude de ces mutants a montré que la glycosylation des molécules de la MEC était nécessaire au guidage des axones des motoneurons primaires et secondaires (Zeller et Granato, 1999 ; Zhang *et al.*, 2001 ; Schneider et Granato, 2006). Sur la base d'une phénocopie partielle entre le mutant *diwanka* et les morphants *coll8a1*, les auteurs proposent que le collagène XVIII, également produit par les cellules adaxiales (Haftek *et al.*, 2003), serait un substrat de *diwanka* (Schneider et Granato, 2006). *Coll5a1b* est exprimé au même moment que *coll8a1* dans les cellules adaxiales. De plus, les morphants *coll5a1b* présentent des défauts de troncation de l'axone du CaP similaires à ceux observés chez les morphants *coll8a1*. Étant donné que les 2 collagènes ont des structures très homologues, ils pourraient assurer des fonctions redondantes dans le chemin axonal et COLXV-B pourrait également être un substrat de *diwanka*.

Afin de tester ces hypothèses, il sera nécessaire de prouver biochimiquement que COLXV-B est aussi un CSPG et/ou un HSPG. Un traitement à la chondroitinase et/ou à

l'héparinase (Li *et al.*, 2000) des extraits protéiques d'embryons de 18 hpf permettraient de montrer la présence de ces chaînes sur le COLXV-B. Cette première étape nous permettra de déterminer s'il est intéressant (1) d'évaluer par western blot l'état de glycosylation de COLXV-B chez les mutants *diwanka* afin de voir si la glycosylation de COLXV-B dépend de l'enzyme LH3 et (2) de réaliser des expériences d'interactions génétiques par co-injection de morpholinos dirigés contre *coll5a1b* et *coll8a1* à des doses subphénotypiques chez l'embryon comme décrit précédemment (Charvet *et al.*, 2013). Les résultats devraient nous permettre d'évaluer les éventuels effets synergétiques dus à l'absence de ces deux multiplexines sur la croissance axonale chez le poisson zèbre.

Il serait également intéressant de déterminer le mécanisme d'action par lequel les axones des motoneurones peuvent être réceptifs à la présence du COLXV-B dans le chemin axonal. Une première cible du collagène XV-B serait bien évidemment les intégrines puisque de nombreuses isoformes ont été montrées comme pouvant se lier à différents types de collagènes (Ricard-Blum et Ruggiero, 2005). De plus il a été montré que l'utilisation d'antagonistes des intégrines injectés chez des embryons de poisson zèbre juste avant l'axonogenèse induisait des défauts du guidage (pathfinding) des axones moteurs (Becker *et al.*, 2003). Comme il a été mentionné dans la partie bibliographique sur COLXV, un récepteur direct de celui-ci, DDR1 a été décrit dans le cadre de la tumorigénèse. Sachant que ce récepteur a déjà été montré comme étant impliqué dans la croissance axonale au cours du développement du cervelet chez les mammifères (Bhatt *et al.*, 2000), il serait donc intéressant de déterminer le patron d'expression de DDR1 chez le poisson zèbre, afin, dans un premier temps de vérifier si une présence potentielle dans les motoneurones.

Une autre alternative concernant le mode d'action de COLXV-B dans le guidage axonal serait que la présence de COLXV-B dans le chemin axonal modifie l'environnement moléculaire des axones en croissance sans que COLXV-B constitue lui-même une véritable molécule de signalisation pour les motoneurones. De par ses propriétés de type protéoglycane, COLXV-B pourrait réguler la permissivité du chemin de guidage aux différentes molécules de guidage ou moduler la biodisponibilité de ces dernières par des interactions physiques, deux modes d'action qui ont déjà été attribués aux groupements CS/HS (Sarrazin *et al.*, 2011; Mikami et Kitagawa, 2013). Ceci pourrait notamment expliquer comment une seule et même molécule comme COLXV-B peut avoir des fonctions multiples sur le guidage axonal des motoneurones primaires et secondaires. Il serait donc intéressant d'analyser (1) des modifications d'expression d'autres molécules présentes dans le chemin axonal telles que la ténascine C ou les CSPGs en l'absence de COLXV-B en microscopie confocale et d'analyser

(2) les conséquences de l'absence du COLXV-B sur l'organisation ultrastructurale du réseau matriciel dans le chemin de guidage en microscopie électronique à transmission.

Afin d'évaluer la contribution éventuelle des CS/HS dans cette fonction, nous proposons d'effectuer des expériences *ex vivo* sur des cultures primaires de motoneurons de poisson zèbre. Ces analyses *ex vivo* consisteront dans un premier temps à produire, de manière recombinante, différentes formes de la protéine COLXV-B portant ou non des chaînes CS et/ou HS à sa surface. Ceci sera réalisé par transfection transitoire de cellules CHO sauvages connues pour leur capacité à avoir toutes les enzymes nécessaires à la synthèse des GAGs (Zhang *et al.*, 2006) ou de lignées de CHO mutées de manière à invalider totalement (CHO745) ou partiellement (CHO677 mutées pour la synthèse des HS) la synthèse des GAGs. Puis les surnageants de culture enrichis en COLXV-B avec ou sans glycosaminoglycanes ou sans le domaine TSPN seront utilisés pour traiter de manière globale ou locale des motoneurons primaires extraits d'embryons de la lignée HB9-GFP et isolés par FACS selon le protocole précédemment décrit (Sakowski *et al.*, 2012). La longueur et/ou la direction préférentielle des neurites seront ensuite analysées dans les différentes conditions de culture en s'inspirant des travaux de Chen *et al.* (2013).

B- Fonction dans les autres tissus nerveux

Au cours de ma thèse, un patron de localisation de COLXV-B préliminaire et non exhaustif à l'échelle de l'ensemble de l'embryon et dans certains organes adultes a été réalisé (**Figure 30**). Il se dégage de ces données que COLXV-B présente une large distribution tissulaire, similaire à celle du collagène XV des mammifères, se retrouvant notamment présent au niveau du coeur, des structures cartilagineuses faciales, de l'oeil et des vésicules optiques (**Figure 30, D-F**). De manière intéressante, COLXV-B semble tout particulièrement associé aux structures du système nerveux embryonnaire et adulte. Il entoure déjà toutes les structures cérébrales en formation très tôt au cours du développement, probablement présent au niveau de la lame basale de celles-ci (**Figure 30, A-C**). A 3 jpf, en plus d'être présent au niveau du chiasma du nerf optique, COLXV-B est également présent au niveau de toutes les structures nerveuses du tronc qui seront myélinisées à la fois dans le système nerveux central (moelle épinière latérale) et le système nerveux périphérique (ligne latérale postérieure, nerfs moteurs) en des endroits précis qui suggèrent un rôle pour ce collagène dans le processus de myélinisation (**Figure 30, E-G**).

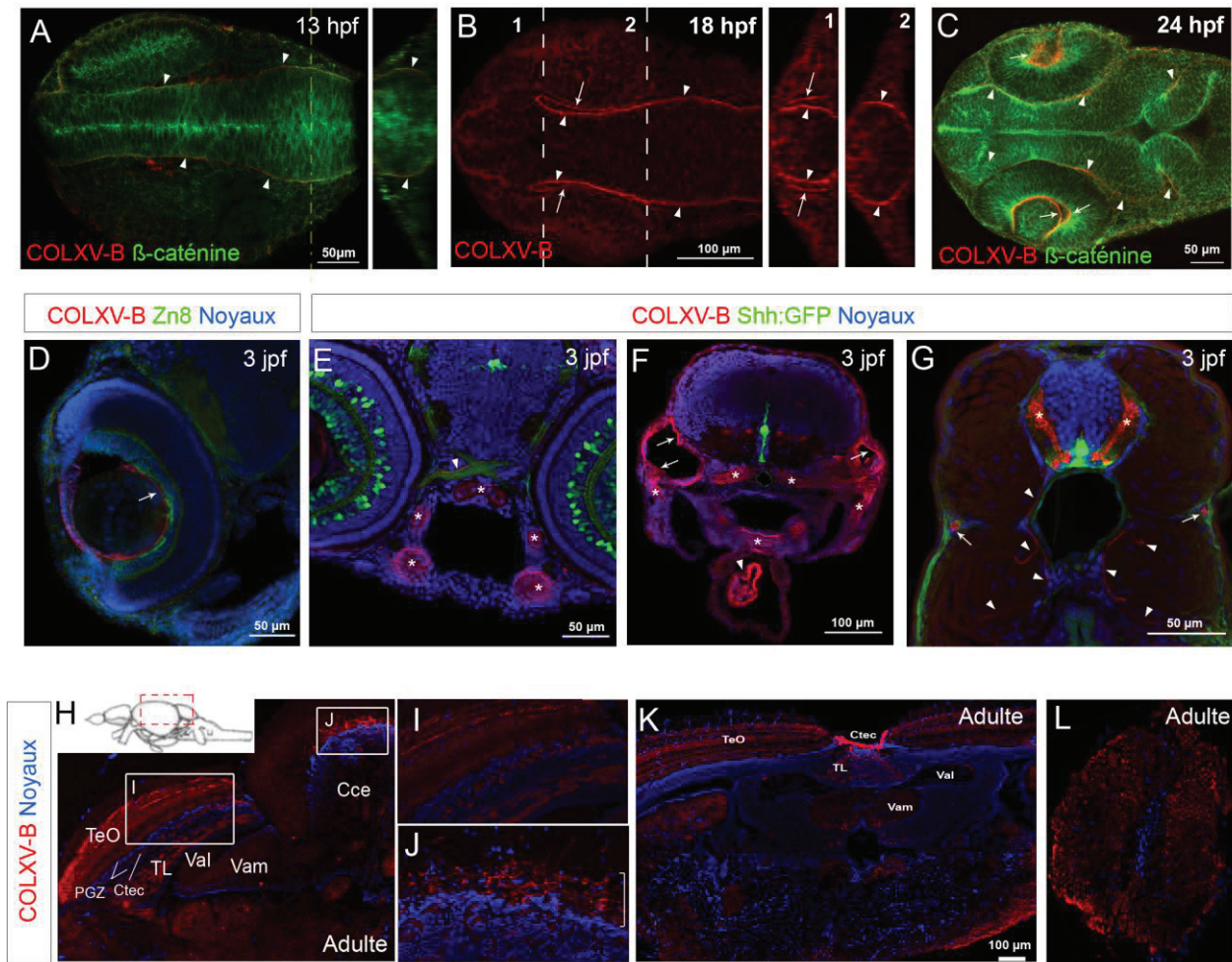


Figure 30. Exemples de distribution tissulaire de COLXV-B au cours du développement embryonnaire et dans le système nerveux central adulte du poisson zèbre.

A-C COLXV-B est présent au niveau des basales délimitant le pourtour externe des structures cérébrales en formation (têtes de flèches) et au niveau des basales délimitant les structures de l'œil en formation (flèches).

Double immunomarquage de COLXV-B et de la β-caténine (A,C) ou simple immunomarquage de COLXV-B (B) sur des embryons de 13 hpf (A) , 18hpf (B) et 24hpf (C). Vue dorsales avec l'antérieur à gauche, associées dans le cas des figures A et B à des vue orthogonales obtenues virtuellement avec le logiciel image J au niveau des pointillés figurants sur la vue dorsale.

D-G A 3jpf, COLXV-B présente une large distribution tissulaire

Double immunomarquage de COLXV-B avec l'anticorps Zn8 (D) ou simple immunomarquage de COLXV-B (E-G) sur des coupes transversales (dorsal en haut) au niveau de la tête (D-F) et du tronc (G) d'embryons sauvages (D) ou d' issu d'une lignée exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de *sonic hedgehog* (*shh*) (E-G). Toutes les coupes sont contre-marquées au Hoechst pour mettre en évidence les noyaux cellulaires. COLXV-B est localisé au niveau de la face externe du cristallin (D, flèches), du chiasma du nerf optique (E, tête de flèche), des structures cartilagineuses de la tête (E,F astérisques), du pourtour des vésicules otiques (F, flèches), du cœur (F, tête de flèche). Au niveau du tronc, COLXV-B est présent au niveau de la partie latérale de la moelle épinière (G, astérisques), au niveau du système nerveux sensoriel de la ligne latérale (G, flèches), et le long des nerfs moteurs (G, têtes de flèches).

H-L COLXV-B est présent au niveau du système nerveux central adulte

Immunomarquage de COLXV-B sur des coupes parasagittales (H-J) et transversales (K) de cerveau et sur une coupe transversale de moelle épinière (L) de poisson zèbre adulte. Toutes les coupes sont contre-marquées au Hoechst pour mettre en évidence les noyaux cellulaires. Teo = tectum opticum ; TL = torus longitudinalis ; Ctec = commissura tecti ; Cce = corpus cerebelli ; Val/ Vam = division latérale /médiale du valcula cerebelli ; PGZ = zone grise périventriculaire du tectum opticum. COLXV-B est présent au niveau du toit optique (I , zoom de l'encadré correspondant en H) avec un fort enrichissement au niveau de la commissure du toit optique (K, Ctec), au niveau de la couche des cellules de purkinje du cervelet (crochet en J, zoom de l'encadré correspondant en H) et au niveau de la substance blanche de la moelle épinière (L).

Cette localisation spécifique de COLXV-B dans les structures myélinisées au cours du développement nous a plus particulièrement interpellée compte tenu que des défauts de myélinisation des nerfs périphériques ont été observés chez les souris *Coll5a1^{-/-}* (Rasi *et al.*, 2010 b). C'est pourquoi, une étude approfondie des modalités d'expression de *coll5a1b* au sein des structures myélinisées sera réalisée au laboratoire et visera notamment à déterminer si *coll5a1b* est exprimé par les cellules nerveuses ou gliales et si cette expression est également sous le contrôle de la voie Hedgehog. La fonction de COLXV-B dans les structures myélinisées centrales et périphériques visant à déterminer si COLXV-B participe à la migration des cellules gliales et/ou à l'établissement du contact entre les cellules gliales et les axones sera également examinée. Enfin, à l'âge adulte, COLXV-B est particulièrement présent au sein du cervelet (au niveau de la couche des cellules de purkinje) et dans une région du mésencéphale au niveau de la commissure du toit optique (**Figure 30, H-K**), deux régions cérébrales au niveau desquelles on observe un processus de neurogenèse (Kizil *et al.*, 2011) montrant encore une fois que la localisation de COLXV-B est particulièrement associée au développement du tissu nerveux chez le poisson zèbre. Ces travaux font l'objet d'un nouveau projet au sein du laboratoire.

Conclusions Générales

CONCLUSIONS GENERALES

Dans l'ensemble, nos données positionnent COLXV-B comme un collagène des tissus nerveux chez le poisson zèbre et suggèrent qu'il pourrait être associé aux multiples processus tels que le guidage axonal, la myélinisation ou la neurogenèse.

Etant donné la similarité globale observée entre les patrons d'expression de COLXV-B et le collagène XV des mammifères, de tels résultats nous amènent donc à reconsidérer l'hypothèse de la présence du collagène XV au sein des structures nerveuses centrales dépourvues de lame basale telle que la moelle épinière et l'encéphale chez les mammifères, ce qui n'a pas été étudié. Dans ce contexte, mes travaux de thèse démontrent une fonction nouvelle pour le collagène de type XV dans le guidage axonal, non décrite auparavant chez les vertébrés. La drosophile (*Drosophila melanogaster*) et le ver (*C. elegans*) possèdent en leur génome un gène codant pour une multiplexine, Dmp/Mp et Cle-1, respectivement (Ackley *et al.* 2001 ; Meyer et Moussian, 2009). Les études de comparaisons de séquences n'ont pas permis de discriminer une homologie plus forte pour l'un des 2 gènes présents chez les vertébrés, et ces gènes codent donc pour une protéine unique COLXV/XVIII. De façon intéressante, l'étude de la fonction des collagènes multiplexines multimodèles a permis de dégager une fonction similaire dans le guidage des axones moteurs chez les invertébrés. Ces travaux suggèrent une fonction conservée pour les multiplexines sans pour autant pouvoir clairement attribuer cette fonction au collagène XV et/ou au collagène XVIII. Les travaux de Schneider et Granato (2006) sur le rôle du collagène XVIII chez le poisson zèbre et les travaux que nous avons conduits sur le collagène XV dans ce même modèle ont clairement démontré que les deux multiplexines sont des acteurs importants du guidage des axones moteurs chez les vertébrés.

Un rôle du collagène XV dans le guidage des axones moteurs chez les mammifères est-il alors envisageable ? Chez la souris, le collagène de type XV est présent le long des fibres nerveuses au sein des nerfs périphériques. Les auteurs ont principalement décrit des problèmes de myélinisation des nerfs périphériques des souris *Coll15a1*^{-/-} mais la croissance des axones sensori-moteurs n'a pas été étudiée plus en détail (Rasi *et al.*, 2010a). Par ailleurs, la présence du collagène de type XV au sein du système neuromusculaire chez l'homme n'a pas été évaluée et serait donc à reconsidérer à la vue des données que nous avons obtenues. Le cas échéant, *COL15A1* deviendrait alors un gène candidat sérieux à considérer dans le cas des pathologies neuromusculaires non résolues.

Références Bibliographiques

- Ackley, B. D., Crew, J. R., Elamaa, H., Pihlajaniemi, T., Kuo, C. J. and Kramer, J. M.** (2001). The NC1/endostatin domain of *Caenorhabditis elegans* type XVIII collagen affects cell migration and axon guidance. *J. Cell Biol.* **152**, 1219–1232.
- Amacher, S. L., Draper, B. W., Summers, B. R. and Kimmel, C. B.** (2002). The zebrafish T-box genes *no tail* and *spadetail* are required for development of trunk and tail mesoderm and medial floor plate. *Development* **129**, 3311–3323.
- Amenta, P. S., Briggs, K., Xu, K., Gamboa, E., Jukkola, A. F., Li, D. and Myers, J. C.** (2000). Type XV collagen in human colonic adenocarcinomas has a different distribution than other basement membrane zone proteins. *Hum. Pathol.* **31**, 359–366.
- Amenta, P. S., Hadad, S., Lee, M. T., Barnard, N., Li, D. and Myers, J. C.** (2003). Loss of types XV and XIX collagen precedes basement membrane invasion in ductal carcinoma of the female breast. *J. Pathol.* **199**, 298–308.
- Amenta, P. S., Scivoletti, N. A., Newman, M. D., Sciancalepore, J. P., Li, D. and Myers, J. C.** (2005). Proteoglycan-collagen XV in human tissues is seen linking banded collagen fibers subjacent to the basement membrane. *J. Histochem. Cytochem.* **53**, 165–176.
- Appel, B., Korzh, V., Glasgow, E., Thor, S., Edlund, T., Dawid, I. B. and Eisen, J. S.** (1995). Motoneuron fate specification revealed by patterned LIM homeobox gene expression in embryonic zebrafish. *Development* **121**, 4117–4125.
- Asakawa, K., Abe, G. and Kawakami, K.** (2013). Cellular dissection of the spinal cord motor column by BAC transgenesis and gene trapping in zebrafish. *Front Neural Circuits* **7**, 100.
- Bandtlow, C. E. and Zimmermann, D. R.** (2000). Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol. Rev.* **80**, 1267–1290.
- Bassett, D. and Currie, P. D.** (2004). Identification of a zebrafish model of muscular dystrophy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31**, 537–540.
- Baxendale, S., Davison, C., Muxworthy, C., Wolff, C., Ingham, P. W. and Roy, S.** (2004). The B-cell maturation factor Blimp-1 specifies vertebrate slow-twitch muscle fiber identity in response to Hedgehog signaling. *Nat. Genet.* **36**, 88–93.
- Beattie, C. E.** (2000). Control of motor axon guidance in the zebrafish embryo. *Brain Res. Bull.* **53**, 489–500.
- Becker, T., McLane, M. A. and Becker, C. G.** (2003). Integrin antagonists affect growth and pathfinding of ventral motor nerves in the trunk of embryonic zebrafish. *Mol. Cell. Neurosci.* **23**, 54–68.
- Bedell, V. M., Westcot, S. E. and Ekker, S. C.** (2011). Lessons from morpholino-based screening in zebrafish. *Brief Funct Genomics* **10**, 181–188.
- Bernhardt, R. R. and Schachner, M.** (2000). Chondroitin sulfates affect the formation of the segmental motor nerves in zebrafish embryos. *Dev. Biol.* **221**, 206–219.

- Bernhardt, R. R., Goerlinger, S., Roos, M. and Schachner, M.** (1998). Anterior-posterior subdivision of the somite in embryonic zebrafish: implications for motor axon guidance. *Dev. Dyn.* **213**, 334–347.
- Bill, B. R., Petzold, A. M., Clark, K. J., Schimmenti, L. A. and Ekker, S. C.** (2009). A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* **6**, 69–77.
- Bink, R. J., Habuchi, H., Lele, Z., Dolk, E., Joore, J., Rauch, G.-J., Geisler, R., Wilson, S. W., den Hertog, J., Kimata, K., et al.** (2003). Heparan sulfate 6-o-sulfotransferase is essential for muscle development in zebrafish. *J. Biol. Chem.* **278**, 31118–31127.
- Bhatt, R. S., Tomoda, T., Fang, Y. and Hatten, M. E.** (2000). Discoidin domain receptor 1 functions in axon extension of cerebellar granule neurons. *Genes Dev.* **14**, 2216–2228.
- Bretnaud, S., Pagnon-Minot, A., Guillon, E., Ruggiero, F. and Le Guellec, D.** (2011). Characterization of spatial and temporal expression pattern of Col15a1b during zebrafish development. *Gene Expr. Patterns* **11**, 129–134.
- Brusés, J. L.** (2011). N-cadherin regulates primary motor axon growth and branching during zebrafish embryonic development. *J. Comp. Neurol.* **519**, 1797–1815.
- Brustein, E., Saint-Amant, L., Buss, R. R., Chong, M., McDearmid, J. R. and Drapeau, P.** (2003). Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J. Physiol. Paris* **97**, 77–86.
- Byron, A., Humphries, J. D. and Humphries, M. J.** (2013). Defining the extracellular matrix using proteomics. *Int J Exp Pathol.*
- Cantu, J. A., Flowers, G. P. and Topczewski, J.** (2013). Notum homolog plays a novel role in primary motor innervation. *J. Neurosci.* **33**, 2177–2187.
- Carulli, D., Laabs, T., Geller, H. M. and Fawcett, J. W.** (2005). Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**, 116–120.
- Chablais, F. and Jazwinska, A.** (2010). IGF signaling between blastema and wound epidermis is required for fin regeneration. *Development* **137**, 871–879.
- Charvet, B., Malbouyres, M., Pagnon-Minot, A., Ruggiero, F. and Le Guellec, D.** (2011). Development of the zebrafish myoseptum with emphasis on the myotendinous junction. *Cell Tissue Res.* **346**, 439–449.
- Charvet, B., Guiraud, A., Malbouyres, M., Zwolanek, D., Guillon, E., Bretnaud, S., Monnot, C., Schulze, J., Bader, H. L., Allard, B., et al.** (2013). Knockdown of col22a1 gene in zebrafish induces a muscular dystrophy by disruption of the myotendinous junction. *Development* **140**, 4602–4613.
- Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K. and Beachy, P. A.** (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* **16**, 2743–2748.

- Chen, Z., Lee, H., Henle, S. J., Cheever, T. R., Ekker, S. C. and Henley, J. R.** (2013). Primary neuron culture for nerve growth and axon guidance studies in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS ONE* **8**, e57539.
- Chong, S.-W., Nguyet, L.-M., Jiang, Y.-J. and Korzh, V.** (2007). The chemokine Sdf-1 and its receptor Cxcr4 are required for formation of muscle in zebrafish. *BMC Dev. Biol.* **7**, 54.
- Clementz, A. G. and Harris, A.** (2013). Collagen XV: exploring its structure and role within the tumor microenvironment. *Mol. Cancer Res.* **11**, 1481–1486.
- Clementz, A. G., Mutolo, M. J., Leir, S.-H., Morris, K. J., Kucybala, K., Harris, H. and Harris, A.** (2013). Collagen XV inhibits epithelial to mesenchymal transition in pancreatic adenocarcinoma cells. *PLoS ONE* **8**, e72250.
- Concordet, J. P., Lewis, K. E., Moore, J. W., Goodrich, L. V., Johnson, R. L., Scott, M. P. and Ingham, P. W.** (1996). Spatial regulation of a zebrafish patched homologue reflects the roles of sonic hedgehog and protein kinase A in neural tube and somite patterning. *Development* **122**, 2835–2846.
- Cortés, F., Daggett, D., Bryson-Richardson, R. J., Neyt, C., Maule, J., Gautier, P., Hollway, G. E., Keenan, D. and Currie, P. D.** (2003). Cadherin-mediated differential cell adhesion controls slow muscle cell migration in the developing zebrafish myotome. *Dev. Cell* **5**, 865–876.
- Coutelle, O., Blagden, C. S., Hampson, R., Halai, C., Rigby, P. W. and Hughes, S. M.** (2001). Hedgehog signalling is required for maintenance of myf5 and myoD expression and timely terminal differentiation in zebrafish adaxial myogenesis. *Dev. Biol.* **236**, 136–150.
- Daggett, D. F., Domingo, C. R., Currie, P. D. and Amacher, S. L.** (2007). Control of morphogenetic cell movements in the early zebrafish myotome. *Dev. Biol.* **309**, 169–179.
- Dahm R., Geisler R. and Nüsslein-Volhard C.** (2005). Zebrafish (*Danio rerio*) Genome and Genetics. p. 593-626 in "Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine", Meyers, R. A. (editor), 2nd edition, Vol. 15, 676 pages, Wiley-VCH, Weinheim, 2005. ISBN: 3-527-30652-8.
- Devoto, S. H., Melançon, E., Eisen, J. S. and Westerfield, M.** (1996). Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development* **122**, 3371–3380.
- Dolez, M., Nicolas, J.-F. and Hirsinger, E.** (2011). Laminins, via heparan sulfate proteoglycans, participate in zebrafish myotome morphogenesis by modulating the pattern of Bmp responsiveness. *Development* **138**, 97–106.
- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R. R., Chong, M., McDearmid, J. R. and Brustein, E.** (2002). Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog. Neurobiol.* **68**, 85–111.
- Draper B. W., McCallum C. M., Stout J. L. and Moens C. B.** (2009). Tilling the Zebrafish Genome A reverse Genetics Approach. p 131-152 in Essential zebrafish methods : Genetics

and Genomics , Dietrich HW III., Westerfield M., Zon LI. (editors), 1st edition, 379 pages, Academic press, 2009 ISBN : 978-0-12-375160-7.

- Driever, W., Stemple, D., Schier, A. and Solnica-Krezel, L.** (1994). Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development. *Trends Genet.* **10**, 152–159.
- Du, S. J., Devoto, S. H., Westerfield, M. and Moon, R. T.** (1997). Positive and negative regulation of muscle cell identity by members of the hedgehog and TGF-beta gene families. *J. Cell Biol.* **139**, 145–156.
- Eisen, J. S.** (1991). Developmental neurobiology of the zebrafish. *J. Neurosci.* **11**, 311–317.
- Eisen, J. S. and Melançon, E.** (2001). Interactions with identified muscle cells break motoneuron equivalence in embryonic zebrafish. *Nat. Neurosci.* **4**, 1065–1070.
- Eisen, J. S. and Pike, S. H.** (1991). The spt-1 mutation alters segmental arrangement and axonal development of identified neurons in the spinal cord of the embryonic zebrafish. *Neuron* **6**, 767–776.
- Eisen, J. S., Pike, S. H. and Debu, B.** (1989). The growth cones of identified motoneurons in embryonic zebrafish select appropriate pathways in the absence of specific cellular interactions. *Neuron* **2**, 1097–1104.
- Ekker, S. C.** (2008). Zinc finger-based knockout punches for zebrafish genes. *Zebrafish* **5**, 121–123.
- Eklund, L., Muona, A., Liétard, J. and Pihlajaniemi, T.** (2000). Structure of the mouse type XV collagen gene, Col15a1, comparison with the human COL15A1 gene and functional analysis of the promoters of both genes. *Matrix Biol.* **19**, 489–500.
- Eklund, L., Piuhola, J., Komulainen, J., Sormunen, R., Ongvarrasopone, C., Fässler, R., Muona, A., Ilves, M., Ruskoaho, H., Takala, T. E., et al.** (2001). Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 1194–1199.
- Fassier, C., Hutt, J. A., Scholpp, S., Lumsden, A., Giros, B., Nothias, F., Schneider-Maunoury, S., Houart, C. and Hazan, J.** (2010). Zebrafish atlastin controls motility and spinal motor axon architecture via inhibition of the BMP pathway. *Nat. Neurosci.* **13**, 1380–1387.
- Feldner, J., Becker, T., Goishi, K., Schweitzer, J., Lee, P., Schachner, M., Klagsbrun, M. and Becker, C. G.** (2005). Neuropilin-1a is involved in trunk motor axon outgrowth in embryonic zebrafish. *Dev. Dyn.* **234**, 535–549.
- Feldner, J., Reimer, M. M., Schweitzer, J., Wendik, B., Meyer, D., Becker, T. and Becker, C. G.** (2007). PlexinA3 restricts spinal exit points and branching of trunk motor nerves in embryonic zebrafish. *J. Neurosci.* **27**, 4978–4983.
- Feng, X., Adiarte, E. G. and Devoto, S. H.** (2006). Hedgehog acts directly on the zebrafish dermomyotome to promote myogenic differentiation. *Dev. Biol.* **300**, 736–746.

- Fernandez-Valle, C., Gorman, D., Gomez, A. M. and Bunge, M. B.** (1997). Actin plays a role in both changes in cell shape and gene-expression associated with Schwann cell myelination. *J. Neurosci.* **17**, 241–250.
- Filipek-Górniok, B., Holmborn, K., Haitina, T., Habicher, J., Oliveira, M. B., Hellgren, C., Eriksson, I., Kjellén, L., Kreuger, J. and Ledin, J.** (2013). Expression of chondroitin/dermatan sulfate glycosyltransferases during early zebrafish development. *Dev. Dyn.* **242**, 964–975.
- Flanagan-Steet, H., Fox, M. A., Meyer, D. and Sanes, J. R.** (2005). Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development* **132**, 4471–4481.
- Flynt, A. S., Li, N., Thatcher, E. J., Solnica-Krezel, L. and Patton, J. G.** (2007). Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nat. Genet.* **39**, 259–263.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L. and Postlethwait, J.** (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**, 1531–1545.
- Gerety, S. S. and Wilkinson, D. G.** (2011). Morpholino artifacts provide pitfalls and reveal a novel role for pro-apoptotic genes in hindbrain boundary development. *Dev. Biol.* **350**, 279–289.
- Goody, M. F., Kelly, M. W., Reynolds, C. J., Khalil, A., Crawford, B. D. and Henry, C. A.** (2012). NAD⁺ biosynthesis ameliorates a zebrafish model of muscular dystrophy. *PLoS Biol.* **10**, e1001409.
- Gordon, L. R., Gribble, K. D., Syrett, C. M. and Granato, M.** (2012). Initiation of synapse formation by Wnt-induced MuSK endocytosis. *Development* **139**, 1023–1033.
- Granato, M. and Nüsslein-Volhard, C.** (1996). Fishing for genes controlling development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 461–468.
- Groves, J. A., Hammond, C. L. and Hughes, S. M.** (2005). Fgf8 drives myogenic progression of a novel lateral fast muscle fibre population in zebrafish. *Development* **132**, 4211–4222.
- Grunwald, D. J. and Eisen, J. S.** (2002). Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 717–724.
- Haftak, Z., Morvan-Dubois, G., Thisse, B., Thisse, C., Garrone, R. and Le Guellec, D.** (2003). Sequence and embryonic expression of collagen XVIII NC1 domain (endostatin) in the zebrafish. *Gene Expr. Patterns* **3**, 351–354.
- Hägg, P. M., Hägg, P. O., Peltonen, S., Autio-Harmainen, H. and Pihlajaniemi, T.** (1997a). Location of type XV collagen in human tissues and its accumulation in the interstitial matrix of the fibrotic kidney. *Am. J. Pathol.* **150**, 2075–2086.
- Hägg, P. M., Horelli-Kuitunen, N., Eklund, L., Palotie, A. and Pihlajaniemi, T.** (1997b). Cloning of mouse type XV collagen sequences and mapping of the corresponding gene to 4B1-3. Comparison of mouse and human alpha 1 (XV) collagen sequences indicates divergence in the number of small collagenous domains. *Genomics* **45**, 31–41.

- Hägg, P. M., Muona, A., Liétard, J., Kivirikko, S. and Pihlajaniemi, T.** (1998). Complete exon-intron organization of the human gene for the alpha1 chain of type XV collagen (COL15A1) and comparison with the homologous COL18A1 gene. *J. Biol. Chem.* **273**, 17824–17831.
- Hale, L. A., Fowler, D. K. and Eisen, J. S.** (2011). Netrin signaling breaks the equivalence between two identified zebrafish motoneurons revealing a new role of intermediate targets. *PLoS ONE* **6**, e25841.
- Halfter, W., Dong, S., Schurer, B. and Cole, G. J.** (1998). Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* **273**, 25404–25412.
- Hamade, A., Deries, M., Begemann, G., Bally-Cuif, L., Genêt, C., Sabatier, F., Bonniou, A. and Cousin, X.** (2006). Retinoic acid activates myogenesis in vivo through Fgf8 signalling. *Dev. Biol.* **289**, 127–140.
- Hammond, C. L., Hinitz, Y., Osborn, D. P. S., Minchin, J. E. N., Tettamanti, G. and Hughes, S. M.** (2007). Signals and myogenic regulatory factors restrict pax3 and pax7 expression to dermomyotome-like tissue in zebrafish. *Dev. Biol.* **302**, 504–521.
- Harpaz, N., Ordan, E., Ocorr, K., Bodmer, R. and Volk, T.** (2013). Multiplexin promotes heart but not aorta morphogenesis by polarized enhancement of slit/robo activity at the heart lumen. *PLoS Genet.* **9**, e1003597.
- Henry, C. A. and Amacher, S. L.** (2004). Zebrafish slow muscle cell migration induces a wave of fast muscle morphogenesis. *Dev. Cell* **7**, 917–923.
- Hilario, J. D., Rodino-Klapac, L. R., Wang, C. and Beattie, C. E.** (2009). Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue for axial motoneurons in vivo. *Dev. Biol.* **326**, 190–200.
- Hilario, J. D., Wang, C. and Beattie, C. E.** (2010). Collagen XIXa1 is crucial for motor axon navigation at intermediate targets. *Development* **137**, 4261–4269.
- Hinitz, Y., Osborn, D. P. S. and Hughes, S. M.** (2009). Differential requirements for myogenic regulatory factors distinguish medial and lateral somitic, cranial and fin muscle fibre populations. *Development* **136**, 403–414.
- Hirata, H., Wen, H., Kawakami, Y., Naganawa, Y., Ogino, K., Yamada, K., Saint-Amant, L., Low, S. E., Cui, W. W., Zhou, W., et al.** (2012). Connexin 39.9 protein is necessary for coordinated activation of slow-twitch muscle and normal behavior in zebrafish. *J. Biol. Chem.* **287**, 1080–1089.
- Hirsinger, E., Stellabotte, F., Devoto, S. H. and Westerfield, M.** (2004). Hedgehog signaling is required for commitment but not initial induction of slow muscle precursors. *Dev. Biol.* **275**, 143–157.
- Hollway, G. E., Bryson-Richardson, R. J., Berger, S., Cole, N. J., Hall, T. E. and Currie, P. D.** (2007). Whole-somite rotation generates muscle progenitor cell compartments in the developing zebrafish embryo. *Dev. Cell* **12**, 207–219.

- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., et al.** (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **496**, 498–503.
- Huang, P., Xiao, A., Tong, X., Zu, Y., Wang, Z. and Zhang, B.** (2014). TALEN construction via “Unit Assembly” method and targeted genome modifications in zebrafish. *Methods*.
- Huebner, K., Cannizzaro, L. A., Jabs, E. W., Kivirikko, S., Manzone, H., Pihlajaniemi, T. and Myers, J. C.** (1992). Chromosomal assignment of a gene encoding a new collagen type (COL15A1) to 9q21 --> q22. *Genomics* **14**, 220–224.
- Hurskainen, M., Ruggiero, F., Hägg, P., Pihlajaniemi, T. and Huhtala, P.** (2010). Recombinant human collagen XV regulates cell adhesion and migration. *J. Biol. Chem.* **285**, 5258–5265.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J.-R. J. and Joung, J. K.** (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* **31**, 227–229.
- Ingham, P. W.** (2009). The power of the zebrafish for disease analysis. *Hum. Mol. Genet.* **18**, R107–112.
- Ingham, P. W. and Kim, H. R.** (2005). Hedgehog signalling and the specification of muscle cell identity in the zebrafish embryo. *Exp. Cell Res.* **306**, 336–342.
- Jackson, H. E. and Ingham, P. W.** (2013). Control of muscle fibre-type diversity during embryonic development: the zebrafish paradigm. *Mech. Dev.* **130**, 447–457.
- Jing, L., Lefebvre, J. L., Gordon, L. R. and Granato, M.** (2009). Wnt signals organize synaptic prepattern and axon guidance through the zebrafish unplugged/MuSK receptor. *Neuron* **61**, 721–733.
- Karlsson, J., von Hofsten, J. and Olsson, P. E.** (2001). Generating transparent zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. *Mar. Biotechnol.* **3**, 522–527.
- Ketley, A., Warren, A., Holmes, E., Gering, M., Aboobaker, A. A. and Brook, J. D.** (2013). The miR-30 microRNA family targets smoothened to regulate hedgehog signalling in zebrafish early muscle development. *PLoS ONE* **8**, e65170.
- Kettleborough, R. N. W., Busch-Nentwich, E. M., Harvey, S. A., Dooley, C. M., de Bruijn, E., van Eeden, F., Sealy, I., White, R. J., Herd, C., Nijman, I. J., et al.** (2013). A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature* **496**, 494–497.
- Kim, M. J., Liu, I.-H., Song, Y., Lee, J.-A., Halfter, W., Balice-Gordon, R. J., Linney, E. and Cole, G. J.** (2007). Agrin is required for posterior development and motor axon outgrowth and branching in embryonic zebrafish. *Glycobiology* **17**, 231–247.

- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**, 253–310.
- Kivirikko, S., Heinämäki, P., Rehn, M., Honkanen, N., Myers, J. C. and Pihlajaniemi, T.** (1994). Primary structure of the alpha 1 chain of human type XV collagen and exon-intron organization in the 3' region of the corresponding gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 4773–4779.
- Kivirikko, S., Saarela, J., Myers, J. C., Autio-Harmainen, H. and Pihlajaniemi, T.** (1995). Distribution of type XV collagen transcripts in human tissue and their production by muscle cells and fibroblasts. *Am. J. Pathol.* **147**, 1500–1509.
- Kizil, C., Kaslin, J., Kroehne, V. and Brand, M.** (2012). Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Dev Neurobiol* **72**, 429–461.
- Lauderdale, J. D., Davis, N. M. and Kuwada, J. Y.** (1997). Axon tracts correlate with netrin-1a expression in the zebrafish embryo. *Mol. Cell. Neurosci.* **9**, 293–313.
- Lee C., Palmer D., Freeman J. L. and Brown KH.** (2009) Molecular Cytogenetic Methodologies and a Second-Generation BAC Probe Panel Resource for Zebrafish Genomic Analyses. p 175-190 in *Essential zebrafish methods: Genetics and Genomics*, Dietrich HW III, Westerfield M, Zon LI. (editors), 379 pages, Academic press, 2009 ISBN : 978-0-12-375160-7.
- Lefebvre, J. L., Jing, L., Becaficco, S., Franzini-Armstrong, C. and Granato, M.** (2007). Differential requirement for MuSK and dystroglycan in generating patterns of neuromuscular innervation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 2483–2488.
- Li, D., Clark, C. C. and Myers, J. C.** (2000). Basement membrane zone type XV collagen is a disulfide-bonded chondroitin sulfate proteoglycan in human tissues and cultured cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 22339–22347.
- Lieschke, G. J. and Currie, P. D.** (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 353–367.
- Lisignoli, G., Codeluppi, K., Todoerti, K., Manferdini, C., Piacentini, A., Zini, N., Grassi, F., Cattini, L., Piva, R., Rizzoli, V., et al.** (2009). Gene array profile identifies collagen type XV as a novel human osteoblast-secreted matrix protein. *J. Cell. Physiol.* **220**, 401–409.
- Liu, D. W. and Westerfield, M.** (1988). Function of identified motoneurons and co-ordination of primary and secondary motor systems during zebra fish swimming. *J. Physiol. (Lond.)* **403**, 73–89.
- Maves, L., Waskiewicz, A. J., Paul, B., Cao, Y., Tyler, A., Moens, C. B. and Tapscott, S. J.** (2007). Pbx homeodomain proteins direct Myod activity to promote fast-muscle differentiation. *Development* **134**, 3371–3382.
- McKeown, K. A., Downes, G. B. and Hutson, L. D.** (2009). Modular laboratory exercises to analyze the development of zebrafish motor behavior. *Zebrafish* **6**, 179–185.

- Melançon, E., Liu, D. W., Westerfield, M. and Eisen, J. S.** (1997). Pathfinding by identified zebrafish motoneurons in the absence of muscle pioneers. *J. Neurosci.* **17**, 7796–7804.
- Messina, G., Biressi, S., Monteverde, S., Magli, A., Cassano, M., Perani, L., Roncaglia, E., Tagliafico, E., Starnes, L., Campbell, C. E., et al.** (2010). Nfix regulates fetal-specific transcription in developing skeletal muscle. *Cell* **140**, 554–566.
- Meyer, F. and Moussian, B.** (2009). *Drosophila* multiplexin (Dmp) modulates motor axon pathfinding accuracy. *Dev. Growth Differ.* **51**, 483–498.
- Mikami, T. and Kitagawa, H.** (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 4719–4733.
- Milla, L. A., Cortés, C. R., Hodar, C., Oñate, M. G., Cambiazo, V., Burgess, S. M. and Palma, V.** (2012). Yeast-based assay identifies novel Shh/Gli target genes in vertebrate development. *BMC Genomics* **13**, 2.
- Mizumoto, S., Mikami, T., Yasunaga, D., Kobayashi, N., Yamauchi, H., Miyake, A., Itoh, N., Kitagawa, H. and Sugahara, K.** (2009). Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 is required for somitic muscle development and motor axon guidance in zebrafish. *Biochem. J.* **419**, 387–399.
- Momota, R., Naito, I., Ninomiya, Y. and Ohtsuka, A.** (2011). *Drosophila* type XV/XVIII collagen, Mp, is involved in Wingless distribution. *Matrix Biol.* **30**, 258–266.
- Momota, R., Narasaki, M., Komiyama, T., Naito, I., Ninomiya, Y. and Ohtsuka, A.** (2013). *Drosophila* type XV/XVIII collagen mutants manifest integrin mediated mitochondrial dysfunction, which is improved by cyclosporin A and losartan. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*
- Moore, C. A., Parkin, C. A., Bidet, Y. and Ingham, P. W.** (2007). A role for the Myoblast city homologues Dock1 and Dock5 and the adaptor proteins Crk and Crk-like in zebrafish myoblast fusion. *Development* **134**, 3145–3153.
- Muona, A., Eklund, L., Väisänen, T. and Pihlajaniemi, T.** (2002). Developmentally regulated expression of type XV collagen correlates with abnormalities in Col15a1(-/-) mice. *Matrix Biol.* **21**, 89–102.
- Muragaki, Y., Abe, N., Ninomiya, Y., Olsen, B. R. and Ooshima, A.** (1994). The human alpha 1(XV) collagen chain contains a large amino-terminal non-triple helical domain with a tandem repeat structure and homology to alpha 1(XVIII) collagen. *J. Biol. Chem.* **269**, 4042–4046.
- Murphy, M. and Kardon, G.** (2011). Origin of vertebrate limb muscle: the role of progenitor and myoblast populations. *Curr. Top. Dev. Biol.* **96**, 1–32.
- Mutolo, M. J., Morris, K. J., Leir, S.-H., Caffrey, T. C., Lewandowska, M. A., Hollingsworth, M. A. and Harris, A.** (2012). Tumor suppression by collagen XV is independent of the restin domain. *Matrix Biol.* **31**, 285–289.

- Myers, J. C., Kivirikko, S., Gordon, M. K., Dion, A. S. and Pihlajaniemi, T.** (1992). Identification of a previously unknown human collagen chain, alpha 1(XV), characterized by extensive interruptions in the triple-helical region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 10144–10148.
- Myers, J. C., Dion, A. S., Abraham, V. and Amenta, P. S.** (1996). Type XV collagen exhibits a widespread distribution in human tissues but a distinct localization in basement membrane zones. *Cell Tissue Res.* **286**, 493–505.
- Myers, J. C., Amenta, P. S., Dion, A. S., Sciancalepore, J. P., Nagaswami, C., Weisel, J. W. and Yurchenco, P. D.** (2007). The molecular structure of human tissue type XV presents a unique conformation among the collagens. *Biochem. J.* **404**, 535–544.
- Naganawa, Y. and Hirata, H.** (2011). Developmental transition of touch response from slow muscle-mediated coilings to fast muscle-mediated burst swimming in zebrafish. *Dev. Biol.* **355**, 194–204.
- Nguyen-Chi, M. E., Bryson-Richardson, R., Sonntag, C., Hall, T. E., Gibson, A., Sztal, T., Chua, W., Schilling, T. F. and Currie, P. D.** (2012). Morphogenesis and cell fate determination within the adaxial cell equivalence group of the zebrafish myotome. *PLoS Genet.* **8**, e1003014.
- Norton, W. H. J., Ledin, J., Grandel, H. and Neumann, C. J.** (2005). HSPG synthesis by zebrafish Ext2 and Extl3 is required for Fgf10 signalling during limb development. *Development* **132**, 4963–4973.
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. and Folkman, J.** (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**, 277–285.
- Ochi, H. and Westerfield, M.** (2007). Signaling networks that regulate muscle development: lessons from zebrafish. *Dev. Growth Differ.* **49**, 1–11.
- Olivier, N., Luengo-Oroz, M. A., Duloquin, L., Faure, E., Savy, T., Veilleux, I., Solinas, X., Débarre, D., Bourgine, P., Santos, A., et al.** (2010). Cell lineage reconstruction of early zebrafish embryos using label-free nonlinear microscopy. *Science* **329**, 967–971.
- Ott, H., Diekmann, H., Stuermer, C. A. and Bastmeyer, M.** (2001). Function of Neurolin (DM-GRASP/SC-1) in guidance of motor axons during zebrafish development. *Dev. Biol.* **235**, 86–97.
- Pagnon-Minot, A., Malbouyres, M., Haftek-Terreau, Z., Kim, H. R., Sasaki, T., Thisse, C., Thisse, B., Ingham, P. W., Ruggiero, F. and Le Guellec, D.** (2008). Collagen XV, a novel factor in zebrafish notochord differentiation and muscle development. *Dev. Biol.* **316**, 21–35.
- Pan, Y. A., Livet, J., Sanes, J. R., Lichtman, J. W. and Schier, A. F.** (2011). Multicolor Brainbow imaging in zebrafish. *Cold Spring Harb Protoc* **2011**, pdb.prot5546.

- Pan, Y. A., Freundlich, T., Weissman, T. A., Schoppik, D., Wang, X. C., Zimmerman, S., Ciruna, B., Sanes, J. R., Lichtman, J. W. and Schier, A. F.** (2013). Zebrafish: multispectral cell labeling for cell tracing and lineage analysis in zebrafish. *Development* **140**, 2835–2846.
- Panzer, J. A., Gibbs, S. M., Dosch, R., Wagner, D., Mullins, M. C., Granato, M. and Balice-Gordon, R. J.** (2005). Neuromuscular synaptogenesis in wild-type and mutant zebrafish. *Dev. Biol.* **285**, 340–357.
- Park, H.-C., Shin, J. and Appel, B.** (2004). Spatial and temporal regulation of ventral spinal cord precursor specification by Hedgehog signaling. *Development* **131**, 5959–5969.
- Peterson, M. T. and Henry, C. A.** (2010). Hedgehog signaling and laminin play unique and synergistic roles in muscle development. *Dev. Dyn.* **239**, 905–913.
- Pike, S. H., Melancon, E. F. and Eisen, J. S.** (1992). Pathfinding by zebrafish motoneurons in the absence of normal pioneer axons. *Development* **114**, 825–831.
- Pownall, M. E., Gustafsson, M. K. and Emerson, C. P., Jr** (2002). Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 747–783.
- Ramchandran, R., Dhanabal, M., Volk, R., Waterman, M. J., Segal, M., Lu, H., Knebelmann, B. and Sukhatme, V. P.** (1999). Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 735–739.
- Rasi, K., Hurskainen, M., Kallio, M., Stavén, S., Sormunen, R., Heape, A. M., Avila, R. L., Kirschner, D., Muona, A., Tolonen, U., et al.** (2010a). Lack of collagen XV impairs peripheral nerve maturation and, when combined with laminin-411 deficiency, leads to basement membrane abnormalities and sensorimotor dysfunction. *J. Neurosci.* **30**, 14490–14501.
- Rasi, K., Piuhola, J., Czabanka, M., Sormunen, R., Ilves, M., Leskinen, H., Rysä, J., Kerkelä, R., Janmey, P., Heljasvaara, R., et al.** (2010b). Collagen XV is necessary for modeling of the extracellular matrix and its deficiency predisposes to cardiomyopathy. *Circ. Res.* **107**, 1241–1252.
- Rescan, P.-Y.** (2008). New insights into skeletal muscle development and growth in teleost fishes. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* **310**, 541–548.
- Ricard-Blum, S.** (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a004978.
- Ricard-Blum, S. and Ruggiero, F.** (2005). The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol. Biol.* **53**, 430–442.
- Riobo N. A.** (2010). PKCs as Mediators of the Hedgehog and Wnt signaling pathways. p 267-286 in Protein kinase C in Cancer Signaling and Therapy. Kazanietz MG. (editor), 494 pages, Humana press, 2010 ISBN : 978-1-60761-542-2.

- Robles, V., Marti, M. and Belmonte, J. C. I.** (2011). Study of Pluripotency Markers in Zebrafish Embryos and Transient Embryonic Stem Cell Cultures. *Zebrafish* **8**, 57–63.
- Robu, M. E., Larson, J. D., Nasevicius, A., Beiraghi, S., Brenner, C., Farber, S. A. and Ekker, S. C.** (2007). p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet.* **3**, e78.
- Rodino-Klapac, L. R. and Beattie, C. E.** (2004). Zebrafish topped is required for ventral motor axon guidance. *Dev. Biol.* **273**, 308–320.
- Roos, M., Schachner, M. and Bernhardt, R. R.** (1999). Zebrafish semaphorin Z1b inhibits growing motor axons in vivo. *Mech. Dev.* **87**, 103–117.
- Roy, S., Wolff, C. and Ingham, P. W.** (2001). The u-boot mutation identifies a Hedgehog-regulated myogenic switch for fiber-type diversification in the zebrafish embryo. *Genes Dev.* **15**, 1563–1576.
- Rygh, C. B., Løkka, G., Heljasvaara, R., Taxt, T., Pavlin, T., Sormunen, R., Pihlajaniemi, T., Curry, F. R., Tenstad, O. and Reed, R. K.** (2014). Image-based assessment of microvascular function and structure in collagen XV- and XVIII-deficient mice. *J. Physiol. (Lond.)* **592**, 325–336.
- Saika, S., Okada, Y., Miyamoto, T., Yamanaka, O., Ohnishi, Y., Yamanaka, A. and Ooshima, A.** (2004). Protein expression pattern of collagen type XV in mouse cornea. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **242**, 432–436.
- Saint-Amant, L. and Drapeau, P.** (1998). Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J. Neurobiol.* **37**, 622–632.
- Saint-Amant, L. and Drapeau, P.** (2000). Motoneuron activity patterns related to the earliest behavior of the zebrafish embryo. *J. Neurosci.* **20**, 3964–3972.
- Sakowski, S. A., Lunn, J. S., Busta, A. S., Palmer, M., Dowling, J. J. and Feldman, E. L.** (2012). A novel approach to study motor neurons from zebrafish embryos and larvae in culture. *J. Neurosci. Methods* **205**, 277–282.
- Sanger, J. W., Wang, J., Holloway, B., Du, A. and Sanger, J. M.** (2009). Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells in zebrafish. *Cell Motil. Cytoskeleton* **66**, 556–566.
- Sarrazin, S., Lamanna, W. C. and Esko, J. D.** (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**,.
- Sato-Maeda, M., Tawarayama, H., Obinata, M., Kuwada, J. Y. and Shoji, W.** (2006). *Sema3a1* guides spinal motor axons in a cell- and stage-specific manner in zebrafish. *Development* **133**, 937–947.
- Schneider, V. A. and Granato, M.** (2006). The myotomal diwanka (*lh3*) glycosyltransferase and type XVIII collagen are critical for motor growth cone migration. *Neuron* **50**, 683–695.
- Schweitzer, J., Becker, T., Lefebvre, J., Granato, M., Schachner, M. and Becker, C. G.** (2005). Tenascin-C is involved in motor axon outgrowth in the trunk of developing zebrafish. *Dev. Dyn.* **234**, 550–566.

- Snow, C. J., Peterson, M. T., Khalil, A. and Henry, C. A.** (2008a). Muscle development is disrupted in zebrafish embryos deficient for fibronectin. *Dev. Dyn.* **237**, 2542–2553.
- Snow, C. J., Goody, M., Kelly, M. W., Oster, E. C., Jones, R., Khalil, A. and Henry, C. A.** (2008b). Time-lapse analysis and mathematical characterization elucidate novel mechanisms underlying muscle morphogenesis. *PLoS Genet.* **4**, e1000219.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. and Smith, C.** (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc* **83**, 13–34.
- Stevens, C. B. and Halloran, M. C.** (2005). Developmental expression of sema3G, a novel zebrafish semaphorin. *Gene Expr. Patterns* **5**, 647–653.
- Stickney, H. L., Barresi, M. J. and Devoto, S. H.** (2000). Somite development in zebrafish. *Dev. Dyn.* **219**, 287–303.
- Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S.** (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123–1133.
- Tomono, Y., Naito, I., Ando, K., Yonezawa, T., Sado, Y., Hirakawa, S., Arata, J., Okigaki, T. and Ninomiya, Y.** (2002). Epitope-defined monoclonal antibodies against multiplexin collagens demonstrate that type XV and XVIII collagens are expressed in specialized basement membranes. *Cell Struct. Funct.* **27**, 9–20.
- Von Hofsten, J., Elworthy, S., Gilchrist, M. J., Smith, J. C., Wardle, F. C. and Ingham, P. W.** (2008). Prdm1- and Sox6-mediated transcriptional repression specifies muscle fibre type in the zebrafish embryo. *EMBO Rep.* **9**, 683–689.
- Westerfield, M.** (2000). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene. *Hardcopies of the 4th edition of The Zebrafish Book can be obtained for a nominal fee from the Zebrafish International Resource Center, 5274 University of Oregon, Eugene, OR 97403 USA; fax: 541-346-6151.*
- Westerfield, M. and Eisen, J. S.** (1988). Neuromuscular specificity: pathfinding by identified motor growth cones in a vertebrate embryo. *Trends Neurosci.* **11**, 18–22.
- Wirz, J. A., Boudko, S. P., Lerch, T. F., Chapman, M. S. and Bächinger, H. P.** (2011). Crystal structure of the human collagen XV trimerization domain: a potent trimerizing unit common to multiplexin collagens. *Matrix Biol.* **30**, 9–15.
- Wolff, C., Roy, S. and Ingham, P. W.** (2003). Multiple muscle cell identities induced by distinct levels and timing of hedgehog activity in the zebrafish embryo. *Curr. Biol.* **13**, 1169–1181.
- Wolman, M. and Granato, M.** (2012). Behavioral genetics in larval zebrafish: learning from the young. *Dev Neurobiol* **72**, 366–372.
- Wu, H., Xiong, W. C. and Mei, L.** (2010). To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* **137**, 1017–1033.

- Yin, C. and Solnica-Krezel, L.** (2007). Convergence and extension movements mediate the specification and fate maintenance of zebrafish slow muscle precursors. *Dev. Biol.* **304**, 141–155.
- Ylikärppä, R., Eklund, L., Sormunen, R., Muona, A., Fukai, N., Olsen, B. R. and Pihlajaniemi, T.** (2003). Double knockout mice reveal a lack of major functional compensation between collagens XV and XVIII. *Matrix Biol.* **22**, 443–448.
- Yu, T. W. and Bargmann, C. I.** (2001). Dynamic regulation of axon guidance. *Nat. Neurosci.* **4 Suppl**, 1169–1176.
- Zeller, J. and Granato, M.** (1999). The zebrafish diwanka gene controls an early step of motor growth cone migration. *Development* **126**, 3461–3472.
- Zeller, J., Schneider, V., Malayaman, S., Higashijima, S., Okamoto, H., Gui, J., Lin, S. and Granato, M.** (2002). Migration of zebrafish spinal motor nerves into the periphery requires multiple myotome-derived cues. *Dev. Biol.* **252**, 241–256.
- Zhang, L.** (2010). Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog Mol Biol Transl Sci* **93**, 1–17.
- Zhang, J. and Granato, M.** (2000). The zebrafish unplugged gene controls motor axon pathway selection. *Development* **127**, 2099–2111.
- Zhang, J., Malayaman, S., Davis, C. and Granato, M.** (2001). A dual role for the zebrafish unplugged gene in motor axon pathfinding and pharyngeal development. *Dev. Biol.* **240**, 560–573.
- Zhang, J., Lefebvre, J. L., Zhao, S. and Granato, M.** (2004). Zebrafish unplugged reveals a role for muscle-specific kinase homologs in axonal pathway choice. *Nat. Neurosci.* **7**, 1303–1309.
- Zhang, L., Lawrence, R., Frazier, B. A. and Esko, J. D.** (2006). CHO glycosylation mutants: proteoglycans. *Meth. Enzymol.* **416**, 205–221.

Productions Scientifiques Annexes

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES ANNEXES

Les compétences techniques et l'expertise scientifique que j'ai pu acquérir au cours de ma thèse m'ont permis de participer à deux publications en dehors de mon projet de thèse qui sont jointes ci après.

Knockdown of *col22a1* gene in zebrafish induces a muscular dystrophy by disruption of the myotendinous junctions. Charvet B, Guiraud A, Malbouyres M, Zwolanek D, Guillon E, Bretaud E, Monnot C, Schulze J, Bader HL, Allard B, Koch M, Ruggiero F. **2013. *Development* 140, 4602–4613.**

Dans le cadre de ce projet, j'ai mis au point et réalisé des expériences d'interactions génétiques dans le but de déterminer des interactions fonctionnelles entre le collagène XXII et les différents composants des systèmes d'ancrage musculaires présents à la jonction myotendineuse chez le poisson zèbre. Pour cela j'ai injecté à des doses subphénotypiques les morpholinos dirigés contre *itga7* et *col22a1* et évalué l'effet synergetique de cette co-inhibition sur le détachement musculaire.

Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. Bignon M, Pichol-Thievend C, Hardouin J, Malbouyres M, Bréchet N, Nasciutti L, Barret A, Teillon J, Guillon E, Etienne E, Caron M, Joubert-Caron R, Monnot C, Ruggiero F, Muller L, Germain S. **2011. *Blood*. 118(14): 3979-89**

Dans le cadre d'une collaboration de mon équipe sur un projet du laboratoire de Stéphane Germain au Collège de France (Paris) qui portait sur l'étude du rôle de la lysyloxydase like 2 dans le processus d'angiogenèse, j'ai analysé l'expression du gène *l2a* par hybridation *in situ* au cours du développement du poisson zèbre et encadré Cathy Pichol Thievent sur cette technique pour permettre le transfert de ce savoir faire dans l'équipe partenaire. Les données obtenues ont permis de montrer que cet orthologue était exprimé par les cellules endothéliales lors de la mise en place de l'angiogénèse chez le poisson zèbre.

RESEARCH ARTICLE

Knockdown of *col22a1* gene in zebrafish induces a muscular dystrophy by disruption of the myotendinous junction

Benjamin Charvet^{1,*}, Alexandre Guiraud^{1,*}, Marilyne Malbouyres¹, Daniela Zwolanek², Emilie Guillon¹, Sandrine Breaud¹, Catherine Monnot³, Jörg Schulze², Hannah L. Bader¹, Bruno Allard⁴, Manuel Koch^{2,5} and Florence Ruggiero^{1,‡}

ABSTRACT

The myotendinous junction (MTJ) is the major site of force transfer in skeletal muscle, and defects in its structure correlate with a subset of muscular dystrophies. *Col22a1* encodes the MTJ component collagen XXII, the function of which remains unknown. Here, we have cloned and characterized the zebrafish *col22a1* gene and conducted morpholino-based loss-of-function studies in developing embryos. We showed that *col22a1* transcripts localize at muscle ends when the MTJ forms and that COLXXII protein integrates the junctional extracellular matrix. Knockdown of COLXXII expression resulted in muscular dystrophy-like phenotype, including swimming impairment, curvature of embryo trunk/tail, strong reduction of twitch-contraction amplitude and contraction-induced muscle fiber detachment, and provoked significant activation of the survival factor Akt. Electron microscopy and immunofluorescence studies revealed that absence of COLXXII caused a strong reduction of MTJ folds and defects in myoseptal structure. These defects resulted in reduced contractile force and susceptibility of junctional extracellular matrix to rupture when subjected to repeated mechanical stress. Co-injection of sub-phenotypic doses of morpholinos against *col22a1* and genes of the major muscle linkage systems showed a synergistic gene interaction between *col22a1* and *itga7* ($\alpha7\beta1$ integrin) that was not observed with *dag1* (dystroglycan). Finally, pertinent to a conserved role in humans, the dystrophic phenotype was rescued by microinjection of recombinant human COLXXII. Our findings indicate that COLXXII contributes to the stabilization of myotendinous junctions and strengthens skeletal muscle attachments during contractile activity.

KEY WORDS: Collagen, Extracellular matrix, Muscular dystrophy, Myotendinous junction, Skeletal muscle, Zebrafish

INTRODUCTION

The myotendinous junction (MTJ) represents the major site of muscle force transmission to tendons. This highly specialized structure displays finger-like folds that increase contact between muscle and tendon. Complex and dynamic interactions between muscle sarcolemma and extracellular matrix (ECM) components

occur at the MTJ, and form trans-sarcolemmal linkage systems that are required for the initiation and maintenance of muscle fiber attachment to tendon. These interactions provide a continuous structural link between intracellular cytoskeleton, sarcolemma and ECM proteins, such as the basement membrane (BM) component laminin. Two independent trans-sarcolemmal linkage systems are present at MTJs: the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) and the $\alpha7\beta1$ integrin complex. Whereas $\alpha7\beta1$ integrin binds only to laminin and was reported to localize primarily at the MTJ, α -dystroglycan interacts with several BM components and distributes along the sarcolemma (Han et al., 2009). DGC and $\alpha7\beta1$ integrin are both crucial for maintaining skeletal muscle integrity and attachments, but a functional overlap between the two linkage systems remains undemonstrated (Rooney et al., 2006; Han et al., 2009).

Mutations in most of the genes encoding components of the linkage complexes result in muscle disorders (Carmignac and Durbeej, 2012). In humans, mutations in the dystrophin gene cause Duchenne and Becker muscular dystrophies, whereas mutations in sarcoglycan genes are responsible for some forms of limb girdle muscular dystrophies (Cohn and Campbell, 2000). Mutations in the integrin $\alpha7$ gene (*ITGA7*) cause congenital myopathy (Hayashi et al., 1998) and the most common form of congenital muscular dystrophy MDC1A is associated with loss of functional laminin $\alpha2$ (Helbling-Leclerc et al., 1995). The impact of these mutations in MTJ formation and/or function is still poorly documented, particularly in the context of human diseases. However, mice that lack dystrophin (*mdx*; *Dmd* – Mouse Genome Informatics) (Law and Tidball, 1993; Law et al., 1995), laminin $\alpha2$ (*dy*; *Lama2* – Mouse Genome Informatics) (Desaki, 1992) or integrin $\alpha7$ (Miosge et al., 1999; Welser et al., 2009) exhibit a striking reduction in the number of membrane folds at MTJ that impairs its function and results in progressive muscular dystrophy.

Collagen XXII (COLXXII) is a distinctive BM component for it is strictly localized at tissue junctions, specifically at the MTJ (Koch et al., 2004). It belongs to the FACIT (fibril-associated collagens with interrupted triple helix) subset of the collagen superfamily, the members of which are known to associate with collagen fibers through their C-terminal collagenous domains and to mediate protein-protein interactions through their N-terminal non-collagenous domains (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). The function of COLXXII remains unknown, but its enrichment at the MTJ, as well as the high capacity of FACIT members to associate with other matrix components suggests that COLXXII may contribute to the mechanical stability of the MTJ.

Zebrafish is becoming instrumental for specifically addressing the extent to which the loss of MTJ components contributes to muscle physiology and pathology (Ingham, 2009). In zebrafish, somitic muscle fibers differentiate to span the entire myotome and

¹Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, ENS de Lyon, UMR CNRS 5242, Université Lyon 1, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France. ²Center for Biochemistry, Medical Faculty, University of Cologne, D-50931 Cologne, Germany. ³Centre Interdisciplinaire de Recherche en Biologie, CNRS UMR 7241/INSERM U1050, Collège de France, Paris, France. ⁴Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS UMR 5534, 69622 Villeurbanne Cedex, France. ⁵Institute for Dental Research and Oral Musculoskeletal Biology, Center for Molecular Medicine Cologne, Medical Faculty, University of Cologne, D-50931 Cologne, Germany.
*These authors contributed equally to this work

[‡]Author for correspondence (florence.ruggiero@ens-lyon.fr)

Received 17 March 2013; Accepted 27 August 2013

vertical myosepta, which are functionally equivalent to the mammalian tendon and serve as attachment sites at myotome borders where the MTJ forms (Henry et al., 2005; Charvet et al., 2011). Zebrafish dystrophic mutants and morphants with skeletal muscle abnormalities represent informative models of muscle disease pathogenesis (Ingham, 2009; Sztal et al., 2012) and therapy, as reported recently (Kawahara et al., 2011). The detachment of muscle fiber at the MTJ is a common phenotypic feature of several dystrophic mutants and/or morphants, e.g. *sapje/dystrophin (sap)* (Bassett et al., 2003; Guyon et al., 2009), *candyfloss/laminin α 2 (caf)* (Hall et al., 2007) and *patchytail/dystroglycan* (Gupta et al., 2011), and the integrin α 7 morphants (Postel et al., 2008). The integrin-linked kinase (ILK)-deficient *loss-contact (loc)* (Postel et al., 2008) and laminin- β 2-deficient *softy (sof)* (Jacoby et al., 2009) mutants also exhibit destabilization of muscle attachments at intracellular (*loc*) and extracellular (*sof*) sides of the MTJ, suggesting that these genes are also important for maintenance of muscle attachments. In most of these mutants, skeletal muscles develop normally but the onset of muscle contractions provokes progressive muscle cell detachment from their insertion site and the subsequent degeneration of the axial myotome (Sztal et al., 2012).

In the present study, we have cloned and characterized the zebrafish ortholog of the human *COL22A1* gene, *col22a1*, and showed that the protein product COLXXII is specifically expressed by skeletal muscle and deposited at the junctional ECM as the MTJ develops. We show that *col22a1* knockdown in zebrafish embryos resulted in muscle dysfunction indicative of dystrophic phenotype. Synergistic interactions suggest that COLXXII contributes to the stabilization of the integrin α 7 β 1 linkage system. Pertinent to a conserved role in humans, the dystrophic phenotype was rescued by microinjection of human COLXXII. Our findings provide functional evidence for a role of *col22a1* in the stabilization and maintenance of the MTJ.

RESULTS

Zebrafish *col22a1* presents the overall structure of its mammalian counterparts

A zebrafish ortholog of the human *COL22A1* gene is available in the CoreNucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The prediction of the zebrafish COLXXII α 1 chain mRNA (XM_685915.3 version GI:189532156) was incomplete but corresponds well to the human and mouse COLXXII α 1 chain. We thus decided to clone and sequence the complete zebrafish *col22a1* cDNA. To this aim, we subjected the predicted zebrafish COLXXII α 1 chain mRNA sequence to a blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) against *Danio rerio* genomic sequences. This blast retrieved the *Danio rerio* strain Tuebingen unplaced genomic scaffold, Zv9_NA466 (NW_003336732.1). Using this sequence, we designed primers to obtain the complete sequence through PCR amplification of 24 hpf embryo cDNA. The sequence (accession number HE_981211; 4925 bp) included full coding sequence (4869 bp) and a part of the 5' and 3' UTR sequences. The protein deduced from the coding sequence contains 1622 amino acids (protein id CCK86746.1).

Alignments of the zebrafish COLXXII α 1 chain with the human, mouse and chicken orthologs revealed an overall 60% identity and about 70% similarity (supplementary material Fig. S1; Table 1). The overall structure is similar to that of other vertebrates and contains the structural signatures of all FACITs (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005) (supplementary material Fig. S1). The only difference from the human COLXXII, but shared with mouse and chicken orthologs,

Table 1. Comparison between the collagen XXII α 1 chain zebrafish (HE_981211) and human (NP_690848.1), mouse (NP_081450.1) and chicken (NP_001132911.1) orthologs

Species	Domains	Identity (%)	Similarity (%)
<i>Homo sapiens</i>	Full length	59	71
	VWA	70	85
	TSPN	67	85
<i>Mus musculus</i>	Full length	59	72
	VWA	69	87
	TSPN	68	87
<i>Gallus gallus</i>	Full length	60	74
	VWA	73	89
	TSPN	69	86

Numbers represent the percentage of identity and similarity obtained from alignments using ClustalW. TSPN, thrombosponin N-terminal-like domain, VWA, von Willebrand factor A-like domain.

was the absence of the NC4 linker sequence (supplementary material Fig. S1). As such, a transcript without NC4 was the unique transcript detected in developing zebrafish (supplementary material Fig. S2).

col22a1 is expressed in skeletal muscle and its protein product localizes at the MTJ

The expression pattern of zebrafish *col22a1* was analyzed at the transcriptional level by RT-PCR (Fig. 1A) and whole-mount *in situ* hybridization (Fig. 1B). By RT-PCR, we first detected *col22a1* expression at 22 hpf, during the third stage of segment boundary formation, as defined by Henry et al. (Henry et al., 2005). At 24 hpf, transcript level increased and expression was then maintained in developing embryos (Fig. 1A). *In situ* hybridization of 24 hpf embryos revealed a diffuse signal within the somites with no signal at myotome boundaries (Fig. 1B,a). As embryos developed, expression concentrated to muscle cell extremities close to vertical myosepta (Fig. 1B,b-e).

Protein expression in developing embryos was then assessed by western blot of whole-protein extracts using our specific polyclonal antibodies raised against a zebrafish COLXXII recombinant domain (supplementary material Fig. S3A,B). Two bands were detected from 24 hpf: one migrating at 200 kDa corresponding to the expected molecular weight of COLXXII α 1 chain and an upper band that likely corresponds to partial non-reducible dimers (Fig. 1C), as reported for the mammalian COLXXII (Koch et al., 2004). Using confocal microscopy, COLXXII was detected in 26 hpf myotomes as a fuzzy signal, which became more intense along the myosepta (Fig. 1D,a). As embryo developed, COLXXII became restricted to myotomes boundaries (Fig. 1D,b,c). In addition, as revealed by whole-mount double immunostaining of 72 hpf embryos (Fig. 1D,c-e), COLXXII colocalized at the confocal resolution with the membrane-associated dystrophin that is enriched at junctional sarcolemma in zebrafish. Moreover, at later larval stage (5 dpf), when MTJ is fully differentiated and forms deep sarcolemmal folds (Charvet et al., 2011), COLXXII antibodies specifically decorated MTJ interdigitations (supplementary material Fig. S3E). Finally, COLXXII was detected in adult MTJs, suggesting a role for COLXXII throughout life (supplementary material Fig. S3C,D). *Col22a1* transcript was also detected in the head and the pectoral fins of 48 hpf (not shown) and 72 hpf (Fig. 1B,d) embryos, but signal was barely visible at the protein level (Fig. 1D,b). Collectively, our data identify *col22a1* as a specific marker of developing and mature zebrafish MTJs.

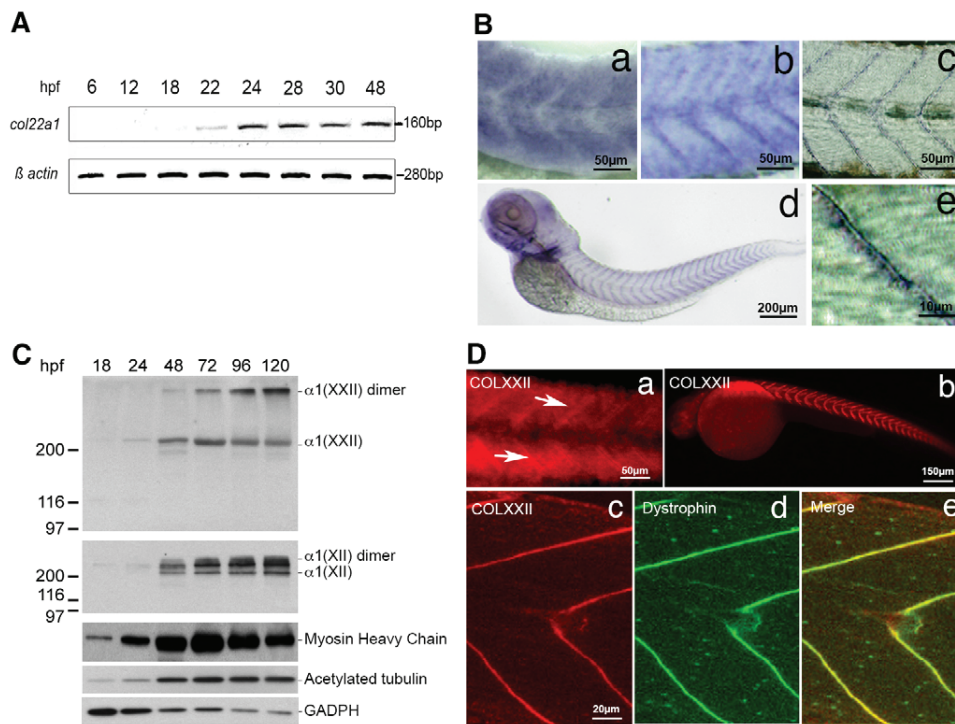


Fig. 1. Expression and distribution of zebrafish *col22a1* mRNA and protein. (A) RT-PCR analysis of zebrafish *col22a1* at different developmental stages. β -Actin was used as a loading control. (B) Whole-mount *in situ* hybridization with *col22a1* antisense probe in the trunk of 24 hpf (a), 48 hpf (b) and 72 hpf (c) embryos. Lateral view of a 72 hpf whole embryo (d) and zoomed image of a somite boundary (e). (a-e) Lateral views with anterior to the left; (a-c) somites in the posterior region of yolk extension are shown. Scale bars: 50 μ m in a-c; 200 μ m in d; 10 μ m in e. (C) Western blot with anti-COLXXII of protein extracts from animals at different stages. COLXXII and myosin heavy chain antibodies were used as collagen and late muscle differentiation marker controls, respectively. Antibodies to GAPDH and acetylated tubulin were used as loading controls. Number on the left indicate sizes (in kDa) of protein standard markers. hpf, hour post-fertilization. (D) Lateral views of whole-mount immunofluorescence staining with anti-COLXXII of 26 hpf (a) and 48 hpf (b) embryos. (a) Arrows indicate COLXXII staining that concentrated along myosepta. (c-e) Double immunostaining of a 72 hpf embryo with anti-COLXXII (c, red), dystrophin (d, green) and merge (e). Anterior is towards the left. Scale bars: 50 μ m in a; 150 μ m in b; 20 μ m in c-e.

***col22a1* knockdown leads to a muscular dystrophy-like phenotype**

To elucidate the function of COLXXII, morpholino-mediated knockdown was performed in zebrafish. The specificity and efficiency of the morpholinos targeting *col22a1* (MO22a and MO22b) was evidenced by western blotting (Fig. 2A) and immunofluorescence staining (Fig. 2B). We also examined the expression levels of collagen XII (COLXII), which is a FACIT collagen expressed in myosepta (Bader et al., 2009), in MO22-injected and uninjected embryos. We showed that COLXII protein levels (Fig. 2C) and *coll2a1a* gene expression (supplementary material Fig. S4A) did not change significantly, which is indicative of a specific effect of MO22 on the target gene. Injection of MO22a or MO22b in one- to two-cell embryos resulted in normal embryos during the first day of development. At 48 hpf, MO22a- and MO22b-injected embryos exhibited identical gross phenotype characterized by a slight (moderate phenotype) or pronounced (severe phenotype) curvature of the tail and trunk (Fig. 2C; supplementary material Table S2 for percentages of embryos in each class). The extent of inhibition of COLXXII protein expression correlated with the severity of the phenotype (supplementary material Fig. S5). The curvature phenotype became progressively more severe with time, which is indicative of the progressive nature of the phenotype (Fig. 2C, histogram). Higher magnification views of the trunk region of 96 hpf larvae revealed that, independently of phenotype severity, somites displayed abnormal U-shape morphology, which is indicative of muscle defects (Fig. 2D).

Muscle defects can correspond to defective muscle differentiation. COLXXII protein was detected from 24 hpf, a time when muscle differentiation is completed (Blagden et al., 1997). In support of this, the time-course expression of the late myogenic marker MHC was similar in MO22-injected and uninjected embryos, suggesting that muscles have differentiated normally (Fig. 2B). In addition to morphological defects, MO22-injected embryos generally failed to hatch and chorions have to be removed manually. Finally, unlike uninjected larvae (supplementary material Movie 1), MO22-injected larvae displayed swim failure and motility impairment after touch stimulation (supplementary material Movie 2). As the two sequence-independent morpholinos against *col22a1* (MO22a and MO22b) yielded identical results, we used them indifferently in all the following experiments and they will be referred as to MO22 hereafter.

The level of birefringence of the trunk muscle under polarized light is commonly used to quantify the level of muscle damage in zebrafish (Sztal et al., 2012). We thus quantified the level of birefringence in 4 dpf MO22-injected larvae with moderate phenotype and compared with larvae of the same age injected with morpholinos against *lama2* (MO-*lama2*) and *itga7* (MO-*itga7*), which have been reported to cause a dystrophic muscle phenotype (Hall et al., 2007; Postel et al., 2008). The percentage of birefringence was significantly reduced in larvae injected with MO22 ($n=10$; $P<0.001$) as for larvae injected either with MO-*lama2* ($n=10$; $P<0.05$) or MO-*itga7* ($n=10$; $P<0.001$) (Fig. 2E). Although reduction of birefringence in *col22a1* morphants was similar to that

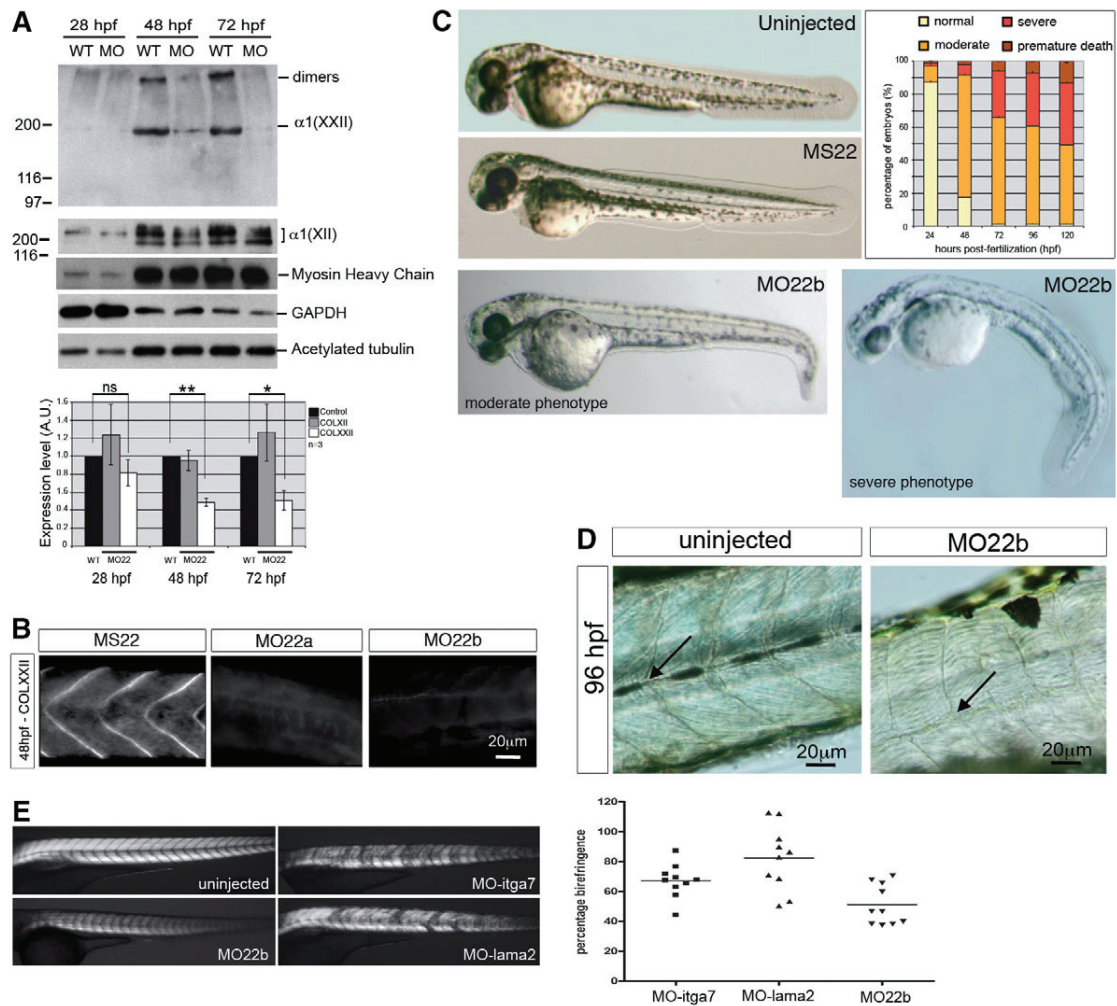


Fig. 2. Morpholino knockdown of *col22a1* in developing zebrafish. (A,B) Efficacy, specificity and functional duration of *col22a1* morpholino-knockdown in developing embryos. (A) Western blots of MO22b-injected (MO) and uninjected (WT) embryo protein extracts with antibodies to COLXXII, myoseptal marker COLXII or myosin heavy chain. Loading controls are GAPDH and acetylated tubulin. Data from one representative experiment are shown. Histogram shows densitometric quantification of relative COLXXII and COLXII expression levels normalized to acetylated tubulin. Data are mean \pm s.e.m. ($n=3$), * $P<0.05$, ** $P<0.01$. (B) Immunofluorescence with antibodies to COLXXII of 48 hpf embryos injected with MO22a, MO22b and five-base mismatch morpholino (MS22). Scale bars: 20 μ m. (C,D) Light microscopy analysis of the phenotype. (C) Representative images of 48 hpf uninjected embryos, embryos injected with control MS22, and moderate and severe phenotypes of *col22a1* morphants (MO22b). Histogram shows percentage of MO22-injected larvae displaying no, moderate or severe phenotypes at different developmental stages ($n=250$; number of injections=3). (D) U-shaped somites of 96 hpf MO-injected larvae (MO22b) compared with the V-shape somites of uninjected larvae (arrows). Scale bars: 20 μ m. (E) Birefringence of 4 dpf MO22-injected larvae. Representative images of larvae injected with morpholinos against *col22a1* (MO22, moderate phenotype), *lama2* (MO-*lama2*) and *itga7* (MO-*itga7*) compared with uninjected larvae. Quantification of birefringence measurements. Values represent mean birefringence normalized to uninjected larvae. Anterior is towards the left.

obtained with the *itga7* and *lama2* dystrophic morphants (Fig. 2E, histogram), *col22a1* morphants did not exhibit a stochastic muscle detachment phenotype, as observed in MO-*lama2* or MO-*itga7* larvae (Fig. 2E, left panel). The reduction of birefringence in MO22-injected larvae was rather caused by a general disorganization of muscles, including larger dark zones at myotome boundaries. When combined, our results showed that loss of COLXXII leads to defects that are indicative of a muscular dystrophic-like phenotype.

***col22a1* knockdown causes muscle weakness and contraction-induced fiber detachment**

The impaired swimming activity of *col22a1* zebrafish suggested defects in muscle force generation. We thus investigated the repercussions of *col22a1* knockdown on electrically evoked skeletal

muscle contractile performance at 5 dpf. Repeated twitch contractions elicited in uninjected larvae exhibited stable amplitudes (Fig. 3A). In MO22-injected larvae, the contractile force was considerably decreased and the mean amplitude of the twitch response was about eight times smaller. Given the localization of COLXXII, this muscle weakness likely resulted from reduced force transmission, although a decrease in the number of functional fibers involved in force development cannot be excluded. We indeed occasionally observed muscle detachment in morphants (Fig. 3B). Acridine Orange exclusively stained the retracted fibers, indicating that muscle fibers underwent cell death only after they detach (Fig. 3B). Histology analysis of 5 dpf MO22-injected larvae revealed cell-free spaces in myotomes (Fig. 3B), resulting from muscle fiber detachment and retraction. In addition, the myosepta

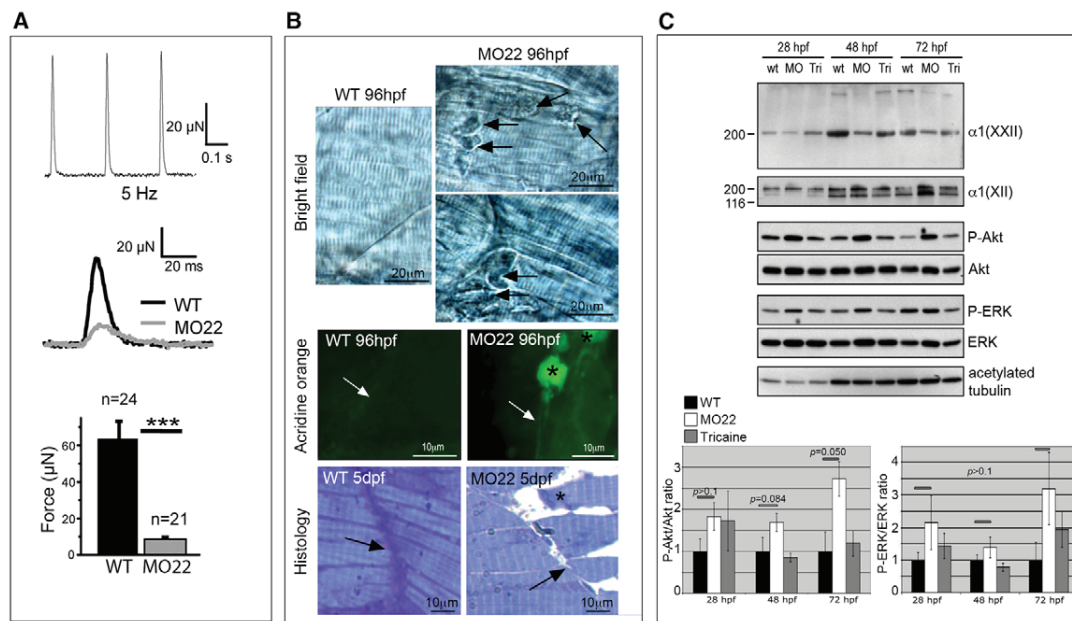


Fig. 3. *col22a1* knockdown leads to muscular dystrophic phenotype. (A) Recording of contraction in response to single supramaximal electric shocks applied to wild-type and MO-22-injected larvae. Twitch responses (middle panel) and mean contraction amplitudes (bottom panel) of 5 dpf wild-type (black) and MO22-injected (gray) larvae. Data are mean±s.e.m. *** $P < 0.001$. (B) 96 hpf uninjected (WT) and MO22-injected (MO22) larvae. Light microscopy (top panel) revealed muscle detachment and retraction (MO22, arrows) from vertical myoseptum. Acridine Orange staining (middle panels): asterisks point to Acridine Orange-positive retracted muscle fibers in MO22 and arrows indicate myoseptum. Histology (bottom panels) of MO22 shows cell-free spaces, reduced MTJ interdigitations (arrows) and clear appearance of myosepta compared with WT. Asterisk indicates a detached and retracting muscle fiber. (C) Western blots with antibodies to phospho-Akt (P-Akt) and total Akt protein (Akt) or phospho-ERK1/2 (P-ERK1/2) and total ERK protein (ERK1/2) of extracts from uninjected (wt) and tricaine-treated (Tri) wild-type and MO22-injected (MO) embryos at different stages. Loading controls are antibodies to COLXXII and acetylated tubulin. Data from one representative experiment are shown. Only one band is detected with ERK1/2 antibodies, as reported for zebrafish (Ng et al., 2012). Histograms show densitometric quantification. Phospho-protein levels were normalized against total protein levels. Data are mean±s.e.m. ($n=3$).

and MTJ displayed perturbed morphology. The myosepta appeared larger and exhibited a clear appearance and the MTJs had lost their interdigitations (Fig. 3B), two structural defects that may also cause muscle weakness. Collectively, these data indicate that COLXXII is crucial for force development, and the integrity and maintenance of muscle attachments.

***col22a1* knockdown leads to increased phosphorylation of the survival factor Akt**

An increase in the phosphorylation of the survival factors Akt (Peter and Crosbie, 2006; Kim et al., 2011) and ERK (Boppart et al., 2011) was reported in dystrophic skeletal muscles and interpreted as a compensatory mechanism that counteracts muscle waste. We therefore investigated the activation of Akt and ERK in skeletal muscles of decapitated and de-yolked MO22-injected and wild-type embryos. Because mechanical forces have also been reported to induce Akt and ERK activation (Mohamed et al., 2010), in parallel with uninjected embryo controls, we raised wild-type embryos under anesthetizing (tricaine) conditions to inhibit muscle contractions. Contrary to controls, phosphorylation of Akt (P-Akt) significantly increased in MO22-injected embryos when substantial increase of embryo movement occurs within chorion (48 hpf) and at time of hatching (72 hpf) (Fig. 3C). We also detected similar elevation of the levels of ERK phosphorylation (P-ERK) though not significant (Fig. 3C). Unexpectedly, a decrease in COLXXII levels was observed in embryos treated with tricaine that was comparable with the reduction observed in 72 hpf MO22-injected embryos (Fig. 3C), suggesting that mechanical stress can regulate COLXXII. Hence,

our data show that the reduction of COLXXII expression does not activate Akt when embryos are raised under anesthetic that suppresses contractile activity and the incidence of muscle injury. Instead, in unanesthetized embryos, knockdown of COLXXII expression caused contraction-induced muscle damage that resulted in a compensatory mechanism promoting cell survival through Akt activation. Similar results were obtained for p-ERK (Fig. 3C). In conclusion, contraction-induced injury is responsible for the activation of Akt in morphant skeletal muscles, most likely to compensate for muscle waste induced by COLXXII deficiency.

COLXXII is required for strengthening MTJ stability at the junctional extracellular matrix

To determine the origin of muscle weakness and to detail the site of rupture leading to muscle fiber detachment, we next examined, using transmission electron microscopy (TEM), the ultrastructure of skeletal muscle of morphants. In agreement with the above western blot data that showed normal MHC expression (Fig. 2A), we did not detect any changes in the ultrastructure of the contractile system and triadic structures of morphants (Fig. 4B) when compared with uninjected larvae (Fig. 4A). Thus, lack of COLXXII did not prevent muscle fiber formation and differentiation. Sarcolemma was tightly associated to the junctional BM in MO22-injected larvae (Fig. 4D). As in controls (Fig. 4C), the BM formed a continuous layer, although, in some areas, its thickness appeared irregular (Fig. 4D). Remarkably, and in support of our histology data (Fig. 3B), MTJs lacked almost completely sarcolemmal folding in MO22-injected larvae (compare Fig. 4D with control in 4C). In addition, morphant

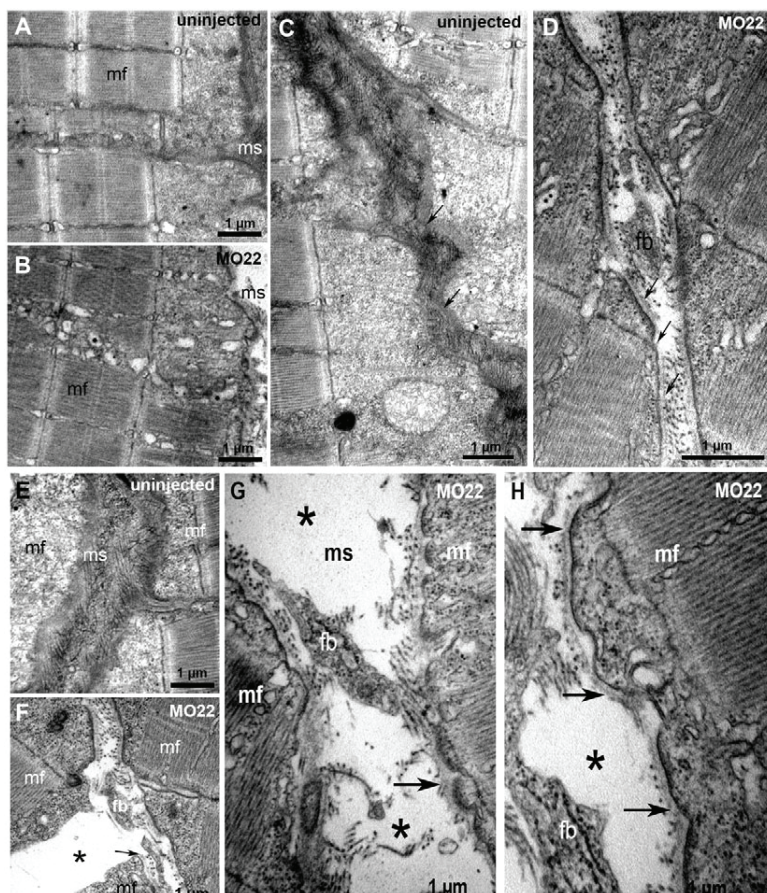


Fig. 4. TEM reveals defects in MTJ and myosepta ultrastructure, and identifies the rupture site at the outer surface of the basement membrane. Micrographs of 5 dpf uninjected (A,C,E) and MO22-injected (B,D,F-H) larvae. (A,B) Sarcomeric organization of skeletal muscle in morphants (B) and uninjected larvae (A). (C,D) Detail of the sarcolemma and basement membrane structure (arrows) in wild type (C) and morphants (D). (E-H) Detail of MTJ and myosepta structure in wild type (E) and morphants (F-H). Asterisks show a gap corresponding to detached and retracted fiber (F) and tears between myosepta and muscle fibers (G,H). At rupture sites, basement membrane remains attached to sarcolemma (G,H, arrows) and is torn away with fiber detachment and retraction (F, arrow). Contrary to control (E), fibroblasts (fb) are observed in damaged myosepta (F-H). ms, myosepta; mf, muscle fiber.

myosepta showed substantial ultrastructural defects. Wild-type myosepta consist of tightly packed collagen fiber bundles with an oblique arrangement (Fig. 4C,E). By striking contrast, myosepta of MO22-injected larvae appeared distended with sparse unorganized collagen fibrils, even in the absence of muscle cell detachment (Fig. 4D,F). In agreement with the reduced fibril density observed in morphant myosepta, qRT-PCR analysis of *coll1a* (encoding the fibril-forming collagen I) expression revealed progressive downregulation as embryos developed (supplementary material Fig. S4B). In addition, unlike controls (Fig. 4C,E), damaged myosepta contained numerous fibroblasts (Fig. 4D,F-H). Triple immunofluorescence staining with antibodies to the myoseptal marker COLXII confirmed that loss of COLXXII affects the structure of myosepta that appeared widened, distorted and irregular, and contained numerous Hoechst-positive elongated cells (compare Fig. 5B with control in 5A). Finally, F-actin staining revealed that instead of being regularly packed (Fig. 5A), muscle fibers of morphants appeared twisted and slack (Fig. 5B). Our data imply that damaged myosepta and MTJ may not be stiff enough to function optimally, resulting in a reduced tensile strength and defective muscle fiber packing.

Numerous tears (Fig. 4G,H) were observed in the vertical myosepta of MO22-injected larvae. The BM remained firmly attached to sarcolemma but interactions with the myoseptal collagen fibrils were disrupted (Fig. 4G,H). Accordingly, when muscle fiber has detached (Fig. 4F), an interruption of the BM was observed at the rupture site, indicating that the BM has retracted with the muscle fibers (Fig. 4F). We next performed confocal double

immunostaining with antibodies to the BM component laminin and to the sarcomeric α -actinin to examine whether laminin epitopes retract with detached fiber ends (Fig. 5C,D). Laminin antibodies primarily stained the MTJ of uninjected (Fig. 5C) and MO22-injected (Fig. 5D) larvae but the MTJ in MO22-injected larvae appeared distorted and irregular (Fig. 5D). In accordance with TEM observations, we observed that laminin epitopes retracted with detached fiber ends (Fig. 5D), indicating that BM component laminin remained associated with sarcolemma when muscle fibers detach and retract. In all, these results indicate that loss of COLXXII alters the interactions between muscle BM and myoseptal collagen fibrils at MTJ, predisposing to muscle cell detachment.

COLXXII functionally and structurally interacts with integrin α 7 β 1 linkage system

The attachment of muscle fibers to ECM is mainly mediated by the integrin α 7 and dystrophin-glycoprotein complex (DGC). In skeletal muscle, the BM component laminin α 2 interacts with DGC α -dystroglycan and integrin α 7 β 1, and thereby connects sarcolemma to ECM. Given similarities of their localization at the MTJ and phenotypes (impaired motility behavior, defective MTJ, reduced mechanical stability), we hypothesized that COLXXII may interact with transmembrane or extracellular components of the major linkage systems, such as the integrin α 7 (*itag7*), laminin α 2 (*lama2*) and/or α -dystroglycan (*dag1*). COLXXII belongs to the FACIT subset of the collagen family, the members of which are characterized by their capacity to mediate protein-protein interactions (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). To determine

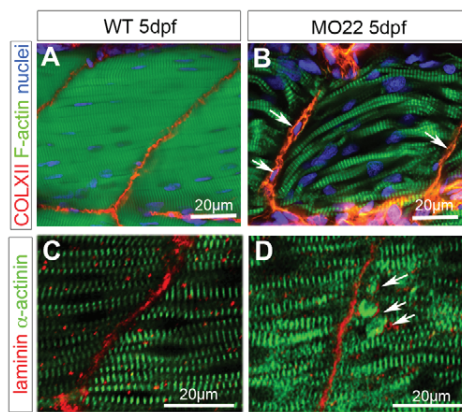


Fig. 5. Whole-mount confocal immunofluorescence. (A,C) Uninjected wild-type (WT) and (B,D) MO22-injected (MO22) larvae at 5 dpf stained with (A,B) anti-COLXXII (red), F-actin (green) and Hoescht solution (blue); and (C,D) laminin (red) and α -actinin (green) antibodies. (A,B) MO22-injected myosepta (B) contain numerous Hoechst-positive cells (blue, arrows). (C,D) Arrows in D indicate laminin epitope (red) retraction with detached muscle cells (green) in MO22-injected larvae.

whether COLXXII is a novel player of one or both of the linkage systems, we conducted gene interaction assays as described (Carney et al., 2010) (Fig. 6). For that, we first determined sub-phenotypic doses of morpholinos against each gene and injected MO22 and MO-*itga7*, MO-*lama2* or MO-*dag1* into one-cell embryos at the indicated doses, either alone or in combination, and assessed the occurrence of muscle fiber detachments in injected embryos at 72 hpf (Fig. 6). Only a few embryos (from 0 to 20%) displayed muscle detachment phenotype when morpholinos were injected individually at low doses (Fig. 6A-C). When combined, sub-phenotypic doses of MO22 and MO-*itga7* dramatically increased the percentage of embryos with muscle detachment (Fig. 6A), whereas co-injection of MO22 with MO-*dag1* failed to substantially compromise muscle attachment (Fig. 6C). In accordance with previous work demonstrating that laminin $\alpha 2$ interacts both with integrin $\alpha 7\beta 1$ and dystroglycan, synergistic interactions were similarly observed upon injection of MO-*lama2* with either MO-*dag1* or MO-*itga7* (Fig. 6D). Besides, co-injection of MO22 and MO-*lama2* had lower effect (Fig. 6B) than combination of MO22 and MO-*itga7* (Fig. 6A), suggesting that additional laminin isoforms may be involved in muscle attachments. Overall, our data suggest that zebrafish COLXXII primary interacts with the integrin $\alpha 7$ linkage complex.

The dystrophic phenotype is rescued by micro-injection of human COLXXII protein

The next issue we addressed was whether zebrafish and human COLXXII are functionally equivalent. For that, we performed protein rescue of the MO22-injected embryo phenotype with the human recombinant protein COLXXII (hCOLXXII) produced and purified as described (supplementary material Fig. S6). One-cell stage embryos were co-injected with purified hCOLXXII and 0.5 pmol MO22 and compared with uninjected larvae and with larvae injected with hCOLXXII or MO22 alone. A significant rescue of the phenotype was achieved by co-injecting 0.16 ng of the human COLXXII with 0.5 pmol of MO22, as judged by their morphology (Fig. 7A-C, Table 2) and ability to respond to touch-evoked stimulations (supplementary material Movie 3). As controls, different combinations of co-injections were performed. Injections

($n=3$) of recombinant human collagen V (Bonod-Bidaud et al., 2007) with MO22 or hCOLXXII with 0.5 pmol morpholinos for the cartilaginous collagen XI (Baas et al., 2009) had no impact on the phenotype rescue (4% of unaffected embryos, $n=150$; 11% of unaffected embryos, $n=150$, respectively). Challenging the MO22-injected larvae with repeated electric shocks led to a considerable increase of the severity of the muscle phenotype (Fig. 7E), but had almost no effect on myotome integrity of larvae co-injected with MO22 and the human COLXXII protein (Fig. 7F) as for wild type (Fig. 7D). TEM examination of the skeletal muscle of MO22-injected larvae confirmed the above TEM observations: distended myosepta with sparse collagen fibrils, strong reduction of the sarcolemma folds and loose muscle attachments (Fig. 7H). By contrast, skeletal muscle fibers, MTJs and myosepta of MO22/hCOLXXII-co-injected larvae (Fig. 7I) appeared similar to uninjected larvae (Fig. 7G) though subtle differences in myoseptal collagen fibril density and MTJ folds persisted. In all, the rescue experiments provide evidence for a conserved function of COLXXII in humans.

DISCUSSION

In this study, we have cloned and characterized the zebrafish *col22a1* and shown that its protein product COLXXII, expressed primarily by skeletal muscle, is a component of developing and mature MTJ. The spatio-temporal expression profile of *col22a1* is compatible with a function in the stabilization of muscle attachments. First, COLXXII protein was detected in myotomes when fast muscle cells have already elongated and attached to vertical myosepta (Blagden et al., 1997; Henry et al., 2005; Snow and Henry, 2009; Charvet et al., 2011). Second, as embryos developed, *col22a1* transcript strictly localized at trunk and tail muscle fiber ends where they attach to myosepta and the protein was deposited at the MTJ. Expression of COLXXII in mouse embryos has not been reported yet. However, *col22a1* mRNA expression and protein distribution in perinatal and adult mice are consistent with our data (Koch et al., 2004). Third, levels of transcript and protein rose considerably when skeletal muscle contractions increased within chorions and then at hatching, suggesting that expression is regulated by mechanical stress as reported for the sarcomeric protein Tcap (Zhang et al., 2009). In support of this assumption, treatment of embryos with anesthetic reduced COLXXII levels significantly.

Knockdown of COLXXII resulted in a gross phenotype similar to that previously reported for the ‘dystrophic’ class of mutants *sapje* (*sap*, dystrophin), *candyfloss* (*caf*, laminin $\alpha 2$), *lost-contact* (*loc*) also called *ilk* (integrin-linked kinase), *patchytail* also called *dag1* (dystroglycan) (Bassett et al., 2003; Hall et al., 2007; Postel et al., 2008; Gupta et al., 2011), and *itga7* (integrin $\alpha 7$) morphants (Postel et al., 2008), all components of the muscle linkage systems present at the MTJ. Although *col22a1* morphants display a dystrophic phenotype, muscle lesions observed in *col22a1* morphants were considerably less severe than in the *caf/lama2* and *loc/ilk* mutants for which massive muscle detachment was observed in individual somites (Hall et al., 2007; Postel et al., 2008). Muscle fiber detachment occurred spontaneously in some *col22a1* morphants but was greatly enhanced when morphants were challenged with high-frequency electrically elicited contractures or with repeated touch-evoked stimuli. Nevertheless, COLXXII knockdown led to a highly significant reduction of muscle force. Because of the apparent integrity of the muscle fiber contractile apparatus, as judged by TEM, confocal microscopy and expression of the late muscle differentiation MHC marker, muscle weakness of *col22a1*

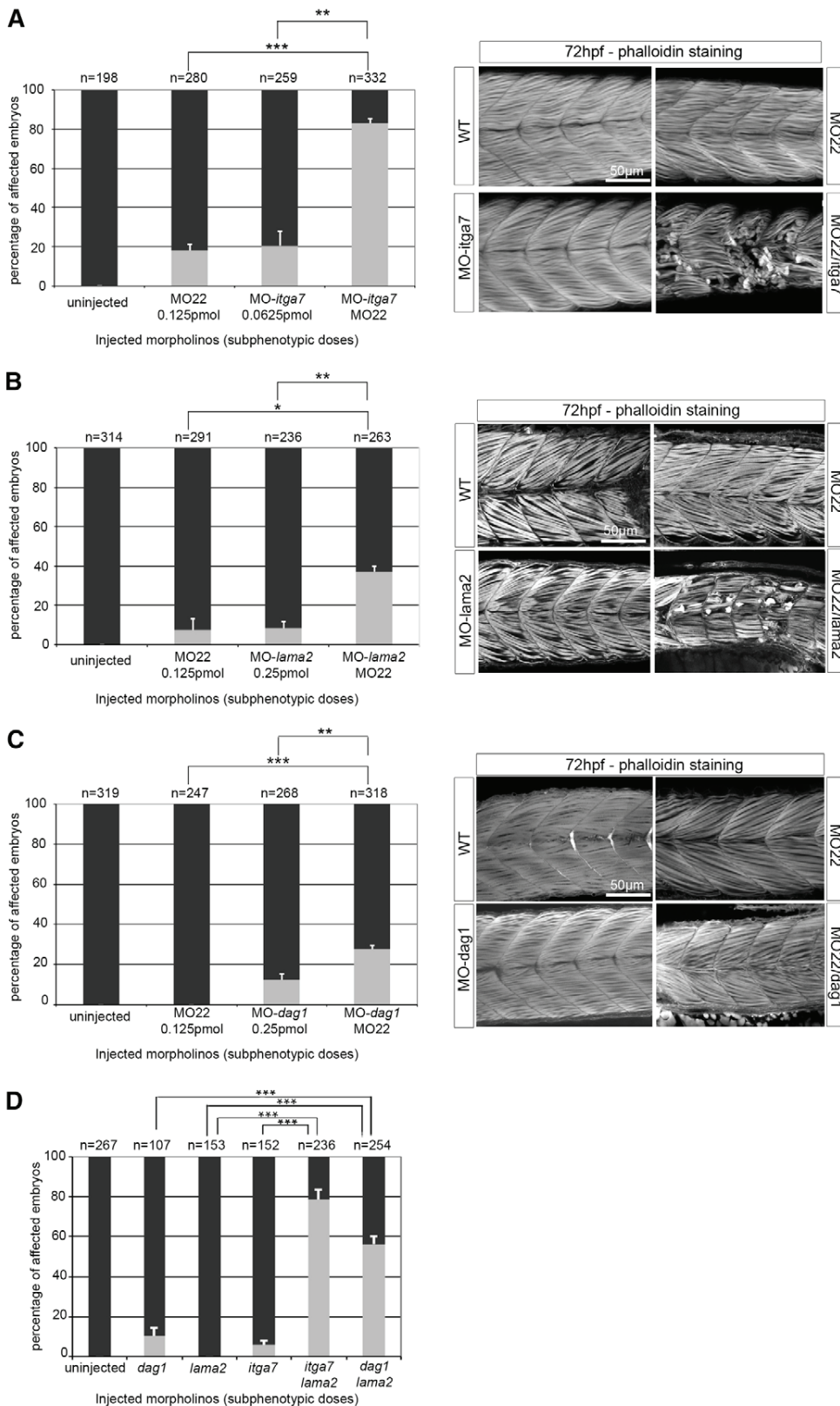


Fig. 6. Genetic interaction between *col22a1* and *itga7*. Synergistic genetic interactions between zebrafish *col22a1* (COLXXII) and *itga7* (integrin $\alpha7\beta1$) (A), *lama2* (laminin $\alpha2$) (B) or *dag1* (dystroglycan) (C), and between *lama2* and *itga7* or *dag1* (D), and mean frequencies of muscle detachment phenotype observed in morphants. Images show lateral views of 72 hpf embryo tail musculature stained with phalloidin-rhodamine after injection, alone or in combination, of sub-phenotypic doses of morpholinos against *col22a1*, *itga7* (A), *lama2* (B) and *dag1* (C). Scale bars: 50 μ m. Data are mean \pm s.e.m. (n=3). ***P<0.001; **P<0.01.

morphants was instead attributable to a reduction of force transmission capacity together with fiber detachment that contributed to reduced number of contracting fibers. In accordance with this line of reasoning, myosepta of *col22a1* morphants

exhibited loosely packed and low-density collagen fibrils compared with the densely packed collagen fibrils of wild-type myosepta, likely causing tissues to respond inefficiently to contractile force and vulnerability to mechanical stress. TEM examination of the

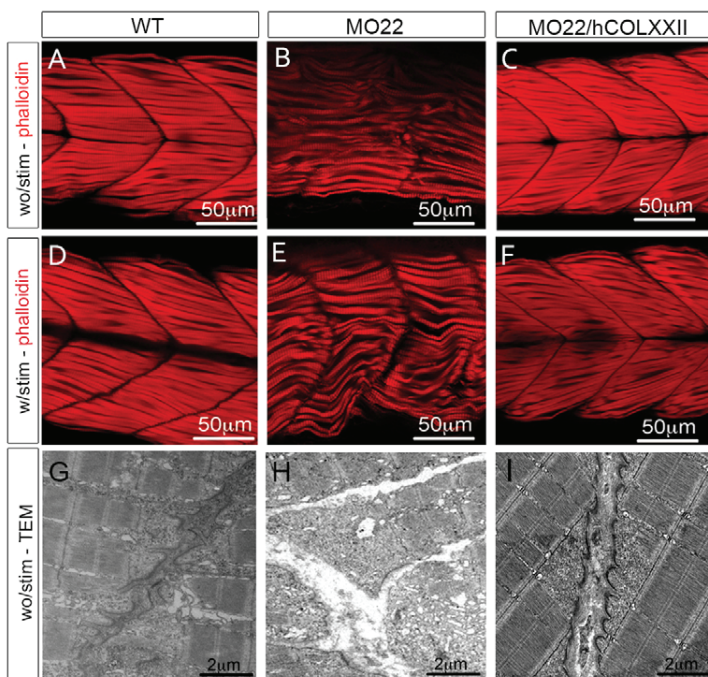


Fig. 7. Protein rescue of MO22-injected embryos. (A-F) 72 hpf and (G-I) 5 dpf uninjected (WT) and embryos injected with 0.16 ng hCOLXXII protein, with 0.5 pmol MO22 or in combination (MO22+hCOLXXII). (A-F) Whole-mount fluorescence staining with phalloidin-rhodamine of embryos stimulated (w/stim, D-F) or not (wo/stim, A-C) with high-frequency field. (G-I) TEM micrographs of skeletal muscle at 5 dpf. Scale bars: 50 μ m in A-F; 2 μ m in G-I.

dystrophic mutants *patchytail/dag1* (Gupta et al., 2011) and *soft/lamb2* mutants (Jacoby et al., 2009) also revealed noticeable defects in myoseptal structure. In addition to myoseptal defects, a strong reduction of sarcolemma folds at the MTJ was observed in *col22a1* morphants, as reported in mice models for muscular dystrophy, such as in *itga7*-null mice (Miosge et al., 1999), *mdx* mice (Law and Tidball, 1993; Law et al., 1995) and the double mutants *mdx/itga7^{-/-}* and *itga7/utr^{-/-}* (utrophin) (Rooney et al., 2006; Welser et al., 2009), but not reported in any of the zebrafish dystrophic class mutants. Reduction of MTJ folds and lack of myoseptal stiffness may also compromise force transmission and likely contributed to fragile muscle attachments. A unique feature of the *col22a1* morphants was the presence of numerous fibroblasts in damaged myosepta. Fibroblasts that are high producers of fibrillar collagens may have been recruited to repair the damaged myosepta, as reported in the tendon-healing process (Wang, 2006). Taken together, our results show that COLXXII contributes to the stabilization and maintenance of muscle attachments and efficient transmission of contractile forces.

Because the onset of COLXXII expression occurred at 24 hpf when the formation/maturation of BM is not completed (Charvet et al., 2011), one can expect that lack of COLXXII would affect junctional BM formation. However, *col22a1* morphants displayed a continuous BM, though irregular in thickness, suggesting that COLXXII is involved in BM maturation but not required for BM

initial assembly. Similarly, no ultrastructural defects were reported in junctional BM in absence of perlecan (Zoeller et al., 2008) or laminin $\alpha 2$ (Hall et al., 2007), though the two proteins are major BM components. With TEM, we demonstrated that muscle detachment occurs at junctional extracellular matrix, between the outer surface of BM and the adjacent myoseptal collagen fibers. This result is consistent with the immunogold localization of COLXXII at the outer surface of mouse skeletal muscle BM (Koch et al., 2004).

Interestingly, we showed that muscle detachment is accompanied by induction of Akt signaling pathway. Elevated Akt signaling was found in skeletal muscle in dystrophic mouse models and in individuals with muscular dystrophy (Peter and Crosbie, 2006). Akt treatment of *mdx* mice counteracted muscle wasting by promoting muscle regeneration (Kim et al., 2011). In addition, compensatory increased $\alpha 7\beta 1$ integrin levels in dystrophin-deficient mice were found to confer a protective effect in dystrophic muscle through the activation of ILK/Akt signaling pathway (Boppart et al., 2011). Elevated Akt activation in *col22a1* morphants can thus represent a compensatory response to counteract muscle injury in zebrafish.

In line with the aforementioned role of COLXXII in the stabilization of muscle attachments and given the phenotype similarities to dystrophic mutants, we assessed the *in vivo* contribution of COLXXII in DGC and/or integrin linkage systems by conducting *in vivo* synergistic interactions. The synergistic interactions data point to a role of COLXXII in stabilizing muscle

Table 2. Muscle phenotypes in treated embryos

Injection	Number of injections	Number of embryos	Phenotype (%)		
			Wild type	Muscle detachment	Other
None	3	250	99	0	1
MO22	3	350	4	90	6
hCOLXXII	3	250	86	0	14
MO22 + hCOLXXII	3	500	86	9	5

Percentage of uninjected embryos and embryos injected embryos with 0.5 pmol MO22 or 0.16 μ g hCOLXXII alone or in combination (MO22+hCOLXXII) that display muscle phenotype (without stimulation) as scored visually under a stereoscope.

attachment through the integrin $\alpha7\beta1$ linkage system. This is not surprising because, as a FACIT collagen (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005; Veit et al., 2006; Agarwal et al., 2012), COLXXII is well suited to engage molecular interactions and to incorporate protein complexes. Recently, we showed that the FACIT collagen XIV participates to epidermal-dermal cohesion in developing zebrafish (Bader et al., 2013). However, whether COLXXII binding to integrin is direct or indirect is questionable. Although we cannot exclude a direct interaction with integrin, because recombinant human COLXXII was reported to interact with $\alpha2\beta1$ integrin-expressing cells (Koch et al., 2004), the fact that disruption occurred external to BM without compromising sarcolemmal integrity supports an indirect interaction. However, co-injection of sub-phenotypic doses of *col22a1* and *lama2* morpholinos elicited weaker phenotype than that generated with co-injection of *col22a1* and *itga7* morpholinos. In addition, although *lama2* was shown to participate in both DGC and integrin linkage systems, double injection of *dag1* and *col22a1* morpholinos at subphenotypic doses revealed that COLXXII does not primary participate to the DGC. These results suggest that, in addition to laminin $\alpha2$, COLXXII may interact with $\alpha7\beta1$ through binding to another laminin isoform. Indeed, developing myotomes express several isoforms (Sztal et al., 2011) and epistasis experiments in zebrafish suggest that different laminin isoforms contribute to muscle attachments and integrity (Sztal et al., 2012). Knockdown of *lama4* or *itga7* resulted in a loss of ILK at the MTJs, which provides evidence that laminin $\alpha4$ is also involved in muscle attachments (Postel et al., 2008). Collectively, our results suggest that COLXXII is a constitutive protein of the transmembrane $\alpha7\beta1$ linkage system that connects BM to the myoseptal extracellular matrix at the MTJ.

The specialized ECM that surrounds muscle cells as they differentiate is thought to play an important role in the formation, maintenance and integrity of muscle. Supporting this assumption, the number of causative extracellular matrix genes associated with muscular dystrophies is expanding (Lisi and Cohn, 2007). Zebrafish represent an excellent model for this group of disorders as *sap*, *caf* and *patchytail* mutants, and morphants in *itg7a*, display compromised muscle attachments that result in muscular dystrophies of various severities (Ingham, 2009) and also for understanding collagen function (Pagnon-Minot et al., 2008; Baas et al., 2009; Bader et al., 2013). The dystrophic phenotype of the *col22a1* morphants and its rescue with injection of the human recombinant protein together with the high sequence conservation between the zebrafish *col22a1* gene and their vertebrate homologs, strongly support a conserved role of COLXXII in humans and qualifies COL22A1 as a candidate gene for muscular dystrophies in humans. Further research should therefore concentrate on the investigation of mutations in COL22A1 gene in defined groups of individuals with unresolved cases of muscular dystrophies.

MATERIALS AND METHODS

Zebrafish strain, maintenance and specific treatments

AB/TU wild-type maintenance, embryo collection and staging were carried out at the zebrafish facilities using established protocols (Bader et al., 2009) (PRECI, SFR Lyon Biosciences Gerland). The developmental stages are given in hours post-fertilization (hpf) and days post-fertilization (dpf) at 28.5°C, according to morphological criteria. From 24 hpf, embryos were treated with phenylthiourea (Sigma P7629) to prevent pigmentation. To prevent muscle contraction, embryos were treated with tricaine as described previously (Renaud et al., 2011). Embryos were raised in Danieau solution containing 0.008% tricaine from 10 hpf onwards and replaced every 24 hours.

col22a1 cloning and RT-PCR

Zebrafish total RNA was isolated from 24 hpf embryos using TRIZOL reagent (Invitrogen) and reverse transcribed with SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies) and oligo(dT)₁₅. Full-length zebrafish *col22a1* was PCR amplified with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) using specific primers (supplementary material Table S1). The PCR product was gel purified and cloned into pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen). The sequence obtained was submitted to the EMBL Sequence Nucleotide Database and registered under the accession number HE_981211.

For standard RT-PCR, total RNA was reverse transcribed with M-MLV reverse transcriptase and random primers (Promega). PCR reactions were performed with taq polymerase (New England Biolabs) and *col22a1* VWA, *col22a1* COL4, *col22a1* NC3 and β -actin primers (supplementary material Table S1).

qRT-PCR

First-strand cDNA was prepared as described above and amplified by PCR using FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) mix (Roche) and specific primers (supplementary material Table S1) using a C1000 Thermal cycler with a CFX96 Real-Time system (Biorad). *beta-actin*, *polr2d*, *thp* were selected as housekeeping genes using BESTKEEPER (Pfaffl et al., 2004) and used for normalization. Relative transcript abundances were determined as described previously (Pfaffl, 2001). Student's *t*-tests were used to determine statistical significance ($n=4$).

Whole-mount *in situ* hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization was performed as described previously (Bader et al., 2009). Probes were amplified from 24 hpf zebrafish cDNA using *col22a1* VWA and *col22a1* TSPN primers (supplementary material Table S1). Stained embryos were observed with a stereomicroscope or a macroscope (all from Leica) equipped with a digital camera.

Morpholino knockdown

Two morpholinos targeting non-overlapping sequences upstream to the *col22a1* start codon (MO22a 5'-CATGAAGTTGCTGCTCCTGTGGAGA-3', MO22b 5'-CCTGAGCCCAAATCGAACTCCATC-3'), and a control mismatch morpholino (MS22 5'-CCTCAGGCCAAATGGAAA-ATCAATC-3') were purchased from Gene Tools (OR, USA) and 0.5 pmol were injected into one- to two-cell embryos as described previously (Pagnon-Minot et al., 2008). Unfertilized eggs were removed at 3 hpf and 50 to 200 embryos were then kept for gross phenotype analysis and remaining eggs were processed as described below.

For gene interaction assays, the integrin $\alpha7$ -ATG morpholinos (MO-*itga7*) (Postel et al., 2008), laminin- $\alpha2$ -MO (MO-*lama2*) (Pollard et al., 2006), dystroglycan-MO (MO-*dag1*) (Parsons et al., 2002) were used. Sub-phenotypic doses determined for each morpholino (0.0625 pmol for MO-*itga7*, 0.125 pmol for MO22a, 0.25 pmol for MO-*dag1* and MO-*lama2*) were used for co-injection into one-cell stage embryos. Morphological and phenotypic observations of morphants were performed with a stereomicroscope or a light microscope (all from Leica) equipped with a digital camera. Muscle detachment was scored when at least one somite was affected.

Immunostaining and antibodies

Whole-mount staining was performed as described (Bader et al., 2009). Stained embryos were observed with a Zeiss LSM510 or a Leica SP5 spectral confocal microscope. Images were processed using Adobe Photoshop and ImageJ softwares. For adult fish, frozen samples were embedded in OCT and immunostaining was performed on cryosections.

Rabbit polyclonal antibodies to zebrafish COLXXII were generated as follows. The N-terminal sequence of collagen XXII was amplified using zebrafish cDNA using degenerated primers (forward, 5'-GAYCTGGYCTTYMTCCTGGACAC-3'; reverse, 5'-ACRTGGAAGA-CRTGNGCNSWCTT-3'). The sequence was 100% identical to NW_003336732.1. For the generation of the recombinant VWA zebrafish domain, the coding sequence was amplified (forward, 5'-

CACGCTAGCCAAAGAGCAGGTTGTAAGAACGTCC-3'; reverse, 5'-GTGGGATCCTTACCTGATCTTGTGCGATGGCGTCAAAG-3' primers) and cloned into our PCEP (Invitrogen) modified expression vector. Underlined nucleotides are, respectively, the *NheI* and *BamHI* cloning sites. The production of polyclonal antibodies was performed as described previously (Bader et al., 2009). The following primary and secondary antibodies were also used: antibodies to zebrafish collagen XII $\alpha 1$ (COLXII) (1:200) (Bader et al., 2009); anti-dystrophin (MANDRA-1) from Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, USA) (1:150), anti- α -actinin (A7811) and rabbit anti-laminin (L9393) from Sigma (1:800 and 1:400, respectively); anti-guinea pig IgG Ab coupled to Cy2 and to Cy3 (1:200); anti-rabbit and anti-mouse IgG coupled to Alexa488 (1:500); anti-rabbit IgG coupled to Alexa546 (all from Invitrogen) (1:500). Nuclei were stained with Hoechst solution and F-actin with fluorescent phalloidin conjugates (Sigma).

Birefringence assay

One-cell embryos were injected with 0.25 pmol MO-*itga7*, 0.5 pmol MO-*lama2* or 0.5 pmol MO22. Uninjected and morpholino-injected 4 dpf zebrafish larvae were anesthetized with tricaine, mounted in 1% low melting agarose on a glass slide, placed between two polarizers (3Dlens, Taiwan) and observed with a Leica microscope equipped with a coolSNAP CCD camera. The mean gray value of pixels in the trunk region was measured with ImageJ software. Values are expressed as the percentage of uninjected larvae \pm s.e.m. ($n=10$). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test (GraphPad Prism Software).

Histology and TEM

Zebrafish larvae were processed as previously described (Charvet et al., 2011). Thin sections stained with Methyl-Azur blue were observed with a light microscope (Leica) equipped with a digital camera (Nikon). Ultrathin sections were observed with a Phillips CM 120 electron microscope equipped with a Gatan digital CCD camera at the Centre Technique des Microstructures (UCBL, Villeurbanne, France).

Muscle contraction measurements

Procedure was adapted from Dou et al. (Dou et al., 2008). Zebrafish larvae were anesthetized with 0.017% tricaine and the head was crushed. Larvae were then bathed in a solution containing (in mM) 140 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES (pH 7.2). The tail was stuck to the bottom of the dish using a small pin while the head was hung on the extended arm of an AE801 force transducer mounted on a micromanipulator that allowed length adjustment. The whole fish musculature was stimulated by applying electric field pulses of 0.5 ms duration using two electrodes placed on either side of the fish. In each larva tested, the voltage was progressively augmented to give maximal twitch response and the voltage selected for investigating maximal force was then further increased by 20%. The larvae were gradually stretched from a resting length up to an optimal length, giving maximal force signal in response to stimulation. The contraction amplitude was measured at the peak of the force signal.

Protein extraction and western blot analyses

Embryos (30/stage/experiment) were sacrificed and yolks and head were discarded. Specimens were then frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Embryos were lysed in 50 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 1% SDS, 10 mM sodium fluoride and 1 mM sodium orthovanadate containing a protease inhibitor cocktail (Complete EDTA-free, Roche). Total extracts were sonicated and 10 μg of proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. Immunological detection was performed with HRP-conjugated secondary antibodies using Immuno-Star WesternC as a substrate (Bio-Rad). The primary antibodies were: rabbit monoclonal anti-phospho-Ser473 Akt (193H12) (1:1000), rabbit polyclonal anti-Akt (1:2000), rabbit monoclonal anti-phospho-Thr202/Tyr204 Erk1/2 (197G2) (1:1000), rabbit monoclonal anti-Erk1/2 (137F5) (1:2000) and rabbit monoclonal anti-GAPDH (14C10) (1:10,000) (Cell Signaling Technology); mouse monoclonal anti-myosin

heavy chain antibody (F59, DSHB) (1:100); and mouse monoclonal anti-acetylated tubulin antibody (6-11B-1, Sigma) (1:10,000). Band intensities were quantified using ImageJ software and Student's *t*-test was used to determine statistical significance.

Touch-evoked escape behavior assay

Live 5 dpf fishes were placed in Danieau buffer. The motility of larvae after stimulation by tail touch was recorded using a macroscope (Macro-Fluo, Leica) with a digital camera system.

Protein rescue

Protein rescue was performed as previously described (Zoeller et al., 2008). Purified recombinant human full-length COLXXII was prepared as previously described (Koch et al., 2004). Recombinant proteins, human COLXXII or human collagen V domain as control (Bonod-Bidaud et al., 2007), were injected in embryos either alone or in combination with morpholino (0.5 pmol) MO22 or *coll11a1* morpholinos as control (Baas et al., 2009) as described above. Fifty to 200 embryos were kept for gross phenotype analysis; 5 and 10 larvae were processed for TEM and phalloidin-rhodamine staining respectively.

Acknowledgements

We thank Laure Bernard (PRECI) for fish maintenance and Christophe Chamot (PLATIM) for expert image analysis (SFR Lyon-Biosciences-Gerland), the 'Centre Technique des Microstructures' (UCBL, Villeurbanne) for technical assistance with transmission electron microscopy and Pauline Nauroy for sharing qRT-PCR primers.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

B.C. performed and analyzed all experiments reported in Fig. 1A,B,D, Fig. 2B-D, Fig. 3A,B, Fig. 5 and Fig. 7; A.G. performed and analyzed all experiments reported in Table 1, Fig. 1C, Fig. 2A, Fig. 3C and all experiments reported in supplementary material Fig. S1, Fig. S2, Fig. S3B and Fig. S5. M.M. performed and analyzed experiments reported in Figs 4 and 6 and contributed to some experiments in Figs 5 and 7 and supplementary material. D.Z. and J.S. produced and characterized antibodies against zebrafish collagen XXII and the recombinant proteins and contributed to experiments reported in supplementary material Figs S3 and S6. E.G. contributed to some experiments reported in Fig. 6 and subsequent data analysis. S.B. designed, performed and analyzed the experiment reported in Fig 2E. H.L.B. and C.M. contributed to Fig. 1B and Fig. 3C, respectively. B.A. designed, supervised and analyzed all experiments reported in Fig. 3A. M.K. designed and supervised production of antibodies and recombinant proteins and subsequent data analysis. B.C., A.G., B.A. and M.K. helped with manuscript editing and critical review. F.R. supervised all experimental design, analyzed all data and wrote the manuscript.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche [10BLAN121901], by the Région Rhône-Alpes (Cible) and Association Française contre les Myopathies [MNM1-2010] to F.R.; by the Köln Fortune Programm to M.K. and D.Z.; and by the Fondation pour la Recherche Médicale to B.C.

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.096024/-/DC1>

References

- Agarwal, P., Zwolanek, D., Keene, D. R., Schulz, J. N., Blumbach, K., Heinegård, D., Zaucke, F., Paulsson, M., Krieg, T., Koch, M. et al. (2012). Collagen XII and XIV, new partners of cartilage oligomeric matrix protein in the skin extracellular matrix suprastructure. *J. Biol. Chem.* **287**, 22549-22559.
- Baas, D., Malbouyres, M., Haftek-Terreau, Z., Le Guellec, D. and Ruggiero, F. (2009). Craniofacial cartilage morphogenesis requires zebrafish *col11a1* activity. *Matrix Biol.* **28**, 490-502.
- Bader, H. L., Keene, D. R., Charvet, B., Veit, G., Driever, W., Koch, M. and Ruggiero, F. (2009). Zebrafish collagen XII is present in embryonic connective tissue sheaths (fascia) and basement membranes. *Matrix Biol.* **28**, 32-43.
- Bader, H. L., Lambert, E., Guiraud, A., Malbouyres, M., Driever, W., Koch, M. and Ruggiero, F. (2013). Zebrafish collagen XIV is transiently expressed in epithelia and is required for proper function of certain basement membranes. *J. Biol. Chem.* **288**, 6777-6787.

- Bassett, D. I., Bryson-Richardson, R. J., Daggett, D. F., Gautier, P., Keenan, D. G. and Currie, P. D. (2003). Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development* **130**, 5851-5860.
- Blagden, C. S., Currie, P. D., Ingham, P. W. and Hughes, S. M. (1997). Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. *Genes Dev.* **11**, 2163-2175.
- Bonod-Bidaud, C., Beraud, M., Vaganay, E., Delacoux, F., Font, B., Hulmes, D. J. and Ruggiero, F. (2007). Enzymatic cleavage specificity of the proalpha1(V) chain processing analysed by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **405**, 299-306.
- Boppert, M. D., Burkin, D. J. and Kaufman, S. J. (2011). Activation of AKT signaling promotes cell growth and survival in $\alpha\beta 1$ integrin-mediated alleviation of muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 439-446.
- Carmignac, V. and Durbecq, M. (2012). Cell-matrix interactions in muscle disease. *J. Pathol.* **226**, 200-218.
- Carney, T. J., Feitosa, N. M., Sonntag, C., Slanchev, K., Kluger, J., Kiyozumi, D., Gebauer, J. M., Coffin Talbot, J., Kimmel, C. B., Sekiguchi, K. et al. (2010). Genetic analysis of fin development in zebrafish identifies furin and hemicentin1 as potential novel fraser syndrome disease genes. *PLoS Genet.* **6**, e1000907.
- Charvet, B., Malbouyres, M., Pagnon-Minot, A., Ruggiero, F. and Le Guellec, D. (2011). Development of the zebrafish myoseptum with emphasis on the myotendinous junction. *Cell Tissue Res.* **346**, 439-449.
- Cohn, R. D. and Campbell, K. P. (2000). Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* **23**, 1456-1471.
- Desaki, J. (1992). Scanning electron microscopical study of skeletal muscle fiber ends in normal and dystrophic mice. *Arch. Histol. Cytol.* **55**, 449-452.
- Dou, Y., Andersson-Lendahl, M. and Arner, A. (2008). Structure and function of skeletal muscle in zebrafish early larvae. *J. Gen. Physiol.* **131**, 445-453.
- Gupta, V., Kawahara, G., Gundry, S. R., Chen, A. T., Lencer, W. I., Zhou, Y., Zon, L. I., Kunkel, L. M. and Beggs, A. H. (2011). The zebrafish dag1 mutant: a novel genetic model for dystroglycanopathies. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1712-1725.
- Guyon, J. R., Goswami, J., Jun, S. J., Thorne, M., Howell, M., Pusack, T., Kawahara, G., Steffen, L. S., Galdzicki, M. and Kunkel, L. M. (2009). Genetic isolation and characterization of a splicing mutant of zebrafish dystrophin. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 202-211.
- Hall, T. E., Bryson-Richardson, R. J., Berger, S., Jacoby, A. S., Cole, N. J., Hollway, G. E., Berger, J. and Currie, P. D. (2007). The zebrafish candyfloss mutant implicates extracellular matrix adhesion failure in laminin alpha2-deficient congenital muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7092-7097.
- Han, R., Kanagawa, M., Yoshida-Moriguchi, T., Rader, E. P., Ng, R. A., Michele, D. E., Muirhead, D. E., Kunz, S., Moore, S. A., Iannaccone, S. T. et al. (2009). Basal lamina strengthens cell membrane integrity via the laminin G domain-binding motif of alpha-dystroglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 12573-12579.
- Hayashi, Y. K., Chou, F. L., Engvall, E., Ogawa, M., Matsuda, C., Hirabayashi, S., Yokochi, K., Ziober, B. L., Kramer, R. H., Kaufman, S. J. et al. (1998). Mutations in the integrin alpha7 gene cause congenital myopathy. *Nat. Genet.* **19**, 94-97.
- Helbling-Leclerc, A., Zhang, X., Topaloglu, H., Cruaud, C., Tesson, F., Weissenbach, J., Tomé, F. M., Schwartz, K., Fardeau, M., Tryggvason, K. et al. (1995). Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **11**, 216-218.
- Henry, C. A., McNulty, I. M., Durst, W. A., Munchel, S. E. and Amacher, S. L. (2005). Interactions between muscle fibers and segment boundaries in zebrafish. *Dev. Biol.* **287**, 346-360.
- Ingham, P. W. (2009). The power of the zebrafish for disease analysis. *Hum. Mol. Genet.* **18** R1, R107-R112.
- Jacoby, A. S., Busch-Nentwich, E., Bryson-Richardson, R. J., Hall, T. E., Berger, J., Berger, S., Sonntag, C., Sachs, C., Geisler, R., Stemple, D. L. et al. (2009). The zebrafish dystrophic mutant softy maintains muscle fibre viability despite basement membrane rupture and muscle detachment. *Development* **136**, 3367-3376.
- Kawahara, G., Karpf, J. A., Myers, J. A., Alexander, M. S., Guyon, J. R. and Kunkel, L. M. (2011). Drug screening in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 5331-5336.
- Kim, M. H., Kay, D. I., Rudra, R. T., Chen, B. M., Hsu, N., Izumiya, Y., Martinez, L., Spencer, M. J., Walsh, K., Grinnell, A. D. et al. (2011). Myogenic Akt signaling attenuates muscular degeneration, promotes myofiber regeneration and improves muscle function in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1324-1338.
- Koch, M., Schulze, J., Hansen, U., Ashwodt, T., Keene, D. R., Brunken, W. J., Burgeson, R. E., Bruckner, P. and Bruckner-Tuderman, L. (2004). A novel marker of tissue junctions, collagen XXII. *J. Biol. Chem.* **279**, 22514-22521.
- Law, D. J. and Tidball, J. G. (1993). Dystrophin deficiency is associated with myotendinous junction defects in preneurotic and fully regenerated skeletal muscle. *Am. J. Pathol.* **142**, 1513-1523.
- Law, D. J., Caputo, A. and Tidball, J. G. (1995). Site and mechanics of failure in normal and dystrophin-deficient skeletal muscle. *Muscle Nerve* **18**, 216-223.
- Lisi, M. T. and Cohn, R. D. (2007). Congenital muscular dystrophies: new aspects of an expanding group of disorders. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 159-172.
- Miosge, N., Klenczar, C., Herken, R., Willem, M. and Mayer, U. (1999). Organization of the myotendinous junction is dependent on the presence of alpha7beta1 integrin. *Lab. Invest.* **79**, 1591-1599.
- Mohamed, J. S., Lopez, M. A., Cox, G. A. and Boriek, A. M. (2010). Anisotropic regulation of Ankr2 gene expression in skeletal muscle by mechanical stretch. *FASEB J.* **24**, 3330-3340.
- Ng, M. C., Hsu, C. P., Wu, Y. J., Wu, S. Y., Yang, Y. L. and Lu, K. T. (2012). Effect of MK-801-induced impairment of inhibitory avoidance learning in zebrafish via inactivation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in telencephalon. *Fish Physiol. Biochem.* **38**, 1099-1106.
- Pagnon-Minot, A., Malbouyres, M., Haffek-Terreau, Z., Kim, H. R., Sasaki, T., Thisse, C., Thisse, B., Ingham, P. W., Ruggiero, F. and Le Guellec, D. (2008). Collagen XV, a novel factor in zebrafish notochord differentiation and muscle development. *Dev. Biol.* **316**, 21-35.
- Parsons, M. J., Campos, I., Hirst, E. M. and Stemple, D. L. (2002). Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development* **129**, 3505-3512.
- Peter, A. K. and Crosbie, R. H. (2006). Hypertrophic response of Duchenne and limb-girdle muscular dystrophies is associated with activation of Akt pathway. *Exp. Cell Res.* **312**, 2580-2591.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. and Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* **26**, 509-515.
- Pollard, S. M., Parsons, M. J., Kamei, M., Kettleborough, R. N., Thomas, K. A., Pham, V. N., Bae, M. K., Scott, A., Weinstein, B. M. and Stemple, D. L. (2006). Essential and overlapping roles for laminin alpha chains in notochord and blood vessel formation. *Dev. Biol.* **289**, 64-76.
- Postel, R., Vakeel, P., Topczewski, J., Knöll, R. and Bakkens, J. (2008). Zebrafish integrin-linked kinase is required in skeletal muscles for strengthening the integrin-ECM adhesion complex. *Dev. Biol.* **318**, 92-101.
- Renaud, O., Herbomel, P. and Kissa, K. (2011). Studying cell behavior in whole zebrafish embryos by confocal live imaging: application to hematopoietic stem cells. *Nat. Protoc.* **6**, 1897-1904.
- Ricard-Blum, S. and Ruggiero, F. (2005). The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol. Biol. (Paris)* **53**, 430-442.
- Rooney, J. E., Welsler, J. V., Dechert, M. A., Flintoff-Dye, N. L., Kaufman, S. J. and Burkin, D. J. (2006). Severe muscular dystrophy in mice that lack dystrophin and alpha7 integrin. *J. Cell Sci.* **119**, 2185-2195.
- Snow, C. J. and Henry, C. A. (2009). Dynamic formation of microenvironments at the myotendinous junction correlates with muscle fiber morphogenesis in zebrafish. *Gene Expr. Patterns* **9**, 37-42.
- Sztaf, T., Berger, S., Currie, P. D. and Hall, T. E. (2011). Characterization of the laminin gene family and evolution in zebrafish. *Dev. Dyn.* **240**, 422-431.
- Sztaf, T. E., Sonntag, C., Hall, T. E. and Currie, P. D. (2012). Epistatic dissection of laminin-receptor interactions in dystrophic zebrafish muscle. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 4718-4731.
- Turner, D. L. and Weintraub, H. (1994). Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev.* **8**, 1434-1447.
- Veit, G., Hansen, U., Keene, D. R., Bruckner, P., Chiquet-Ehrismann, R., Chiquet, M. and Koch, M. (2006). Collagen XII interacts with avian tenascin-X through its NC3 domain. *J. Biol. Chem.* **281**, 27461-27470.
- Wang, J. H. (2006). Mechanobiology of tendon. *J. Biomech.* **39**, 1563-1582.
- Welsler, J. V., Rooney, J. E., Cohen, N. C., Gurdur, P. B., Singer, C. A., Evans, R. A., Haines, B. A. and Burkin, D. J. (2009). Myotendinous junction defects and reduced force transmission in mice that lack alpha7 integrin and utrophin. *Am. J. Pathol.* **175**, 1545-1554.
- Zhang, R., Yang, J., Zhu, J. and Xu, X. (2009). Depletion of zebrafish Tcap leads to muscular dystrophy via disrupting sarcomere-membrane interaction, not sarcomere assembly. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4130-4140.
- Zoeller, J. J., McQuillan, A., Whitelock, J., Ho, S. Y. and Iozzo, R. V. (2008). A central function for perlecan in skeletal muscle and cardiovascular development. *J. Cell Biol.* **181**, 381-394.

Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane

*Marine Bignon,¹⁻³ *Cathy Pichol-Thievend,¹⁻³ †Julie Hardouin,⁴ †Marilyne Malbouyres,⁵ Nicolas Bréchet,¹⁻³ Luiz Nasciutti,¹⁻³ Alain Barret,¹⁻³ Jérémie Teillon,¹⁻³ Emilie Guillon,⁵ Eric Etienne,¹⁻³ Michel Caron,⁴ Raymonde Joubert-Caron,⁴ Catherine Monnot,¹⁻³ Florence Ruggiero,⁵ Laurent Muller,¹⁻³ and Stéphane Germain¹⁻³

¹College de France, Center for Interdisciplinary Research in Biology, Paris, France; ²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 7241, Paris, France; ³Inserm U1050, Paris, France; ⁴Laboratoire de Biochimie des Protéines et Protéomique, UMR CNRS 7033, Université Paris 13, Bobigny Cedex, France; and ⁵Institut de Génomique Fonctionnelle, ENS-Lyon, UMR CNRS 5242, Université de Lyon, Lyon Cedex, France

Sprouting angiogenesis is associated with extensive extracellular matrix (ECM) remodeling. The molecular mechanisms involved in building the vascular microenvironment and its impact on capillary formation remain elusive. We therefore performed a proteomic analysis of ECM from endothelial cells maintained in hypoxia, a major stimulator of angiogenesis. Here, we report the characterization of lysyl oxidase-like protein-2 (LOXL2) as a hypoxia-target expressed in neovessels

and accumulated in the endothelial ECM. LOXL2 belongs to the lysyl oxidase family of secreted enzymes involved in ECM crosslinking. Knockdown experiments in *Tg(fli1:egfp)y1* zebrafish embryos resulted in lack of intersegmental vessel circulation and demonstrated LOXL2 involvement in proper capillary formation. Further investigation in vitro by loss and gain of function experiments confirmed that LOXL2 was required for tubulogenesis in 3D fibrin gels and demonstrated

that this enzyme was required for collagen IV assembly in the ECM. In addition, LOXL2 depletion down-regulated cell migration and proliferation. These data suggest a major role for LOXL2 in the organization of endothelial basal lamina and in the downstream mechanotransductive signaling. Altogether, our study provides the first evidence for the role of LOXL2 in regulating angiogenesis through collagen IV scaffolding. (*Blood*. 2011;118(14):3979-3989)

Introduction

Angiogenesis occurs during development and tissue remodeling, and in the pathologic context of cardiovascular ischemic diseases or tumor growth. Sprouting of new vessels is initiated by stimulation of endothelial cells (ECs) by a combination of signals from the microenvironment that includes oxygen tension and growth factors. Cells from not yet vascularized tissue and ECs that invade this microenvironment are both hypoxia targets through the Hypoxia Inducible Factor (HIF) pathway. HIF activates transcription of genes coding for autocrine/paracrine factors like vascular endothelial growth factor (VEGF) and extracellular matrix (ECM) components.¹ Synergy between these responses is assumed through local concentration of growth factors in the ECM where they function as attractant for ECs. Specialized ECs, called tip cells, lead vascular growth by sending out filopodia to explore the hypoxic microenvironment.² Tip cells are thus continuously exposed to low oxygen concentration.³ Stalk cells, located behind the tip cells, serve to vessel growth by proliferation, lumen formation and junction establishment.⁴

Vascular ECM undergoes major remodeling during angiogenesis, consisting in ECM/basement membrane degradation, provisional ECM generation and assembly of a new basement membrane. ECM-mediated mechanotransductive signaling regulates 3D multicellular organization, including lumen formation and tubulogenesis. Thus, in addition to storing angiogenic factors and providing structural features, ECM is a dynamic promoter of

angiogenesis.⁵ Subendothelial basement membrane is composed of nonfibrillar collagen IV, laminin, perlecan and nidogens. Other collagens (VIII, XV, and XVIII), fibronectin and matricellular proteins (thrombospondin-1, Cyr61) are associated with the basement membrane. There is only little data concerning the assembly of the vascular microenvironment and its impact on angiogenesis. Genes encoding ECM components and enzymes involved in their assembly and stabilization are targets of hypoxia in ECs.¹ To identify key regulators of the angiogenesis-associated ECM remodeling, we performed a proteomic analysis of endothelial ECM generated in vitro under hypoxic conditions. We found that the ECM cross-linking enzyme, lysyl oxidase-like protein-2 (LOXL2) is a major target of hypoxia. Lysyl oxidases, consisting in lysyl oxidase (LOX) and 4 lysyl oxidase-like proteins (LOXL 1 to 4), catalyze the deamination of lysines and hydroxylysines, generating aldehydes that spontaneously react to form covalent cross-links.^{6,7} These secreted enzymes are characterized by a conserved C-terminal catalytic domain that contains the lysyl tyrosyl quinone cofactor and the copper-binding site. The N-terminal part is specific to each member and is thought to confer partner and/or substrate specificity.⁶ Deletion of *lox* or *lox11* gene leads to vascular defects.^{8,9} *Lox11* knockout only affects elastogenesis, whereas *lox* knockout phenotype is more severe, consisting in perinatal lethality because of aortic rupture caused by defects in both elastin and fibrillar collagen organization.

Submitted October 13, 2010; accepted July 19, 2011. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, August 11, 2011; DOI 10.1182/blood-2010-10-313296.

*M.B. and C.P.-T. contributed equally to this article.

†J.H. and M.M. contributed equally to this article.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2011 by The American Society of Hematology

LOXL2 expression profile has not been characterized in detail and its physiologic role remains unresolved.⁶ Its expression is up-regulated in several pathologic contexts, and its involvement in fibrosis and cancer has been shown.¹⁰⁻¹³ LOXL2 was identified in EC in vitro,¹⁴ but its role in vascular cells has yet to be determined. Considering its activity as an ECM cross-linking enzyme and the importance of microenvironment stiffness and ECM assembly in 3D multicellular organization,¹⁵ we investigated the impact of LOXL2 on angiogenesis. Knocking down its expression in zebrafish embryo prevented formation of intersegmental vessels (ISV). Similarly, capillary formation in 3D fibrin gel was impaired by LOXL2 depletion. These effects were mediated by the regulation of collagen IV assembly in the vascular ECM and of EC migration and proliferation.

Methods

Antibodies, reagents, and oligonucleotide sequences

Detailed information is provided in supplemental Methods (available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were prepared and grown as previously described.¹⁶ Human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) were purchased from Clonetics. Experiments were performed between passages 2 and 5. Normal dermal human fibroblasts were purchased from Promocell. In some experiments, cells were incubated in hypoxia (1% O₂) or with 500 μM β-aminopropionitrile (β-APN).

Expression vector, lentivirus, siRNA, and shRNA tools

Human *lox12* cDNA was purchased from Origene and cloned in pcDNA3.1 (Invitrogen) for transient overexpression using a nucleofector device (Amaxa). *Loxl2* cDNA was cloned in pLenti6/V5-DEST using the Gateway LR Clonase™ II (Invitrogen). Plasmids coding for shRNA were purchased from Sigma-Aldrich. Lentivirus production was performed using either ViralPower lentiviral expression system (Invitrogen) or Mission lentiviral Packaging Mix (Sigma-Aldrich). ECs isolated from 1 umbilical cord were split in 2 and infected before the first passage with control or LOXL2 targeting lentivirus. Infections were repeated on HUVECs from 3 different cords. Cells were selected with either blasticidin (5 μg/mL) or puromycin (0.5 μg/mL).

Mouse model of hindlimb ischemia

Unilateral critical ischemia was generated by ligation of epigastric artery and excision of the femoral artery in C57BL/6 mice (Charles River) as previously described.¹⁷ This study conforms to the standards of Inserm regarding the care and use of laboratory animals, in accordance with European Union Council Directives (86/609/EEC) and was approved by the institutional research ethics committee IDF - Paris - Comité 1 (2008004).

Zebrafish experiments

General maintenance of zebrafish was carried out according to common practices at 28°C. Morpholino oligonucleotides designed complementary to the sequence near the start of translation (Gene Tools) or human *lox12* mRNA were microinjected into one to 2-cell stage embryos in 1× Danieau buffer. Embryos were mounted in 1% agarose and anesthetized with 0.01% Tricaine. Morphology and blood circulation were analyzed with a Leica stereoscope. GFP-expressing ECs were visualized in *Tg(fli1:egfp)*^{y1} zebrafish with a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems). Stacks of 20-30 focal planes were processed with MetaMorph. In some experiments 10mM β-APN (Sigma-Aldrich) was added in egg water.

Immunohistochemistry, immunofluorescence, and in situ hybridization

For whole mount staining, eyes were fixed in 4% PFA and retinas were dissected and stained as previously described.¹⁸ For immunohistochemistry, eyes were embedded in cryoblock medium (Labonord) on dry ice. Eye and sections were incubated with anti-LOXL2 before fixation with acetone and further processing with secondary antibodies. Immunohistochemistry and in situ hybridization of mouse *tibialis anterior* muscles was performed as described.^{17,19} For immunofluorescence, cells seeded on coverslips were fixed with cold methanol.²⁰ Coverslips were mounted in Mowiol containing DAPI or TO-PRO-3 as nuclear stains. Images were acquired with a Leica DMLB microscope equipped with a Qicam camera or a Leica TCS SP5 confocal microscope.

Protein extraction and immunoblotting

Confluent ECs grown for 5 days were detached on ice by sequential incubation with 10mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 10mM EDTA, and the same solution containing 0.2% Triton-X100. ECM proteins were extracted in Laemmli buffer. Proteins from overnight serum-free secretion medium were TCA-precipitated before treatment with Laemmli buffer. Mouse frozen tissues were lysed in 2% SDS, 20mM Tris pH 6.8, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM DTT, and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Zebrafish embryos were lysed in 25mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% DOC, 0.5% NP40, and protease inhibitor cocktail, centrifuged for 30 minutes at 15 000g. Supernatants and pellets were both treated with Laemmli buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Immunologic detection was performed with alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies, using AttoPhos (Promega) as a substrate. Quantification was done with an FX Pro+ PhosphorImager and QuantityOne 4.6 software (Bio-rad).

RT-PCR analysis

RNA was extracted from cells or tissues using Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel) or Trizol (Invitrogen), respectively. Reverse transcription was carried out using Superscript II Reverse transcriptase with random hexamers (Invitrogen). Band intensity was quantified using QuantityOne (Bio-Rad). For RT-qPCR, cDNA were amplified using an iQ SYBR green supermix (Bio-Rad) and an iCycler equipped with a MyiQ optical module (Bio-Rad).

LOXL2 activity assay

Lysyl oxidase activity was determined using 1,5-diaminopentane as a substrate in a fluorescent assay previously described.²¹ Lysyl oxidase activity was calculated as the difference between the total amine oxidase activity and the activity measured in the presence of 500 μM β-APN.

2D motility assays and time-lapse microscopy

HUVEC motility was analyzed by time-lapse videomicroscopy in 12-well plates coated with 10 μg/mL fibronectin, in the presence of 10 ng/mL of VEGF and bFGF. Eight fields per well were randomly chosen and images were acquired every 5 minutes over the following 12 hours with a Leica DMIRBE microscope in a Life Imaging Services incubator. Motility was measured using MetaMorph 7.7 software (Molecular Devices).

3D migration and tube formation assays

Three-dimensional fibrin gel assays were carried out as previously described.²² Briefly, HUVECs were seeded either on Cytodex beads (GE Healthcare) 24 hours before embedding in a 2.5 mg/mL fibrin gel or directly in the gel. Fibroblasts were plated on top of the gel and incubated in complete medium containing 10 ng/mL bFGF. For time-lapse video microscopy, images were acquired every 20 minutes for 16 hours with the Leica DMIRBE microscope. Tube length was measured using MetaMorph.

Proliferation assay

HUVECs infected with lentivirus coding for control or *lox* or *lox2* shRNA were plated in 96-well plates and cultured in 0.5% FBS during 24 hours, before stimulation with 5% FBS for 48 hours. Total DNA content was quantified using CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen).

Statistics

Statistical evaluation of data was performed with the Mann-Whitney *U* test for expression analyses and with the Student *t* test for tube formation and migration analyses.

Results

Hypoxia induces endothelial ECM assembly and up-regulates LOXL2

Angiogenesis-associated ECM remodeling was assessed during vascularization of mouse retina, which extends from the optic nerve head to reach the periphery at postnatal day 7 (P7). Endothelial tip cells migrate toward a hypoxic environment in response to VEGF secreted by astrocytes.^{2,3} Immunostaining of collagen IV and fibronectin was performed at P5. At the vascular front, collagen IV was only detected in ECs, both as intracellular staining and in the basement membrane, except at sites of filopodia protrusion (Figure 1A). Fibronectin was detected both associated with ECs and in the avascular zone (Figure 1A). This latter staining corresponds to fibronectin deposited by astrocytes. Tip cell filopodia extend along this fibronectin network. Differences in the pattern and intensity of endothelial and astrocytic fibronectin indicated its fibrillogenesis and remodeling by ECs. Tip cells are thus involved in both de novo synthesis and assembly of basement membrane and reorganization of the preexisting ECM.

To gain insight into ECM remodeling in hypoxia, we characterized collagen IV and fibronectin deposition by ECs in vitro. Assembly of both proteins was increased by hypoxia as a dense fibrillar network (Figure 1B). Similar results were obtained for collagen XVIII,²³ and with both HUVECs and HDMECs (M.B., L.N., and L.M., unpublished data, August 2006). Hypoxia is thus sufficient for stimulating ECM synthesis and assembly as observed during retina vascularization. Confocal analysis demonstrated the polarized deposition of collagen IV at the basal side of ECs, suggesting its assembly in a basement membrane-like manner (supplemental Figure 1A). Furthermore, distribution and amount of collagen IV in the ECM were not altered by detaching cells (Figure 1B and supplemental Figure 1B). ECM generated in normoxic or hypoxic conditions were then separated by 2D gel electrophoresis. A train of proteins at a molecular weight of 100 kDa ranging from pI 6.2-6.6 were highly up-regulated by hypoxia in HDMEC and HUVECs (Figure 2A). Mass spectrometry analysis identified 2 of these spots as LOXL2 (supplemental Figure 2). LOXL2 expression and localization were further investigated in HUVECs. LOXL2 secretion was increased by hypoxia, at a molecular weight of 100 kDa, and resulted in its accumulation in the ECM (Figure 2B). It was weakly detected in the ECM in normoxic conditions, in sparse extracellular fibers spanning over several cells labeled at cell-cell adhesion using CD31 (Figure 2C). Hypoxia strikingly increased the density of this ECM network. In hypoxic ECM, LOXL2 was colocalized with collagen IV and fibronectin, but not with the matricellular protein Cyr61 which binds heparan-sulfate proteoglycans (Figure 2D). Increased *lox2* mRNA content was observed after 2 and 5 days in hypoxia, reaching 168.7% and

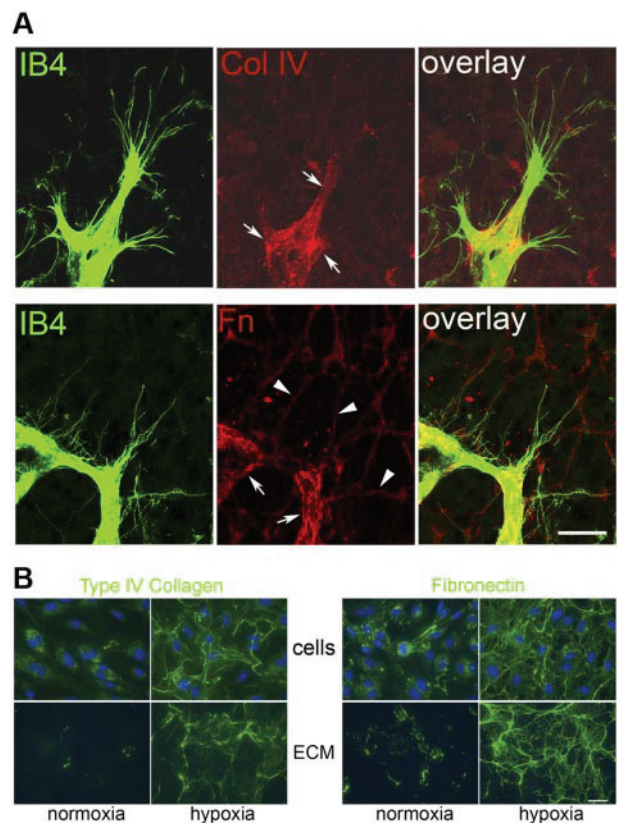


Figure 1. Hypoxia-induced deposition of collagen IV and fibronectin in endothelial ECM. (A) Whole mount immunofluorescence of P5 mouse retina was performed for detection of collagen IV (Col IV) and fibronectin (Fn). ECs were stained with isolectin B4 (IB4). Images correspond to the projection of 6 confocal sections at the vascular front. Arrows indicate sites of deposition of collagen IV and fibronectin by tip cells in the basement membrane. Arrowheads indicate the fibronectin network in the avascular zone. Bar: 20 μ m. (B) HUVECs were cultured in normoxia or hypoxia for 5 days. Immunofluorescence of collagen IV (left panel) and fibronectin (right panel) was performed on either whole cell layer (cells) or ECM after detaching cells (ECM). Nuclei were stained with DAPI. Bar: 30 μ m. See also supplemental Figure 1.

141.7% respectively (Figure 2E), suggesting that stable mRNA might lead to LOXL2 accumulation in the hypoxic ECM.

We then investigated the impact of increased LOXL2 on lysyl oxidase activity. HUVECs are known to express LOX and LOXL2, which are targets of hypoxia.^{14,24,25} Both enzymes possess lysyl oxidase activity sensitive to β -APN.⁷ Hypoxia increased 2.7-fold the total β -APN-sensitive lysyl oxidase activity in ECs, compared with normoxic conditions (Figure 2F). We used a gene silencing approach by siRNA to knock down either *lox* or *lox2* (supplemental Figure 3). Transfecting ECs with *lox2* siRNA reduced β -APN-sensitive lysyl oxidase activity by 62.3% in hypoxia, whereas *lox* siRNA diminished lysyl oxidase activity by 28.2% compared with control siRNA (Figure 2G), thus demonstrating that whereas both enzymes are active, LOXL2 is the main source of β -APN-sensitive lysyl oxidase activity in hypoxic ECs.

LOXL2 is expressed in the vascular basement membrane and up-regulated in neovessels

We then investigated the expression of LOXL2 in developmental and pathologic angiogenesis. LOXL2 protein was detected in rat retina EC at P5, as demonstrated by colocalization with von Willebrand factor, and by its presence on the luminal side of the basement membrane stained with collagen IV (Figure 3A). In addition, LOXL2 was colocalized with collagen IV in the basement membrane.

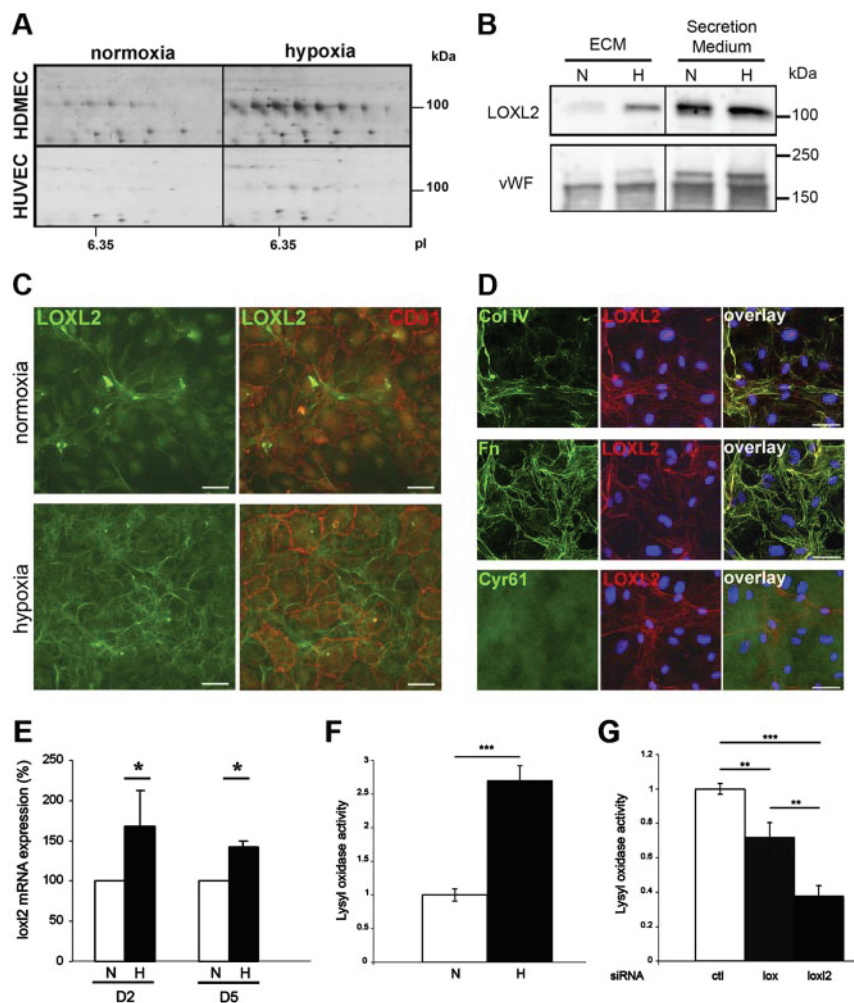


Figure 2. LOXL2 expression, ECM localization and activity are induced by hypoxia in endothelial ECM in vitro. (A) Two-dimensional silver stained gels of ECM from HDMEC or HUVECs cultured in normoxia or hypoxia for 5 days. Areas corresponding to similar molecular weights and pI are shown. (B) LOXL2 and von Willebrand factor (VWF) were immunodetected in ECM extracts or secretion medium from HUVECs cultured in normoxia (N) or hypoxia (H). von Willebrand factor was used as a control ECM-binding protein secreted by EC, whose amount and distribution between the secretion medium and the ECM were not modified by hypoxia. (C) Epifluorescence of HUVECs cultured in normoxia or hypoxia and double-stained for LOXL2 and CD31. (D) Confocal images of HUVECs cultured in hypoxia. Double-immunofluorescence of LOXL2 and either collagen IV (Col IV), or fibronectin (Fn) or Cyr61 was performed. Nuclei were stained with TO-PRO-3. Bars: 20 μ m (C and D). (E) Semi-quantitative RT-PCR of *lox2* mRNA from HUVECs cultured in normoxia (N) or hypoxia (H) for 2 (D2) or 5 (D5) days. *Actin* was used as a control. The mean expression of 3 independent experiments is represented \pm SD. * $P < .05$. (F-G) Lysyl oxidase activity was measured as the amine oxidase activity inhibited by β -APN. (F) HUVECs were cultured in normoxia (N) or hypoxia (H). (G) HUVECs silenced for either *lox* or *lox2* using siRNA were cultured in hypoxia. Lysyl oxidase activity was normalized to the mean of controls. Graphs represents the mean of 3 independent experiments values \pm SEM. ** $P < .005$ and *** $P < .001$. See also supplemental Figures 2-3.

For studying postischemic revascularization, we used a mouse model of hindlimb ischemia. Tissue revascularization is initiated within 2 days and reaches its maximum rate 6 days after surgery.²⁶ LOXL2 protein and mRNA increased 9.8- and 14.7-fold, respectively, in ischemic *tibialis anterior* muscle (Figure 3B-C). The highest expression of *lox2* mRNA was detected by in situ hybridization in areas containing high capillary density and regenerating myofibers, whereas it was low or absent in areas with low capillary density, corresponding to either necrotic or preserved muscle areas (Figure 3D and supplemental Figure 4).¹⁷ To identify cells expressing *lox2*, serial sections were immunostained for CD31: colocalization indicated that *lox2* mRNA is expressed in newly formed capillaries (Figure 3D and supplemental Figure 4).

Altogether, this first set of experiments showed that the ECM remodeling associated with angiogenesis involved modulation of both expression and organization of its major components, collagen IV and fibronectin. In this context, the hypoxia-driven induction of LOXL2 in endothelial ECM suggested that it could be a promoter of such remodeling and of angiogenesis.

LOXL2 participates to intersegmental vessel formation in zebrafish embryo

To investigate the functional involvement of LOXL2 in angiogenesis, dynamic analysis of ISV development in zebrafish embryo was performed. Zebrafish genome encodes 2 *lox2* genes (*lox2a* and *lox2b*). Whereas *lox2b* expression is initiated during early

development throughout the notochord and extinguished between 24 and 48 hours after fertilization (hpf),²⁷ the expression pattern of *lox2a* has not been reported yet. *Loxl2a* mRNA increased between 20 and 48 hpf and was detected in ISV (Figure 4A-B). In parallel, 2 proteins were detected by immunoblot: (–1) a weak 100 kDa band in the soluble fraction of both 24 and 48 hpf samples; (–2) an intense band migrating at 240 kDa in the detergent resistant fraction at 48 hpf only (Figure 4C). Both bands were recognized by 2 LOXL2 monoclonal antibodies. LOXL2a mRNA and protein were thus induced between 24 and 48 hpf in sprouting ISV.

We performed knockdown experiments using 2 distinct morpholino oligonucleotides targeting *lox2a*. Injection of 4 ng of *lox2a* morpholino 1 (*lox2a*-MO1) suppressed ISV blood circulation in 65% of embryos (supplemental Videos 1-2), which appeared otherwise unaffected (supplemental Figure 5A). Similar circulation defects were observed with *lox2a*-MO2, whereas embryos injected with up to 16 ng of mismatch morpholino (ms-MO) were not affected. Lack of ISV circulation is not because of developmental delay of the cardiovascular system as attested by the correct formation and perfusion of the dorsal aorta (DA) and cardinal vein (CV; supplemental Video 2) and by normal heart development and heartbeat (data not shown). *Loxl2a*-MO1 decreased LOXL2 expression at 24 hpf (supplemental Figure 5B) and the absence of ISV circulation was correlated with a strong decrease in LOXL2 protein expression at 48 hpf (Figure 4D). These results also demonstrated that the 240 kDa protein corresponds to LOXL2a (Figure 4D).

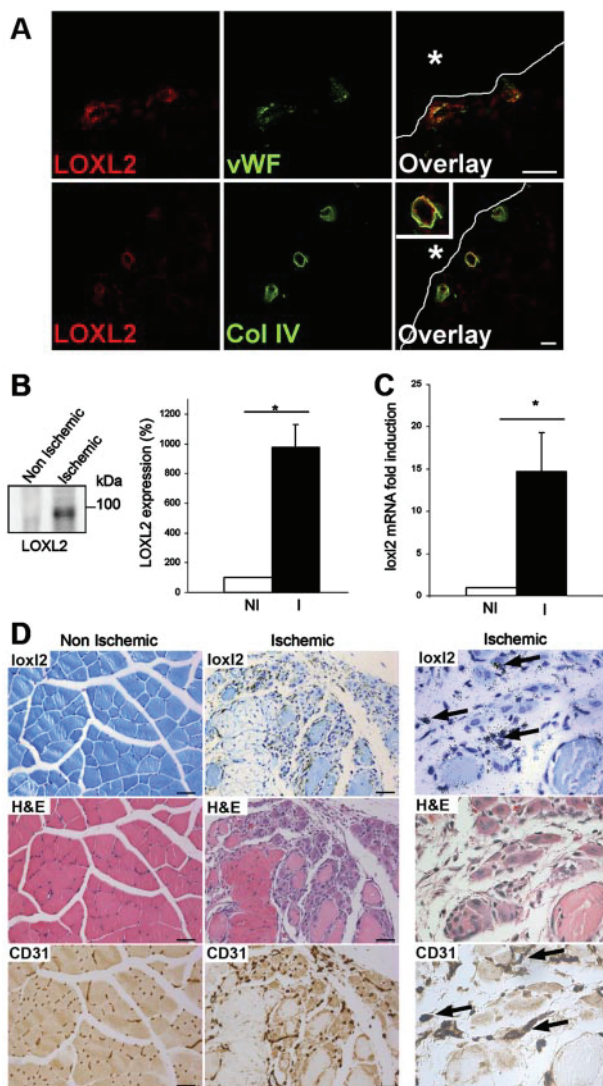


Figure 3. LOXL2 is expressed by ECs in developmental and pathologic angiogenesis. (A) Immunofluorescence was performed on cryosections of P6 rat eye for detection of LOXL2 and either von Willebrand factor (VWF) or collagen IV (Col IV). Vitreous humor is indicated by asterisks and white lines. Bar: 20 μ m. (B-D) Unilateral critical ischemia (I; ischemic) was analyzed 6 days postsurgery, using contralateral hindlimb as control (NI; non ischemic). (B) Fifty micrograms of total protein extracts were subjected to immunoblotting of LOXL2 (left panel). LOXL2 amount was quantified in extracts from 3 mice (right panel). Results are represented \pm SD. (C) Quantification of *loxl2* mRNA induction by real-time quantitative PCR. For each mouse ($n = 3$), actin was used as control. Mean relative induction in ischemic muscle (I) is represented \pm SD. (D) In situ hybridization of *loxl2* mRNA was performed on sections of non ischemic or ischemic tibialis anterior muscle (top lane). Slides were counterstained with toluidine blue. Serial sections were stained with H&E (middle lane), and CD31 was immunostained (bottom lane). Arrows indicate colocalization of *loxl2* and CD31 in high magnification images (right panel). Bar: 200 μ m. See also supplemental Figure 4.

Coinjection of the mRNA coding for human LOXL2 with *lox12a*-MO1 rescued the phenotype as it restored normal circulation at 48 hpf (supplemental Video 3), resulting in only 10.8% non circulating embryos. EC sprout from the DA at 20 hpf, reach the dorsal roof and fuse to form the dorsal longitudinal anastomotic vessels (DLAV) at 36 hpf; by 48 hpf, they have established a perfused lumen.²⁸ ISV of *Tg(fli1:egfp)y1* embryos injected with ms-MO displayed a normal pattern of development, whereas some sprouts had not emerged from the DA in *lox12a*-MO1-injected zebrafish at 24 hpf (Figure 4E top panel). By 48 hpf, some ISV had not reached the dorsal roof, while others had lost connection to the

DA (supplemental Figure 5C). They were unable to form a continuous DLAV (Figure 4E bottom panel; supplemental Figure 5C). LOXL2 depletion however did not result in any guidance defect. In addition, no hemorrhage was detected using O-dianisidine staining (supplemental Figure 5A). Finally, the role of LOXL2 in blood vessel formation was further supported by defects of branchial arch vessels (supplemental Figure 5D).

To analyze the involvement of lysyl oxidase catalytic activity in ISV formation, embryos were treated with β -APN either at an early stage (3 hpf) or at initiation of ISV formation (23 hpf). β -APN treatment of 3 hpf embryos resulted in striking notochord distortion (Figure 4F), a defect involving LOX, LOXL1, and LOXL5b,^{27,29} and altered vascular patterning with distortion of the DA and irregular distribution of ISV (Figure 4H). Even though ISV have all migrated to the dorsal roof and formed the DLAV, embryos displayed very variable number of perfused ISV at 48 hpf (Figure 4G). These vascular defects might thus be secondary to notochord distortion and somite disorganization. Embryos were then treated with β -APN at 23 hpf, when notochord development is almost completed. At this time point, β -APN affected notochord only in the caudal section confirming inhibition of lysyl oxidase activity (Figure 4F). Similar results were obtained when β -APN was added at 20 hpf, that is, before sprouting of tip cells (data not shown). This data show that β -APN did not affect ISV formation nor perfusion (Figure 4G-H), suggesting that lysyl oxidase catalytic activity was not essential to ISV formation.

LOXL2 regulates capillary formation in vitro

To gain insight into the role of LOXL2 in capillary formation, we investigated in vitro endothelial tubulogenesis. When embedded in 3D fibrin gel in the presence of bFGF and VEGF, HUVECs migrate inside the gel but are unable to engage a tubulogenic program. When cocultured with fibroblasts, they generate vessel-like structures with a patent lumen (supplemental Figure 6).²² The expression of endothelial *loxl2* mRNA was increased 1.3-fold by coculture (Figure 5A) and both LOXL2 and collagen IV deposition were induced in the endothelial ECM (Figure 5B). Collagen IV assembly was also induced in the basement membrane during tubulogenesis in 3D fibrin gels (Figure 5C and supplemental Figure 6C) and colocalized with LOXL2 (supplemental Figure 6D).

LOXL2 overexpression increased capillary formation (Figure 5D). The involvement of LOXL2 was further demonstrated using shRNA-mediated depletion in HUVECs (Figure 5E). Knocking down LOX expression slightly affected tube formation, whereas LOXL2 knockdown dramatically decreased tubulogenesis (Figure 5F and supplemental Figure 6E). We then tested the involvement of LOX and LOXL2 catalytic activity using β -APN with cells depleted for LOXL2 and LOX, respectively. Whereas 48% of the tubes generated in the presence of LOX were affected, β -APN only inhibited 16% of LOXL2-mediated tube formation (Figure 5F). Time-lapse microscopy demonstrated that β -APN did not block cell migration but rather resulted in the formation of unstable capillaries, with transient lumen formation (supplemental Videos 3-4). Furthermore, adding β -APN after capillary were formed triggered their regression within 4 days of treatment, thus demonstrating that lysyl oxidase enzyme activity is required for maintaining the capillary structure (Figure 5G). We then set up a system in which single EC suspension was seeded both inside the fibrin gel and on the bottom of the culture dish. When maintained with fibroblasts, HUVECs established a 3D network inside the gel and a 2D network under the gel. As shown above (Figure 5F and

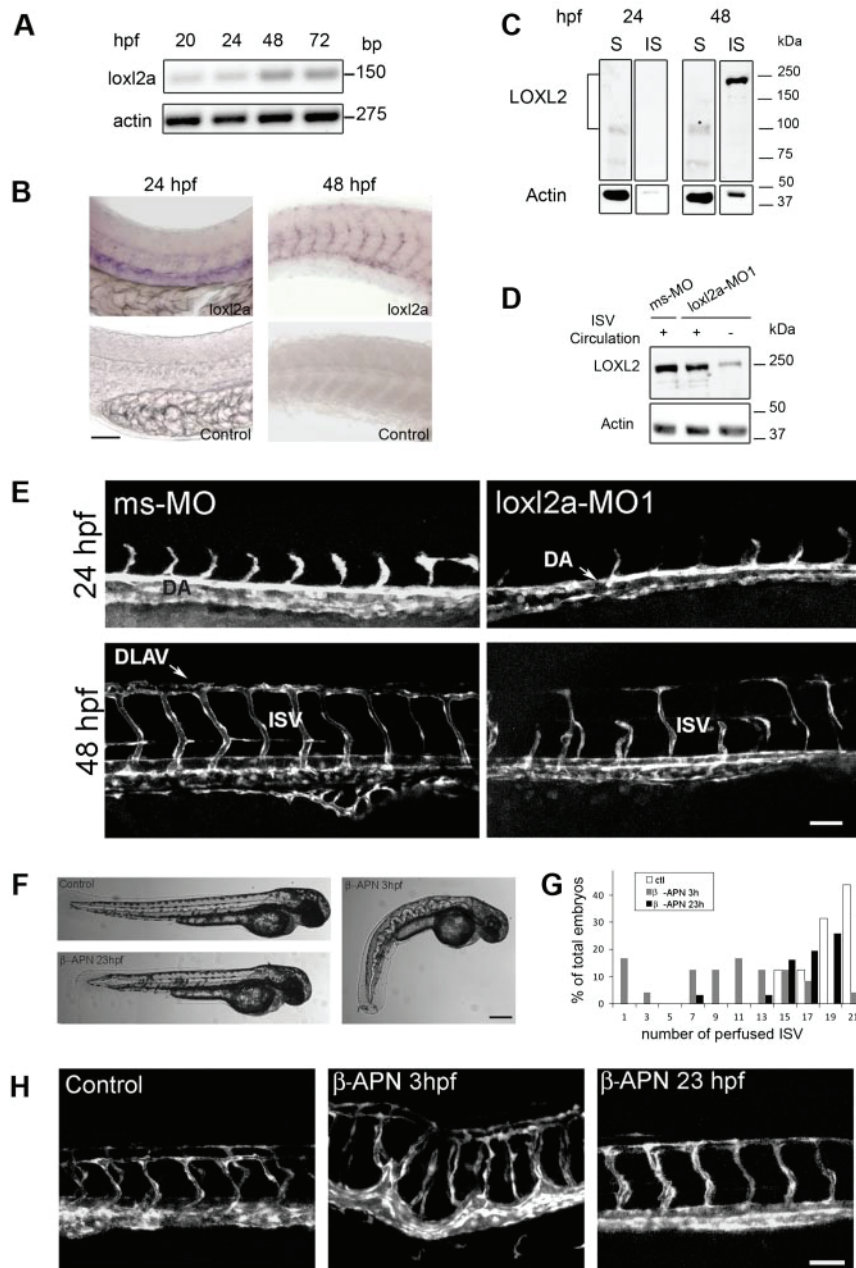


Figure 4. LOXL2 is required for proper formation of intersegmental vessels in zebrafish. (A) Semiquantitative RT-PCR of *loxl2a* and *actin* mRNA from zebrafish embryos was performed at different developmental stages (20–72 hpf). (B) Whole-mount in situ hybridization of *loxl2a* in zebrafish embryos at 24 and 48 hpf using a sense probe as a control. Bar: 50 μ m. (C) LOXL2 and actin were immunodetected in protein extracts of 24 and 48 hpf embryos. Proteins were sequentially extracted in an NP40/Deoxycholate-soluble fraction (S) and in an SDS-soluble fraction (IS). (D) Zebrafish embryos (48 hpf) injected with mismatch (ms-MO) or *loxl2a* morpholinos (*loxl2a*-MO1) morpholinos were sorted according to the presence (+) or the absence (–) of ISV blood circulation. SDS-soluble proteins were subjected to immunoblotting for actin and LOXL2 detection. (E) Confocal images of Tg(*fli1:egfp*)y1 zebrafish embryos at 24 and 48 hpf, injected with either mismatch (ms-MO) or *loxl2a* morpholinos (*loxl2a*-MO1). Bar: 100 μ m. (F) Brightfield images of 48 hpf embryos untreated (control) or treated with β -APN at 3 hpf and 23 hpf. Bar: 250 μ m. (G) Quantification of the number of perfused ISV in 48 hpf embryos untreated or treated with β -APN at 3 hpf or 23 hpf (n = 30–32 embryos per condition). (H) Confocal images of Tg(*fli1:egfp*)y1 zebrafish embryos at 48 hpf, untreated or treated with β -APN at 3 hpf or 23 hpf. Bar: 100 μ m. See also supplemental Figure 5 and supplemental Videos 1–3.

supplemental Figure 6E) using Cytodex beads, silencing LOXL2 inhibited the 3D tubular organization inside the gel, whereas it only slightly decreased the total network density (Figure 5H). Altogether, these data demonstrated that LOXL2 knockdown induced a dramatic decrease of endothelial tube formation in 3D, while inhibiting catalytic activity only slightly affected capillary formation.

LOXL2 modulates EC migration and proliferation

Considering that LOXL2 regulates angiogenesis in vivo and capillary formation in vitro, we investigated the processes that could mediate this effect: cell migration and proliferation, and ECM assembly. Slightly reduced migration was observed when endogenous LOXL2 expression was knocked down compared with ECs transfected with control siRNA (–24.2%; Figure 6A). Transient overexpression of LOXL2 increased EC motility to 156.7% (Figure 6B). β -APN partially inhibited migration

induced by LOXL2 overexpression (42%), suggesting that LOXL2 regulates cell-ECM interactions both independently of and through its catalytic activity. As cell migration depends in vivo on ECM stiffness and on interactions with the microenvironment that are absent from 2D cell culture, migration was further assayed in a 3D setting. In the absence of fibroblasts, HUVECs seeded on Cytodex beads migrate in the fibrin gel without 3D tubulogenesis (Figure 6C left panel). HUVECs infected with a lentivirus encoding human *loxl2* for sustained overexpression displayed increased 3D migration (Figure 6C). Cell proliferation in LOX- and LOXL2-depleted EC was assayed in the presence of FBS (Figure 6D). EC proliferation was decreased to the same extent in both cases. These results suggested that even though LOXL2 modulation of migration and proliferation could alter tube formation, additional mechanisms might mediate the regulation of capillary formation by this enzyme in zebrafish embryos and fibrin gels (Figures 4E and 5F, respectively).

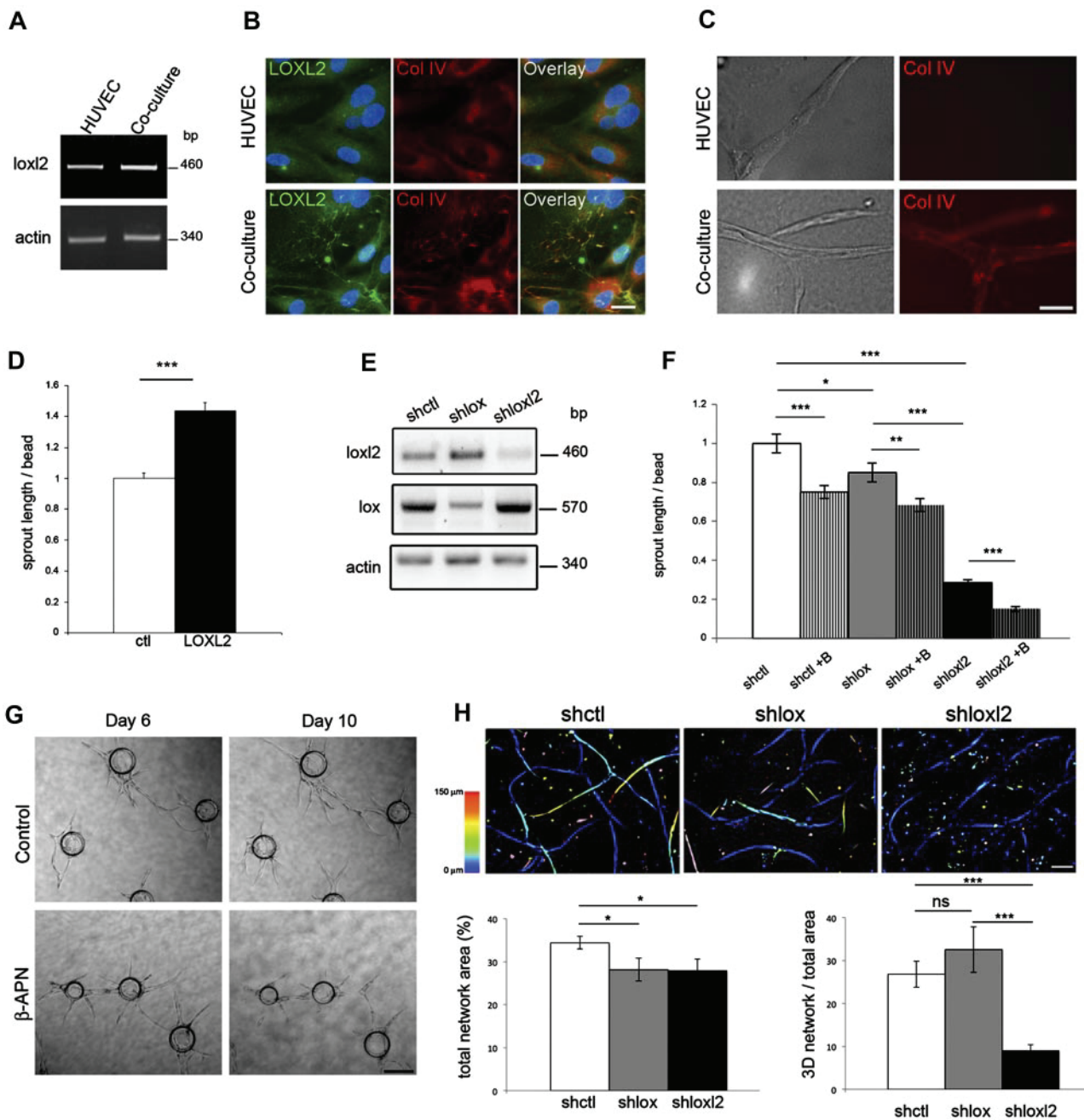


Figure 5. LOXL2 increases tubulogenesis in 3D fibrin gel. (A-C) Culture of HUVECs in absence (HUVEC) or presence (Coculture) of fibroblasts. HUVECs were seeded in 6 well plates and fibroblasts in culture inserts above HUVECs (A-B). Cells were maintained in complete medium for 2 days (A) or 4 days (B). (A) Expression of *lox12* mRNA was measured by semiquantitative RT-PCR. *Actin* was used as control. A representative gel of 3 independent experiments is shown. (B) Distribution of LOXL2 and collagen IV was analyzed by immunofluorescence. Nuclei were stained with DAPI. Bar: 20 μ m. (C) Single HUVEC suspension was embedded in fibrin gels and maintained in the presence (coculture) or absence (HUVEC) of fibroblasts on top of the gel. Immunofluorescence staining of collagen IV was performed. Bar: 50 μ m. (D, F) HUVEC-coated Cytodex beads were embedded in fibrin gels and maintained in the presence of fibroblasts. Images were acquired at day 6 for sprout length measurement. For each experiment ($n = 3$), mean total length of sprouts per bead was normalized to the mean of control cells. Graph represents the mean of normalized values \pm SEM. * $P < .05$, ** $P < .005$, and *** $P < .001$. (D) HUVECs were infected with a control (ctl) or a *lox12* coding lentivirus (LOXL2). (E-F) HUVEC were infected with lentiviruses coding for either control (shctl) or *lox* (shlox) or *lox12* (shlox12) shRNA. (E) Semiquantitative RT-PCR of *lox*, *lox12*, and *actin*. (F) HUVEC were treated (+β) or not with β-APN. (G) Cocultures were treated with β-APN from day 6 to day 10 to follow sprout evolution. Bar: 200 μ m. (H) Single cell suspensions of HUVEC infected with lentiviruses coding for either control (shctl), or *lox* (shlox), or *lox12* (shlox12) shRNA were embedded in fibrin gel at 100×10^3 cells per well under low cross-linking conditions. Cells were maintained in the presence of fibroblasts on top of the gel and stained with CMTMR CellTracker. Epifluorescence z-stacks (150 μ m thick and 10 μ m step) were acquired and treated with ImageJ Version 1.43. Projections are represented with a 0-150 μ m color-code for depth in the z dimension. Bars: 100 μ m (H). Graphs represent measurements from one experiment (duplicate wells and 4 fields per well). SEM * $P < .05$ and *** $P < .001$. See also supplemental Figure 6 and supplemental Videos 4-5.

LOXL2 is involved in collagen IV network assembly

Considering that lysyl oxidases are primary candidates for modulating microenvironment rigidity,³⁰ the role of LOXL2 in endothelial ECM assembly was investigated. Strikingly, collagen IV network

assembly was strongly decreased when LOXL2 expression was knocked down, whereas LOX depletion had no effect (Figure 7A). The involvement of LOXL2 in collagen IV assembly was further supported by: (–1) absence of modification of *col4a1* mRNA

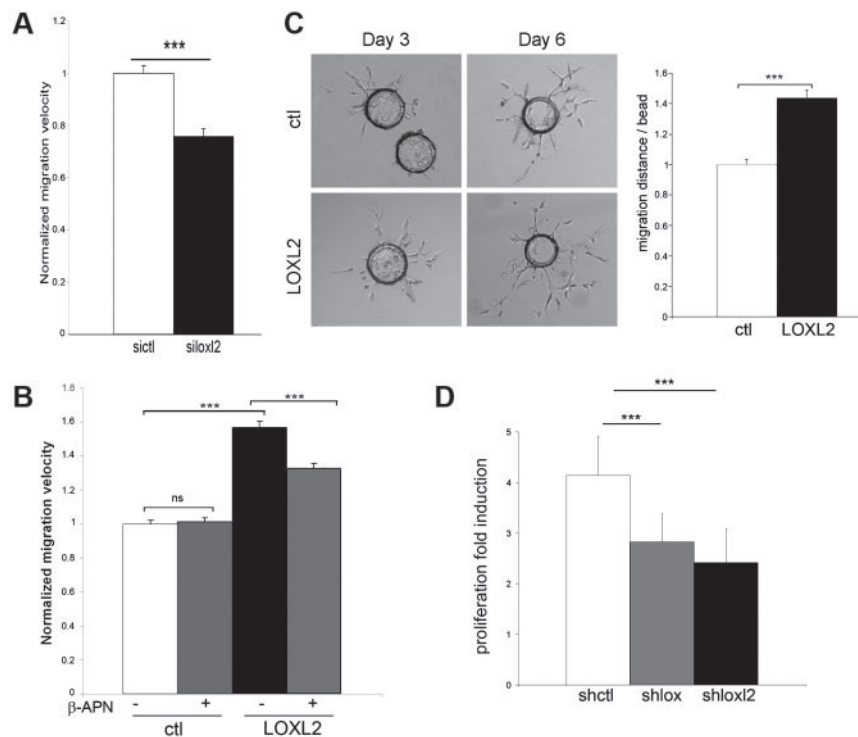


Figure 6. LOXL2 is involved in endothelial migration and proliferation. (A-B) HUVEC motility on fibronectin in serum-free medium containing 10 ng/mL VEGF and 10 ng/mL bFGF was measured by time-lapse microscopy. Images were acquired every 5 minutes over the next 12 hours for cell tracking. For each experiment (A: $n = 4$; B: $n = 3$), velocity was normalized to the mean of control cell velocity. Graph represents the mean of normalized values \pm SEM. (A) HUVECs were transfected with either control (sic1l) or *lox12* (silox12) siRNA. (B) HUVECs were transfected with a plasmid either empty (ct1) or coding for LOXL2 and incubated in the presence or absence of β -APN. (C) HUVEC migration in 3D fibrin gel was assessed using cells infected with control (ct1) or LOXL2 coding lentivirus. HUVEC-coated Cytodex beads were embedded in a fibrin gel and maintained in complete medium supplemented with 10 ng/mL bFGF. Bright-field images were acquired (left panel) for migration measurement (right panel). Mean distance per bead was normalized to the mean of controls. Bar: 200 μ m. (D) FBS-induced proliferation of HUVECs infected with lentiviruses coding for either control (shct1) or *lox* (shlox) or *lox12* (shlox12) shRNA. Graph represents the mean of normalized values \pm SD. *** $P < .001$.

expression (Figure 7B); (-2) increased amount of soluble collagen IV in the secretion medium (Figure 7C). Together, these data suggested that collagen IV was secreted but not incorporated in the ECM. LOXL2 was then reexpressed in shRNA silenced HUVECs (Figure 7D). Rescuing LOXL2 expression increased collagen IV network assembly in hypoxic ECM (Figure 7E), confirming LOXL2 involvement in this process. To determine whether collagen IV was cross-linked, confluent HUVECs were treated with β -APN in hypoxia for 5 days. Inhibiting lysyl oxidase activity increased the amount of collagen IV solubilized from the ECM (Figure 7F), but did not alter collagen IV network assembly (Figure 7G). To further investigate the role of collagen IV assembly in tubulogenesis, *col4a1* was down-regulated using shRNA (Figure 7H-I). Loss of *col4a1* inhibited tubulogenesis to a similar extent as LOXL2 depletion (Figure 7J). These data suggest that LOXL2 is involved in collagen IV assembly in the vascular basement membrane which in turn could mediate the modulation of capillary formation.

Discussion

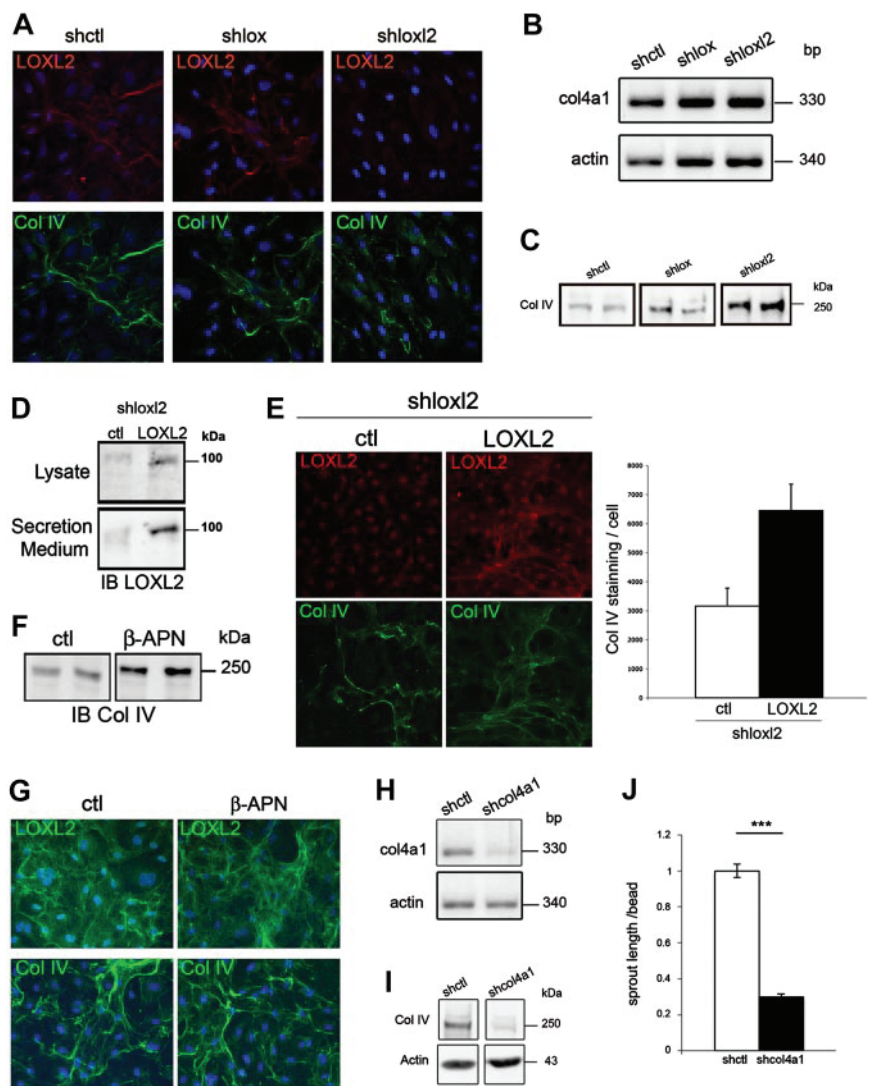
ECM remodeling plays a major role in the development of a functional vascular system.^{5,31} Whereas ECM degradation has been the subject of many studies, the mechanisms of ECM assembly and their impact on the early steps of capillary formation, before perivascular cell recruitment, remain elusive. Here we report the first demonstration of the regulation of angiogenesis by LOXL2, a secreted protein involved in remodeling the extracellular microenvironment. LOXL2 is expressed in angiogenic EC and accumulates in the vascular basement membrane of developing vessels. This expression pattern is associated with the functional involvement of LOXL2 in capillary formation mediated primarily by collagen IV network assembly and by EC proliferation and migration.

We and others had already reported that *lox12* is up-regulated in ECs after short-term exposure to low O_2 concentrations.^{24,32} This effect is mediated by HIF1 α in EC as in tubular epithelial cells.^{12,25} In this study, we show that the sustained induction of *lox12* mRNA results in the accumulation of the protein in the endothelial ECM during long-term exposure to hypoxia, as this is the case for tip cells invading avascular territories. Indeed, the up-regulation of *lox12* mRNA in tip cells was recently reported during vascularization of the retina.¹⁸ A former study analyzing the whole proteome of HUVECs in hypoxia failed to detect LOXL2, even though its mRNA was highly up-regulated.³² Whereas analysis of whole cell lysate is limited by the low amount of secreted proteins compared with abundant cytoplasmic proteins, a subproteomic approach, as we performed here for ECM-associated proteins, is a more powerful tool. The induction of angiogenesis regulators such as VEGF, thrombospondin-1 and angiopoietin-like 4, occurs with similar kinetics as LOXL2 in mouse postischemic revascularization,^{17,20,26} suggesting that this enzyme is part of the EC angiogenic response. Indeed, we show that activation of capillary formation in vitro increases LOXL2 expression and deposition in the ECM. These data also demonstrated that additional angiogenic factors regulate LOXL2 expression.

Our study provides the first evidence for the expression of LOXL2 in the vascular wall of neovessels, where it is colocalized with collagen IV. LOXL2 expression had already been reported in other cells that deposit basement membrane.^{12,33,34} LOXL2 could thus be the member of the lysyl oxidase family more specifically targeted to basement membranes and dedicated to cross-linking the nonfibrillar collagen IV. Lysyl oxidase-mediated crosslinks are located in the 7S domain of collagen IV, but the lysyl oxidase responsible is not identified yet.³⁵ The 7S domain contains the potential cross-linking site Gly-Thr-Hyl-Gly-Glu-Arg, which differs from that of the fibrillar collagens that are LOX substrates

Figure 7. LOXL2 is functionally involved in the hypoxia-induced network assembly of collagen IV.

(A-C) HUVECs transfected with control (shctl), *lox* (shlox), or *lox2* (shlox2) shRNA were cultured in hypoxia. (A) Immunofluorescence detection of LOXL2 and collagen IV (Col IV) was performed. Nuclei were stained with DAPI (blue). (B) Semiquantitative RT-PCR of *col4a1* and *actin* from HUVEC transfected with control, *lox* or *lox2* shRNA. (C) Overnight media were collected and subjected to immunoblotting for collagen IV (Col IV). (D-E) *Loxl2*-depleted HUVEC (shlox2) were infected with control (ctl) or LOXL2 coding lentivirus (LOXL2). (D) Cell lysates and secretion media were subjected to immunoblotting for LOXL2 detection (IB LOXL2). (E) Immunofluorescence of LOXL2 and collagen IV (Col IV) in the ECM of EC incubated in hypoxia. Collagen IV assembly was analyzed by confocal microscopy (left panel) and quantified using ImageJ (right panel). (F-G) HUVEC were cultured in hypoxia in absence (ctl) or presence of β -APN for 5 days. (F) Duplicate ECM extracts were subjected to immunoblotting of collagen IV. (G) Immunofluorescence detection of LOXL2 and collagen IV (Col IV). (H-J) HUVECs transfected with control (shctl) or *col4a1* (shcol4a1) shRNA. (H) Semiquantitative RT-PCR of *lox2*, *col4a1*, and *actin*. (I) Collagen IV (Col IV) expression in HUVECs was detected by immunoblot in total lysate (cell and extracellular matrix). (J) HUVECs were coated on Cytodex beads, embedded in fibrin gels and maintained in the presence of fibroblasts. Images were acquired at day 6 for sprout length measurement. For each experiment ($n = 3$), total length of sprouts per bead was normalized to the mean of control cells. Graph represents the mean of normalized values \pm SEM. *** $P < .001$.



(Gly-X-Hyl-Gly-His-Arg). This sequence could thus specify collagen IV as a substrate for LOXL2 rather than LOX. More importantly, we demonstrate that LOXL2 expression is functionally required for proper assembly of collagen IV in the basement membrane. In contrast, knocking-down LOX does not affect collagen IV assembly. Indeed, several lines of evidence support that LOXL2, rather than LOX, is responsible for collagen IV assembly and cross-linking: (–1) Unlike LOXL2, LOX is not colocalized with collagen IV in hypoxic HUVECs (data not shown); (–2) the complementary distribution of LOX and LOXL2 in cells that generate the interstitial ECM or that deposit basement membrane, respectively, was reported in the epidermis and placenta^{33,34}; (–3) collagen IV up-regulates LOXL2 expression and exerts opposite effects on LOX³³; (–4) there is no modification of collagen IV deposition nor of basement membrane organization in LOX knockout mice, whereas fibrillar collagen organization is altered³⁶; in contrast, LOXL2 knockdown does not affect deposition of collagen I.¹⁰ We found that inhibiting LOXL2 cross-linking activity did not affect collagen IV assembly. Assembly could thus be mediated by LOXL2 N-terminal domain that consists in 4 SRCR domains absent in LOX. An interesting hypothesis is thus that interaction of LOXL2 with collagen IV would first mediate its homotetramerization and the formation of the basement membrane

network, and would then allow cross-linking and stabilization of this network.

Knocking down LOXL2 expression decreased capillary formation both in vivo and in a 3D tubulogenesis model in vitro. In zebrafish embryos, LOXL2 knockdown impaired formation of ISV and of branchial arch vessels. Sprout guidance was not affected, as EC migrated along the intersomitic septae without vascular patterning defect, but EC protrusive activity was impaired. Proliferation of ECs, including tip cells, is required during ISV formation and in vitro tubulogenesis.³⁷ Whereas LOXL2 depletion dramatically affects tubulogenesis, it decreases cell proliferation to the same level as LOX depletion, suggesting that LOXL2 regulates capillary formation through additional mechanisms. EC migration is inhibited by LOXL2 depletion in vitro and could also participate to tubulogenesis down-regulation. Several studies described the regulation of cell migration by lysyl oxidases,^{12,38} and LOXL2 was recently proposed to act as a regulator of tumor cell migration.³⁹ The mechanisms involved however remain unresolved. LOX-mediated migration is correlated with Src and FAK phosphorylation because of hydrogen peroxide generation³⁸ or of oxidation of cell surface receptors.⁴⁰

Multiple levels of cell-ECM interactions are potentially involved in capillary formation. Here, we demonstrate that *col4a1*

depletion inhibits tubulogenesis to a similar extent as *lox12* depletion. Down-regulating collagen IV network in the ECM, and subsequently both the integrin-mediated and the mechanotransductive signaling might constitute an important mediator of decreased capillary formation.¹⁵ Collagen IV is not required for proper organization of the basement membrane, but it is essential for its structural integrity.⁴¹ Whereas the overall development of large vessels is not affected in mice invalidated for *col4a1/2*, reduced capillary density and irregular protrusion of capillaries were described.⁴¹ In a similar manner, LOXL2a depletion in zebrafish affects ISV formation but does not alter aorta development and perfusion. It is thus tempting to propose that LOXL2 regulates productive capillary sprouting through network assembly of collagen IV. Collagen IV network assembly could provide the structural features and stiffness required for the tunnel formation involved in capillary morphogenesis.⁴²⁻⁴⁵ Quite remarkably, we found that it is indeed the 3D organization of endothelial cells inside the gel that is affected by loss of LOXL2 expression, whereas tubulogenesis is not affected when cells are seeded on the rigid culture dish and only covered by the gel.

The molecular mechanisms of action of LOXL2 remain to be characterized. Nevertheless, we report that cell migration and tubulogenesis, both in vivo and in vitro, were more affected by LOXL2 loss of expression than by its pharmacologic inhibition by β -APN. Similarly, collagen IV assembly in the ECM was dramatically reduced by loss of LOXL2 expression, but was not inhibited by β -APN, even though LOXL2 is the main source of β -APN-sensitive lysyl oxidase activity. Altogether, these data suggest that LOXL2 regulated these processes through mechanisms that are partially independent of lysyl oxidase activity. In agreement with these observations, an antibody directed against the SRCR domains of LOXL2 and blocking its enzyme activity could inhibit tumor growth more efficiently than β -APN.¹⁰ This antibody is however not as efficient as β -APN for inhibiting the catalytic activity in vitro.⁷ These data suggest that blocking LOXL2 interactions with the microenvironment outperforms catalytic inhibition alone.

Altogether, our study provides the first evidence for the regulation of angiogenesis by LOXL2, suggesting the following model. The induction of LOXL2 expression by angiogenic stimulators like hypoxia participates to cell proliferation and migration and initiates the proper deposition of collagen IV in the basement

membrane by tip cells. The resulting vascular microenvironment is required for optimal formation of patent capillaries.

Acknowledgments

The authors are grateful to Sylvie Ricard-Blum for helpful discussion along the development of this study. They thank Laure Bernard (PRECI, IFR 128 Biosciences Gerland, Lyon) and Sophie Vrize and Christine Rampon (CIRB, CNRS UMR 7241, Collège de France, Paris) for zebrafish facilities. Confocal and time-lapse microscopy was performed at both the PLATIM core facility (IFR 128 Biosciences-Gerland, Lyon) and the Ibis ImaChem facility (ENS-Collège de France, Paris).

M.B., C.P.-T., and N.B. were supported by grants from the Société Française d'Hypertension Artérielle (SFHTA), the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR), and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), respectively. This work was supported in part by ANR-06-JCJC-0160 and by La Ligue Nationale contre le Cancer.

Authorship

Contribution: M.B. and C.P.T. designed and performed research and analyzed data; J.H., M.M., N.B., L.N., A.B., J.T., E.G., and E.E. performed experiments; M.C., R.J.C., and F.R. provided expertise and contributed to the design and analysis of the study; and L.M., C.M., and S.G. supervised the study and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

The current affiliation for J.H. is Université de Rouen, Laboratoire "Polymères, Biopolymères, Surfaces," FRE CNRS 3101, Plate-forme protéomique de l'IFRMP 23, Mont-Saint-Aignan, France. The current affiliation for L.N. is Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária-Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence: Laurent Muller, College de France, Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), 11 place Marcelin Berthelot, Paris, F-75005, France; e-mail: laurent.muller@college-de-france.fr.

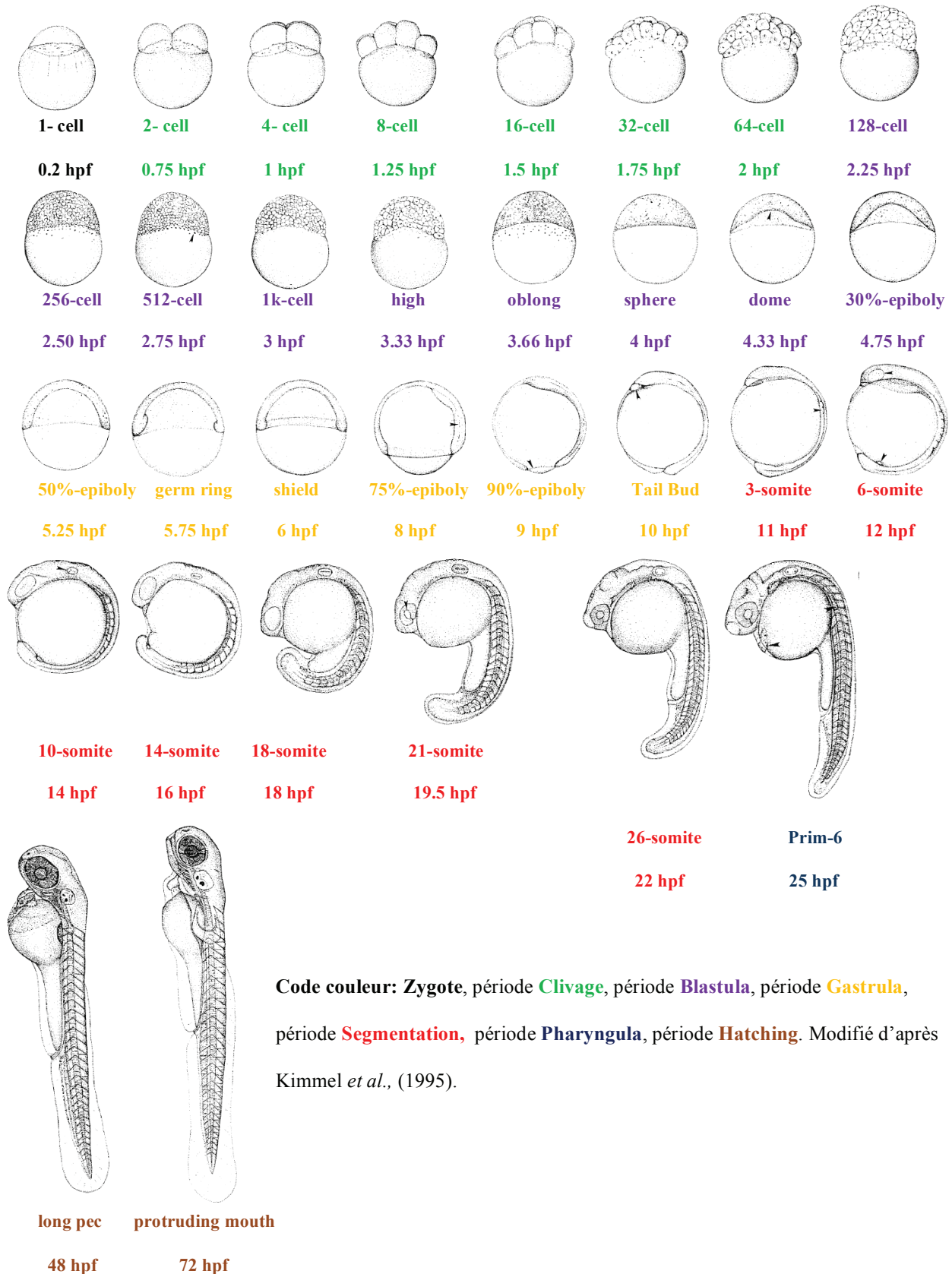
References

- Germain S, Monnot C, Muller L, Eichmann A. Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(3):245-251.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 2003;161(6):1163-1177.
- West H, Richardson WD, Fruttiger M. Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes. *Development*. 2005;132(8):1855-1862.
- Iruela-Arispe ML, Davis GE. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev Cell*. 2009;16(2):222-231.
- Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res*. 2005;97(11):1093-1107.
- Maki JM. Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions. *Histol Histopathol*. 2009;24(5):651-660.
- Rodriguez HM, Vaysberg M, Mikels A, et al. Modulation of lysyl oxidase-like 2 enzymatic activity by an allosteric antibody inhibitor. *J Biol Chem*. 2010;285(27):20964-20974.
- Maki JM, Rasanen J, Tikkanen H, et al. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation*. 2002;106(19):2503-2509.
- Liu X, Zhao Y, Gao J, et al. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet*. 2004;36(2):178-182.
- Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, et al. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med*. 2010;16(9):1009-1017.
- Brekhan V, Lugassie J, Zaffryar-Ellot S, et al. Receptor activity modifying protein-3 mediates the protumorigenic activity of lysyl oxidase-like protein-2. *Faseb J*. 2011;25(1):55-65.
- Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2007;117(12):3810-3820.
- Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, et al. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J*. 2005;24(19):3446-3458.
- Lelievre E, Hinek A, Lupu F, Buquet C, Soncin F, Mattot V. VE-statin/egfl7 regulates vascular elastogenesis by interacting with lysyl oxidases. *EMBO J*. 2008;27(12):1658-1670.
- Kumar S, Weaver VM. Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(1-2):113-127.
- Chomel C, Cazes A, Faye C, et al. Interaction of the coiled-coil domain with glycosaminoglycans protects angiopoietin-like 4 from proteolysis and regulates its antiangiogenic activity. *Faseb J*. 2009;23(3):940-949.
- Brechot N, Gomez E, Bignon M, et al. Modulation of macrophage activation state protects tissue from necrosis during critical limb ischemia in thrombospondin-1-deficient mice. *PLoS ONE*. 2008;3(12):e3950.

18. del Toro R, Prahst C, Mathivet T, et al. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood*. 2010;116(19):4025-33.
19. Le Jan S, Amy C, Cazes A, et al. Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2003;162(5):1521-1528.
20. Cazes A, Galaup A, Chomel C, et al. Extracellular matrix-bound angiopoietin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton. *Circ Res*. 2006;99(11):1207-1215.
21. Palamakumbura AH, Trackman PC. A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples. *Anal Biochem*. 2002;300(2):245-251.
22. Nakatsu MN, Sainson RC, Aoto JN, et al. Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUV-EC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and angiopoietin-1. *Microvasc Res*. 2003;66(2):102-112.
23. Faye C, Inforzato A, Bignon M, et al. Transglutaminase-2: a new endostatin partner in the extracellular matrix of endothelial cells. *Biochem J*. 2010;427(3):467-475.
24. Le Jan S, Le Meur N, Cazes A, et al. Characterization of the expression of the hypoxia-induced genes neurtin, TXNIP and IGFBP3 in cancer. *FEBS Lett*. 2006;580(14):3395-3400.
25. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005;105(2):659-669.
26. Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzensbichler B, Isner JM. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol*. 1998;152(6):1667-1679.
27. Gansner JM, Mendelsohn BA, Hultman KA, Johnson SL, Gitlin JD. Essential role of lysyl oxidases in notochord development. *Dev Biol*. 2007;307(2):202-213.
28. Isogai S, Lawson ND, Torrealdaly S, Horiguchi M, Weinstein BM. Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development*. 2003;130(21):5281-5290.
29. Reynaud C, Baas D, Gleyzal C, Le Guellec D, Sommer P. Morpholino knockdown of lysyl oxidase impairs zebrafish development, and reflects some aspects of copper metabolism disorders. *Matrix Biol*. 2008;27(6):547-560.
30. Levental KR, Yu H, Kass L, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009;139(5):891-906.
31. Rhodes JM, Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med*. 2007;11(2):176-205.
32. Scheurer SB, Rybak JN, Rosli C, Neri D, Elia G. Modulation of gene expression by hypoxia in human umbilical cord vein endothelial cells: a transcriptomic and proteomic study. *Proteomics*. 2004;4(6):1737-1760.
33. Fujimoto E, Tajima S. Reciprocal regulation of LOX and LOXL2 expression during cell adhesion and terminal differentiation in epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2009;55(2):91-98.
34. Hein S, Yamamoto SY, Okazaki K, Jourdan-LeSaux C, Csiszar K, Bryant-Greenwood GD. Lysyl oxidases: expression in the fetal membranes and placenta. *Placenta*. 2001;22(1):49-57.
35. Reiser K, McCormick RJ, Rucker RB. Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *Faseb J*. 1992;6(7):2439-2449.
36. Maki JM, Sormunen R, Lippo S, Kaarteenaho-Wiik R, Soininen R, Myllyharju J. Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues. *Am J Pathol*. 2005;167(4):927-936.
37. Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling and the regulation of angiogenesis. *Cell Adh Migr*. 2007;1(2):104-106.
38. Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, et al. Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res*. 2005;65(24):11429-11436.
39. Hollosi P, Yakushiji JK, Fong KS, Csiszar K, Fong SF. Lysyl oxidase-like 2 promotes migration in noninvasive breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *Int J Cancer*. 2009;125(2):318-327.
40. Lucero HA, Ravid K, Grimsby JL, et al. Lysyl oxidase oxidizes cell membrane proteins and enhances the chemotactic response of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2008;283(35):24103-24117.
41. Poschl E, Schlotzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development*. 2004;131(7):1619-1628.
42. Kucera T, Strlic B, Regener K, Schubert M, Laudet V, Lammert E. Ancestral vascular lumen formation via basal cell surfaces. *PLoS One*. 2009;4(1):e4132.
43. Sacharidou A, Koh W, Stratman AN, Mayo AM, Fisher KE, Davis GE. Endothelial lumen signaling complexes control 3D matrix-specific tubulogenesis through interdependent Cdc42- and MT1-MMP-mediated events. *Blood*. 2010;115(25):5259-5269.
44. Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood*. 2009;114(24):5091-5101.
45. Zovein AC, Luque A, Turlo KA, et al. Beta1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. *Dev Cell*. 2010;18(1):39-51.

Annexes

STADES DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU POISSON ZEBRE



Code couleur: Zygote, période **Clivage**, période **Blastula**, période **Gastrula**,
période **Segmentation**, période **Pharyngula**, période **Hatching**. Modifié d'après
Kimmel *et al.*, (1995).