



HAL
open science

Etude du développement des tendons et de leur interaction avec les précurseurs de muscles lors de la myogenèse appendiculaire chez la Drosophile

Lilia Laddada

► **To cite this version:**

Lilia Laddada. Etude du développement des tendons et de leur interaction avec les précurseurs de muscles lors de la myogenèse appendiculaire chez la Drosophile. Biologie du développement. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAC011 . tel-01887368

HAL Id: tel-01887368

<https://theses.hal.science/tel-01887368v1>

Submitted on 4 Oct 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.

*ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

Thèse

Présentée à l'université Clermont-Auvergne

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR

(Décret du 5 juillet 1984)

**Étude du développement des tendons et de leur
interaction avec les précurseurs de muscles lors de la
myogenèse appendiculaire chez la drosophile**

LADDADA Lilia

Spécialité : Biologie du développement

Directeur de thèse : **DR. SOLER Cédric**

Soutenue publiquement le vendredi 04 mai 2018

Membres du JURY

DR. AUDIBERT Agnès, rapporteur, Université Paris VI.

DR. DUPREZ Delphine, rapporteur, Université Paris VI.

DR. SUZANNE Magalie, rapporteur, Université de Toulouse.

DR. GACHE Vincent, examinateur, Université Lyon1.

DR. JAGLA Krzysztof, membre invité, Université Clermont-Auvergne.

Résumé

La mise en place du système musculo-(exo)squelettique de la drosophile est un modèle d'organisation particulièrement propice à l'étude des interactions tissulaires au cours du développement.

Notre étude vise à, d'une part, comprendre la myogenèse appendiculaire à travers l'étude des interactions précoces entre les précurseurs de tendon et les myoblastes, et d'autre part, étudier les mécanismes de différenciation des précurseurs de tendons associés au disque de patte. Dans ce contexte nous avons adapté la méthode GRASP (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners) ainsi que l'imagerie en temps réel à notre modèle pour démontrer l'existence des interactions cellulaires entre les précurseurs de tendons et les myoblastes, nous avons aussi mis au point une approche cellule-spécifique afin de trier les précurseurs de tendons et les myoblastes associés au disque de patte, ce qui nous a permis d'obtenir dans un premier temps les données transcriptomiques des précurseurs de tendons.

J'ai également étudié l'impact de l'altération des précurseurs de tendon sur le comportement des myoblastes associés et inversement. Nos résultats montrent que l'altération du développement des tendons entraîne une désorganisation spatiale des myoblastes environnants.

Dans la seconde partie de mon projet, je me suis intéressée à l'implication de la voie Notch et des gènes de la famille *odd-skipped* dans la différenciation et la morphogenèse des précurseurs de tendon. J'ai ainsi démontré que Notch est nécessaire et localement suffisant pour induire l'expression de *stripe* et que les gènes *odd-skipped* et *stripe* coopèrent en aval cette voie pour permettre l'invagination et l'élongation sous forme de tube des longs tendons internes de la patte.

Mots Clés : *Drosophila*, Myogenèse, Tendon, Notch.

Abstract

The formation of the musculo-(exo)skeletal system in *Drosophila* is a remarkable example of tissue patterning making it a suitable model for studying multiple tissue interactions during development.

The aim of our study is to better understand appendicular myogenesis through the identification of early interactions between tendon and muscle precursors, and by investigating the mechanisms governing the specification of tendon cell precursors of the leg disc.

In order to characterize the interaction between these two tissues, we adapted the GRASP method (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners) and set up live imaging experiments to reveal cellular interactions between tendon precursors and myoblasts. We have also conducted a genome wide cell-specific analysis using Fluorescence-activated cell sorting (FACS) on imaginal discs which allowed us to perform a tendon cell specific transcriptional analysis.

To test whether reciprocal muscle-tendon interactions are necessary for correct muscle-tendon development, I performed experiments to specifically interfere with the development of tendon or muscle precursors. By altering tendon precursors formation during the early steps of leg development, we affect the spatial localization of the associated myoblasts. These findings provide the first evidence of the developmental impact of early interactions between muscle and tendon precursors in the leg disc.

In the second part of my project, I investigated the role of Notch pathway and *odd-skipped* genes in the differentiation and morphogenesis of tendon precursors. Thus, I have demonstrated that Notch signalling pathway is necessary and locally sufficient for the initiation of *stripe* expression, and that both *odd-skipped* genes and *stripe* are required downstream of Notch to promote morphological changes associated with formation of long tubular tendons.

Key words: *Drosophila*, Myogenesis, Tendon, Notch.

Remerciements

Je voudrais remercier tout d'abord Krzysztof JAGLA pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son équipe pendant ces 3 ans et demi, pour ses nombreux conseils et ses encouragements.

Je tiens aussi à remercier mon encadrant Cédric SOLER pour m'avoir permis de faire ma thèse (et la finir !), de sa présence, sa disponibilité et sa patience qui ont constituées un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené jusqu'à bon port.

Je suis très reconnaissante à Agnès AUDIBERT et Delphine DUPREZ pour l'intérêt qu'elles ont porté à mon travail en prenant part à mes comités de thèse, leurs recommandations, leurs conseils, et d'avoir accepté d'être mes rapportrices.

Je remercie aussi Magalie SUZANNE pour le temps qu'elle m'a accordé et d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et d'évaluer mon travail.

Je remercie également Vincent GACHE pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur.

J'adresse toute ma gratitude aux Gredins (gens du GreD) parmi lesquels se trouve des gens vraiment formidables, qui grâce à leur sympathie quotidienne et leur soutien m'ont permis de faire face au stress et aux incertitudes qu'on rencontre durant les années de thèse. J'aurais voulu remercier chaque personne en citant toutes les anecdotes qu'on a pu avoir mais il aurait fallu écrire au moins 10 pages, et j'avoue que je n'ai plus vraiment le temps pour le faire

Je remercie donc les personnes de mon équipes, TOUS, les actuels et les anciens, j'ai passé beaucoup de bon moments avec vous ; à Quentin pour tous ces moments partagés à essayer de faire des manips et nos aller-retour aux CHU Estaing, ainsi que pour ton aide et ton support, A Guillaume L pour... être ce que tu es et pour faire ce que tu sais faire, et parfois pour ne pas le faire. A Monika pour ta gentillesse et tes petites balades en Auvergne. A Cristiana pour ta sympathie, tes tiramisus et de toujours être partante pour être un modèle pour mes photos. A Guillaume J pour tes critiques toujours faites avec beaucoup de tact (oui c'est ironique) mais remplies de bonnes intentions. A Benjamin pour ta bonne humeur ton soutien et tes surnoms un peu tirés par les cheveux. A Thomas pour ton écoute, ta sympathie et (pas) pour ta culture musicale particulièrement dérangementue que tu interprètes souvent en duo avec GL, et que j'avoue parfois ça a fini par me faire rire. A mes copines Emilie et Lucie qui sont parties en me laissant un grand vide ! A JIPI et Theresa pour leur bonne humeur quotidienne. ...

Je remercie aussi Fabiana pour ton amitié et toutes les discussions intéressantes qu'on a eu et qu'on était les seules à comprendre apparemment, merci d'avoir partagé avec moi ton amour pour les arbres. A Stéphanie M pour tes encouragements et pour me rappeler toujours qu'il faut fêter chaque victoire aussi petite soit-elle, et à tous les autres du « 4eme étage » ou du « ex GreD-coté fac »...Vous allez tous beaucoup me manquer !

A mes amis « extérieurs », qui ont toujours été là pour me changer les idées, à mes « besties » Moh et Imène, à mes cousines Yasmine et Lidia, à Smail, Manu, Alexis et Mouloud...

A Nicolas, pour m'avoir supportée (dans les deux sens du terme) de manière inconditionnelle, surtout pendant le stress de la période de « la dernière ligne droite ».

Enfin, A mes parents et mes frères, qui m'ont souvent manqués ces dernières années mais qui n'ont jamais manqué de me transmettre leur encouragements et leur soutien infaillible.

Table des matières

<i>Introduction</i>	2
I. La myogenèse chez la drosophile	2
1. La myogenèse embryonnaire	2
b. Spécification des progéniteurs musculaires et sélection des cellules fondatrices..	6
c. Formation des myotubes	8
d. Attachement et innervation des myotubes	10
2. La myogenèse Adulte	13
a. Organisation de la musculature adulte et caractéristiques structurelles	13
b. Origine de la musculature adulte	15
c. Mécanismes de formation des muscles adultes.....	18
d. Mécanismes moléculaires de la différenciation des AMPs.....	21
e. Cellules fondatrices des muscles et organisation multi-fibrillaire des muscles adultes.....	23
f. Les cellules souches musculaires et régénération	25
II. Le développement des tendons	27
1. Développement des tendons larvaires au cours de l'embryogénèse.....	27
a. Spécification des cellules tendons au stade embryonnaire:.....	27
b. Guidance et attachement.....	32
c. Différenciation finale des cellules tendons	33
d. Formation de la jonction myotendineuse	34
2. Formation des tendons adultes	37
a. Expression de Sr dans le disque d'aile	37
b. Mise en place de la jonction myotendineuse (MTJ)	37
c. Implication des tendons dans l'assemblage des myofibrilles	39
III. Développement de la patte chez la drosophile	41
1. L'origine du disque de patte.....	43

2.	Etablissement des axes dans le disque de patte	43
a.	L'établissement de l'axe antéro-postérieur (A/P).....	45
b.	L'établissement de l'axe dorso-ventral (D/V).....	45
c.	L'établissement de l'axe proximo-distal (P/D).....	47
3.	Formation des joints entre les segments de la patte	50
a-	La voie de signalisation Notch.....	50
b-	Rôle de Notch dans la détermination des domaines de joints présomptifs	51
4.	La myogenèse appendiculaire	58
a.	Organisation générale de la musculature de la patte	58
b.	Mécanismes moléculaires de la myogenèse appendiculaire.....	59
c.	Différenciation des tendons appendiculaire	62
	<i>But de la recherche</i>	65
	<i>Résultats</i>	68
I.	Caractérisation des interactions entre les précurseurs de muscles et de tendons	68
1.	Mise en évidence des interactions membranaires : méthode GRASP.....	68
2.	Culture de disque ex-vivo et mise au point de l'analyse en temps réel par microscopie confocale (image 4D)	71
3.	Influence des tendons sur le développement des myoblastes	73
a.	Impact sur l'organisation spatiale des myoblastes (publication 2016).....	73
b.	Impact sur la spécification et l'identité des myoblastes	76
c.	Impact sur l'apoptose et la prolifération des myoblastes	76
4.	Influence des myoblastes sur le développement des tendons	79
5.	Analyses transcriptomiques des cellules précurseurs de tendons et des myoblastes appendiculaires.....	81
6.	Matériels et Méthodes	88
a.	Lignées de drosophile utilisées	88
b.	Les systèmes d'expression bipartite de la drosophile :.....	89
c.	Expériences d'immunomarquages	90

d. Imagerie <i>ex vivo</i>	91
e. Tri cellulaire	92
II. L'étude de différenciation des tendons appendiculaires : Rôle de la voie Notch et des gènes Odd-skipped dans la spécification des tendons (Publication)	94
<i>Discussion</i>	96
Interactions muscle-tendon au cours du développement chez les vertébrés et chez la drosophile	96
<i>Mise en place des outils pour caractériser les interactions entre les précurseurs de tendons et les myoblastes</i>	98
<i>Impact de l'altération des précurseurs de tendon sur les myoblastes et réciproquement</i>	100
<i>Analyse transcriptomique des interactions myoblastes/précurseurs de tendon</i>	102
Les mécanismes de régulation de l'expression de <i>stripe</i>	104
<i>L'expression de <i>stripe</i> au cours du développement des tendons est Notch dépendante et nécessite la présence des gènes de la famille odd-skipped</i>	104
<i>D'autres signaux sont nécessaires à l'induction de <i>stripe</i> :</i>	105
<i>Stripe et les gènes odd-skipped pourraient coopérer pour induire la morphogenèse des tendons appendiculaires</i>	106
<i>Les apodèmes appendiculaires : tissu(s) conjonctif(s) primitifs associé(s) aux muscles ?</i>	111
Annexe	114
Références bibliographiques	116

Liste des figures

Figure 1: La myogenèse chez la drosophile.....	1
Figure 2: Le patron musculaire embryonnaire/larvaire.....	3
Figure 3 : Détermination et migration du mésoderme.....	5
Figure 4 : subdivision du mésoderme.....	7
Figure 5: Spécification des myoblastes.....	7
Figure 6: Structures des muscles fibrillaires et des muscles tubulaires.....	12
Figure 7: Organisation de la musculature adulte.....	14
Figure 8: Représentation schématique de la myogenèse thoracique.....	17
Figure 9: Deux populations distinctes de myoblastes dans le disque d'aile.....	20
Figure 10 : Attachement des myotubes à l'épiderme.....	28
Figure 11: Les signaux ectodermiques contrôlant l'expression de <i>stripe</i>	30
Figure 12 : La jonction myotendineuse (MTJ).....	35
Figure 13: Attachement des muscles indirects de vol.....	38
Figure 14: Correspondance entre disques imaginaires larvaires et les structures adultes.....	40
Figure 15: Développement du disque de patte en patte adulte.....	42
Figure 16: Origine embryonnaire du disque de patte.....	44
Figure 17: Segmentation du disque de patte à partir du 3ème stade larvaire.....	46.
Figure 18 : Organisation des différents domaines du disque de patte au cours du développement. ...	48
Figure 19: Rôle de Notch dans la formation des « vrais » joints de la patte.....	53
Figure 20: Réarrangement cellulaire lors de la formation des joints du tarse.....	55
Figure 21: Organisation des muscles et tendons de la patte chez la drosophile.....	57
Figure 22: Le nombre de fibres musculaires de la patte est sous le contrôle de la voie FGF.....	61
Figure 23: Développement coordonné des tendons et des muscles appendiculaires.....	63
Figure 24 : Le développement des précurseurs de tendons et des myoblastes au sein du disque de patte en cours d'évagination.	67
Figure 25: Méthode GRASP (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners) et application aux précurseurs de tendons et myoblastes.....	70
Figure 26: Visualisation en temps réel des filopodes émanant des précurseurs de tendons.....	73
Figure 27: L'altération des tendons affecte le nombre de myoblastes associés au tendon.....	76

Figure 28: L'altération des tendons n'induit pas l'apoptose des myoblastes associés au tendon.....	78
Figure 29 L'absence de myoblastes n'affecte pas le développement des tendons.....	80
Figure 30 : Représentation des processus biologiques majoritairement représentés dans les données de transcriptomique des précurseurs de tendons.....	82
Figure 31 : Diagramme de Venn regroupant la liste des gènes enrichis (FC>2) dans nos données transcriptomiques tendons spécifiques.....	84
Figure 32: Profil d'expression de la Fascicline II dans une sous-région du disque de patte.....	86
Figure 33 : Schéma récapitulatif d'un modèle possible d'interactions entre Notch, Odd et Sr lors du développement des tendons appendiculaires de la drosophile.....	107
Figure 34: L'expression ectopique de <i>stripe</i> entraîne une accumulation de la protéine Notch et est capable d'induire l'expression de Odd.....	109
Figure 35: Tissus connectifs chez les vertébrés.....	112

Introduction

“Il n'y a pas de synthèse : il n'y a que le discontinu.”
Jules Renard / Journal 1893 - 1898

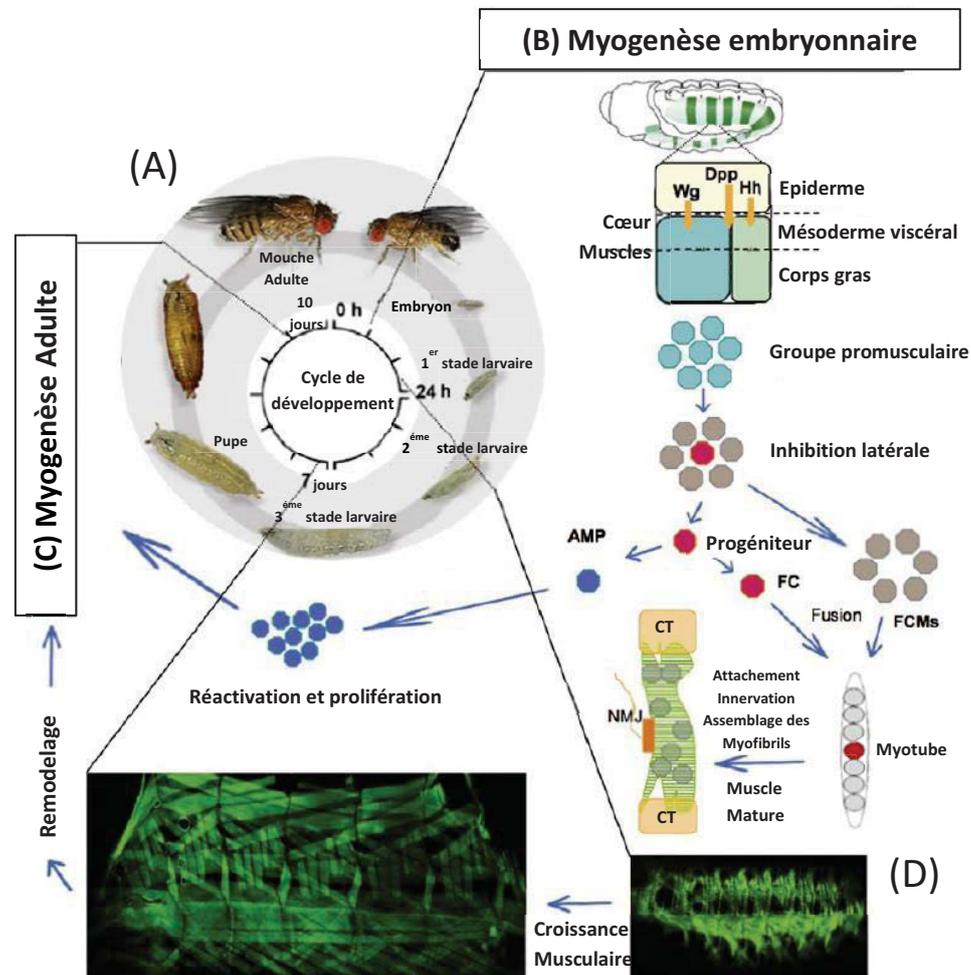


Figure 1: La myogenèse chez la drosophile

(A) Le cycle de vie de la drosophile comporte 4 stades principaux : embryon, larve, pupes et adulte. (B) Au cours de l'embryogenèse, le mésoderme est segmenté et subdivisé en groupes pro-musculaires exprimant le gène pro-neuronal, *letal of scute* (*l'sc*). Un processus d'inhibition latérale restreint l'expression de *l'sc* à une cellule progénitrice par groupe alors que les cellules non sélectionnées deviennent des myoblastes compétents à la fusion (FCM). Après division asymétrique, la cellule progénitrice donne soit 2 cellules fondatrices (FC) soit une seule FC et un précurseur de muscle adulte (AMP) qui participera à la myogenèse adulte (C). Chaque FC par fusion avec des FCM est à l'origine de la formation d'un myotube dont la différenciation donnera naissance à une fibre musculaire spécifique. Au cours de leur différenciation, les myotubes en croissance interagissent avec les cellules tendons (CT) et avec les motoneurones pour établir des jonctions neuromusculaires (NMJ). (D) La myogenèse embryonnaire conduit à l'établissement d'un modèle stéréotypé de 30 muscles par hémisegment révélés par l'expression de la protéine de fusion Mhc-tauGFP, dont la croissance se poursuit au cours des stades larvaires. Au cours de la métamorphose, la plupart des muscles larvaires sont histolysés, les AMPs assurent la formation des muscles adultes *de novo* (C). À noter qu'une partie des muscles larvaires servent d'échafaudage pour la formation des muscles de vol indirects (DLMs). Aadaptée de de Jousineau *et al.*, 2012.

I. La myogenèse chez la drosophile :

Drosophila melanogaster est un insecte holométabole (à métamorphose complète) dont le cycle de vie comprend différents stades : trois stades larvaires mobiles séparés par des mues et un stade nymphal immobile, la pupe, qui conduit après métamorphose au stade adulte (**Fig.1**). Du fait des nombreux outils génétiques, cellulaires et moléculaires disponibles, la drosophile est aujourd'hui un modèle flexible et très puissant qui permet d'étudier une multitude de processus développementaux dont la myogenèse.

Deux phases de myogenèse ont lieu au cours du cycle de vie de la drosophile ; la myogenèse embryonnaire qui permet la mise en place la musculature larvaire, et la myogenèse dite adulte au cours de la métamorphose qui aboutit à la formation des muscles de l'insecte adulte (**Fig.1**).

1. La myogenèse embryonnaire :

Les muscles somatiques (squelettiques) de la larve sont formés lors de la première vague de myogenèse et permettent à la larve d'éclore, et d'assurer sa locomotion. Cette musculature somatique représente un modèle relativement simple. Elle est composée d'environ 30 muscles par hémisegment organisés de manière stéréotypée (**Fig.2**). Chaque muscle est composé d'une seule fibre multinucléée rattachée à l'exosquelette par des sites d'attachement appelés apodèmes, équivalents aux cellules tendons. Ainsi chaque muscle présente ses propres caractéristiques de forme, de taille et d'orientation. Les différentes étapes aboutissant à la formation des muscles somatiques larvaires à partir du mésoderme somatique sont résumées ci-dessous.

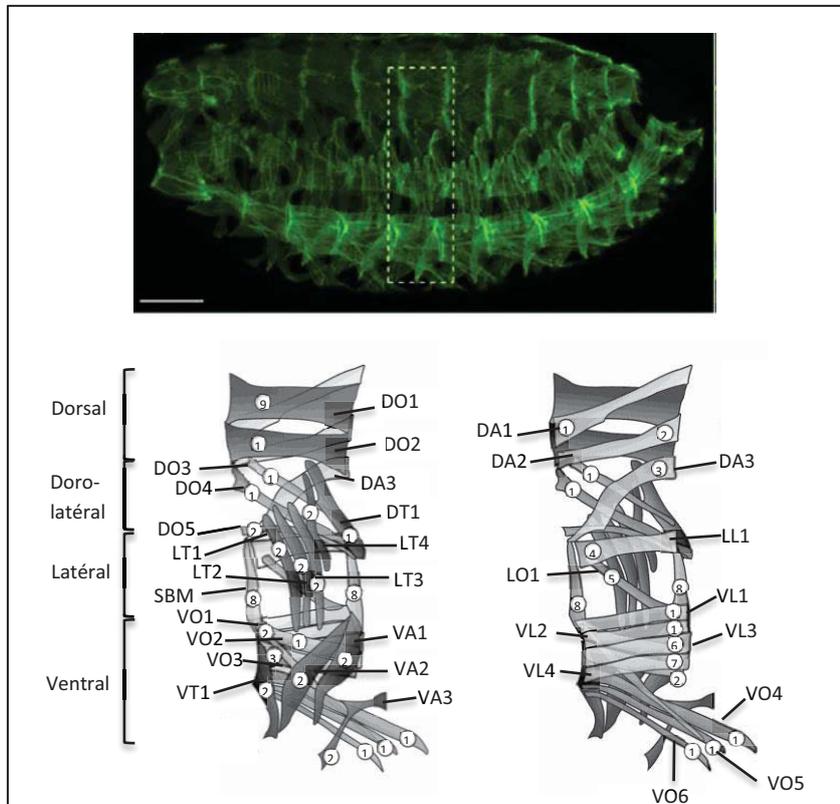


Figure 2: Le patron musculaire embryonnaire/larvaire.

Vue latérale d'un embryon de stage 16 marqué avec un anticorps dirigé contre la myosine révélant le patron musculaire dans chaque hémisegment (A-P: axe antéro-postérieur, D-V axe dorso-ventral). Les muscles sont regroupés en quatre régions : ventrale (VA1-3, VL1-4, VO1-6, VT1), latérale (LT1-4, LO1, SBM), dorso-latérale (DO3-5, DA3, DT1, LL1) et dorsale (DA1-2, DO1-2)

a. Développement du mésoderme somatique :

Le mésoderme est un feuillet embryonnaire à l'origine des tissus musculaires (somatiques, viscéraux et cardiaques) et du corps gras chez la drosophile (Bate, 1993). Il se met en place du côté ventral de l'embryon au cours de la gastrulation. En effet, le morphogène maternel Dorsal induit l'expression des facteurs de transcription Twist (Twi) et Snail (Sna), qui sont nécessaires pour la spécification du mésoderme (Thisse *et al.*, 1991 ; Ip *et al.*, 1992). Les cellules exprimant Twi et Sna s'invaginent et migrent dans le sillon ventral (Leptin et Grunewald, 1990). Le processus de migration est dépendant de la présence du récepteur FGF Heartless (Htl) et de ses deux ligands Thisbee et Pyramus (Stathopoulos *et al.*, 2004) (**Fig.3**).

Suite à cette migration, le mésoderme subit une régionalisation, il est subdivisé en plusieurs segments et chaque segment est divisé en quatre domaines distincts selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Cette régionalisation se fait sous l'influence de plusieurs signaux externes provenant de l'ectoderme tels que Wingless (Wg), Decapentaplegic (Dpp) et Hedgehog (Hh). La division selon l'axe antéro-postérieur de chaque segment est réalisée à travers la mise en place de deux domaines présentant différents niveaux d'expression de Twi. Ainsi le maintien d'un niveau élevé de Twi par Wg et par le gène de segmentation *sloppy-paired* du côté antérieur détermine la formation des mésodermes somatiques et cardiaques (Lawrence *et al.*, 1995). A l'inverse, la voie de signalisation Hh et l'expression du gène de segmentation *even-skipped* induisent un faible niveau de Twi du côté postérieur à l'origine de du mésoderme viscéral et du corps gras (Azpiazu et Frasch, 1993) (**Fig.4**). La division dorso-ventrale du mésoderme se fait sous le contrôle du morphogène Dpp qui provient de l'ectoderme dorsal (Frasch, 1995). Le gradient de Dpp est responsable de la séparation du mésoderme dorsal cardiaque du mésoderme somatique (Frasch, 1995) (**Fig.4**).

En plus de jouer un rôle précoce dans la spécification du mésoderme, Twi est aussi nécessaire à l'acquisition du programme myogénique. En effet, Twi est capable d'induire la formation de fibres musculaires ectopiques lorsqu'il est surexprimé dans

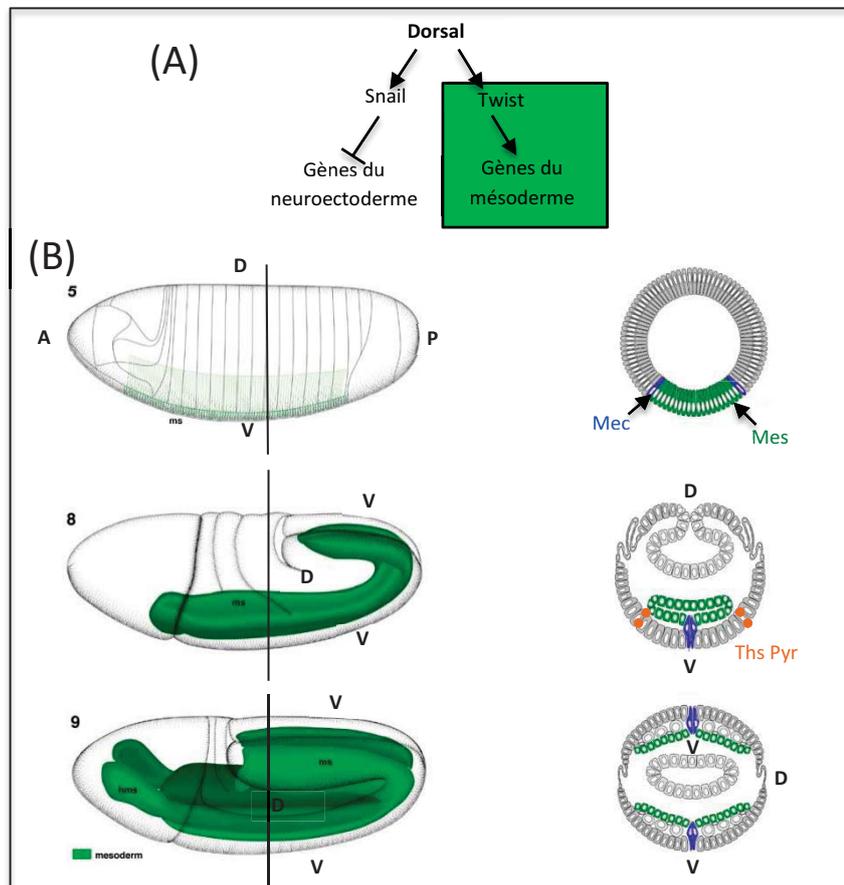


Figure 3 : Détermination et migration du mésoderme

(A) Au stade blastoderme, la forte concentration du facteur Dorsal induit l'expression de Twist et Snail. Twist active l'expression de gènes impliqués dans le programme myogénique alors que Snail réprime l'expression des gènes non mésodermiques. (B) Une fois déterminé, le mésoderme s'invagine à l'intérieur de la cavité embryonnaire. Les ligands, Thisbee (Ths) et Pyramus (Pyr) exprimés au niveau du neuroectoderme se fixent sur le récepteur Heartless (Htl) exprimé au niveau des cellules mésodermiques, ce qui induit leur migration vers la partie dorsale. (ms: mésoderme, mec: mésodermite). Adaptée de Atlas of Drosophila Development, Volker Hartenstein, 1993.

l'ectoderme. De plus, en son absence la formation des muscles somatiques est abolie (Baylies et Bate, 1996). Twi agit sous forme d'homodimère pour induire d'autres facteurs promusculaires, en particulier Mef2 (myocyte enhancer factor-2), facteur clé de la différenciation musculaire somatique (Bour et *al.*, 1995 ; Taylor, 1995). Ainsi Twi et Mef2 sont considérés comme des facteurs myogéniques de type MRF (Myogenic Regulatory Factor) et, comme MyoD et Mef2 chez les vertébrés, « coopèrent » pour réguler l'expression des gènes musculaires.

b. Spécification des progéniteurs musculaires et sélection des cellules fondatrices

Au sein du mésoderme somatique (exprimant un niveau élevé de Twi), des domaines de compétences, appelés « cluster » promusculaires, sont spécifiés par les signaux Wg, Dpp et par la voie de signalisation MAPK. Ce sont des groupes de cellules équivalentes exprimant le facteur de transcription Lethal of scute (L'sc) qui joue un rôle important dans la spécification des progéniteurs musculaires (Carmena *et al.*, 1995). Ainsi, au sein de chaque segment, 18 « clusters » sont établis contenant chacun entre 4 et 6 cellules (**Fig. 5**).

Par la suite, une seule cellule par « cluster » va être sélectionnée pour devenir progéniteur musculaire alors que les autres cellules deviendront des myoblastes compétents à la fusion (FCMs). La sélection du progéniteur musculaire se fait par un processus d'inhibition latérale médié par la voie Notch. Ainsi, le maintien au-dessus d'un certain seuil de la voie MAPK dans l'une des cellules du « cluster » (futur progéniteur) provoque l'expression du ligand Delta à sa surface, activant ainsi la voie Notch dans les cellules avoisinantes (Brennan *et al.*, 1999). L'activation de la voie Notch dans les cellules voisines inhibe la voie MAPK ainsi que l'expression de L'sc et permet l'expression de gènes spécifiques des FCMs. Le maintien de l'activité de la voie MAPK et l'expression de L'sc dans le progéniteur musculaire est en partie responsable de l'expression des gènes d'identités musculaire tels que *ladybird (lb)*, *slouch (s59)* ou encore *vestigial (vg)* (Jagla *et al.*, 1998; Knirr *et al.*, 1999 ; Bate *et al.*, 1993).

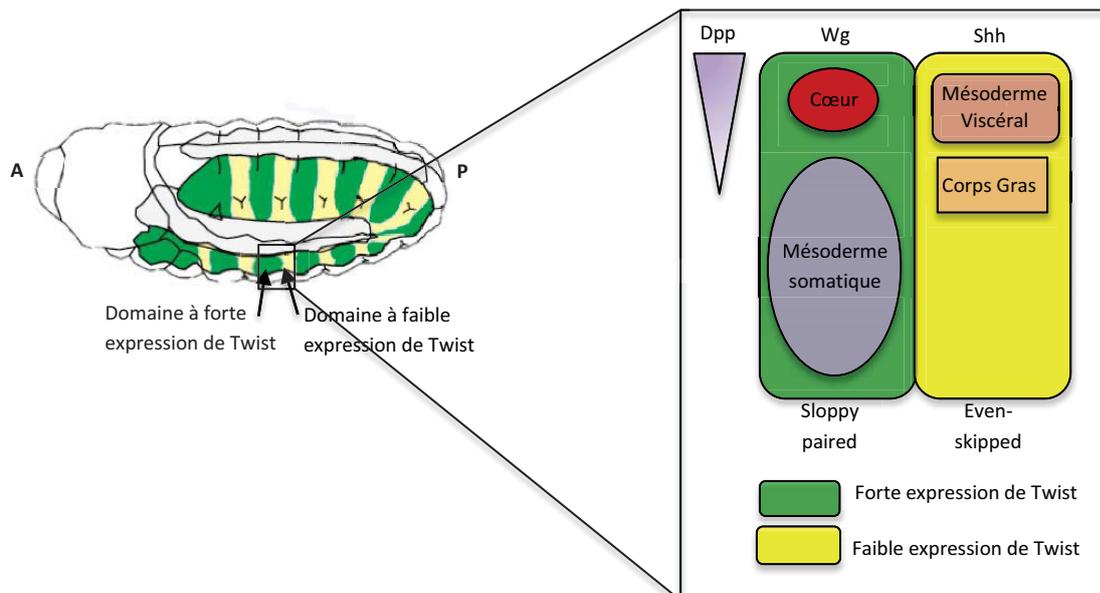


Figure 4 : subdivision du mésoderme.

Le mésoderme est subdivisé 2 domaines sous l'influence des signaux Wingless (Wg), et Hedgehog (Hh), chaque domaine correspondant une expression différentielle de *Twist*. Un niveau faible de *Twist* se traduit par la mise en place de la musculature viscérale et du corps gras alors qu'un niveau élevé de *Twist* détermine la formation des muscles somatiques et du cœur. Le gradient de diffusion du signal Dpp (decapentaplegic) permet de subdiviser les mésodermes cardiaques (dorsal) et somatiques (ventral).

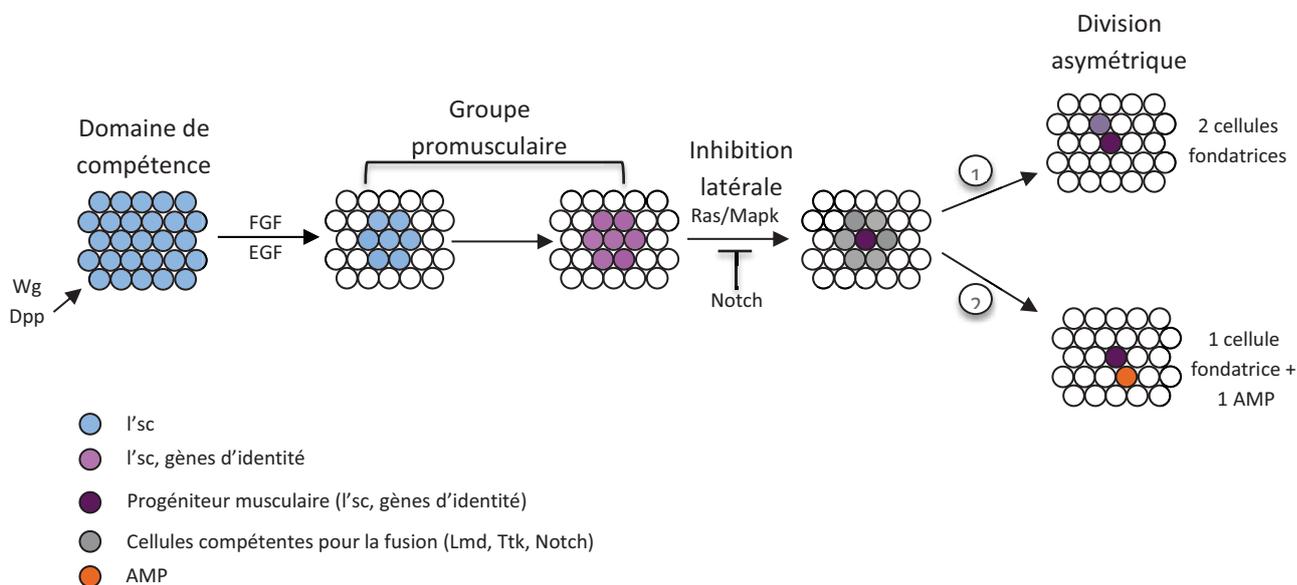


Figure 5: Spécification des myoblastes.

Les signaux Wg et Dpp conduisent à la formation de domaines de compétence exprimant *l'sc* au sein du mésoderme somatique. La voie MAPK permet ensuite de restreindre l'expression de *l'sc* à des groupes pro-musculaires et participe à l'expression des gènes d'identité. Le processus d'inhibition latérale médiée par la voie Notch permet la spécification d'un myoblaste progéniteur musculaire par groupe dont la division asymétrique donnera les FC et/ou les AMP. Les autres cellules du groupe pro-musculaire seront spécifiées en tant que myoblastes compétents à la fusion.

Une fois le progéniteur musculaire spécifié, il va subir une division supplémentaire. Cette division est dite asymétrique et conduit à la naissance de 2 cellules fondatrices (FC) (Bate, 1990). Cette division requière la localisation de deux complexes protéiques comprenant respectivement Numb (Nb) et Inscutable (Insc) aux pôles opposés du progéniteur (Carmena *et al.*, 1998). Suite à cette division, les deux cellules filles héritent de l'un ou l'autre de ces complexes. Dans la cellule fille héritant de Nb la voie Notch est inhibée par la capacité de Nb à bloquer cette dernière (Guo *et al.*, 1996 ; Carmena *et al.*, 1998; Ruiz-Gómez *et al.*, 2000) (**Fig.5**). La voie Notch étant capable de moduler voir d'inhiber l'expression de certains gènes d'identité musculaire, il en résulte l'apparition de 2 cellules fondatrices qui expriment des combinaisons différentes de ces gènes et par conséquent possédant des identités distinctes. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription qui déterminent les propriétés morphologiques de la future fibre (taille, forme, orientation...). Ainsi, 30 cellules fondatrices sont spécifiées par hémisegment et sont à l'origine de la diversification musculaire.

Dans certains cas, la division asymétrique des progéniteurs musculaires donne naissance à une cellule fondatrice et une cellule péricardique (Carmena *et al.*, 1998) ou à une cellule fondatrice et un précurseur de muscle adulte (Figeac *et al.* 2010). Les précurseurs de muscles adultes (AMP) n'héritent pas du complexe comprenant Numb et maintiennent donc l'activité de la voie Notch. La voie Notch est ainsi responsable du maintien dans un état indifférencié des AMPs jusqu'aux stades pupaux via l'expression d'un certain nombre de gènes inhibiteurs de la différenciation tels que *twist* et *Him* (Anant *et al.*, 1998; Liotta *et al.*, 2007; Soler et Taylor, 2009).

c. Formation des myotubes :

Chacun des 30 muscles présents par hémisegment est formé par la fusion d'une cellule fondatrice avec un certain nombre de myoblastes compétents à la fusion (FCM) (Taylor, 2002 ; Rochlin *et al.*, 2010). Le nombre de FCM (de quelques-uns à

plusieurs dizaines) fusionnant avec une FC est déterminé par les facteurs d'identité qu'exprime cette dernière (Bataillé *et al.*, 2010 ; Tixier *et al.*, 2010).

La taille de la fibre musculaire est déterminée par le nombre d'évènements de fusion entre une FC et plusieurs FCMs. Dans une première étape, une FC fusionne avec une ou deux FCMs aboutissant à la formation d'une pré-fibre bi ou tri-nucléée. Le recrutement de FCMs supplémentaires permettra d'augmenter la taille de la fibre et de donner un myotube mature (Beckett et Baylies, 2007).

Le processus de fusion se fait en plusieurs étapes :

La migration des FC vers les FCMs: Durant cette étape les FCMs forment des filopodes en direction des FCs, ou myotubes en cours de formation, avec lesquelles ils vont fusionner (Richardson *et al.*, 2007).

Reconnaissance et adhésion : la reconnaissance entre les FC et les FCMs se fait via des molécules d'adhésion de la famille des immunoglobulines transmembranaires (IgSF). Ainsi les FCs expriment Dumbfounded (Duf) et Roughest (Rst), alors que les FCMs expriment Sticks and stones (sns) et son paralogue Hibris (Hbs). Les interactions hétérophiliques entre Duf ou Rst et Sns permettent l'adhésion entre les FCs et les FCMs. (Artero *et al.*, 2001; Bour *et al.*, 2000; Ruiz-Gómez *et al.*, 2000; Strünkelnberg *et al.*, 2001). L'interaction entre ces protéines entraîne un remodelage du cytosquelette d'actine au niveau du site de fusion (Bothe *et al.*, 2014).

Remodelage du cytosquelette et fusion: Suite à la fusion, un remodelage du cytosquelette se produit. Ce remodelage se traduit par la formation d'un foyer (foci) d'actine F au niveau du site de fusion. Ce foci d'actine se forme de manière asymétrique entre les FCs et les FCMs. En effet, du côté des FCs une fine couche d'actine est observée alors que du côté des FCMs l'accumulation dense d'actine F forme des structures semblables à des podosomes et ayant des capacités invasives. Grâce à ces protrusions, les FCMs peuvent pénétrer à l'intérieur des FCs (Haralalka *et al.*, 2014; Sens *et al.*, 2010; Shilagardi *et al.*, 2013). Au final, chaque muscle possède un nombre de noyaux qui lui est propre. Ceci est donc déterminé par les facteurs

d'identité qui participent au contrôle des événements de fusions dans un muscle donné, en régulant de manière différentielle l'expression de plusieurs gènes codant en particulier pour des protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette (Bataillé *et al.*, 2010).

Suite à cette fusion, les FCM subissent une reprogrammation transcriptionnelle afin d'adopter le profil transcriptomique de la cellule FC. Dès que le noyau de la FCM est incorporé, il commence à exprimer progressivement les gènes d'identité spécifiques de la FC et à réprimer les gènes spécifiques des FCMs (Bataillé *et al.*, 2017). Le processus de fusion continue jusqu'à ce que chaque fibre atteigne le nombre de noyaux prévu par l'identité de la fibre.

d. Attachement et innervation des myotubes :

- *Attachement à l'exosquelette*

Afin d'être fonctionnelle, la fibre musculaire doit être solidement ancrée à l'exosquelette de la larve. Cet ancrage se fait par le biais des sites d'attachement, aussi appelés apodèmes, équivalents des cellules tendons chez les vertébrés.

Au cours de la fusion, le myotube s'allonge jusqu'à rentrer en contact avec ses sites d'attachement spécifiques pour établir les jonctions myotendineuses (MTJ), cette étape sera explicitée en détail dans le chapitre abordant la formation des cellules tendons embryonnaires.

- *Innervation des myotubes*

La contraction musculaire nécessite l'innervation précise de chaque muscle par des motoneurones pour répondre aux stimuli nerveux. Chaque fibre musculaire est innervée par un ou plusieurs motoneurones (Bate et Broadies, 1995). Ainsi, 36 motoneurones innervent les 30 muscles de chaque hémisegment de l'embryon (Landgraf et Thor, 2006). Chaque motoneurone est identifiable par sa position, son arborescence dendritique et sa projection axonale vers son/ses muscle(s) cible(s) (Landgraf *et al.*, 1997). Bien que la différenciation des motoneurones soit

indépendante du développement musculaire, le patron d'innervation est directement dépendant du patron musculaire et à ce titre extrêmement stéréotypé.

Les motoneurons contactent leurs muscles respectifs pour établir une jonction neuromusculaire. La connexion spécifique des motoneurons vers les muscles se fait grâce à des protéines sécrétées ou exprimées à la surface des cellules. Ces molécules représentent soient des signaux d'attraction ou de répulsion qui vont guider les motoneurons vers leur cibles respectives. Parmi ces molécules on peut citer les molécules de type Leucin-Rich-Repeat (LRR) telles que Connectin, Capricious ou Toll (review Nose 2012). L'expression des gènes codant pour ces molécules est finement régulée et dépendante de différents facteurs tels que Wnt4 ou les gènes *Hox* et *Ubx* (Dixit *et al.*, 2008 ; Hessinger *et al.*, 2017) ainsi que des facteurs d'identités musculaires (Tixier *et al.*, 2010 ; Inaki *et al.*, 2010). Ainsi le pattern d'innervation est directement dépendant du pattern et de l'identité musculaire.

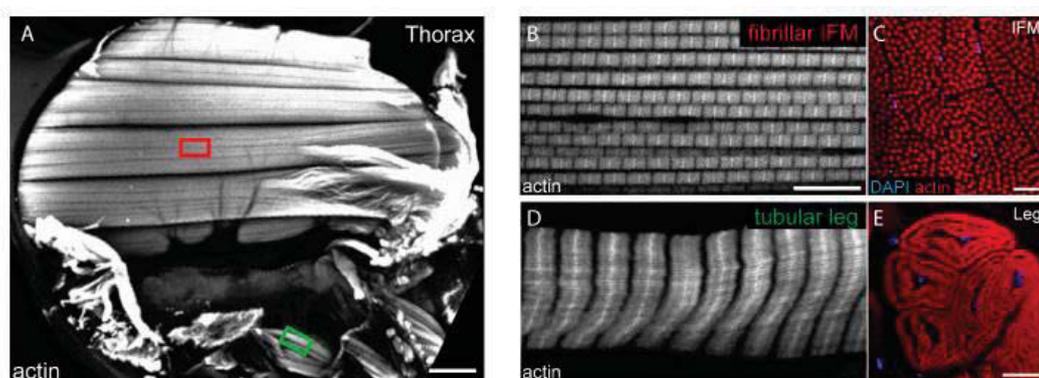


Figure 6: Structures des muscles fibrillaires et des muscles tubulaires.

(A) IFMs et muscle de pattes marqués à la phalloïdine qui permet la visualisation de l'actine F. les rectangles rouge et vert sont agrandis dans les fenêtres B et D. (B) structure fibrillaire des IFMs. (C) coupe transversale montrant des myofibrilles individualisées caractéristiques de la structure fibrillaire. (D) structure tubulaire d'un muscle de patte. (E) une coupe transversale montrant l'arrangement tubulaire des myofibrilles avec des noyaux situés au centre de la fibre. (D'après Schonbauer et *al.*, 2011).

2. La myogenèse Adulte :

A la fin des stades larvaires, la larve forme une puppe, à l'intérieur de laquelle aura lieu la métamorphose. Lors de cette dernière, la majorité des tissus larvaires, dont les muscles, sont histolysés alors qu'en parallèle les tissus adultes sont formés à partir des tissus imaginaux.

a. Organisation de la musculature adulte et caractéristiques structurelles :

Les muscles somatiques de la drosophile adulte sont différents des muscles somatiques larvaires. La principale différence réside dans le fait qu'une partie des muscles adultes sont composés de plusieurs fibres musculaires multinucléées, une architecture également retrouvée chez les vertébrés. De plus, la mouche adulte présente une plus grande diversité musculaire liée aux différentes fonctions à remplir telles que le vol, la marche et la reproduction (**Fig.6**). On distingue deux grands types de muscles multi-fibrillaires: les muscles tubulaires et les muscles fibrillaires (Miller, 1950 ; Smith, 1961). Les muscles fibrillaires, comme les muscles indirects de vol, se caractérisent par un non alignement des myofibrilles et des sarcomères. Cette organisation particulière permet une contractilité à oscillations très rapide se traduisant par des battements d'aile à une fréquence d'environ 200Hz (Iyengar et Wu, 2014). Les muscles plus « lents » comme les muscles de patte, sont dits tubulaires et se caractérisent par un alignement des myofibrilles et sarcomères, leur architecture est comparable à celle des muscles squelettiques chez les vertébrés (**Fig. 6**).

Les muscles thoraciques : Les muscles les plus proéminents et les plus étudiés de la musculature adulte sont les muscles de vol dans le thorax (Miller, 1950). Ils sont classés selon deux groupes fonctionnels : les muscles directs de vol (DFMs) liés à l'aile, et les muscles indirects de vols (IFMs) attachés de part et d'autres de la cavité thoracique (**Fig.7**).

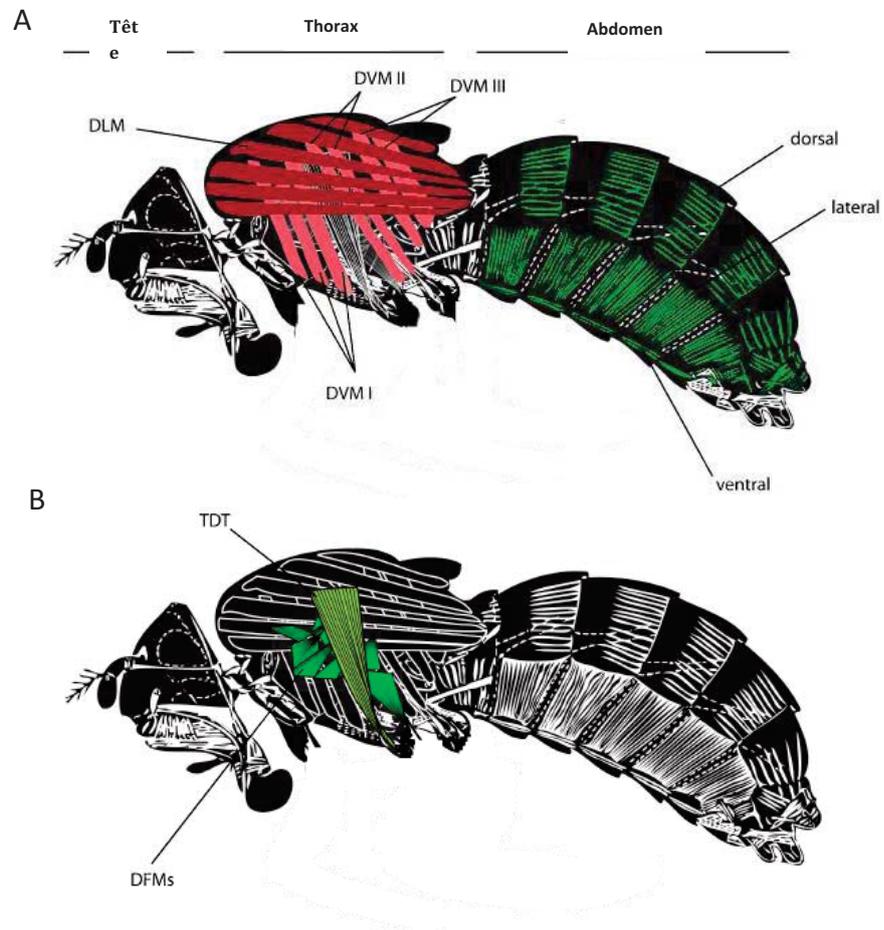


Figure 7: Organisation de la musculature adulte.

(A) les muscles indirects de vols (IFMs) comprennent deux types de muscles : les muscles dorso-latéraux (DLMs, en rouge foncé), muscles dorso-ventraux (DVMs, rouge clair), les muscles abdominaux (en vert). (B) Les muscles directs de vols (DFMs, vert foncé) et le « jumpe muscle » ou « Tergal depressor of Trochanter » (TDT , vert clair) ».adaptée de Miller , 1950.

Les DFMs sont des muscles tubulaires composés de huit petits muscles, leur contraction induit directement un changement dans l'orientation de l'aile et sont nécessaires au contrôle de la position des ailes durant le vol.

Les IFMs constituent une grande partie des muscles thoraciques. Ils sont, contrairement au reste des muscles de l'insecte adulte, de type fibrillaire. Cette structure leur permet de réaliser les battements d'aile à haute fréquence. Ils sont subdivisés en deux groupes ; les muscles dorso-latéraux (DLMs) composés de 6 fibres par hémi-thorax et trois muscles dorso-ventraux (DVMs) composés de 3 groupes de muscles (Miller, 1950). Les battements d'aile sont assurés par la contraction asynchrone soutenue des DLMs et DVMs (Fig.7).

Il existe un troisième type de muscle thoracique appelé le TDT « Tergal Depressor of the Trochanter » ou « jump muscle ». Ce dernier relie la partie dorsale du thorax à la deuxième paire de pattes et est essentiel à l'initiation du vol 'en réponse à un danger' (*escape response*) (Jaramillo *et al.*, 2009).

Les muscles abdominaux : Les muscles de chaque hémisegment de l'abdomen sont classifiés en trois groupes suivant leur positionnement : on retrouve les muscles ventraux, les muscles latéraux et les muscles dorsaux (Curie et Bate, 1991).

Il existe d'autres petits muscles chez l'insecte adulte qui ont été moins caractérisés tels que les muscles de la tête. La musculature de la tête comprend approximativement 16 muscles dans chaque hémisegment (Miller, 1950).

Enfin, il existe une musculature spécifique permettant les mouvements de la patte, cette musculature appendiculaire sera plus précisément détaillée dans le chapitre III.4.

b. Origine de la musculature adulte :

Les précurseurs des muscles adultes (AMPs) sont généralement associés aux tissus imaginaux dont ils formeront la future musculature. Ainsi les précurseurs des

muscles de patte sont associés aux disques de pattes, les précurseurs des muscles de vol aux disques d'aile ou encore les muscles de l'appareil génital aux disques génitaux. Les précurseurs de muscles abdominaux sont quant à eux associés aux nerfs (Broadie et Bate 1991).

Comme nous l'avons vu précédemment, les AMPs possèdent la même origine que les FC embryonnaires. Ils sont issus de la division asymétrique d'un progéniteur musculaire en une FC et un AMP. Les AMPs sont caractérisés par le maintien de la voie Notch responsable de la persistance de l'expression de *Tw1*, ce qui maintient l'AMP dans un état indifférencié jusqu'à la moitié du deuxième stade larvaire (Bate, 1991, Anant, 1998, Figeac *et al.* 2010). En plus de *Tw1*, d'autres facteurs de transcription cibles de Notch ont été décrits comme jouant un rôle dans le maintien de l'état indifférencié des AMPs. C'est le cas de *Him* (Holes in muscles) et de *Zfh-1* (zinc finger protein 1) (Liotta *et al.*, 2007 ; Postigo *et al.*, 1999). Ces deux derniers sont capables d'inhiber l'activité de *Mef-2*. La diminution de l'expression de ces facteurs en début de métamorphose libère l'activité pro-myogénique de *Mef2* et permet l'entrée en différenciation des AMPs.

La réactivation des AMPs au cours des stades larvaires a plus particulièrement été étudiée pour les précurseurs des muscles abdominaux (Figeac *et al.*, 2010; Aradhya *et al.*, 2015). Pendant l'embryogenèse, les AMPs sont étroitement associés aux muscles larvaires avoisinants qui leurs servent de niche. Puis au cours des stades, les AMPs sont réactivés et commencent à proliférer tout en restant associés à leurs muscles larvaires. Certains signaux ont été identifiés comme jouant un rôle dans cette réactivation et la régulation de leur prolifération. Ainsi, il a été démontré que la voie EGF est requise pour le contrôle du nombre de divisions des AMPs (Figeac *et al.*, 2010). En effet, l'absence d'AMPs est observée chez les embryons exprimant une forme dominante négative de récepteur EGFR et inversement ; on observe la présence d'AMPs surnuméraires dans le contexte gain de fonction de l'activité EGF (Figeac *et al.*, 2010). De plus, Aradhya *et al.* (2015) ont démontré que Notch, en plus de jouer un rôle précoce dans la spécification des AMPs, est un acteur important pour leur réactivation. Leur travail a permis de montrer que la voie Notch

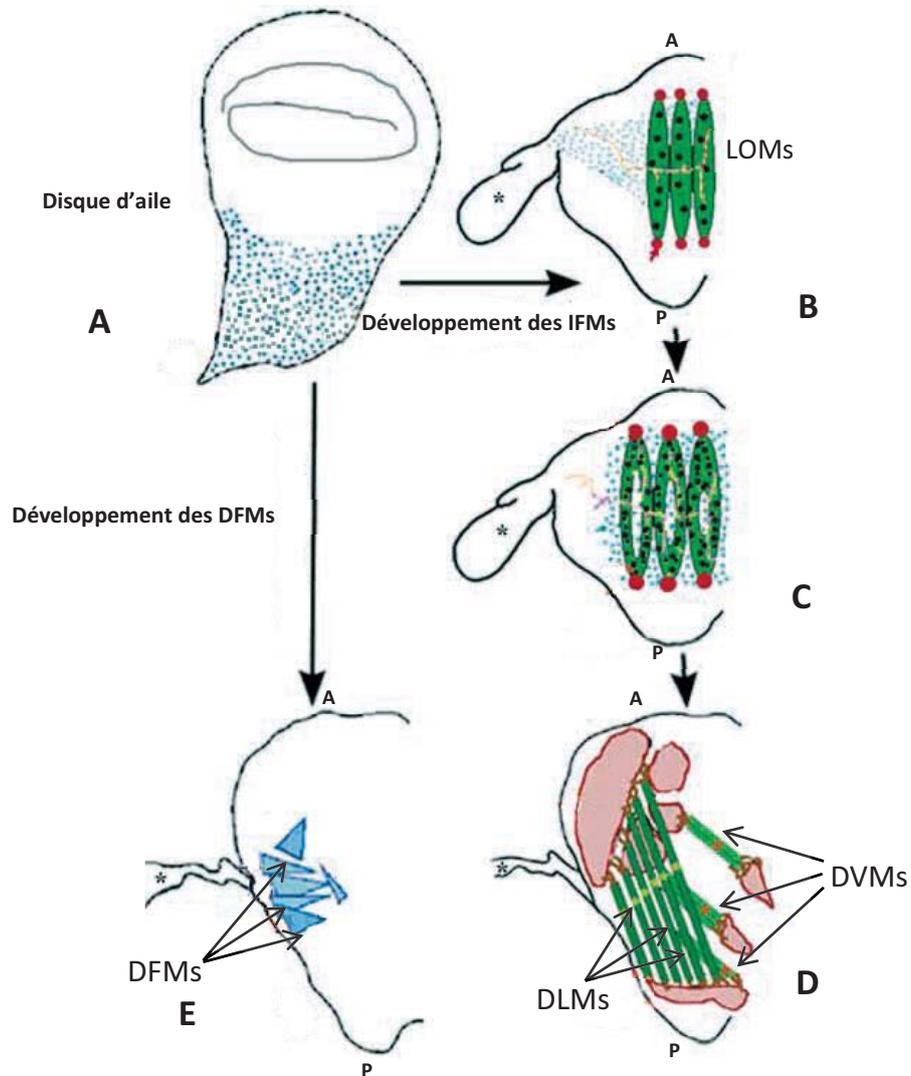


Figure 8: Représentation schématique de la myogenèse thoracique.

(A) Schéma d'un disque d'aile en troisième stade larvaire, les myoblastes (points bleus flèche) sont associés au notum et sont à l'origine des muscles de vol, les IFMs et DFMs. (B-E) Développement des IFMs et des DVMs (vue de dessus: antérieure en haut et aile marqué par un astérisque). (B) Durant la métamorphose les myoblastes (flèche) migrent vers les muscles larvaires persistants (LOMs). (C) avec lesquels ils fusionnent entraînant leur « splitting » donnant ainsi 6 muscles dorso-longitudinaux (DLMs). (D) Les myoblastes associés aux disques d'ailes donnent également les muscles dorso-ventraux (DVM) qui se forment *de novo*. (E) C'est le cas également pour les DFMs qui se forment à la base des ailes. D'après Ghazi *et al.*, 2011.

est activée dans les AMPs par la voie insuline en amont de leur prolifération (Aradhya *et al.*, 2015). En effet, la surexpression d'une forme constitutivement active du récepteur à l'insuline induit l'augmentation de la forme intracellulaire (active) de Notch (Aradhya *et al.*, 2015).

La voie insuline est activée dans les AMPs suite à la sécrétion locale de ligands du récepteur à insuline dIlps (drosophila Insulin-like peptides) par les muscles environnants (Aradhya *et al.*, 2015). L'activation de Notch par la voie insuline induit l'expression d'un de ces gènes cibles dMyc, un facteur de transcription impliqué dans plusieurs processus cellulaires dont la prolifération. Il a été ainsi montré que dMyc est requis pour la prolifération et la réactivation des AMPs. Ainsi la cascade Insuline-Notch-dMyc est nécessaire à la réactivation des AMPs et leur prolifération (Aradhya *et al.*, 2015).

Dans les segments thoraciques, en plus des groupes de cellules AMPs qui sont associés aux muscles larvaires, on distingue dès les stades embryonnaires un autre groupe d'AMPs associé aux précurseurs de disques imaginaux de patte (ventralement) et d'aile (dorsalement). Ces groupes d'AMPs resteront intimement liés aux disques imaginaux durant tous les stades larvaires (Bate *et al.*, 1991, Roy et VijayRaghavan, 1999).

c. Mécanismes de formation des muscles adultes :

Durant les premières heures de la formation de la puppe, les AMPs continuent à proliférer et migrent vers différents sites où ils vont générer les muscles adultes de deux manières distinctes : soit par une formation *de novo*, soit en se servant des muscles larvaires ayant résisté à l'histolyse comme « échafaudage » pour la fusion. Ce dernier mode ne concerne que les muscles DLMS dans le thorax, le reste des muscles thoraciques étant générés *de novo* (Fernandes *et al.*, 1991) (**Fig.8**).

- *Formation des DLMS à partir des muscles larvaires :*

Dans le thorax, l'histolyse est complète au bout de 8h après formation de la puppe (APF). Ainsi, tous les muscles thoraciques sont histolysés à l'exception de trois

muscles situés dorsalement : les muscles obliques larvaires (LOMs) qui résistent à cette histolyse. Cependant, leur morphologie et structure sont fortement altérées, ils deviennent plus fins et plus longs et se vacuolisent.

A 6-8h APF, une partie des AMPs associés aux disques d'aile migrent vers les LOMs et fusionnent avec cette trame musculaire provoquant leur scission (splitting) en six fibres musculaires composant les DLMs (Fernandes *et al.*, 1991). Les LOMs sont comportent ainsi en tant que cellules fondatrices exprimant Duf et avec lesquels une partie des AMPs associés au disque d'aile fusionnent (Fernandes *et al.*, 1996 ;Atreya et Fernandes, 2008). Les mécanismes provoquant la scission des LOMs sont peu connus, cependant la perte de fonction de Notch induit un défaut de « splitting », les LOMs ne se scindent pas en deux et il en résulte trois fibres DLMs au lieu de six (Anant *et al.*, 1998). De manière intéressante, en absence des AMPs du disque d'aile, les LOMs finissent par dégénérer, ce qui suggère que les muscles larvaires qui servent de trame (*template*) nécessitent une interaction avec les AMPs pour produire des muscles adultes (Roy and VijayRaghavan, 1998). A 30h APF le mécanisme de fusion des myoblastes est terminé, les fibres musculaires se compactent et l'organisation de leurs myofibrilles et sarcomères peut débuter (Fernandes *et al.*, 1991).

- *La formation de novo des muscles adultes :*

La majorité des muscles adultes se forment donc *de novo* et n'ont pas besoin de trame musculaire. Ainsi les DVMs se forment en parallèle des DLMs, ils sont également issus des AMPs associés aux disques d'aile. Les AMPs à l'origine des DVMs migrent vers le thorax aux endroits où les futurs DVMs se formeront, certains de ces AMPs sont sélectionnées en tant que cellules fondatrices des différentes fibres musculaires (Dutta *et al.*, 2004).

En plus d'être à l'origine de l'ensemble des muscles indirectes de vol (DVMs et DLMs), les AMPs associés aux disques d'aile forment aussi les muscles directs de vol (DFMs) (Ghazi *et al.*, 2000). Mais contrairement à ceux des IFMs les progéniteurs des DFMs ne quittent pas le disque d'aile et restent associés aux cellules épithéliales à

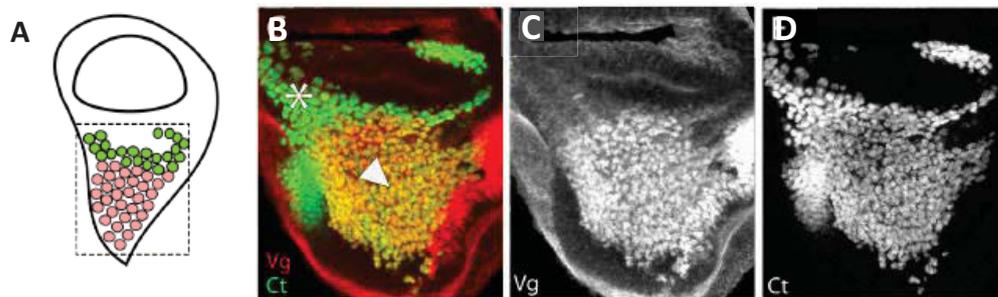


Figure 9: Deux populations distinctes de myoblastes dans le disque d'aile.

(A) Schéma des deux populations de myoblastes associés à un disque d'aile en troisième stade larvaire (L3), avec des myoblastes en rouge exprimant fortement *Vestigial* (*vg*) et qui donneront pas la suite les muscles indirects de vol (DLM et DVM), et des myoblastes en vert exprimant *cut* qui formeront les muscles direct de vol (DFM). (B-D) Disque d'aile en L3 marqué avec les anticorps anti-Vg (B en rouge et C) et anti-Cut (B en vert et D). L'astérisque marque une forte expression de cut dans les myoblastes donnant les IFMs. La flèche indique les myoblastes exprimant fortement *vg* et plus faiblement *cut* et qui seront à l'origine des DFMs. D'après Sudarsan et al., 2001.

l'origine des parties latérales du thorax. Ils commencent à fusionner à 24h APF et dès 36h APF la formation des DFMs est achevée (Kozopas et Nusse, 2002).

Enfin, le développement des muscles abdominaux se fait plus tardivement, en effet l'histolyse dans l'abdomen ne se termine pas avant 20h APF. Peu après le début de la pupaison, les AMPs associés aux nerfs dans l'abdomen prolifèrent puis migrent vers leurs sites de différenciation en position dorsal, ventral et latéral le long des nerfs auxquels ils sont associés. Ils fusionnent 24h APF et le pattern musculaire final est établi 40h APF (Currie et Bate, 1991).

d. Mécanismes moléculaires de la différenciation des AMPs :

Comme décrit précédemment, les précurseurs de muscles adultes sont le résultat de la division asymétrique ayant lieu lors du développement embryonnaire. Ils sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription Twi impliqué dans leur maintien à l'état quiescent et indifférencié. Les facteurs moléculaires permettant aux AMPs de donner les différents myoblastes à l'origine des différents muscles adultes sont peu connus, la majorité des données moléculaires proviennent des études faites sur les muscles de vols.

Je résumerai ci-dessous les acteurs identifiés comme jouant un rôle dans la différenciation des AMPs :

- *Vestigiale et Cut*

Dès le début du deuxième stade larvaire les AMPs thoraciques commencent à proliférer et s'associent aux disques imaginaux. Les AMPs associés aux disques d'ailes ne sont pas une population uniforme. Cette hétérogénéité se fait grâce à deux facteurs de transcription Cut et Vestigiale (Vg) qui divisent cette population en deux groupes distincts (Sudarsan *et al.*, 2001). La population majoritaire de myoblastes exprime fortement Vg et faiblement Cut alors que l'autre groupe de myoblastes exprime uniquement Cut. Les myoblastes exprimant uniquement Cut seront à l'origine des DFMs alors que les myoblastes exprimant fortement Vg et faiblement Cut donneront les IFMs (**Fig.9**).

De manière intéressante, la mise en place de cette diversité au sein des myoblastes commence précocement durant les stades embryonnaires. En effet l'expression de Vg est détectée dans les myoblastes présents dans le segment T2 de l'embryon puis durant le troisième stade larvaire certains de ces myoblastes commencent à exprimer Cut (Sudarsan *et al.*, 2001).

Les mécanismes responsables de l'établissement du profil d'expression Vg-Cut ne sont pas connus, cependant le maintien de cette diversité au sein des myoblastes est assuré par la voie de signalisation Wg. En effet Wg qui est exprimé par des cellules épithéliales du disque, assure le maintien de l'expression de Vg dans les myoblastes adjacents qui donneront par la suite les IFMs (Sudarsan *et al.*, 2001). Ces deux protéines jouent un rôle important dans la détermination du destin cellulaire de ces myoblastes. Enfin, on peut noter qu'en plus d'exprimer fortement Cut, les myoblastes qui donneront les DFMs expriment également le facteur de transcription Apterous (Ap). En effet, dans les mutants *ap* les DFMs sont fortement affectés (Ghazi *et al.*, 2000).

Vestigial est impliqué dans l'identité musculaire des IFMs (DLMs et DVMs). En effet, en plus de l'absence d'ailes et d'haltères des mouches mutantes pour *vg* des défauts des muscles IFM sont observés : les DLMS sont en nombre réduits et montrent un phénotype de fibres tubulaires (Bernard *et al.*, 2003). Par la suite, il a été démontré que *vg* joue un rôle important dans la détermination de l'identité fibrillaire des IFMs. En particulier, Vg est responsable de l'expression du facteur de transcription *spalt-major* (*salm*), facteur clé de la différenciation des muscles fibrillaires (Schönbauer *et al.*, 2011). Ainsi, l'expression ectopique de *salm* dans les muscles tubulaires induit leur transformation en muscles fibrillaires et inversement, son absence est suffisante pour changer les muscles fibrillaires en muscles tubulaires. Ainsi, Vg est nécessaire en amont de *salm* pour induire son expression (Schönbauer *et al.*, 2011).

Ces résultats montrent que, pendant la myogenèse adulte, l'identité musculaire est mise en place au sein d'une population de myoblastes, contrairement à la myogenèse embryonnaire où elle est spécifiée au niveau cellulaire au sein de chaque FC.

- *Drosophila Myocyte Enhancer Factor 2 (Mef2)*

Comme au cours de l'embryogenèse le facteur de transcription Mef2 (drosophila Myocyte Enhancer Factor 2), joue un rôle déterminant lors de la différenciation des muscles adultes (Ranganayakulu *et al.*, 1995).

Au niveau des AMPs associés au disque d'aile, l'expression de Mef2 est initiée à la fin du troisième stade larvaire sous le contrôle de Twist (Cripps *et al.*, 1998). La surexpression de Mef2 dans les myoblastes associés aux disques d'ailes induit leur différenciation précoce et l'expression de la myosine confirmant son rôle pro-myogénique chez l'adulte (Lovato *et al.*, 2005). Ce phénotype est annulé par la surexpression simultanée de Notch, indiquant que Notch régule négativement Mef2. Par la suite, il a été démontré que la voie Notch et Twist régulent négativement la différenciation des AMPs (Anant *et al.*, 1998, Bernard *et al.*, 2010) en particulier via le contrôle de Him (Hole in muscles) un facteur de transcription cible de la voie Notch capable de réguler négativement l'activité de Mef2 (Liotta *et al.*, 2007 ; Soler et Taylor, 2009). Ces résultats montrent que l'expression et l'activation de Mef-2 sont étroitement régulées pour assurer la synchronisation des étapes de la différenciation des muscles adultes.

e. Cellules fondatrices des muscles et organisation multi-fibrillaire des muscles adultes :

La principale caractéristique des muscles adultes de la drosophile est leur organisation multi-fibrillaire où chaque muscle est composé d'un nombre bien précis de fibres musculaires, ce qui rajoute un degré de complexité supplémentaire par rapport au développement des muscles larvaires.

La détermination du nombre de fibres musculaires par muscle est assurée par le recrutement des myoblastes exprimant la protéine transmembranaire Duf. Le nombre et la position de ces myoblastes correspond au nombre et position des futures fibres musculaires composant chaque muscle (Dutta *et al.*, 2004). Ces myoblastes se comportent donc comme les cellules fondatrices de l'embryon (FCs) ; elles expriment Duf et fusionnent avec les myoblastes n'exprimant pas ce dernier et sont capables de former des fibres musculaires à elles seules quand la fusion est bloquée (Dutta *et al.*, 2004).

L'expression de Duf dans les myoblastes associés aux disques d'ailes varie durant la métamorphose. En effet, au troisième stade larvaire une faible expression de Duf est détectée dans tous les myoblastes. Cette expression persiste durant les premiers stades pupaux (13-14h APF) et commence à diminuer vers 16h APF, pour se restreindre uniquement à quelques myoblastes qui deviendront les FCs adultes. À 28h APF, ces FCs se positionnent au niveau des sites de développement des futures fibres musculaires. Chaque FC fusionne avec les myoblastes n'exprimant pas Duf. L'expression de Duf persiste dans les fibres après la fusion et commence à diminuer vers 70h APF (Dutta *et al.*, 2004).

Le mécanisme de sélection des cellules fondatrices adultes est différent de celui observé lors de la myogenèse embryonnaire. En effet il a été démontré que l'inhibition latérale médiée par Notch n'était pas impliquée (Dutta *et al.*, 2004). Un autre mécanisme a cependant été décrit lors de la spécification des FCs dans les muscles abdominaux, celui-ci repose sur la signalisation FGF via le récepteur Heartless (Htl). Ainsi, il a été démontré que l'interaction des acteurs de la signalisation FGF aboutit à la spécification des FCs. Cette interaction implique la régulation de Sprouty (Sty) (un régulateur négatif de la signalisation FGF) et Heartbroken (Hbr) (un régulateur positif requis pour la signalisation FGF via Htl). Il a été proposé qu'un signal externe joue sur la balance entre Sty et Hbr afin de réguler positivement l'expression de Htl qui une fois activé induirait l'expression des gènes spécifique des FCs tel que *duf* (Dutta *et al.*, 2005).

f. Les cellules souches musculaires et régénération :

Les cellules satellites musculaires des vertébrés sont des cellules souches, mises en place à la fin de la vie fœtale, se localisant sous la lame basale en périphérie des muscles en restant quiescentes (Mauro, 1961; Schultz *et al.*, 1978). Elles sont réactivées après la naissance afin d'assurer la croissance post-natale des muscles, elles peuvent également être activées à la suite d'une lésion musculaire pour participer à la régénération du muscle affecté et maintenir son intégrité (Schultz *et al.*, 1978).

Chez la drosophile, les précurseurs de muscle adulte sont spécifiés au cours de l'embryogenèse puis sont maintenus indifférenciés pendant la majeure partie de la vie larvaire. Certaines caractéristiques des AMPs tel que, leur rôle dans la formation des muscles adultes *de novo* ou par régénération de certains muscles thoraciques (DLM) au cours de la métamorphose (Fernandes *et al.*, 1991 ; Fernandes et Keshishian, 1996) ont permis de les assimiler aux cellules souches et en particulier aux cellules satellites des vertébrés (Figeac *et al.*, 2007 ; Gunage *et al.*, 2014).

Plus récemment, Gunage *et al.* (2017) a montré que les AMPs associés aux disques d'aile, après leur prolifération symétrique durant les stades larvaires, subissent une division asymétrique sous l'influence de signaux ectodermiques (Wg et Notch) permettant de générer une nouvelle vague de cellules souches musculaires au cours de la métamorphose. Dans une étude complémentaire, cette équipe a démontré qu'une partie de ces cellules sont à l'origine de myoblastes détectées à la périphérie des fibres musculaires des IFMs chez la mouche adulte (Chaturvedi *et al.*, 2017). Ces cellules bien qu'exprimant Mef2 n'ont pas fusionné avec les fibres musculaires et restent indifférenciées par le maintien de l'expression du facteur de transcription Zfh1 sous contrôle de la voie Notch (Chaturvedi *et al.*, 2017). De manière intéressante, il a été montré que ces cellules participent à l'homéostasie du muscle après l'émergence de la mouche adulte et à la régénération musculaire en cas de blessure (Chaturvedi *et al.*, 2017).

L'identification de cette nouvelle population de cellules musculaires adultes souligne encore la diversité musculaire de la drosophile et la conservation de plusieurs mécanismes clés de la myogenèse depuis les premières étapes de différenciation du mésoderme jusqu'à la régénération musculaire chez l'adulte.

II. Le développement des tendons :

Le tendon fait partie intégrante du système musculo-squelettique. Il permet de transmettre la force générée par le muscle au squelette, ou à l'exosquelette dans le cas des insectes. Malgré son rôle primordial, les mécanismes du développement des tendons ont fait l'objet de beaucoup moins d'études en comparaison avec ceux de la myogenèse proprement dite. Certaines avancées dans le domaine ont cependant été réalisées en particulier à travers l'analyse du développement des tendons chez l'embryon de drosophile.

1. Développement des tendons larvaires au cours de l'embryogénèse

Chez les invertébrés, les muscles somatiques sont attachés à l'exosquelette par le biais de cellules épidermiques spécialisées appelés apodèmes. Ces cellules qualifiées de sites d'attachement sont donc les analogues fonctionnels des tendons des vertébrés.

La plupart des muscles de la larve de drosophile nécessitent la présence d'une cellule-tendon unique à chaque extrémité de la fibre. Les différentes étapes embryonnaires du développement de ces cellules ont été très bien étudiées (résumé dans Volk, 1999; Schweitzer *et al.*, 2010). Cependant la mise en place des différents tendons des muscles adultes reste à ce jour très mal connue.

a. Spécification des cellules tendons au stade embryonnaire:

L'élément clé de la différenciation des cellules tendons est le facteur de transcription à trois doigts de zinc de la famille EGR (Early Growth Response): Stripe (Sr) (Frommer *et al.*, 1996). Il est admis que l'activité de Sr est nécessaire et suffisante pour l'induction de la différenciation des cellules tendons. En effet, les embryons mutants pour *sr* se caractérisent par l'absence de sites d'attachements des muscles, et il en résulte une désorganisation complète de la paroi musculaire. Alors que l'expression ectopique de *sr* au niveau de l'ectoderme conduit à l'apparition de nouveaux sites d'attachements capable d'attirer les muscles et de former des

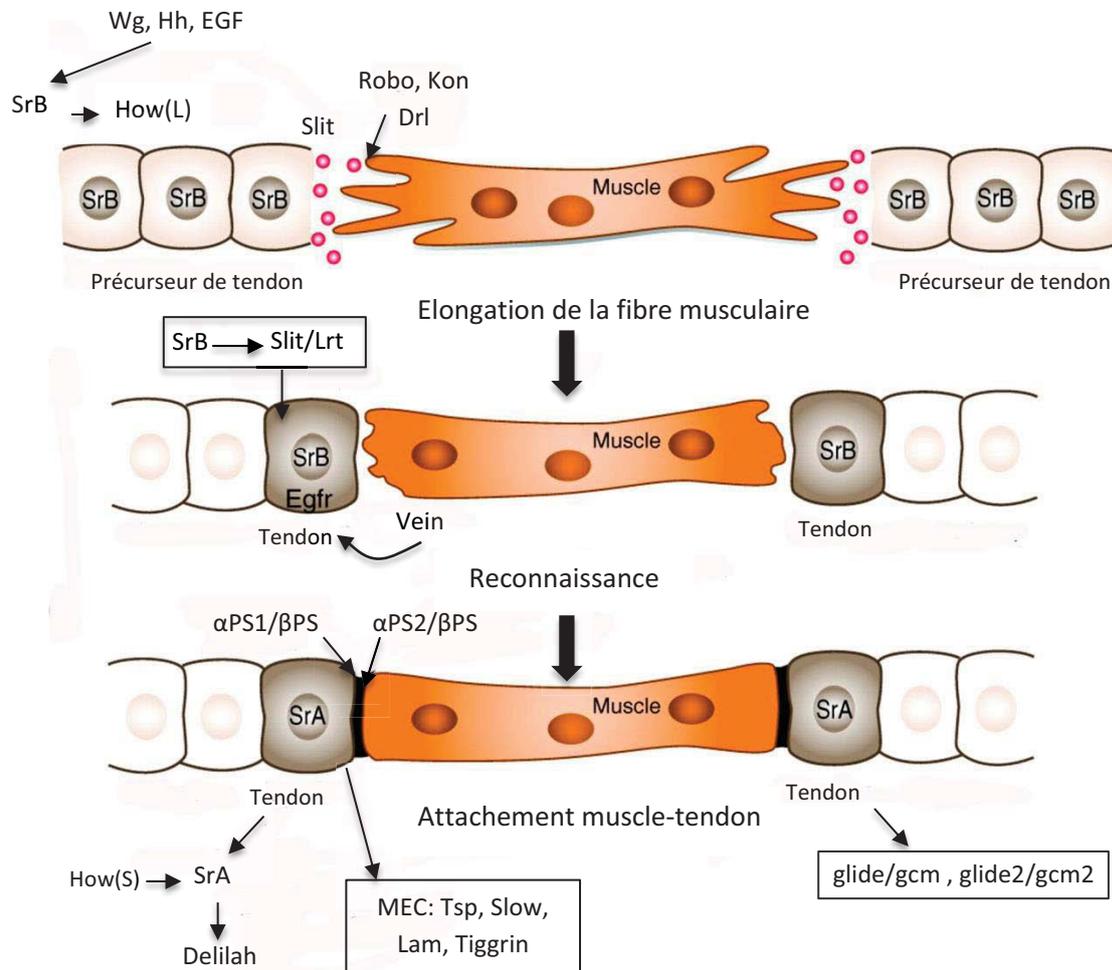


Figure 10 : Attachement des myotubes à l'épiderme.

Les signaux Wg, Hh, et EGF permettent l'expression de *SrB* nécessaire à la détermination précoce des cellules tendon qui vont sécréter Slit permettant la migration de la fibre musculaire qui exprime Robo. Les cellules tendons et les extrémités des muscles expriment des gènes permettant le guidage spécifique des muscles vers les tendons. En parallèle, les tendons se différencient sous l'influence de la voie Egfr et du complexe glide/gcm-glide2/gcm2. Les jonctions myotendineuses sont formées pour permettre la stabilisation des points d'attachement. Adaptée de Schweitzer *et al.*, 2010.

jonctions myotendineuses (MTJ) (Frommer *et al.*, 1996; Vorbrüggen et Jäckle, 1997; Becker *et al.*, 1997).

Le gène *sr* code pour deux isoformes protéiques issues d'un épissage alternatif (SrA et SrB). Ces deux isoformes possèdent le même domaine de liaison à l'ADN mais diffèrent par la présence/absence de l'exon 1, épissé dans l'isoforme SrB (Frommer *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1995). SrB permet la différenciation initiale des cellules épithéliales en cellules tendon tandis que SrA est un marqueur de différenciation terminale des apodèmes et régule en particulier l'expression des gènes impliqués dans la mise en place de la MTJ. L'expression de *sr* est étroitement contrôlée : on distingue 3 niveaux de régulation: (1) une régulation transcriptionnelle médiée par les produits des gènes de la polarité segmentaire de l'embryon ; (2) une régulation post-transcriptionnelle notamment par l'intermédiaire d'une protéine de liaison à l'ARN Held out Wings (How) ; (3) une régulation « terminale » muscle dépendante. Les différentes étapes de la formation des tendons au stade embryonnaire sont résumées dans la **Figure 10**.

- *Initiation de l'expression de stripe :*

L'expression de *sr* au sein de certaines cellules épithéliales débute peu après les étapes de segmentation de l'embryon (7,5h à 9h après la ponte des œufs). L'expression ectodermique de *sr* se fait selon un pattern répété dans chaque segment, en effet on distingue plusieurs rangées de cellules ectodermiques orientées dans l'axe dorsoventral exprimant l'isoforme *srB* (Hatini et Dinardo, 2001 ; Volk, 1999) (**Fig.11**). L'activation différentielle de l'expression de *sr* dans chacune des trois rangées de cellules en position ventrale est dépendante respectivement de trois voies de signalisation différentes : Hedgehog (Hh), EGF et Wingless (Wg) impliquées dans la segmentation de l'épiderme ventral (Hatini et Dinardo, 2001) (**Fig.11**). Le signal Hedgehog permet d'induire l'expression de *sr* dans la rangée de cellule directement postérieure aux cellules émettrices du signal et correspondant aux cellules de bordure de segment (Hatini et Dinardo, 2001).

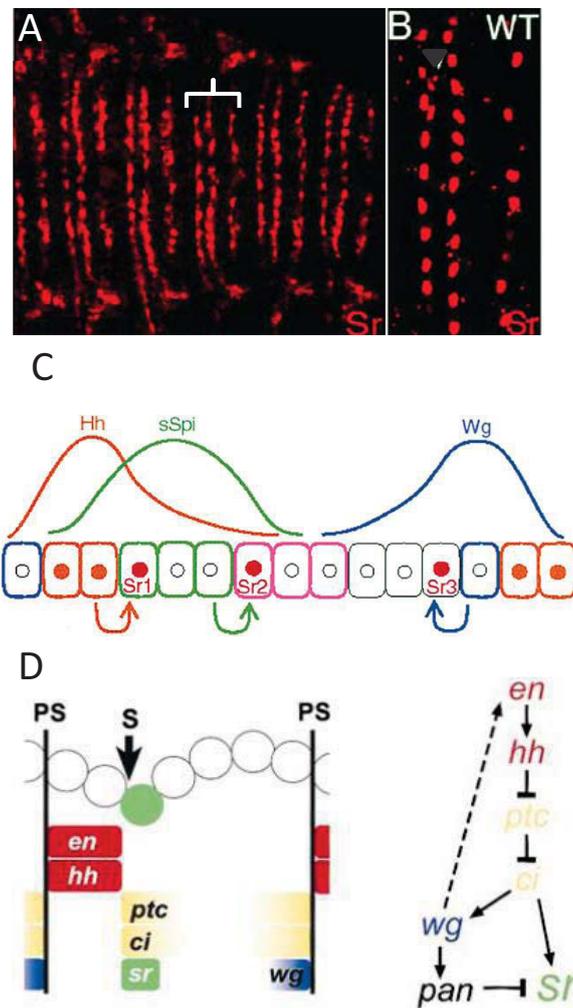


Figure 11: Les signaux ectodermiques contrôlant l'expression de *stripe*.

(A) Expression de *stripe* du côté ventral d'un embryon de stade 13 (10h) un pattern répété de trois rangé sr positive est observé. (B) Zoom sur trois rangés composant un hémisegment. (C) Schéma représentant les trois signaux principaux qui régulent l'expression de *sr* dans ces trois rangés. La signalisation Hedgehog (Hh) induit la première rangée. Spitz (Spi) régule l'expression de la rangée 2 à travers la signalisation EGFR. Et Wingless induit la troisième rangée. (D) Représentation schématique des différents gènes régulateurs de l'expression de *sr* dans un parasegment. Interactions génétiques conduisant à l'expression de *wg* et *sr* (côté droit). PS, limite du parasegment; S, segment. Adaptée de Hatini et Dinardo, 2001 et Piepenburg *et al.*, 2016.

De manière intéressante, la voie Wg interfère avec le signal Hh dans les cellules directement adjacentes à ce dernier pour assurer une activation asymétrique de *sr*. Cette répression se fait via l'interaction (compétition) des effecteurs des deux voies de signalisation, dTCF/pangolin (*pan*) (acteur de la voie Wg) et Cubitus interruptus (acteur de la voie Hh), au niveau des régions régulatrices du gène (**Figure 11**) (Piepenburg *et al.*, 2000). La seconde rangée intrasegmentale est induite par l'activation du récepteur EGF (Epidermal Growth Factor) par son ligand Spitz libéré par les cellules adjacentes. Enfin, la rangée la plus postérieure de cellules Sr positives est établie par le signal Wg émanant de cellules immédiatement postérieures (Hatini et DiNardo, 2001) (**Fig.11**). Cette régulation différentielle de l'expression du gène *sr* souligne la complexité de l'organisation des régions régulatrices de ce gène qui permettent de répondre à différents signaux émanant des différents territoires établis lors de la segmentation de l'embryon (Piepenburg *et al.*, 2000; Hatini et DiNardo, 2001).

La différenciation initiale des cellules épithéliales se caractérise par la faible expression de *SrB*. Cependant ce faible niveau d'expression est suffisant pour initier le programme développemental des sites d'attachement caractérisé par l'expression de différents gènes spécifiques à ces derniers, tels que *alien*, *groovin* ou encore *delilah* (Becker *et al.*, 1997). Il est important de noter que la spécification des cellules tendineuses se fait indépendamment des muscles. En effet l'expression de *sr* est détectée dans les mutants nuls *twist* pour lesquels le programme myogénique est totalement aboli (Becker *et al.*, 1997).

- *Régulation post-transcriptionnelle de stripe :*

Par la suite, l'expression de *sr* est régulée par le produit du gène *Held out wing* (How) codant pour une protéine de liaison à l'ARN. Il a été montré que la stabilité de l'ARN messager (ARNm) de *sr* est directement régulée par l'activité de How. L'épissage alternatif de l'ARNm de *how* produit deux isoformes de la protéine How ayant des fonctions opposées : une version longue How(L) qui régule négativement l'ARNm de *sr* en accélérant sa dégradation et une version courte How(S) qui augmente la quantité de l'ARNm de *sr* en le stabilisant (Nabel-Rosen *et al.*, 2002).

Par ailleurs, dans les précurseurs de tendon, *SrB* induit l'expression de *How* (L) qui va donc déstabiliser le transcrit *sr* et ainsi le maintenir à un faible niveau, créant de cette manière une boucle de rétrocontrôle négatif (Nabel-Rosen *et al.* 2002). Par la suite, comme nous le verrons lors de la différenciation terminale des tendons, l'approche des fibres musculaires vers les cellules tendons favorisera l'épissage de la forme courte de *How*(S) qui se traduira par une stabilisation de l'ARNm de *srB* puis de *srA*. Par conséquent, l'épissage différentiel de *How*(L) vers *How*(S) marquera la phase de différenciation terminale des tendons.

b. Guidance et attachement

Pendant la détermination des rangées de précurseur de tendons, les myoblastes fusionnent pour former des myotubes qui s'allongent pour atteindre leur site d'attachement spécifique. L'allongement des myotubes se fait de manière bidirectionnelle c'est à dire en direction de sites d'attachement opposés et cela se fait par la mise en place de filopodes à chaque extrémité des muscles (Schnorrer et Dickson, 2004). Il a été démontré que les précurseurs de tendons avaient la capacité d'attirer les myotubes vers leurs sites d'attachements spécifique. En effet l'expression ectopique de *Sr* dans l'ectoderme induit l'attraction des myotubes vers ces sites d'attachement ectopiques (Becker *et al.*, 1997; Vorbrüggen et Jäckle, 1997).

Plusieurs signaux connus pour leur rôle dans le guidage axonal ont également été décrits pour leur implication dans l'attraction des myotubes vers leurs sites d'attachement, c'est le cas de la voie « canonique » *Slit-Robo* (Kramer *et al.*, 2001). Ainsi les précurseurs de tendon de bordure de segments (intersergementaux) expriment *Slit*, une molécule d'attraction, reconnue par l'extrémité des myotubes en croissance qui expriment son récepteur *Robo*. *Slit* subit un clivage qui lui permet de moduler les signaux d'attraction/répulsions conduisant chaque muscle à son site d'attachement approprié (Ordan et Volk, 2015). De plus, *Sr* induit aussi l'expression d'une protéine transmembranaire *Lrt* (leucine rich tendon specific protein) interagissant avec *Robo* signalant l'arrêt de la migration au niveau des cellules tendineuses (Wayburn et Volk, 2009).

Un mécanisme de guidage différent a été décrit pour le guidage des muscles latéraux (LTs) vers leurs sites d'attachement internes (intrasegmentaux). En effet, les LTs n'expriment que faiblement le récepteur Robo et sa surexpression entraîne un attachement anormal aux sites d'attachement de bordure de segments (Kramer *et al.*, 2001). Les muscles LTs expriment cependant Derailed (Drl), un récepteur de type tyrosine kinase. Chez les mutants *drl*, les LTs ignorent les cellules exprimant Sr et continuent de s'allonger ventralement (Callahan *et al.*, 1996). Il a été montré que Drl est le récepteur de Wnt5 dans le système nerveux central de la drosophile (Yoshikawa *et al.*, 2003). De plus, les mutants *wnt5* présentent un phénotype similaire à celui des mutants *drl*, les LTs ignorent leurs sites d'attachements et s'attachent à d'autres régions de l'ectoderme (Lahaye *et al.*, 2012).

Enfin, un autre complexe protéique a été décrit comme jouant un rôle dans le guidage des muscles ventro-latéraux (VL). Ce complexe comprend la protéine transmembranaire Kontiki (Kon), son partenaire cytoplasmique Grip et la protéine de surface Echinoïde (Ed) (Estrada *et al.*, 2007; Schnorrer *et al.*, 2007; Swan *et al.*, 2006). Dans un contexte mutant la perte de *kon*, qui est accumulée au niveau des filopodes en condition sauvage, affecte la migration des muscles VLs (Schnorrer *et al.*, 2007). Il a été montré que Kon et Ed se lient à Grip via ses domaines PDZ et cette interaction est nécessaire à l'extension de VLs vers leurs sites d'attachement (Swan *et al.*, 2006).

c. Différenciation finale des cellules tendons

Le nombre initial de cellules précurseurs de tendon est plus élevé que le nombre final des cellules tendons matures car seules les cellules en contact avec des myotubes vont conserver l'expression de Sr et établir une jonction myotendineuse. Par exemple, le nombre de cellules Sr positives intrasegmentales de part et d'autre des extrémités des muscles LTs est d'environ treize, parmi ces cellules seulement trois vont maintenir l'expression de Sr et devenir des cellules tendons matures permettant l'ancrage des extrémités des trois muscles LTs (Volk, 1999). Le mécanisme contrôlant la maturation des cellules précurseurs de tendon est muscle

dépendant. En effet, l'absence de certains muscles dans les mutants *htl* entraîne la perte de l'expression de Sr au niveau de leurs sites d'attachement (Becker *et al.*, 1997). De façon analogue, la formation de muscles ectopiques dans des mutants *apterous*, entraîne le maintien de l'expression de Sr dans des domaines ectodermiques élargis (Becker *et al.*, 1997). Le signal musculaire requis pour la maturation des précurseurs de tendon est médié par Vein, un facteur de type neuregulin, ligand du récepteur EGF. Vein est sécrété par les muscles et est capable d'activer la voie EGF dans les précurseurs de tendon (Yarnitzky *et al.*, 1997).

L'activation de la voie EGF dans le tendon favorise l'expression de How(S) par rapport à How(L) ce qui permet la stabilisation des transcrits *srB* puis une induction de *srA* (Nabel-Rosen *et al.*, 2002 ; Volohonsky *et al.*, 2007). SrA induit alors l'expression des gènes de différenciation tardive des tendons tels que *Delilah (Dei)*, qui code pour un facteur de transcription qui régule l'expression de l'intégrine β PS, et Shortstop (Shot), une protéine de la famille des spectraplakines qui relie le cytosquelette d'actine aux microtubules régulant les propriétés élastiques des cellules tendons (Schweitzer *et al.*, 2010; Subramanian *et al.*, 2003).

Il est à noter que d'autres facteurs intrinsèques aux tendons ont été identifiés comme régulateurs de la différenciation terminale de certains tendons. C'est le cas des facteurs de transcription du complexe glide/gcm et glide2/gcm2 (glial cell deficient/glial cell missing) initialement décrits comme étant impliqués dans la différenciation des cellules gliales (Hosoya *et al.*, 1995). La perte de fonction du complexe glide-glide2 affecte la différenciation terminale de certaines cellules tendons et altère l'attachement des muscles correspondant. A l'inverse son expression forcée est capable d'induire l'expression de marqueurs spécifiques de la différenciation terminale des tendons de manière Sr indépendante (Soustelle *et al.*, 2004).

d. Formation de la jonction myotendineuse :

Le contact établi entre les myotubes et leurs sites d'attachement respectifs, va entraîner la formation de la jonction myotendineuse. Cette dernière est composée

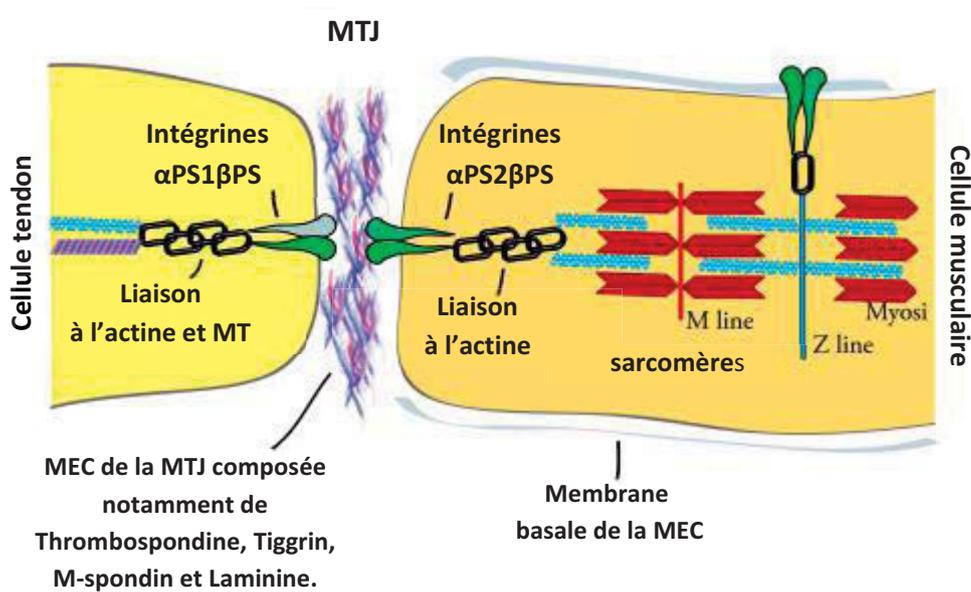


Figure 12 : La jonction myotendineuse (MTJ).

Vue d'ensemble de la MTJ et de sa relation avec le cytosquelette. Dans les cellules tendineuses, les intégrines relient la matrice extracellulaire (MEC) aux réseaux d'actine et de microtubules (MT). Dans les muscles, les intégrines relient la MEC à l'actine et à l'appareil contractile (les sarcomères). (Adaptée de Maartens et Brown, 2015)

d'une matrice extracellulaire (MEC) majoritairement composée de thrombospondine et reliée aux membranes des muscles et des tendons via des complexes d'intégrines au niveau d'hémidesmosomes (Subramanian *et al.*, 2007).

La formation d'hémidesmosomes se fait par l'intermédiaire d'hétérodimères d'intégrines α PS1 β PS du côté de la cellule tendon, et α PS2 β PS du côté muscle. Chez les individus porteurs de mutations au niveau de gènes codant pour des intégrines, l'interaction initiale entre les muscles et les tendons se déroule normalement mais dès la première contraction, les muscles se détachent et adoptent une forme sphérique (phénotype myosphéroïde) (Leptin *et al.*, 1989).

Ces deux hétérodimères d'intégrines interagissent avec des protéines différentes de la MEC : les α PS1 β PS des cellules tendons interagissent avec la Laminine pendant que les α PS2 β PS musculaires interagissent avec les protéines Trombospondine (Tsp) et Tiggrin. La Laminine et la Tsp sont secrétées par les cellules tendons et la Tiggrin par les cellules musculaires. Les mutants *laminine* ou *tsp* présentent des jonctions myotendineuses non fonctionnelles conduisant à une dissociation complète des muscles et des tendons responsable d'une létalité embryonnaire importante (Fogerty *et al.*, 1994; Chanana *et al.*, 2007; Gotwals *et al.*, 1994)

Un autre acteur important dans la formation des jonctions myotendineuses est la protéine de liaison au cytosquelette appelée Taline qui participe à l'établissement du complexe IACs (Integrin adhesion Complex) dans les cellules musculaires et les tendons (Horton *et al.*, 2016). Ainsi, les hétérodimères d'intégrines permettent la liaison entre la MEC et les cytosquelettes des muscles et des tendons (**Fig.12**).

2. Formation des tendons adultes

Les mécanismes contrôlant le développement des cellules tendons de la musculature adulte lors de la métamorphose n'ont fait l'objet que de très peu d'études. Les recherches se sont focalisées principalement sur la mise en place de sites d'attachement des muscles de vol et de patte. Les précurseurs de ces sites d'attachement sont spécifiés au sein de l'épithélium des disques d'aile et de patte respectivement et sont également caractérisés par l'expression du gène *sr* (Ghazi *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2004).

a. Expression de Sr dans le disque d'aile

Dans le disque d'aile cinq domaines d'expression de Sr sont détectés correspondant aux sites d'attachement des DLMs et DVMs (Ghazi *et al.*, 2003). Les précurseurs de tendon apparaissent dès le troisième stade larvaire comme le révèle l'expression de Sr au niveau des cellules épithéliales du notum du disque d'aile, sous forme de cinq domaines distincts (Fernandes *et al.*, 1996). Ces précurseurs sont à l'origine des sites d'attachement de l'ensemble des muscles de vol, leur mise en place et leur ségrégation sont le résultat d'une combinaison complexe de signaux présents dans le notum (Ghazi *et al.*, 2003). L'expression de Sr est sensible aux signaux de régionalisation du disque d'aile, ainsi il a été montré que Wg et Dpp affectent de manière différentielle les domaines d'expression de Sr, et sont nécessaires pour l'établissement correct de ces différents domaines (Ghazi *et al.*, 2003). De plus, chez les mutants *pannier* et *u-shaped*, des gènes connus pour réguler la voie Wg dans le disque d'aile, l'expression de Sr est altérée (Ghazi *et al.*, 2003). Il a aussi été démontré que Notch jouait un rôle dans la régulation de l'expression de Sr, en effet l'induction de l'expression de Sr dépend de Notch et est inhibée par son ligand Serrate (Ghazi *et al.*, 2003).

b. Mise en place de la jonction myotendineuse (MTJ)

Les jonctions myotendineuses se forment, comme lors de l'embryogenèse, via les hétérodimères d'intégrines, α PS1 β PS du côté des cellules tendons et α PS2 β PS coté

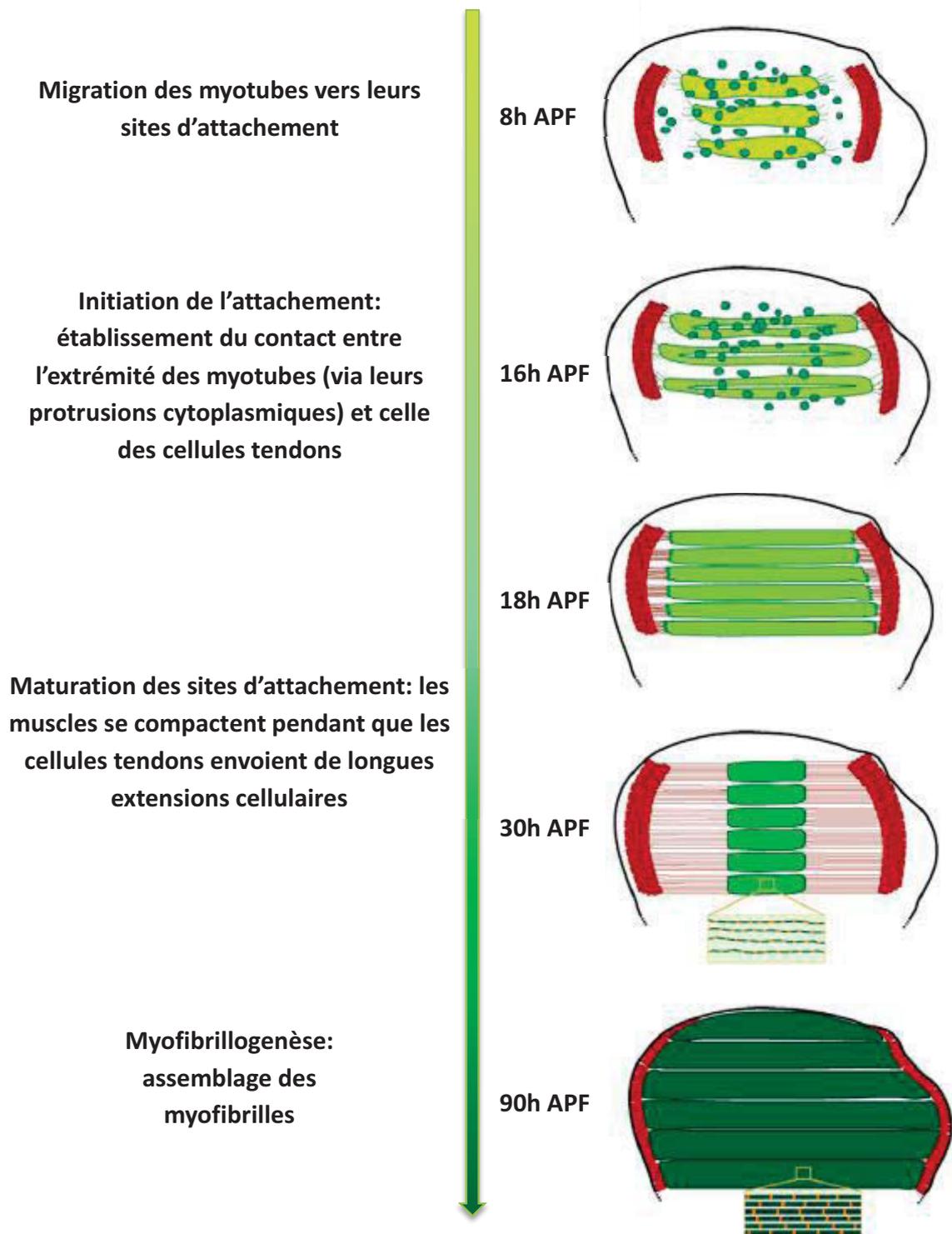


Figure 13: Attachement des muscles indirects de vol.

Schéma montrant les étapes de l'attachement des muscles dorso-latéraux (DLMs) aux cellules tendons. Ces dernières sont représentées en rouge, les myoblastes et les DLM en vert avec zoom montrant l'organisation myofibrillaire à 30 heures et 90 heures après formation de la puppe (APF). Adaptée de Weitkunas *et al.*, 2014.

musculaire. Chez les mutants affectant les sous unités α PS1 ou α PS2, les muscles sont dans l'incapacité de se fixer à leur sites d'attachement et finissent par dégénérer ou se fixer de manière ectopique (Fernandes *et al.*, 1996).

La formation des MTJs nécessite également les gènes du complexe Broad-Complex (BR-C), codant pour des facteurs de transcription impliqués dans la transmission du signal hormonal ecdysone induisant la métamorphose (Karim *et al.*, 1993). Les mutations affectant certains de ces gènes ont pour effet le détachement des IFMs de leurs sites d'attachement ou leur attachement à des sites ectopiques (Sandstrom *et al.*, 1997 ; Sandstrom et Restifo, 1999).

c. Implication des tendons dans l'assemblage des myofibrilles

L'attachement des muscles aux tendons est requis pour la formation et l'assemblage des myofibrilles composant les muscles adultes. En effet, l'étude menée par Weitkunat *et al.*, a montré que lors de l'attachement des IFMs à leurs cellules tendons une tension mécanique est générée et celle-ci est requise pour la myofibrillogenèse. Cette étape définit la formation et l'assemblage des myofibrilles qui sont des structures cylindriques du muscle squelettique composées d'éléments répétés appelés sarcomères, unité contractile du muscle.

Durant la formation des DLMs et une fois la fusion des myoblastes terminée, les cellules tendons envoient de longs filopodes ($> 200\mu\text{m}$) au contact des muscles pour initier l'attachement (Weitkunat *et al.*, 2014 et 2017). Pendant le processus de la maturation de l'attachement une forte tension est générée, il a été montré que cette tension participait au mécanisme de myofibrillogenèse (**Fig.13**). En effet lors d'expériences d'ablation laser des extensions émises par les cellules tendons ou chez des mutants *kon* (gène impliqué dans l'établissement de la jonction myotendineuse), la formation des myofibrilles est fortement perturbée (Weitkunat *et al.*, 2014).

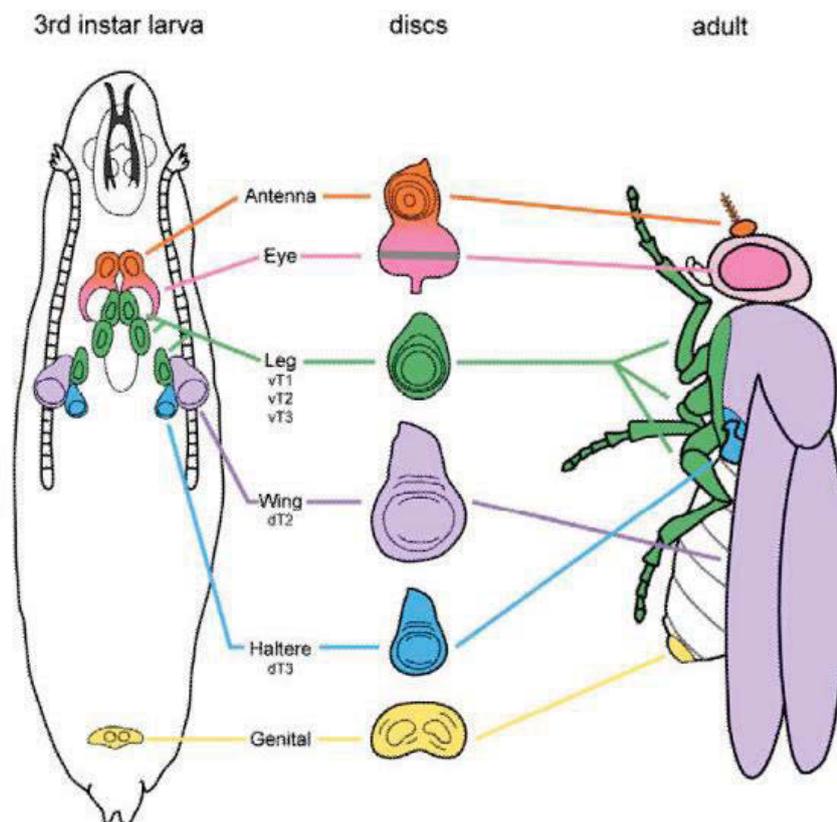


Figure 14: Correspondance entre disques imaginaux larvaires et les structures adultes.

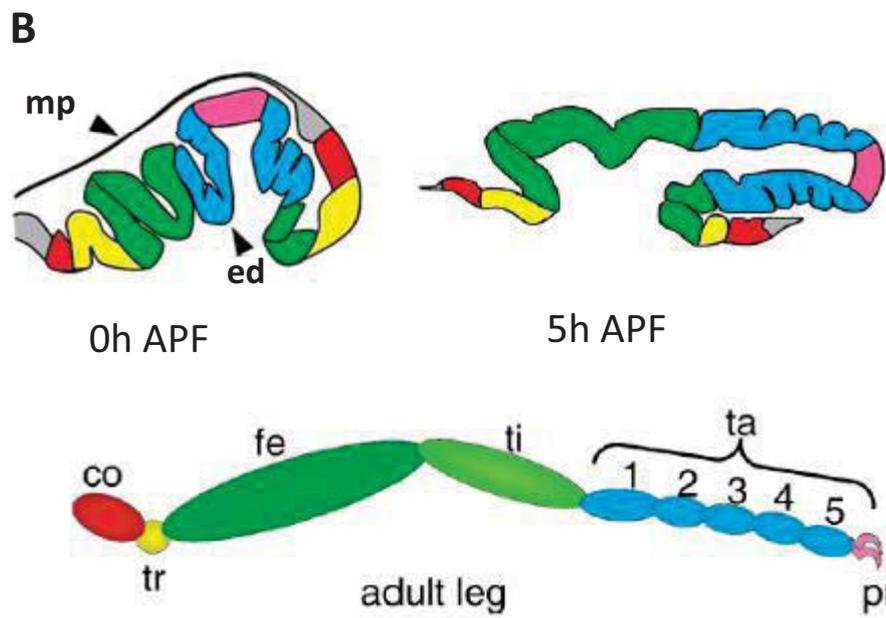
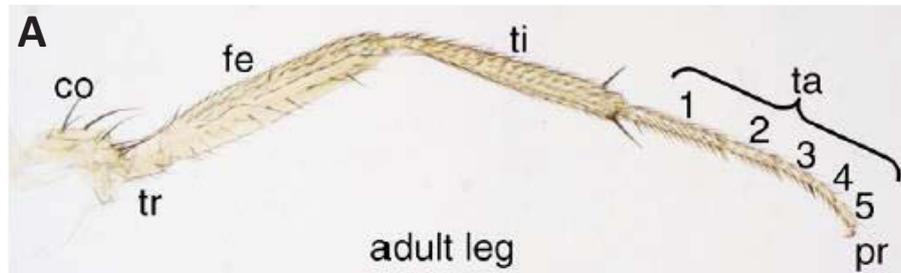
Schéma représentant la localisation des différents disques imaginaux dans la larve ainsi que les différentes structures adultes dont ils sont l'origine. Adaptée de Jory *et al.*, 2012.

III. Développement de la patte chez la drosophile :

L'imago est une autre appellation de l'insecte adulte, même si cette dernière est peu utilisée, on continue à appeler les cellules précurseurs des structures adultes "cellules imaginale". Ainsi, les structures cuticulaires adultes : tête, thorax et appendices, sont issues des disques imaginaires qui sont constitués d'une monocouche de cellules indifférenciées issues de l'ectoderme embryonnaire. Il existe chez la drosophile 19 disques imaginaires, 9 paires et un seul disque génital (Fristrom et Fristrom, 1993) (**Fig.14**). Les cellules des disques imaginaires prolifèrent activement jusqu'au milieu du 3ème stade larvaire. A partir de la fin du troisième stade larvaire et du début de la métamorphose, les cellules des disques subissent de profonds remaniements sous l'influence de l'ecdysone (hormone de la mue) qui conduisent à l'évagination des disques et ainsi à la formation des structures correspondantes (Mandaron, 1971).

La drosophile possède 3 paires de pattes appelées prothoraciques, mésothoraciques et métathoraciques qui présentent une organisation générale commune. Chaque patte se divise le long de l'axe proximo-distal en dix segments ; le coxa, le trochanter, le fémur, le tibia, cinq segments du tarse (de T1 à T5) et le prétarse portant deux griffes. Ces différents segments sont séparés par des joints qui permettent de former un organe articulé (**Fig.15**).

Au cours des stades embryonnaires, le disque de patte ne compte que 20 à 30 cellules (Cohen, 1993). Ces cellules vont ensuite proliférer pour atteindre plus de 10000 cellules durant les deuxième et troisième stades larvaires. Deux types de cellules commencent à se distinguer : les cellules squameuses qui constituent la membrane péripodiale et les cellules en colonnes plus larges qui constituent l'épithélium du disque proprement dit. C'est à partir de ce dernier que se forme la patte (Fristrom et Fristrom, 1993).



1. L'origine du disque de patte :

Les cellules à l'origine du disque de patte, d'aile et d'haltère sont détectées à environ six heures après la ponte sous forme de six domaines circulaires comprenant ~20-30 cellules et exprimant le gène *distal-less* (*dll*) (Cohen, 1993). A ce stade ces cellules sont pluripotentes et ont la capacité de donner naissance aux disques de patte, d'aile, d'haltère ou encore à l'organe de Keilin (McKay *et al.*, 2009). Ce dernier est un organe sensoriel périphérique de la larve constitué de trois soies, il est considéré comme un appendice rudimentaire de la larve (Cohen, 1993). (**Fig. 16**).

L'expression initiale de Dll est induite par la signalisation Wg, alors qu'elle est réprimée dorsalement et ventralement par les activités des voies Dpp et EGFR respectivement (Cohen, 1990; Goto et Hayashi, 1997; Kubota *et al.*, 2000).

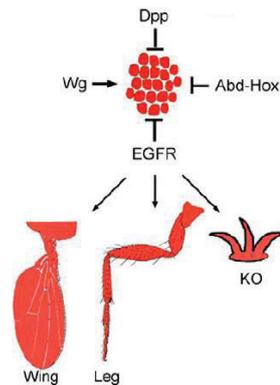
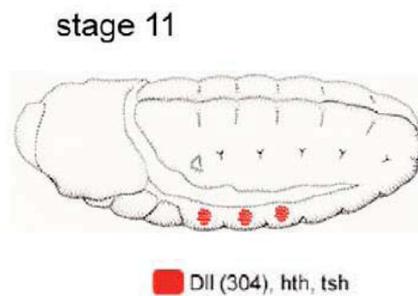
A la fin des stade embryonnaires, les cellules précurseurs des disques d'aile et d'haltère migrent dorsalement, elles cessent d'exprimer Dll et commencent à exprimer les gènes nécessaires au développement des disques correspondants tels que les facteurs de transcription vestigial et snail (Cohen *et al.*, 1993). Parmi les cellules à l'origine de disque de patte on distingue deux populations : les cellules qui cessent d'exprimer Dll et qui expriment escargot (*esg*) vont donner les cellules proximales de la patte. Pendant que celles qui maintiennent l'expression de Dll vont être à l'origine des parties les plus distales (Gonzalez-Crespo *et al.*, 1998; Kubota *et al.*, 2003) (**Fig.16**).

Il s'agit là du premier stade, où l'on peut reconnaître une subdivision proximo-distale au niveau du disque de patte.

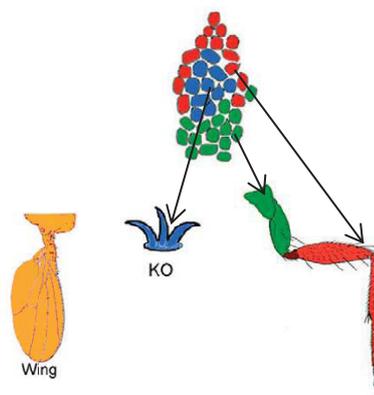
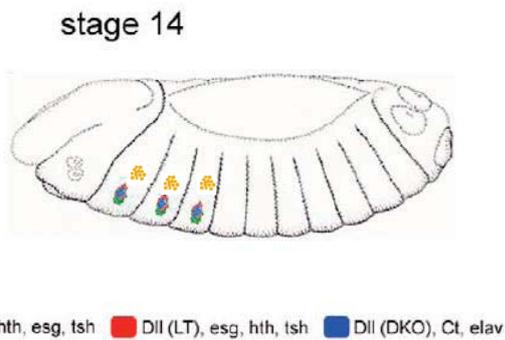
2. Etablissement des axes dans le disque de patte

Tout au long des stades larvaires, les cellules du disque acquièrent progressivement les informations concernant leur identité et leur position dans l'appendice adulte (Cohen, 1993). L'établissement des axes antéro-postérieur (A/P), dorso-ventral (D/V) et proximo-distal (P/D) constitue une étape cruciale pour l'acquisition de ces informations.

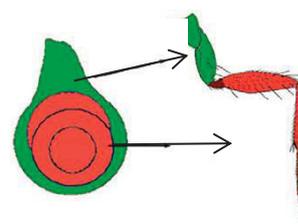
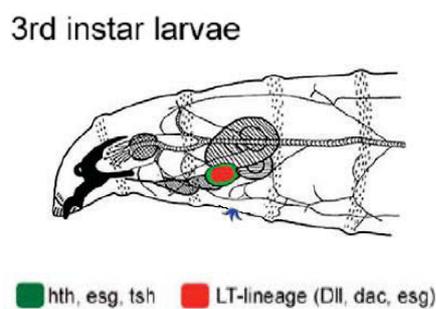
A



B



C



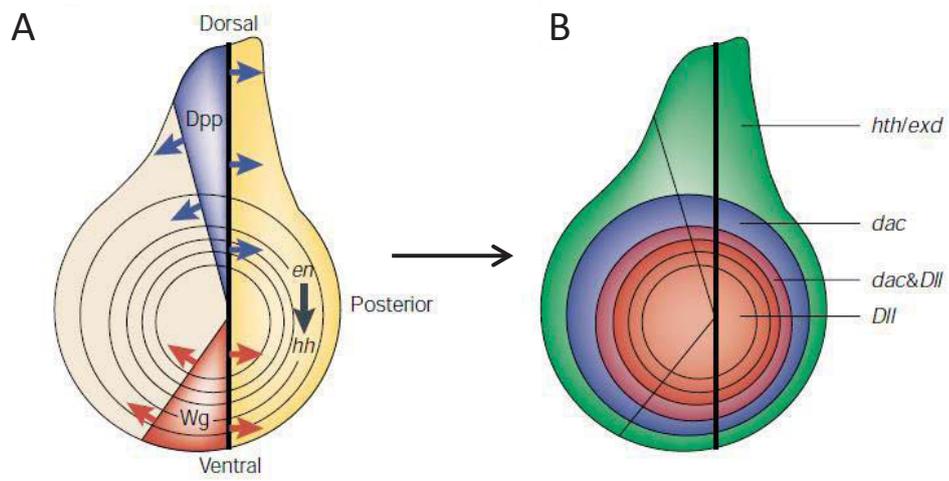
a. L'établissement de l'axe antéro-postérieur (A/P) :

Dès leur formation, les disques de pattes sont subdivisés en compartiments cellulaires antérieur et postérieur (Morata, 2001). Le compartiment postérieur est défini par l'expression du gène à homéoboîte *engrailed* (*en*). Chez les mutants *en* les structures postérieures issues des disques de pattes sont transformées en structures antérieures (Garcia-Bellido et Santamaria, 1972). De plus, *en* se comporte comme un gène sélecteur en réprimant les gènes spécifiques du compartiment antérieur, tels que, *cubitus interruptus* (*ci*), *patched* (*ptc*) et *dpp* (Tabata *et al.*, 1995).

En revanche, le compartiment antérieur est défini par l'activité du morphogène *hedgehog* (*hh*). L'expression de ce dernier est induite par facteur En dans le compartiment postérieur du disque. La protéine Hh diffuse ensuite vers le côté antérieur (Basler et Struhl, 1994). Les cellules du compartiment antérieur ont la capacité de répondre à Hh par la présence de *smoothened* qui code une protéine transmembranaire requise pour la réception du signal Hh (Dahmann et Basler, 2000). La diffusion de la protéine Hh dans le compartiment antérieur va induire dans ce dernier l'expression de molécules de signalisation codées par *dpp* et *wg*, responsable de la mise en place l'axe D/V (Basler et Struhl, 1994; Campbell *et al.*, 1993).

b. L'établissement de l'axe dorso-ventral (D/V):

En réponse à la signalisation Hh, les deux morphogènes *dpp* et *wg* sont induits respectivement dans les cellules antérieures dorsales et antérieures ventrales qui se trouvent à proximité de la frontière antéro-postérieure (Basler et Struhl, 1994). Ainsi, Dpp spécifie le compartiment dorsal en réprimant le devenir ventral des cellules et inversement ; Wg spécifie le compartiment ventral et réprime le devenir dorsal. Il y a donc une répression mutuelle de ces deux morphogènes : lorsque la signalisation Wg (ou inversement Dpp) est abolie dans les disques de pattes, l'expression de Dpp (et inversement Wg) s'étend tout le long de la frontière A/P (Theisen *et al.*, 1996). L'activité combinée des signalisations Wg et Dpp, qui se croisent au centre du disque



aboutit à l'établissement de l'axe P/D notamment en induisant l'expression de Dll (**Fig.17**) (Diaz-Benjumea *et al.*, 1994).

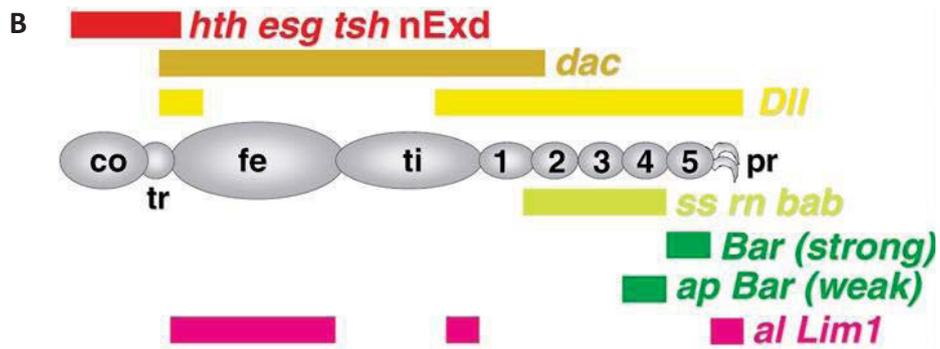
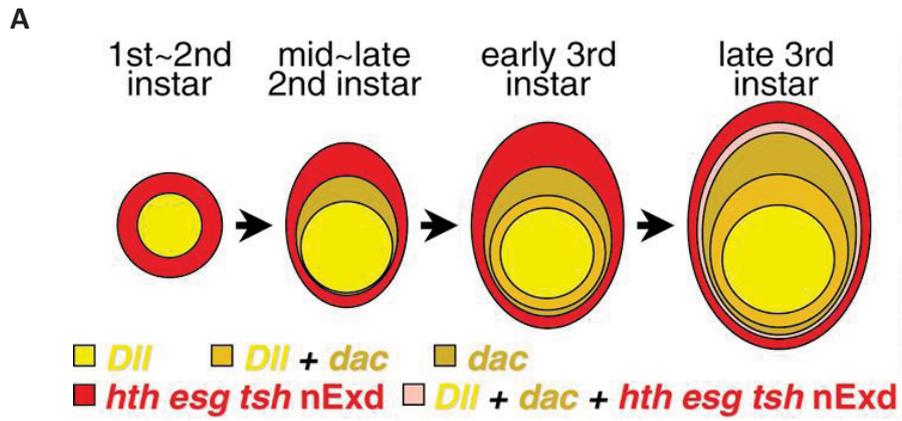
c. L'établissement de l'axe proximo-distal (P/D):

Dans le disque de patte, les régions centrales donnent les parties distales de la patte adulte pendant que les régions périphériques du disque donneront les parties proximales (Fristrom et Fristrom, 1993). Au cours des stades larvaires, les coordonnées des cellules le long de l'axe P/D semblent déterminées par des sous-domaines concentriques dans lesquels des facteurs de transcription régions spécifiques sont exprimés.

L'un des gènes les plus importants et précoces dans l'établissement de l'axe P/D est *dll*, dont l'expression est donc induite distalement par l'activité combinée des signaux Wg et Dpp (Diaz-Benjumea *et al.*, 1994). Il est initialement exprimé dans tout le primordium de la patte pour être plus tard limité aux segments qui vont donner le tibia distal et la région des tarsi, ainsi qu'un anneau dans le trochanter (Cohen *et al.*, 1989 ; Diaz-Benjumea *et al.*, 1994).

Ainsi, jusqu'au deuxième stade larvaire, Dll est exprimé au centre du disque de patte pendant que le gène *homothorax* (*hth*) s'exprime en anneau autour du domaine Dll (**Fig.18A**). *Hth* code une protéine à homéodomaine se liant à la protéine Extradenticle (Exd), un cofacteur des produits issus des gènes *hox*, régulant ainsi sa translocation dans le noyau. Le gène *hth* est exprimé dans la région du disque qui s'étend du coxa à la partie proximale du tibia, où il est requis avec le gène *exd*, pour le développement de ces structures (**Fig.18A**) (Abu-Shaar et Mann, 1998).

Au cours du deuxième stade larvaire, un troisième gène, *dachshund* (*dac*) s'exprime aussi dans un domaine en anneau de manière à s'intercaler entre les domaines d'expression de *dll* et de *hth* (Wu & Cohen, 1999) (**Fig.18.A**). *Dac* code pour une protéine nucléaire nécessaire au développement des segments intermédiaires (fémur et tibia) de la patte. En effet, chez les mutant *dac* ces segments intermédiaires sont absents ou sévèrement affectés (Mardon *et al.*, 1994).



Ainsi, au début du troisième stade larvaire, le disque de patte se trouve subdivisé en au moins trois régions : une région proximale exprimant *Hth*, une région médiale où *Dac* est exprimé et une région distale exprimant *Dll* (**Figure 18.A**). Par la suite, deux régions où les cellules ont une identité intermédiaire se mettent en place : une quatrième région exprimant à la fois *Dll* et *dac*, et une cinquième région avec l'apparition d'un nouvel anneau d'expression de *Dll* (au niveau de la région à l'origine du trochanter) qui se chevauche avec l'expression de *Dac* et *Hth* (Kojima, 2004) (**Fig.18A**).

Ainsi, les différents niveaux d'activité des gènes *wg* et *dpp* régulent l'expression des gènes *hth*, *dac* et *dll* qui vont permettre au disque de patte d'être progressivement subdivisé en cinq domaines. Cette première subdivision est cependant incomplète : chacun de ces cinq domaines correspond à plusieurs segments présomptifs, une subdivision supplémentaire est donc nécessaire plus tard au cours du développement afin de spécifier plus finement l'identité de chaque segment de patte. Plusieurs gènes, codant majoritairement pour des facteurs de transcription et régulant notamment la subdivision des segments de tarse ont été caractérisés. C'est le cas d'*aristaless* (*al*) (T5 et pinces), *tarsalless* (*tal*) (T4), *rotund* (*rn*) (T3 et T4), *bric à brac* (*bab*) (T2 et T4), d'*apterous* (*ap*) (T4) et *Bar* (B) (T4 et T5) (Campbell et Tomlinson, 1998; St Pierre *et al.*, 2002; Godt *et al.*, 1993; Kojima *et al.*, 2000; Pueyo et Couso, 2004) (**Fig.18B**).

L'expression de ces gènes permettant l'intercalation des segments de tarse est régulée par la mise en place d'un gradient d'activité de la voie EGF à partir de l'extrémité, distale du disque. Ce gradient est établi à partir d'une source du facteur EGF, *Vein* (*Vn*) au centre du disque. L'expression de *Vn* est induite durant le troisième stade larvaire par les voies de signalisation *Wg* et *Dpp* et la présence de *Dll* dans la région centrale (distale) du disque (Campbell, 2002 ; Galindo *et al.*, 2002).

Ainsi, des niveaux élevés de la signalisation EGF induisent l'expression des gènes les plus distaux tels que *al* et inversement, des niveaux progressivement plus faibles sont suffisants pour induire les gènes plus proximaux tels que *bar* et *ap*

(Galindo *et al.*, 2005). Les interactions entre ces gènes et la voie EGF définissent précisément la subdivision des segments du tarse (**Fig.18B**).

3. Formation des joints entre les segments de la patte :

Les jonctions ou joints sont des structures flexibles reliant les différents segments de la patte. Selon leur structure et leurs fonction (Bishop *et al.*, 1999 ; Fristrom et Fristrom, 1993; Mirth et Akam, 2002; Tajiri *et al.*, 2010) on peut distinguer: (i) les « vrais » joints, qui séparent les segments coxa, trochanter, fémur, tibia, tarse 5 et prétarse, caractérisés par la présence de sites d'attachement musculaires et une diversité morphologique propre à chaque segment ; et (ii) les « faux » joints entre chaque segment du tarse, caractérisés par une structure identique et l'absence de site d'attachement musculaire.

La différenciation des joints est un processus complexe qui implique des changements de forme cellulaire, d'adhérence entre les cellules et une redistribution de l'actine filamenteuse et des protéines de la matrice extracellulaire (Fristrom et Fristrom 1993; Mirth et Akam, 2002). Sur le plan moléculaire l'activation de la voie Notch dans les tissus présomptifs des joints est nécessaire à la formation de ces derniers (de Celis *et al.*, 1998; Bishop *et al.*, 1999; Rauskolb et Irvine, 1999). Les tissus présomptifs des joints correspondent aux cellules les plus distales de chaque segment qui sont adjacents aux domaines d'expression des ligands de Notch : Delta (Dl) et Serrate (Ser). La perte de fonction de *Notch* ou de ses ligands conduit à la perte des joints et à la fusion des segments de la patte. Le signal Notch est également suffisant pour induire la formation de nouveaux joints. En effet, des joints ectopiques peuvent être induits lorsque Notch ou ses ligands sont activés de manière ectopique (de Celis *et al.*, 1998; Bishop *et al.*, 1999; Rauskolb et Irvine 1999).

a- La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est un mécanisme de communication cellulaire hautement conservé. Elle repose sur la liaison entre un récepteur et un ligand transmembranaires présents à la surface de deux cellules adjacentes.

La voie canonique de Notch débute par l'interaction du récepteur Notch (N) avec l'un de ces ligands transmembranaires Delta (Dl) ou Serrate (Sr). Lors de la liaison avec ces ligands, le récepteur Notch subit deux clivages protéolytiques (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Le premier clivage (S2), effectué dans la partie extracellulaire du récepteur, est catalysé par une métalloprotease de la famille ADAM (Kuzbanian chez la drosophile). Ce clivage est essentiel à l'initiation du second clivage intramembranaire (S3) (Mumm *et al.*, 2000). Le clivage intramembranaire S3, catalysé par le complexe γ -secretase, induit la libération de la partie intracellulaire du récepteur (N^{intra}) (Struhl et Adachi, 1998). Après sa libération, N^{intra}, la forme active de N, est directement transloquée dans le noyau, où elle interagit avec le facteur de transcription Suppressor of Hairless Su(H) afin de réguler l'expression de ces gènes cibles (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999).

Plusieurs acteurs supplémentaires sont connus pour moduler la voie Notch. C'est le cas de Fringe, une glycosyl transférase impliquée dans la modification post traductionnelle de Notch. La modification de Notch par Fringe accroît son affinité pour Delta. En absence de Fringe, Notch n'est pas modifié et présente une plus forte affinité pour Serrate (Brückner *et al.*, 2000).

Au cours de la morphogénèse du disque de patte, la voie Notch est activée au niveau des cellules formant les joints entre chaque segment et joue ainsi un rôle crucial dans la segmentation de la patte le long de l'axe proximo-distal. En effet dans un contexte perte de fonction de Notch, l'ensemble des joints de la patte sont absents (Bishop *et al.*, 1999).

b- Rôle de Notch dans la détermination des domaines de joints présomptifs :

Il a été suggéré que les différents signaux impliqués dans la mise en place des segments tout au long de l'axe P/D, notamment Wg et dpp, participeraient à l'établissement des domaines d'expression de Notch (Rauskolb et Irvine, 1999). Au cours du troisième stade larvaire les gènes *serrate*, *delta* et *fringe* sont exprimés dans des anneaux concentriques dans la partie proximale de chaque segment présomptif pour activer la voie Notch dans les parties distales. (Bishop *et al.*, 1999; Rauskolb et

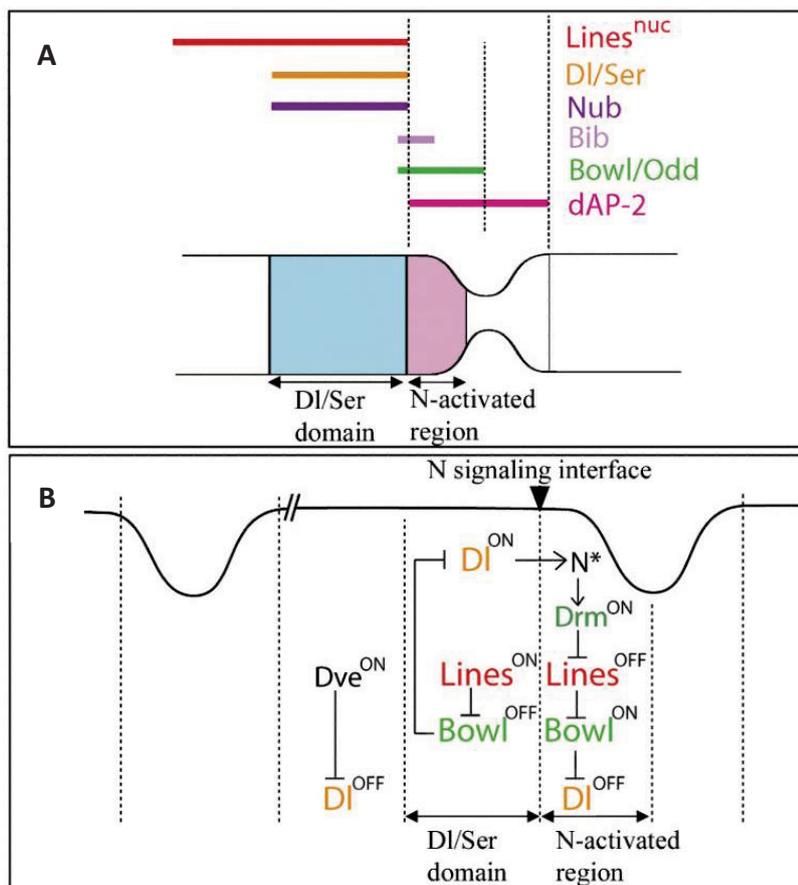
Irvine, 1999; de Celis *et al.*, 1998). Cependant l'activation de Notch est finement régulée afin d'être restreinte uniquement au domaine du futur joint. Ainsi, l'expression des ligands Ser et D1 à la frontière de chaque segment permet l'activation de la voie Noth dans les cellules directement adjacentes induisant les changements morphologiques nécessaires à la formation de l'articulation (Bishop *et al.*, 1999; Rauskolb et Irvine, 1999; de Celis *et al.*, 1998).

Le maintien de la répartition spatiale asymétrique entre l'expression du ligand et l'activation de Noth est crucial pour la segmentation de la patte. En effet, l'expression ectopique des ligands dans les cellules où la voie Notch est active, réprime la formation des jonctions en inhibant la signalisation Notch (Bishop *et al.*, 1999; Rauskolb et Irvine, 1999). La distribution différentielle des cellules exprimant le ligand et celles exprimant Notch, est accomplie par une boucle négative qui réprime l'expression du ligand dans les cellules exprimant Notch (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Fortini, 2009). Réciproquement, les cellules exprimant le ligand perdent leur propre capacité à répondre à Notch, par une répression transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle de Notch (Bécam *et al.*, 2010; Fortini, 2009; Miller *et al.*, 2009).

- *Régulation de Notch lors de l'établissement des 'vrais' joints*

Lors de la formation des vrais joints, il a été démontré que l'établissement de frontières précises d'activation de la voie Notch reposait sur l'interaction entre la voie Notch et les gènes de la famille odd-skipped: *odd-skipped* (*odd*), *drumstick* (*drm*) et *Brother of odd with entrails limited* (*bowl*) (Greenberg et Hatini, 2009).

Ces derniers sont des cibles effectrices de la voie Notch codant pour des facteurs de transcriptions présentant une forte homologie entre leurs domaines à doigts de zinc (Coulter *et al.*, 1990; Hart *et al.*, 1996; Wang et Coulter, 1996; Green *et al.*, 2002). Ces facteurs sont présents dans les cellules formant les vraies joints (Rauskolb et Irvine 1999; Ibeas et Bray, 2003; Hao *et al.*, 2003). De par leur probable redondance fonctionnelle, aucune de leurs pertes de fonction simple ne présente de défauts apparents dans la formation des joints (Ibeas et Bray, 2003; Hao *et al.*, 2003).



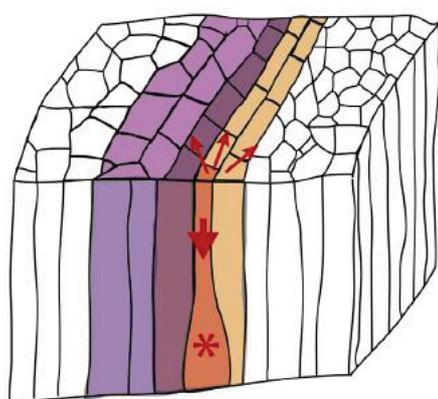
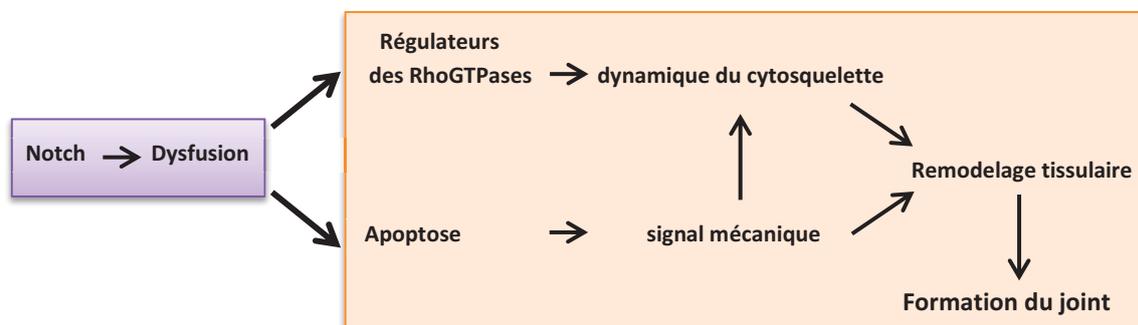
Cependant leur expression ectopique dans les cellules du disque ont montré qu'ils sont capables d'induire des changements cellulaires (redistribution de l'actine, forme cellulaire) comparables à ceux observés pour les cellules des joints (Hao *et al.*, 2003).

Plus précisément, il a été montré que Bowl est régulé par le produit du gène *Lines*. Ce dernier code pour une protéine dont la localisation nucléaire lui permet d'interagir avec le facteur de transcription Bowl, de le déstabiliser et de conduire à sa dégradation (Greenberg et Hatini, 2009; Hatini *et al.*, 2005). Dans les cellules exprimant *DI*, la protéine *Lines* est présente dans le noyau et Bowl est ainsi dégradé. Dans les cellules des joints, la voie Notch active l'expression du gène *drm*, la protéine *Drm* est capable de se lier à *Lines* et empêche ainsi la dégradation de Bowl. Par conséquent, Bowl peut s'accumuler dans le noyau où il réprime l'expression de *DI* (Greenberg et Hatini, 2009). Ce mécanisme renforce la frontière entre les cellules exprimant *DI* et celles ne l'exprimant pas et assure ainsi le maintien d'une signalisation Notch stable le long du développement du joint (Greenberg et Hatini, 2009) (**Fig.19**).

Enfin, il a été proposé que les gènes de la famille *odd-skipped* favorisent spécifiquement le remodelage tissulaire associés à la morphogénèse des joints. Ils seraient ainsi responsable du plissement localisé de l'épithélium du disque à l'origine de l'invagination des cellules d joint (Hao *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2002). Certains auteurs ont ainsi suggéré que ces facteur de transcription réguleraient l'expression de gènes codants des protéines impliquées dans le réarrangement du cytosquelette ou/et dans l'adhésion cellulaire cependant aucun de ces gènes n'a été identifié à ce jour (Hao *et al.*, 2003).

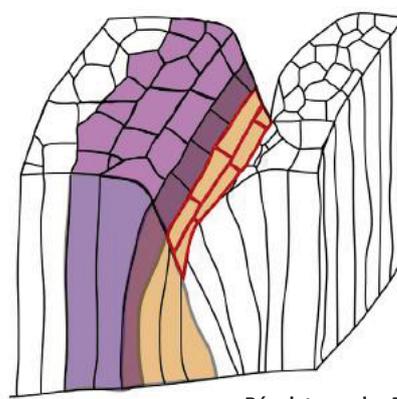
- *Régulation de Notch lors de l'établissement des joints du tarse*

La formation des « faux » joints entre segment du tarse implique aussi la mise en place de frontière précise entre les cellules Delta positive et Delta négative. Plusieurs mécanismes ont été décrits dans la mise en place de ces frontières. Le gène *tarsal-less (tal)* joue un rôle crucial dans la formation des joints du tarse. Tal est



Régulateurs des RhoGTPases et de l'apoptose
 Activation de la voie Notch

* Cellule en apoptose
→ Forces apoptotiques



Régulateurs des RhoGTPases et de l'apoptose
 Activation de la voie Notch

↔ Accumulation de l'actomyosine

exprimé dans les régions activées par Notch dans le tarse et est nécessaire pour le développement des jonctions. La signalisation Notch active l'expression de Tal. En retour, la protéine Tal rétrocontrôle Notch par la répression de la transcription du gène *Dl* via le facteur de transcription Shavenbaby (Svb) (Pueyo et Couso, 2011).

D'autres mécanismes impliqués dans l'établissement d'une frontière précise d'activation de la voie Notch ont été décrits. Ainsi les facteurs AP-2 et Defective proventriculus (*Dve*) sont requis pour limiter l'expression distale des ligands Ser et Dl (Ciechanska *et al.*, 2007).

En plus de son rôle dans la formation des vrais joints, Bowl semble aussi avoir un rôle dans la formation des joints du tarse. En effet, l'absence de Bowl dans le tarse et le tibia est suffisante pour altérer la formation des joints à ces endroits, malgré la présence de Odd, Drm, et sob dans cette région de la patte (Ibeas et Bray, 2003). De plus, contrairement aux autres gènes de la famille odd-skipped, l'expression ectopique de Bowl n'induit pas la formation de joints ectopiques (Bras-pereira et Casares, 2008). Le rôle de Bowl dans la formation des joints du tarse serait médié par la répression du gène *bric à brac 2* (Mojica-Vázquez *et al.*, 2017).

Contrairement aux vrais joints, plusieurs mécanismes impliqués dans la morphogénèse épithéliale des joints du tarse ont été décrits. La plupart de ces mécanismes dépendent de l'activation de Notch. Le facteur de transcription Dysfusion (Dys), jouant un rôle important dans la morphogénèse des joints du tarse est une cible de la voie Notch. Dys est exprimé spécifiquement dans les cellules du tarse où Notch est activé, son expression colocalise partiellement avec l'expression des gènes pro-apoptotiques *Reaper (rpr)* et *Head involution defective (hid)* et des régulateurs des RhoGTPases qui contrôlent la distribution du cytosquelette d'actomyosine (Greenberg et Hatini, 2011).

Ainsi, Dys orchestre la morphogénèse de l'épithélium en induisant un réarrangement du cytosquelette et en contrôlant le « pattern » de l'apoptose (Fig.20). En effet, il a été montré que l'apoptose joue un rôle actif dans le remodelage

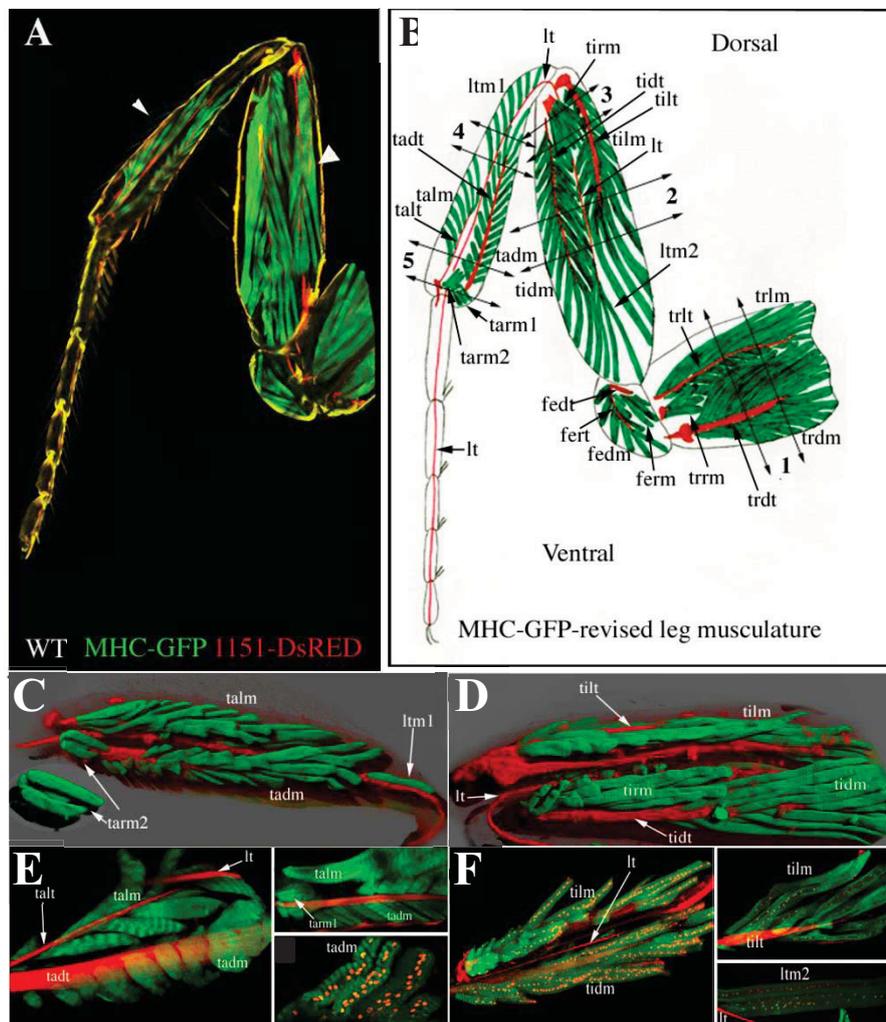


Figure 21: Organisation des muscles et tendons de la patte chez la drosophile.

(A) observation au microscope confocal des muscles (MHC-tauGFP) et des tendons 1151>UASDsRed. (B) Schéma représentant les différents muscles appendiculaires et leurs tendons internes. On observe deux muscles principaux par segment, excepté dans les segments de tarse (traversés par un long tendon uniquement). (C-D) Reconstruction 3D du tibia (C) et du fémur (D). (E-F) visualisation de fibres musculaires et des tendons associés après dissection, les noyaux sont révélés par marquage avec iodure de propidium (IP). Adaptée de Soler *et al.*, 2004.

tissulaire responsable de la formation d'un pli initiant l'invagination au sein de l'épithélium du tarse (Córdoba et Estella, 2014 ; Monier *et al.*, 2015). La cellule apoptotique réduit sa surface apicale tout en maintenant une forte adhésion avec les cellules voisines générant une force contractile. Cette force repose sur la formation d'un câble apico-basal d'acto-myosine. La contraction de ce câble entraîne la déformation de la surface apicale de l'épithélium, la stabilisation de la myosine II au niveau des jonctions adhérentes et une augmentation de tension dans les cellules voisines. La synergie de plusieurs cellules apoptotiques dans un domaine restreint permet une augmentation de tension suffisante pour entraîner la formation d'un pli permettant la création du joint au niveau de l'épithélium du tarse (Monier *et al.*, 2015).

4. La myogenèse appendiculaire :

Contrairement aux muscles de vol les muscles de la patte ont été peu étudiés. La première description de la musculature de la patte a été faite par Miller en 1950, cette description a été par la suite complétée par Soler *et al.*, 2004 et a permis de faire une description plus complète et plus détaillée de l'ensemble des muscles et des tendons formant la musculature appendiculaire (Fig.21).

a. Organisation générale de la musculature de la patte :

La musculature de la patte de la drosophile présente une architecture complexe comparable à celle retrouvée chez les vertébrés, avec en particulier l'organisation de muscles multi-fibrillaires de type tubulaire autour de longs tendons internes permettant le mouvement de l'organe articulé.

La patte de la drosophile comporte au total quatorze muscles distincts repartis dans les différents segments de la patte à l'exception du tarse qui en est dépourvu. Dans chacun des autres segments on distingue ainsi la présence de deux muscles principaux, un muscle levateur et un muscle dépresseur, assurant les mouvements de la patte grâce à leur association avec de longs tendons internes (Fig.21).

b. Mécanismes moléculaires de la myogenèse appendiculaire

- *Identité des myoblastes appendiculaires :*

Les AMPs associés aux disques de patte sont à l'origine des fibres musculaires formées par un processus de myogenèse *de novo*. Comme dans le disque d'aile, deux populations de myoblastes sont présentes, une population présentant un niveau élevé du facteur de transcription Cut et une autre population avec un faible niveau de Cut mais un niveau important du facteur Vestigial (Vg). Cependant contrairement au disque d'aile, où les myoblastes exprimant uniquement Cut représentent une petite sous population, la population de myoblastes Cut-positif du disque de patte est majoritaire et se situe dans la région principale du disque (celle qui forme les segments de la patte) et donne donc naissance à l'ensemble des muscles tubulaires de la patte. Seule une petite population de myoblastes présente dans les régions plus proximales exprime Vg (et Cut), elle participe en partie avec les myoblastes issus du disque d'aile au muscles de saut (TDT) et aux muscles indirects de vol dorso-ventraux (DVMs) (Rivlin *et al.*, 2000 ; Maqbool *et al.*, 2006 ; Jaramillo *et al.*, 2009).

En plus de l'expression de Cut qui caractérise les myoblastes à l'origine de muscles tubulaires, les myoblastes associés aux disques de patte se caractérisent par l'expression des gènes d'identité *ladybird early et late (lbe/lbl)*, dont l'orthologue *Lbx1* chez les vertébrés est requis pour la formation des muscles de membres (Neyt *et al.*, 2000 ; Maqbool *et al.* 2006).

L'atténuation de l'expression des gènes *lbe/lbl* par ARN interférence dans les myoblastes du disque de pattes altère fortement la structure musculaire de la patte adulte entraînant des défauts de locomotion des mouches (Maqbool *et al.*, 2006). De plus la surexpression de Vg dans les myoblastes appendiculaires réprime l'expression des gènes *lbe/lbl* et conduit à la formation d'imposantes fibres musculaires comparables aux larges fibres des muscles indirects de vol (Maqbool *et al.*, 2006).

Les gènes *lbe/lbl* participent donc vraisemblablement à l'identité musculaire appendiculaire. De manière intéressante, les gènes *lbe/lbl* sont exprimés plus

fortement dans les myoblastes ventraux que dans les myoblastes dorsaux (Maqbool *et al.*, 2006). De plus, la surexpression de Lbe ou Lbl dans tous les myoblastes affecte plus sévèrement les muscles dorsaux par rapport aux muscles ventraux indiquant que le maintien d'un niveau précis d'expression des gènes *lbe/lbl* est nécessaire à la bonne formation des différents muscles appendiculaires et que ce niveau d'expression participe à l'identité musculaire (Maqbool *et al.*, 2006). Ce niveau différentiel d'expression est dépendant de la signalisation Wingless/Wnt. En effet, l'expression forcée d'une forme dominante négative de la protéine dTCF/pan (effecteur de la voie Wg) réprime totalement l'expression des gènes *lbe/lbl* dans l'ensemble des myoblastes.

Par ailleurs, l'expression d'une forme constitutivement active de la protéine β -catenin/Armadillo induit l'expression d'un niveau élevé de Lbe dans l'ensemble des myoblastes incluant les myoblastes Vg-positifs des régions proximales (Maqbool *et al.* 2006).

Ce résultat est cohérent avec un rôle de la voie Wnt dans l'établissement d'un niveau différent d'expression de *lbe/lbl* plus important dans les myoblastes ventraux (proche de la source du ligand Wg) que dans les myoblastes dorsaux.

- *Sélection des cellules fondatrices*

Parmi les myoblastes exprimant Cut et Lbe/Lbl, certains sont sélectionnés en tant que cellules fondatrices (FC). Ces cellules sont caractérisées par l'expression du marqueur des cellules fondatrices Dumbfounded (Duf) (Soler *et al.*, 2004 ; Maqbool *et al.*, 2006). Les mécanismes régulant l'activation et la sélection de ces cellules fondatrices restent à élucider.

Néanmoins il a été démontré que comme lors de la sélection des cellules fondatrices des muscles abdominaux, la voie FGF pourrait être impliquée. En effet, les myoblastes Lbe/Lbl positifs expriment le récepteur FGF, Heartless (Htl). L'atténuation de l'expression de Htl réduit considérablement le nombre de myoblastes Lbe et Duf positifs alors que la surexpression de la forme

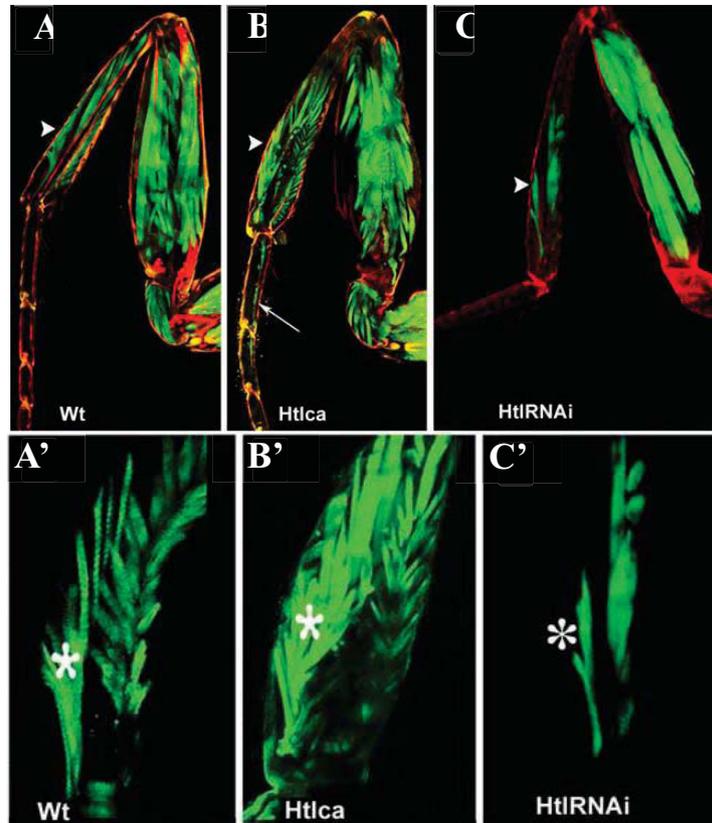


Figure 22: Le nombre de fibres musculaires de la patte est sous le contrôle de la voie FGF.

A) Patte adulte contrôle (WT) visualisation des muscles MHC-tauGFP (vert) et des tendons 1151>dsRed (rouge). **(B)** L'expression du récepteur FGF Heartless constitutivement actif (*Htlca*) induit la formation de fibres musculaires supplémentaires (pointe de flèche) avec formation de muscles ectopiques dans les segments du tarse (flèche). **(C)** L'expression de Heartless RNAi induit une réduction importante des fibres musculaires (pointe de flèche). **(A')** Visualisation des muscles du tibia d'une mouche control avec MHC-GFP en vert. **(B'-C')** Expression de *Htlca* et *HtlRNAi* et visualisation de l'effet sur les fibres musculaires du muscle élévateur du tibia (talm, astérisque). Adaptée de Maqbool et *al.*, 2006.

constitutivement active de Htl conduit à l'augmentation du nombre de myoblastes exprimant Lbe et Duf. Ceci a pour conséquence la présence de fibres musculaires ectopiques dans les pattes de l'insecte adulte (Maqbool *et al.*, 2006) (**Fig.22**).

c. Différenciation des tendons appendiculaire :

Tout comme pour les tendons du disque d'aile, les précurseurs des tendons des muscles de la patte dérivent de l'épithélium du disque et sont caractérisés dès le troisième stade larvaire par l'expression du gène *sr*. Ainsi sept domaines *sr* positifs correspondant aux futurs longs tendons internes de la patte apparaissent progressivement entre le début du 3ème stade larvaire et le début de la métamorphose. De manière intéressante, ces domaines d'expression de *sr* sont spécifiés parmi les cellules des «vrais joints » exprimant Odd (Soler *et al.*, 2004). Lors de leur développement, les cellules tendons vont s'invaginer puis progresser vers l'intérieur du disque formant un long tube central auquel seront rattachées l'une des extrémités de chaque fibre musculaire (l'autre extrémité étant fixée à la surface interne du de l'épithélium du disque au niveau d'une cellule *sr* positive unique). Ainsi les longs tendons internes de la patte présentent un aspect unique chez la drosophile comparable morphologiquement aux longs tendons présents dans les membres des vertébrés en particulier au niveau des autopodes.

La formation de ces longs tendons nécessite un remodelage profond des cellules du disque pour passer d'un épithélium plat à un long tube polarisé entourant un lumen central, la surface apicale de chaque cellule faisant face au lumen tandis que la surface basale projette des extensions cytoplasmiques dirigées vers l'intérieur du segment (données non publiées et présentées dans ce travail). Les mécanismes conduisant à ces changements importants sont totalement inconnus à ce jour, il est cependant intéressant de noter que les cellules des joints à partir desquelles se forment ces tendons subissent elles-mêmes une invagination sous l'influence de la voie Notch qui régule les gènes de la famille *odd-skipped* (cf. chapitre II). Le processus de formation des tendons pourrait donc être en partie lié aux mécanismes d'invagination des cellules des jonctions de la patte.

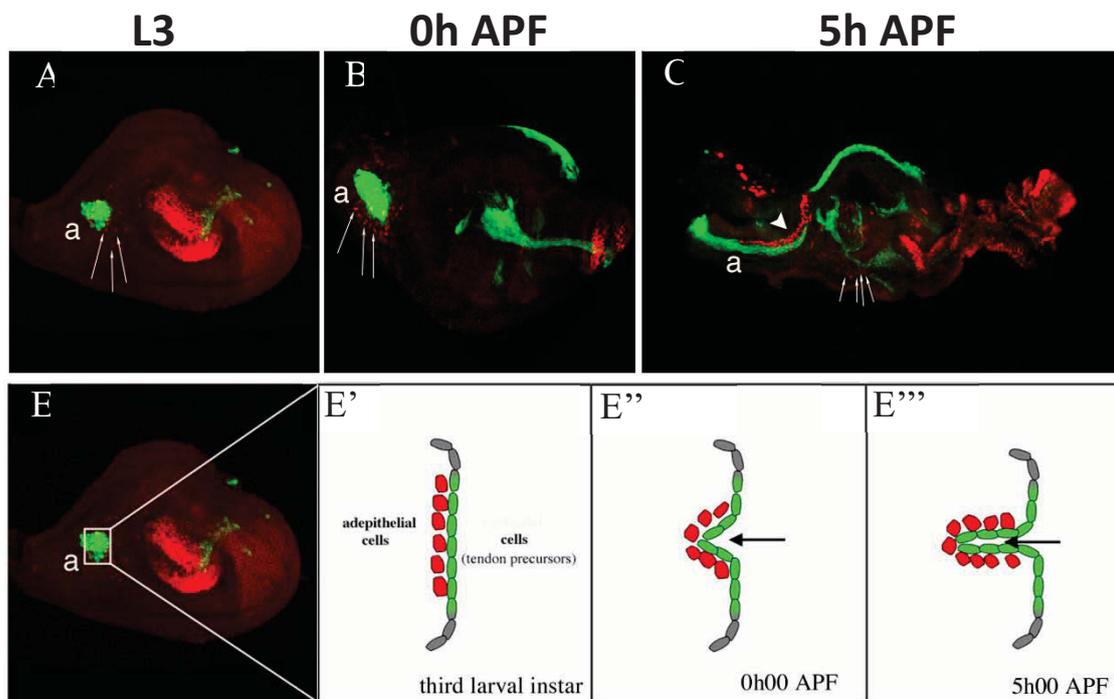


Figure 23: Développement coordonné des tendons et des muscles appendiculaires. (A-C) étape de développement du disque de patte du troisième stade larvaire (A) 0h après formation de la pupe (APF) (B) et à 5h APF (C). Les cellules précurseurs de tendon sont visualisées avec *Sr-gal4>UASmCD8GFP* (en vert) et les cellules fondatrices sont révélées par le gène rapporteur *Duf-lacZ* (en rouge, flèches). Le domaine à l'origine du tendon du fémur est noté (a). Au cours de la métamorphose, alors que le disque de patte s'évagine, les précurseurs de tendon s'invaginent à l'intérieur du disque (a). Les cellules fondatrices s'associent précocement au précurseurs de tendon (flèches) et s'organisent autour de celui-ci au cours de son invagination. (E-E''') Modèle représentant les cellules fondatrices associées à leur tendon au cours d'invagination. Adaptée de Soler *et al.*, 2004.

Enfin, les observations précédentes réalisées dans l'équipe montrent que les précurseurs de tendon et les cellules fondatrices musculaires présentent un développement coordonné dans l'espace et dans le temps (Soler *et al.*, 2004) (**Fig.23**). Ainsi, dès le troisième stade larvaire, les FCs sont spatialement très proches des précurseurs de tendon. Cette association est maintenue au cours de l'invagination des tendons. Ces résultats suggèrent des interactions précoces entre ces précurseurs de muscle et de tendon, dont la nature reste encore à élucider. Ce phénomène n'existe pas pendant l'embryogenèse et n'a pas été rapporté au niveau du disque d'aile, où les premières interactions observées jusqu'à aujourd'hui se déroulent entre les tendons et les fibres musculaires déjà formées. Cependant, on peut noter que chez les vertébrés, il a été rapporté que les compartiments donnant naissance aux muscles axiaux et à leurs tendons respectifs interagissent dès les premières étapes de la myogenèse (Brent *et al.*, 2003).

But de la recherche

Le développement d'un organe est la conséquence d'un ensemble de processus développementaux coordonnés. Chaque tissu entretient une communication permanente avec son environnement, permettant de réguler la croissance et la différenciation cellulaire au cours du temps. La mise en place du système musculo-squelettique est un modèle d'organisation particulièrement propice à l'étude des interactions tissulaires développementales. Le système musculo-squelettique de la patte de drosophile représente un modèle pertinent pour l'étude des interactions cellulaires et de la coordination entre les tissus musculaires et tendineux lors du développement.

L'objectif principal de ma thèse est d'une part, la compréhension de la myogenèse appendiculaire à travers l'étude des interactions précoces entre les précurseurs de tendons et les myoblastes, et d'autre part, l'étude des mécanismes de différenciation des précurseurs de tendons associés au disque de patte. Les différentes expériences réalisées au cours de ma thèse s'articulent autour de deux grands axes :

➤ Le premier axe concerne la caractérisation des interactions précoces entre les précurseurs de tendons et les myoblastes du disque de patte. Pour ce faire, il a été nécessaire de mettre en place des outils pour démontrer l'existence des interactions cellulaires entre les précurseurs des deux tissus. J'ai réalisé des expériences afin d'interférer spécifiquement avec le développement des précurseurs de tendons ou de muscle et étudier l'impact de ces changements sur le développement de ces deux tissus. Dans le but d'identifier les gènes impliqués dans ces communications inter-tissulaires, j'ai participé à la mise en place d'une approche cellule-spécifique afin de trier les précurseurs de tendons et les myoblastes associés au disque de patte. Nous avons ainsi obtenu les données transcriptomiques des précurseurs de tendons dont l'analyse est toujours en cours.

➤ Le deuxième axe s'intéresse à la différenciation des tendons appendiculaires. En effet, contrairement à la myogenèse qui est un mécanisme relativement bien étudié chez la drosophile, le développement des tissus tendineux reste peu connu. L'étude vise à améliorer nos connaissances sur les étapes de différenciation des précurseurs de tendons et sur leur développement subséquent. En ce sens, il est important de déterminer les voies de signalisations majeures, responsables de la différenciation et de l'initiation de l'expression de *Sr*, facteur clé de développement des tendons chez la drosophile. Mon intérêt s'est surtout porté sur l'implication de la voie Notch et des gènes de la famille *odd-skipped* dans la différenciation et la morphogenèse des précurseurs de tendons. En effet, l'hypothèse d'un rôle de la voie Notch au cours de la formation des tendons appendiculaire est sous-tendue par l'expression de Notch et du facteur de transcription Odd (cible directe de Notch) dans les tendons en cours d'invagination. J'ai ainsi altéré l'activité de la voie Notch et l'expression des différents gènes de la famille *odd-skipped* pour analyser les effets sur le développement des tendons et déterminer leur rôle.

Résultats

“ Il est beaucoup plus intéressant de regarder où l'on ne va pas pour la bonne raison que, là où l'on va, il sera toujours temps d'y regarder quand on y sera.”
Les devises Shadok

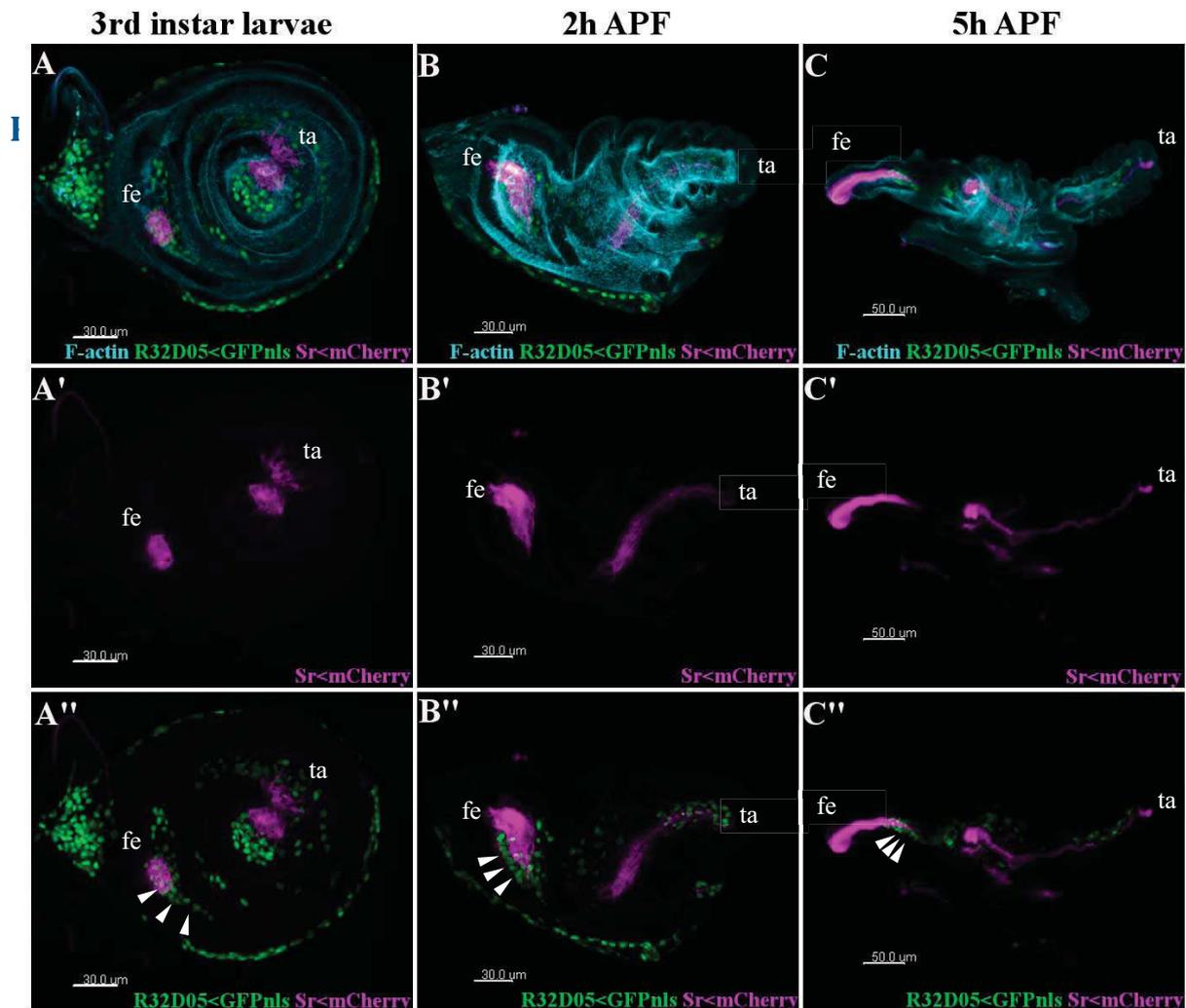


Figure 24: Le développement des précurseurs de tendons et des myoblastes au sein du disque de patte en cours d'évagination.

Disque de patte à différents stades de développement : L3 (A-A''), 2h APF (B-B'') et 5h APF (C-C'') permettant d'observer le processus d'évagination selon l'axe proximo-distal pour former la patte adulte. Les précurseurs de tendon qui sont des domaines de cellules appartenant à l'épithélium du disque (magenta) sont visualisés grâce à l'expression du transgène mCherry sous le contrôle du pilote Stripe-gal4 (A', B' et C'). Ces précurseurs de tendons vont s'invaginer à l'intérieur du disque au cours de la métamorphose pour former de longs tendons internes. Les myoblastes observés par l'expression de la GFPnls sous le contrôle du pilote R32D05lexA (lignée pilote spécifique des myoblastes) s'organisent en population spatialement proche des précurseurs de tendons (flèches) et y restent associés au cours de leur invagination. fe:tendon dans le fémur dorsal, ta: long tendon des tarse.

I. Caractérisation des interactions entre les précurseurs de muscles et de tendons :

Dans cette première partie de mon projet de thèse je m'intéresse à la coordination du développement des muscles et des tendons de la patte de drosophile. Ceci s'inscrit dans la continuité des observations précédentes, faites au laboratoire, lors de la première étude du développement appendiculaire chez la drosophile (Soler *et al.*, 2004).

Comme mentionné précédemment, pendant la métamorphose, les disques de pattes subissent une évagination pendant laquelle les précurseurs de tendons, formant les futurs longs tendons internes s'invaginent à l'intérieur du disque. Durant cette étape, des populations de myoblastes restent étroitement associées à ces tendons (**Fig. 24**). Suite à cette observation est née l'hypothèse de l'existence d'interactions entre les précurseurs de tendons et les myoblastes. Mon étude se focalise ainsi sur la caractérisation de ces potentielles interactions et moyens de communication pouvant exister entre les précurseurs de muscles et de tendons, et notamment sur les mécanismes cellulaires et moléculaires permettant l'établissement d'un éventuel dialogue entre ces deux tissus. Une partie de ces résultats a été obtenue en collaboration avec Quentin Laurichesse, dans le cadre de son stage de M2, comme la mise au point de la méthode GRASP et du tri-cellulaire précédant l'analyse transcriptomique des cellules précurseurs de tendons.

1. Mise en évidences des interactions membranaires : méthode GRASP

La méthode GRASP (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners) a été mise au point par Feinberg *et al.* (2008) et adaptée chez la drosophile par Gordon et Scott (2009). Cette technique est basée sur l'expression de deux parties complémentaires de la protéine GFP au niveau de la membrane de deux cellules distinctes. Si les membranes de ces deux cellules sont suffisamment proches, la protéine GFP est

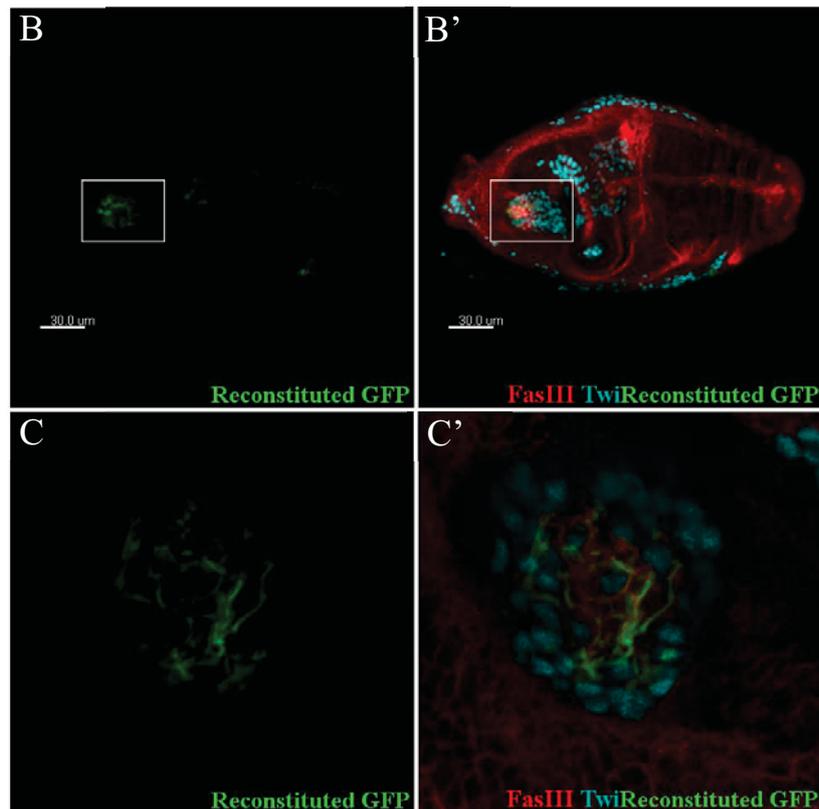
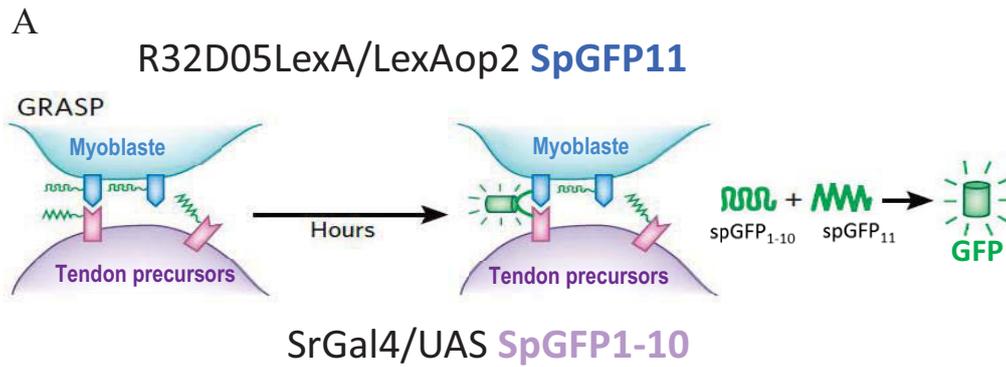


Figure 25: Méthode GRASP (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners) et application aux précurseurs de tendons et myoblastes. (A) L'expression de deux fragments complémentaires de la protéine GFP (GFP₁₋₁₀ et GFP₁₁) au niveau de deux membranes de cellules physiquement très proches (< 20nm) permet la reconstitution de la fluorescence de la protéine au niveau des membranes (Schéma adapté de Feinberg *et al.*, 2008). (B-B'') disque de patte de 3h APF, La présence de GFP (vert) à l'interface tendon-myoblastes, suite à l'expression des deux fragments de la GFP dans les cellules tendons, révélées par l'accumulation de la Fascioline III, en rouge (jonctions de type septates) d'une part et dans les myoblastes d'autre part (marquage Twist en Cyan), rend compte de la proximité des types cellulaires.(C-C'') Agrandissement au niveau du tendon du fémur mettant en évidence l'accumulation de la GFP au niveau des points supposés de contact entre les deux tissus.

localement reconstituée et émet de la fluorescence après excitation (**Fig. 25.A**). L'émission de fluorescence indiquant alors que la distance entre les membranes est suffisamment faible (<20nm) pour envisager une communication locale de type synaptique (ligand/récepteur). Nous avons donc utilisé cette technique pour estimer la distance entre les myoblastes et les précurseurs de tendons et valider l'hypothèse d'un échange possible d'informations entre ces deux types cellulaires.

Dans ce but le système UAS/Gal4 (Brent and Perimon 1993) a été combiné à un deuxième système indépendant d'expression binaire appelé LexA/LexAop (Lai et al. 2006). Dans ce système le facteur LexA est exprimé de manière tissu spécifique et se fixe et active l'opérateur *lexAop*. Pour notre analyse nous avons donc utilisé notre pilote Sr-gal4 pour exprimer l'une des parties de la GFP dans les précurseurs de tendons. Dans le but de trouver une lignée LexA pilote spécifique des myoblastes du disque de patte, nous avons passé en revue les images de disques de patte générées dans le cadre du « Flylight Project » (Pfeiffer et al., 2008 ; Jory et al., 2012). Ce projet a eu pour but de cloner en amont du gène gal4 de larges fragments de régions régulatrices correspondant à de nombreux gènes et ainsi créer et mettre à disposition les lignées transgéniques établies. De ce fait, la lignée R32D05-Gal4 (région régulatrice du gène *string*) a été sélectionnée pour sa capacité à activer l'expression du transgène UAS-GFP spécifiquement dans les myoblastes des disques de patte (http://flweb.janelia.org/cgi-bin/view_flew_imagery.cgi?line=R32D05). Après vérification par un marquage avec un anticorps dirigé contre Twist, cette même région R32D05 a été par la suite clonée par Quentin L. en amont du gène codant pour la protéine LexA permettant ainsi d'obtenir la lignée R32D05-LexA.

Ainsi, la combinaison des lignées R32D05-LexA et Stripe-Gal4 puis leur croisement avec la lignée portant les deux transgènes : UAS-mCD8GFP₁₋₁₀ et LexAOP-mCD8GFP₁₁ (transgènes codant pour les 2 parties scindées de la protéine GFP), a permis l'expression membranaires des deux parties de la GFP dans les tendons d'une part et dans les myoblastes d'autre part (**Fig.25B-C**).

Dans les contrôles négatifs n'exprimant qu'une seule des deux parties de la GFP, aucune fluorescence n'a pu être observée (seulement Stripe-Gal4 ou R32D05-

LexA), traduisant bien l'incapacité des deux protéines à générer séparément une fluorescence. A l'inverse, l'expression dans chacun des types cellulaires des 2 parties complémentaires de la GFP membranaire, nous a permis de mettre en évidence des points de rapprochement de type synaptique entre les myoblastes et les tendons. Ce « contact » étant assez stable pour permettre la reconstitution locale de la GFP et donc l'émission de fluorescence (**Fig. 25**). Ceci indique avec une forte probabilité que des échanges puissent avoir lieu et qu'ainsi une communication puisse s'établir entre ces deux types cellulaires. Au cours de ma thèse les molécules impliquées dans ces interactions n'ont pas encore pu être caractérisées. Néanmoins, les futurs gènes candidats pourront potentiellement être analysés et testés dans le cadre de cette expérience de GRASP.

2. Culture de disque ex-vivo et mise au point de l'analyse en temps réel par microscopie confocale (image 4D) :

Afin d'observer le développement des tendons et le comportement des myoblastes en temps réel au sein du disque de patte, j'ai mis au point au laboratoire une méthode de culture de disques imaginaires *ex-vivo*. Pour cela j'ai tiré profit de l'expérience du laboratoire du Dr. Suzanne qui a mis au point cette technique (Monnier *et al.*, 2015), au CRBD de Toulouse où j'ai effectué un stage de quelques jours.

Dans le cadre de notre modèle d'étude, les disques de pattes sont disséqués en tout début de métamorphose (0h après formation de la puppe), stade auquel débute l'invagination du tendon du fémur dorsal auquel les myoblastes qui lui sont associés sont particulièrement bien visibles. Ces disques sont ensuite montés sur un support adapté dans un milieu M3 complété (cf. matériel et méthode). A l'heure actuelle, cette technique permet de suivre le développement du disque durant environ 10 heures. Cependant, les conditions de culture *ex vivo* font que le temps de développement est notablement ralenti de telle sorte qu'en fin de culture le stade de développement correspond à des disques âgés de 4 à 5h maximum.

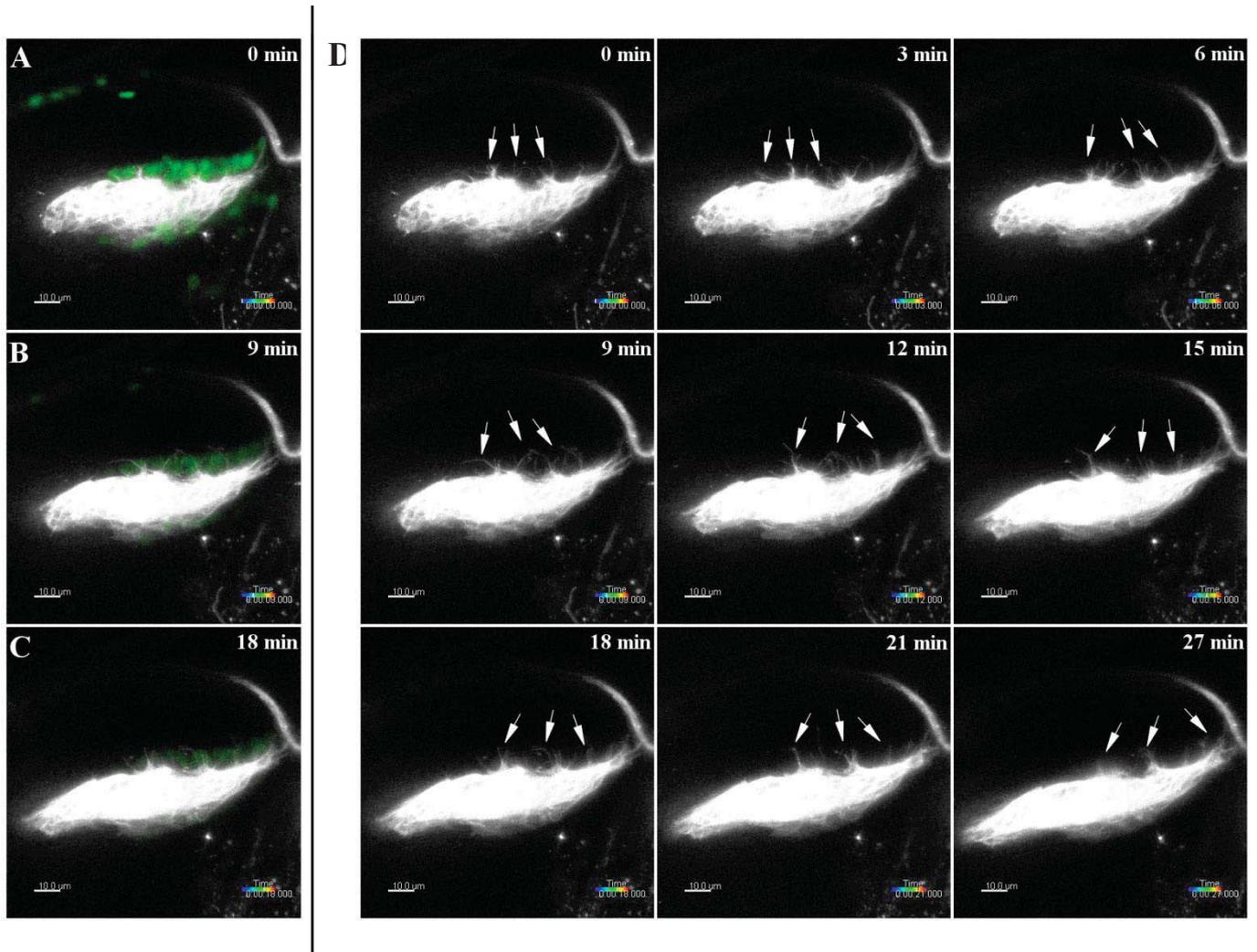


Figure 26: Visualisation en temps réel des filopodes émanant des précurseurs de tendons. Observation *ex vivo* du tendon du fémur dorsal en cours d’invagination (sens de l’invagination de gauche à droite) à partir de disques en culture issus de la lignée Sr-Gal4<UAS-CAAXmCherry (blanc). **(A-C)** Tendon du fémur dorsal (Blanc) à 0h APF, nous pouvons observer que les extensions cytoplasmiques des cellules précurseurs de tendon semblent être dirigées vers les myoblastes observés à travers l’expression du transgène LexAop-GFPnls (en vert) induit par le pilote R32D05-lexA. Noter que la GFP perd de son intensité au cours du temps. **(D)** Analyse en temps réel de la dynamique de ces filopodes, ils se localisent à l’extrémité et le long du tendon correspondant au pôle basal des cellules (flèches). Les minutes après le début du film sont indiquées dans le coin supérieur droit des images.

Bien que limitée dans le temps, cette méthode nous a permis d'observer pour la première fois et en temps réel le positionnement des myoblastes le long des tendons en cours d'invagination. Ce procédé devrait à terme nous permettre de caractériser plus précisément les types d'interaction s'établissant entre les précurseurs de tendons et les myoblastes.

L'expression du transgène UAS-CAAXmcherry dans les tendons a permis la visualisation des membranes (Sr-gal4>UAS-mcherry), et a ainsi confirmé la présence de nombreuses projections cytoplasmiques à l'extrémité basale des tendons en cours d'invagination. De plus, ces projections semblent dirigées vers les myoblastes qui sont observés à travers l'expression nucléaire du transgène GFPnls (nuclear localization sequence) sous le contrôle de la lignée pilote R32D05 (R32D05LexA>GFP LexAop) (**Fig. 26**).

A ce jour, cette nouvelle méthode de visualisation nous a donc permis de confirmer la présence de ces projections cytoplasmiques apparentées à des filopodes au niveau des tendons, et surtout d'observer la dynamique de ces derniers au cours du développement. Leur nombre, leur croissance ainsi que leur dynamique doivent maintenant être plus précisément détaillés pour pouvoir caractériser leur rôle dans des expériences de perte et gain de fonction affectant par exemple la dynamique du cytosquelette d'actine. Une des hypothèses de travail serait que ces filopodes, senseurs de l'environnement extracellulaire, permettraient de médier les interactions avec les myoblastes.

3. Influence des tendons sur le développement des muscles

a. Impact sur l'organisation spatiale des myoblastes (publication 2016)

Afin de comprendre la relation entre les précurseurs de tendons et les myoblastes, une forme dominante négative de Sr (SrDN) a été exprimée spécifiquement dans les cellules précurseurs de tendons (Sr-Gal4).

L'expression de SrDN altère fortement la formation des longs tendons autour desquels s'organisent les cellules fondatrices (cf Fig.1 de la publication). Pour des

raisons de reproductibilité, nous avons à nouveau choisi de focaliser notre analyse sur les myoblastes associés au long tendon du fémur dorsal.

L'analyse quantitative des distances/positions des myoblastes par rapport à la structure tendon a pu être réalisée à l'aide du logiciel Imaris© (modélisation en trois dimensions). Les premières observations montrent que l'altération du développement des tendons (absence d'invagination) entraîne une désorganisation spatiale des myoblastes environnants. Ainsi, ce résultat montre qu'en affectant le développement normal des cellules tendons, il est possible d'impacter le positionnement des précurseurs musculaires.

Ce résultat a fait l'objet en 2016 d'une publication « perspective » dans *frontiers in Physiology*.



Coordinated Development of Muscles and Tendon-Like Structures: Early Interactions in the *Drosophila* Leg

Cedric Soler*, Lilia Laddada and Krzysztof Jagla*

Genetics, Reproduction and Development Laboratory (GReD) Genetics, Reproduction and Development Laboratory, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1103, Centre National de la Recherche Scientifique UMR6293, Clermont University, Clermont-Ferrand, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Elzbieta M. Pyza,
Jagiellonian University, Poland

Reviewed by:

Peter Bräunig,
Rheinisch-Westfälische Technische
Hochschule, Germany

Xiaoqing J. Gao,
Stanford University, USA

Michael Taylor,
Cardiff University, UK

*Correspondence:

Cedric Soler
cedric.soler@udamail.fr;
Krzysztof Jagla
christophe.jagla@udamail.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Invertebrate Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 16 September 2015

Accepted: 15 January 2016

Published: 04 February 2016

Citation:

Soler C, Laddada L and Jagla K
(2016) Coordinated Development of
Muscles and Tendon-Like Structures:
Early Interactions in the *Drosophila*
Leg. *Front. Physiol.* 7:22.
doi: 10.3389/fphys.2016.00022

The formation of the musculoskeletal system is a remarkable example of tissue assembly. In both vertebrates and invertebrates, precise connectivity between muscles and skeleton (or exoskeleton) via tendons or equivalent structures is fundamental for movement and stability of the body. The molecular and cellular processes underpinning muscle formation are well-established and significant advances have been made in understanding tendon development. However, the mechanisms contributing to proper connection between these two tissues have received less attention. Observations of coordinated development of tendons and muscles suggest these tissues may interact during the different steps in their development. There is growing evidence that, depending on animal model and muscle type, these interactions can take place from progenitor induction to the final step of the formation of the musculoskeletal system. Here, we briefly review and compare the mechanisms behind muscle and tendon interaction throughout the development of vertebrates and *Drosophila* before going on to discuss our recent findings on the coordinated development of muscles and tendon-like structures in *Drosophila* leg. By altering apodeme formation (the functional *Drosophila* equivalent of tendons in vertebrates) during the early steps of leg development, we affect the spatial localization of subsequent myoblasts. These findings provide the first evidence of the developmental impact of early interactions between muscle and tendon-like precursors, and confirm the appendicular *Drosophila* muscle system as a valuable model for studying these processes.

Keywords: tendon, muscle development, leg disc, tissue interactions, *Drosophila*

In vertebrates, the progenitors of axial tendons arise from a dorsal subdomain of the sclerotome, called syndetome, that is immediately adjacent to the myotome from which myogenic cells originate (Brent et al., 2003). Crucial here is the fact that FGF signals emanating from the myotome are directly responsible for inducing the syndetome (Brent and Tabin, 2004; Brent et al., 2005; Chen and Galloway, 2014). Interactions between tendon and muscle progenitors thus take place in the very early steps of axial tendon development. On the other hand, the progenitors of limb and craniofacial tendons emerge independently of muscle progenitors (Kardon, 1998; Schweitzer et al., 2010). However, the muscles are subsequently required for further tendon development and maintenance (Edom-Vovard et al., 2002; Grenier et al., 2009). Thus, at either early or later stages of

development, musculoskeletal formation in vertebrates is reliant on interactions between muscles and tendons.

The myogenesis process has been remarkably well preserved throughout the evolution. Various different models have been developed to study muscle development and muscle physiology, including insect models such as grasshopper and fly (Ho et al., 1983; Ball et al., 1985a; de Joussineau et al., 2012; Dobi et al., 2015). *Drosophila melanogaster* is the dominant genetic model used in studies of insect development, as transgenic flies are relatively easy to generate and there is a large range of genetic tools now available. Most of our knowledge of *Drosophila* muscle development stems from studies conducted on larval muscles (see Dobi et al., 2015 and de Joussineau et al., 2012 for review). Larval somatic muscles are set up during embryogenesis and have a very simplified pattern of 30 muscles repeated in each hemisegment. They originate from a subdivision of the mesoderm from which segregate three types of myoblasts, including the so-called Founder Cells (FC) and Fusion Competent Myoblasts (FCM) (Bate, 1990; Leptin, 1991; Baylies et al., 1998). Each FC fuses with several FCM to build a syncytial myotube (Rochlin et al., 2010; Abmayr and Pavlath, 2012; Kim et al., 2015). The expression of a distinct set of identity genes by the original FC determines the characteristic shape, size, position and innervation of each myofiber (Tixier et al., 2010; de Joussineau et al., 2012). Adult muscle precursors (AMP) are the third type of myoblasts that are set aside during embryogenesis. AMPs are maintained quiescent and undifferentiated during embryogenesis and larval life, before proliferating then differentiating into adult muscles during metamorphosis (Bate et al., 1991; Brodie and Bate, 1991; Currie and Bate, 1991; Roy and VijayRaghavan, 1999). At both larval and adult stages, muscles are only effective when they are properly anchored to the exoskeleton through Muscle Attachment Sites (MAS). These tendon-like cells have been well investigated for larval muscles, yet only a few studies have focused on adult “tendogenesis” (Volk, 1999; Ghazi et al., 2000, 2003; Schnorrer and Dickson, 2004; Soler et al., 2004; Schweitzer et al., 2010).

DEVELOPMENT OF THE TENDON-LIKE STRUCTURES IN *DROSOPHILA*

Mechanisms of Interaction between Muscles and MAS during Embryogenesis

Much as in vertebrates, *Drosophila* muscles have to be properly attached to the (exo-)skeleton in order to transmit the force generated by fiber contraction.

Invertebrate model organisms lack an internal skeleton, but somatic muscles interact with Epidermal Muscle Attachment (EMA) cells that are singled out from a cluster of exoskeleton cells called the apodeme (Ball et al., 1985b; Radnikow and Bässler, 1991; Volk, 1999). As muscles and apodemes connect through a secreted extracellular matrix, forming the equivalent of the Myo-Tendinous Junction (MTJ) in vertebrates, they are widely referred to as “tendons” in *Drosophila* studies (Volk, 1999; Schweitzer et al., 2010). Therefore, although invertebrate apodemes and vertebrate tendon cells do not share the same

origin (ectodermal and mesodermal origin, respectively), they do ensure the same function.

As stated earlier, MAS formation has been well described in *Drosophila* for larval muscles (Volk, 1999; Schnorrer and Dickson, 2004; Schweitzer et al., 2010) in which studies report how the apodemes derive from specialized ectodermal cells. The initial differentiation of these cells is muscle-independent and requires ectodermal signals such as Wg, Hh, and EGF (Piepenburg et al., 2000; Hatini and DiNardo, 2001) to induce the expression of Stripe (Sr). Sr is the earliest known marker of tendon-like precursors. It encodes a transcription factor with a zinc-finger domain and shares sequence homologies with members of the vertebrate Egr family (Volk and VijayRaghavan, 1994; Frommer et al., 1996). Interestingly, EGR1 and EGR2 are involved in tendon-cell differentiation in vertebrate limbs (Lejard et al., 2011). In *Drosophila*, Sr is both necessary and sufficient for MAS induction by activating the expression of most of the MAS-specific genes (Becker et al., 1997; Vorbrüggen and Jäckle, 1997). The Sr gene encodes for two isoforms: SrA and SrB (Frommer et al., 1996). A low level of SrB isoform is required for induction of tendon-like precursors during early embryonic development (Becker et al., 1997; Vorbrüggen and Jäckle, 1997). These precursors then secrete signaling molecules that are involved in muscle guidance and attachment. For example, under Sr regulation, Slit ligand is expressed by tendon-like precursors and interacts with its receptors Robo 1 and 2 that are located on the membrane of specific muscles migrating toward their attachment sites (Kramer et al., 2001; Volohonsky et al., 2007). In turn, muscle fibers produce Vein, a neuregulin-like ligand that activates the EGFR pathway in tendon-like cells (Yarnitzky et al., 1997). EGFR pathway activation leads to an increase in SrB expression, which subsequently promotes splicing of the SrA isoform and leads to the terminal differentiation of the MAS and the establishment of the MTJ (Nabel-Rosen et al., 2002; Volohonsky et al., 2007). The tendon-like precursors that do not receive EGF signal from muscles lose MAS marker expression and eventually dedifferentiate. Thus, in a similar way to the craniofacial and limb tendons described in vertebrate studies, tendon-like precursors in *Drosophila* embryo are specified independently of muscle cells whereas the terminal phase of differentiation is muscle-dependent (Volk, 1999; Schnorrer and Dickson, 2004; Schweitzer et al., 2010).

Adult Muscles Anchoring to Cuticle within the Thorax Allows Fly Locomotion

The MAS development during the adult myogenesis in *Drosophila* has paid much less attention than in embryo. In adults, the main thoracic muscles are the flight muscles [including Direct Flight Muscles (DFM) and large Indirect Flight Muscles (IFM)] and the leg muscles (Miller, 1950; Fernandes et al., 1991; Soler et al., 2004) developing from AMP that are associated with wing and leg discs, respectively. These myoblasts are characterized by the expression of Twist that persists until metamorphosis (Bate et al., 1991; Brodie and Bate, 1991). The MAS of flight muscles develop from distinct groups of Sr-expressing cells from the wing disc epithelium (Fernandes et al., 1996). The pattern of flight muscle MAS is defined by

the integration of several molecular signals including Notch, Wnt, and Dpp, and is regulated by the transcription factors Apterous and Achaete scute (Ghazi et al., 2000, 2003; Usui et al., 2004). In the leg, apodemes adopt their own particular shape. Sr-expressing epithelial cells invaginate inside the developing leg to form long internal structures (Soler et al., 2004). Remarkably, Twist-expressing myoblasts accumulate around the apodeme precursors long before they form syncytial fibers. This observation strongly suggests that muscle and tendon-like precursors interact with each other at an early stage in the developing leg (Soler et al., 2004). Similar long internal apodemes have been described in appendages of other insects (Ball et al., 1985b; Radnikow and Bässler, 1991) and more generally in several groups of arthropods, including crustaceans (Medler and Mykles, 2015). Despite their value as models for histological and physiological studies, the lack of genetic tools for these organisms precludes any attempt at systematic molecular or genetic analysis.

PERSPECTIVES

Drosophila Appendicular Myogenesis as a Model for Early Interactions between Muscle and Muscle Attachment Site Progenitors

The leg muscle system of *Drosophila* is a complex structure that counts 14 distinct muscles (Miller, 1950; Soler et al., 2004). Unlike larval muscles, each leg muscle is composed of several fibers organized around a specific long internal apodeme and attached from one side to this tendon-like structure and from the other side to the cuticle (via embryonic-like apodemes) (Soler et al., 2004). This particular pattern of multifiber muscles enables precise and coordinated movements of all nine articulated segments of the leg. In addition to being functionally comparable to vertebrate limb muscles, there are other morphological parallels to draw with the musculoskeletal system of the vertebrate limb. For example, in vertebrates, long tendons of the limb extend from the most distal region (paw) to more proximal segments (arm/leg) where they are associated with their corresponding muscles, allowing articulation of the distal limb part (Kardon, 1998; Huang et al., 2015). Similar schemes have been developed in insect legs, with some long internal apodemes running through several leg segments (Ball et al., 1985b; Radnikow and Bässler, 1991; Soler et al., 2004). In *Drosophila*, the leg muscles derive from adepithelial cells that are located at the surface of leg imaginal discs while the tendon-like precursors are groups of Stripe-positive cells belonging to the disc epithelium. Both tendon-like and muscle precursors are set aside before metamorphosis and leg development. More strikingly, a specialized subpopulation of muscle precursors identified as Founder Cells (FCs) are specified as early as the third larval instar (L3) near these tendon-like precursors (Soler et al., 2004; Maqbool et al., 2006). We have previously reported (Soler et al., 2004) that at the early pupa stage when a disc evaginates to form a 3D leg structure, the tendon-like precursors invaginate inside the developing leg and specific FC myoblasts follow this pattern (Figures 1A,B). This observation suggested that invaginating

tendon-like precursors of the leg could interact with FCs to accurately localize them, and could thus play a crucial role during the early steps of leg muscle development. This hypothesis is further supported by our recent data indicating that tendon-like precursors are indeed required for proper patterning of appendicular myoblasts (Figure 1).

How Could Disruption of Tendon-Like Precursors Affect Muscle FCs in the Developing Leg?

Our earlier work (Maqbool et al., 2006) showed that *ladybird early (lbe)*, an ortholog of *Lbx1*, which is a key regulator of appendicular myogenesis in vertebrates (Buckingham et al., 2003), is expressed in different sub-populations of myoblasts characterized by Twist expression (Bate et al., 1991; Broadie and Bate, 1991). From the third instar larval stage, the spatial distribution of these myoblasts revealed a highly stereotyped pattern that underpins the formation of defined muscles in the adult leg. We also showed that *lbe* and its paralog *ladybird late (lbl)* genes are required for proper patterning of leg muscles and that different levels of Lbe protein contribute to myoblast diversity within the leg (Maqbool et al., 2006). As these myoblasts also express the Dumbfounded-lacZ reporter gene, they are very likely the equivalent of embryonic FC in embryo (Soler et al., 2004; Maqbool et al., 2006). More strikingly, in each segment, Lbe-positive groups of myoblasts lie close to Sr-positive tendon-like precursors. This distribution is particularly obvious in the dorsal femur where Lbe and Twist-expressing myoblasts accumulate next to the tibia levator tendon (tilt). At the beginning of metamorphosis, these myoblasts remain associated with the tilt as it begins to invaginate. Five hours After Pupae Formation (APF), they progressively align all along this internal apodeme. Figures 1A,B illustrates this spatial distribution of myoblasts and their association with invaginating apodemes. In dissected leg discs, apodemes are visualized by GFP expression driven by Sr-Gal4 driver and myoblasts by immunostaining against Lbe and Twist (Figures 1D-F). In order to determine whether invaginating apodeme could influence myoblast behavior, we challenged apodeme development by over-expressing a dominant-negative form of Sr (Sr^{DN}) (Vorbrüggen and Jäckle, 1997) using the Sr-Gal4 driver. As Sr is also involved in MAS development in embryos, we used a ubiquitous temperature-sensitive Gal80^{ts} allele to repress Sr^{DN} expression until mid-L3 stage. Figures 1G-I shows that Sr^{DN} expression affects apodeme formation at 5 h APF. In particular, compared to controls (Figure 1E) tendon-like cells appear unable to form a long internal structure in the dorsal femur (Figure 1H). Even after disrupting apodeme development, Lbe expression was still detected in associated myoblasts, indicating that the occurrence of invaginating apodeme is not required to maintain the expression of this muscle identity gene (compare panels F and I in Figure 1). However, these myoblasts appeared disorganized within the evertting segment when the apodeme is affected (Figure 1I) yet well aligned on the developing apodeme of the control leg disc (Figure 1F). This observation indicates that in the absence of invaginating tendon-like precursors, myoblasts

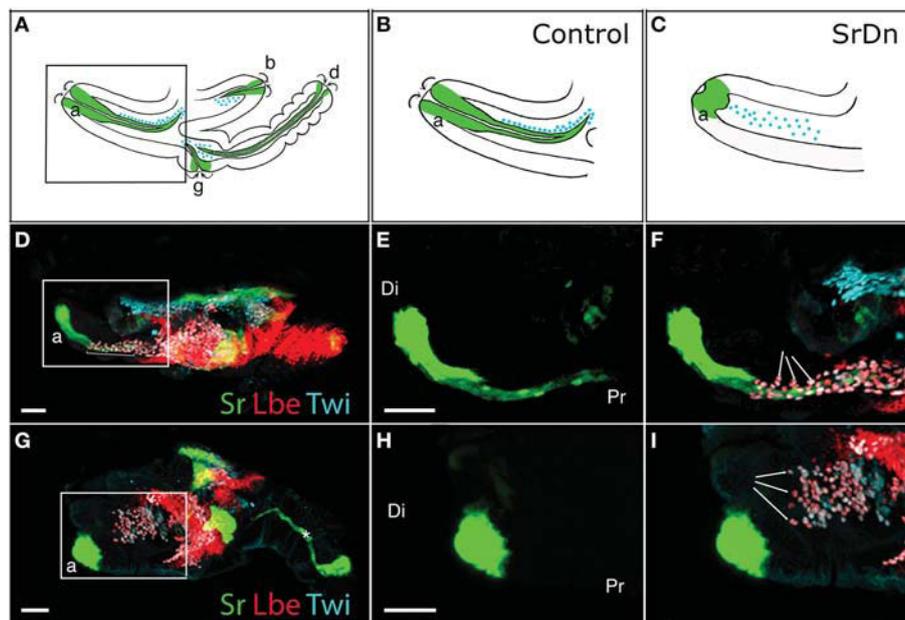


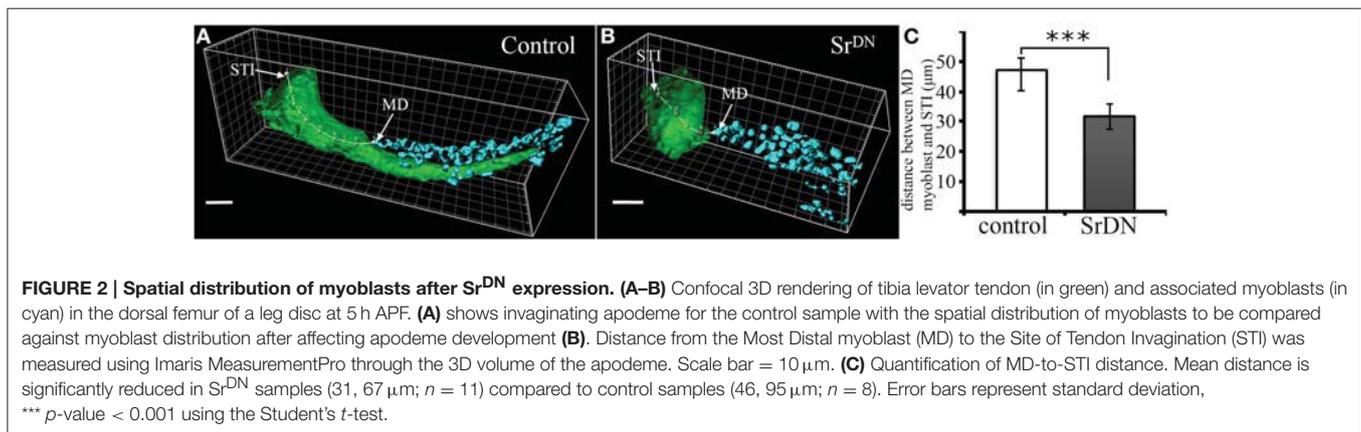
FIGURE 1 | Disrupting apodeme development affects myoblast spatial organization. (A–C) Drawings of sagittal views at 5 h After Pupae Formation (APF) of a whole wild-type leg disc **(A)** with a focus on the tibia levator tendon/apodeme (a) of the dorsal femur segment **(B)** and a leg disc for which apodeme invagination in the dorsal femur was affected **(C)**. Only some apodemes (green) and their associated myoblasts (blue) are represented. Note that their invagination (curved arrows) goes on to form a lumen. **(D–I)** Leg discs at 5 h APF from Tub-Gal80^{TS};Stripe-gal4>UASGFP **(D–F)** and Tub-Gal80^{TS};Stripe-gal4>UASGFP, UAS-Stripe^{DN} **(G–I)**. Apodemes are visualized by GFP and myoblasts stained for Twist (in cyan) and Lbe (in red). At this stage, the leg disc elongates along the proximo-distal axis (Pr-Di). **(D)** Control leg disc showing tibia levator tendon (a) invaginating from distal to proximal ends of the dorsal femur (insert), the myoblasts are aligned along this apodeme (brackets). **(E,F)** Enlargements of the box region in **(D)** showing apodeme developing in the femur **(E)** and the myoblasts organized around it (arrows in **F**). **(G)** When Stripe^{DN} is expressed in apodemes, they fail to develop correctly, with the result that the apodeme (a) in the dorsal femur is unable to invaginate to form a long internal structure (insert). **(H,I)** Enlargements of the box region in **(G)** showing aborted apodeme in femur **(H)**. Myoblasts in this region do not appear to align in the proximo-distal axis and seem to distribute in random directions into the femur segment (arrows in **I**). Note that in **(G)**, the main apodeme in the tarsus (star) does invaginate despite expressing UAS-Stripe^{DN} at 5h APF. This first apodeme invaginates as early as L3, at which stage we shifted the larvae from 18 to 29°C to allow Gal4 expression, which thus makes it very likely that it undergoes invagination before Stripe^{DN} protein accumulation could have any effect. Myoblasts associated with this apodeme are not in focus. Scale bar = 30 μm. Apodeme and muscle annotations: (a) tibia levator tendon in dorsal femur (associated muscle: tibia levator muscle), (b) tibia depressor tendon in ventral femur (associated muscle: tibia depressor muscle), (d) long tendon in tarsus (associated muscles: long tendon muscle 1, tarsus reductor muscles 1 and 2), (g) tarsus levator tendon in dorsal tibia (associated muscle: tarsus levator muscle). See Soler et al. (2004) for more detailed annotations.

are no longer correctly distributed within the observed segment, even though they still follow the segmental subdivision of the leg disc. To compare the spatial distribution of dorsal femur myoblasts between control leg discs and Sr^{DN} leg discs in which tilt apodeme is significantly affected, 3D reconstructions of several early pupa discs (5 h APF) were built and visualized using ImarisTM Software (**Figures 2A,B**). These 3D reconstructions were then used to measure the distance between the Most Distal myoblast (MD myoblast) and the Site of Tendon-like Invagination (STI) at the epithelium surface (distal femur) (**Figure 2**). This MD myoblast-to-STI distance was the parameter that showed least variation across Sr-DN samples. Our data show that, mean MD myoblast-to-STI distance is significantly higher in control leg discs (46,9 μm, $n = 8$) than after Sr^{DN} expression in tendon-like precursors (shortened to 31,67 μm, $n = 11$; **Figure 2C**). This result demonstrates that apodeme alteration leads to aberrant myoblast positioning in the leg discs of early pupa and may therefore impact the morphological and functional properties of the corresponding adult leg muscles. It remains to be elucidated whether muscle precursor distribution

is controlled by direct interactions with the developing apodemes or whether their positioning is guided by physical constraints during leg disc evagination. It is reasonable to assume that in absence of apodeme, myoblasts would have a wider area in which to spread within the segment cavity. In both hypotheses, the data reported here show that in the early steps of leg development, apodemes are directly or indirectly required for proper patterning/organization of myoblasts that have previously been identified as FC (Soler et al., 2004; Maqbool et al., 2006).

DISCUSSION

Taken together, the data reported here show that in developing *Drosophila* legs, the invaginating tendon-like precursors orchestrate the spatial positioning of tightly associated appendicular founder myoblasts. Such early interactions between apodeme and muscle precursors have never before been observed during embryonic or flight muscle development. This study demonstrates that appendicular myogenesis is an attractive model for studying early interactions between



tendon-like and muscle progenitors. In vertebrate limbs, muscle, and tendon induction occur independently, but the specification of tendon progenitors of the axial musculoskeletal system is directly dependent on the FGF ligand emanating from the adjacent myotome (Brent et al., 2003; Brent and Tabin, 2004). Thus, at least for certain muscles, early muscle/tendon interactions are required in both *Drosophila* and vertebrates and similar mechanisms may control certain aspects of these interactions. Note too that long internal apodemes have already been described in appendages of many invertebrates such as crustaceans (Medler and Mykles, 2015) and insects undergoing hemimetabolous development (incomplete metamorphosis with no pupal stage), as is the case of grasshoppers for which leg muscle system development around a long internal apodeme has been well described (Ball and Goodman, 1985; Ball et al., 1985b). In this model, muscle pioneers (equivalent of FC cells) are associated with ectodermal sites where the invagination begins (Ball et al., 1985b). However, the lack of specific markers precludes any attempt to determine whether these sites were already specified as tendon-like precursors and whether physical contacts were made at this stage. Using our *Drosophila* leg model, we showed that the presumptive leg muscle founders segregate close to the Sr-expressing apodeme, long before they start invaginating (Soler et al., 2004). Moreover, our most recent observations (CS, unpublished

data) indicate that cell–cell contact indeed occurs as early as the third larval stage through cytoplasmic projections. The role of these connections has yet to be elucidated, but one possibility is that they are required to promote the segregation of FC and their identity. This hypothesis could be tested by abolishing the specification of the tendon-like precursors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CS, conception and design of the work, analysis and interpretation of data, drafting the work, final approval, and agreement for all aspects of the work; LL, acquisition, analysis, and interpretation of data, revising the work, final approval, and agreement for all aspects of the work; KJ, interpretation of data, revising the work, final approval, and agreement for all aspects of the work.

FUNDING

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Association Française contre les Myopathies (AFM), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and the national grant IDE-CELL-SPE from the Agence Nationale de la Recherche (ANR).

REFERENCES

- Abmayr, S. M., and Pavlath, G. K. (2012). Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* 139, 641–656. doi: 10.1242/dev.068353
- Ball, E. E., and Goodman, C. S. (1985). Muscle development in the grasshopper embryo: II. Syncytial origin of the extensor tibiae muscle pioneers. *Dev. Biol.* 111, 399–416. doi: 10.1016/0012-1606(85)90493-2
- Ball, E. E., Ho, R. K., and Goodman, C. S. (1985a). Development of neuromuscular specificity in the grasshopper embryo: guidance of motoneuron growth cones by muscle pioneers. *J. Neurosci.* 5, 1808–1819.
- Ball, E. E., Ho, R. K., and Goodman, C. S. (1985b). Muscle development in the grasshopper embryo: I. Muscles, nerves, and apodemes in the metathoracic leg. *Dev. Biol.* 111, 383–398. doi: 10.1016/0012-1606(85)90492-0
- Bate, M. (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* 110, 791–804.
- Bate, M., Rushton, E., and Currie, D. A. (1991). Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development* 113, 79–89.
- Baylies, M. K., Bate, M., and Gomez, M. R. (1998). Myogenesis: a view from *Drosophila*. *Cell* 93, 921–927. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81198-8
- Becker, S., Pasca, G., Strumpf, D., Min, L., and Volk, T. (1997). Reciprocal signaling between *Drosophila* epidermal muscle attachment cells and their corresponding muscles. *Development* 124, 2615–2622.
- Brent, A. E., Braun, T., and Tabin, C. J. (2005). Genetic analysis of interactions between the somitic muscle, cartilage and tendon cell lineages during mouse. *Development* 132, 515–528. doi: 10.1242/dev.01605
- Brent, A. E., Schweitzer, R., and Tabin, C. J. (2003). A Somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* 113, 235–248. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00268-X
- Brent, A. E., and Tabin, C. J. (2004). FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors Pea3 and Erm to

- regulate scleraxis expression. *Development* 131, 3885–3896. doi: 10.1242/dev.01275
- Broadie, K. S., and Bate, M. (1991). The development of adult muscles in *Drosophila*: ablation of identified muscle precursor cells. *Development* 113, 103–118.
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., et al. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat.* 202, 59–68. doi: 10.1046/j.1469-7580.2003.00139.x
- Chen, J. W., and Galloway, J. L. (2014). The development of zebrafish tendon and ligament progenitors. *Development* 141, 2035–2045. doi: 10.1242/dev.104067
- Currie, D. A., and Bate, M. (1991). The development of adult abdominal muscles in *Drosophila*: myoblasts express twist and are associated with nerves. *Development* 113, 91–102.
- de Jossineau, C., Bataillé, L., Jagla, T., and Jagla, K. (2012). Diversification of muscle types in *Drosophila*: upstream and downstream of identity genes. *Curr. Top. Dev. Biol.* 98, 277–301. doi: 10.1016/B978-0-12-386499-4.00011-2
- Dobi, K. C., Schulman, V. K., and Baylies, M. K. (2015). Specification of the somatic musculature in *Drosophila*. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 4, 357–375. doi: 10.1002/wdev.182
- Edom-Vovard, F., Schuler, B., Bonnin, M.-A., Teillet, M.-A., and Duprez, D. (2002). Fgf4 positively regulates scleraxis and tenascin expression in chick limb tendons. *Dev. Biol.* 247, 351–366. doi: 10.1006/dbio.2002.0707
- Fernandes, J., Bate, M., and VijayRaghavan, K. (1991). Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* 113, 67–77.
- Fernandes, J. J., Celniker, S. E., and VijayRaghavan, K. (1996). Development of the indirect flight muscle attachment sites in *Drosophila*: role of the PS integrins and the stripe gene. *Dev. Biol.* 176, 166–184. doi: 10.1006/dbio.1996.0125
- Frommer, G., Vorbrüggen, G., Pasca, G., Jäckle, H., and Volk, T. (1996). Epidermal egr-like zinc finger protein of *Drosophila* participates in myotube guidance. *EMBO J.* 15, 1642–1649.
- Ghazi, A., Anant, S., and VijayRaghavan, K. (2000). Apterous mediates development of direct flight muscles autonomously and indirect flight muscles through epidermal cues. *Development* 127, 5309–5318.
- Ghazi, A., Paul, L., and VijayRaghavan, K. (2003). Prepattern genes and signaling molecules regulate stripe expression to specify *Drosophila* flight muscle attachment sites. *Mech. Dev.* 120, 519–528. doi: 10.1016/S0925-4773(03)00042-X
- Grenier, J., Teillet, M.-A., Grifone, R., Kelly, R. G., and Duprez, D. (2009). Relationship between neural crest cells and cranial mesoderm during head muscle development. *PLoS ONE* 4:e4381. doi: 10.1371/journal.pone.0004381
- Hatini, V., and DiNardo, S. (2001). Distinct signals generate repeating striped pattern in the embryonic parasegment. *Mol. Cell* 7, 151–160. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00163-0
- Ho, R. K., Ball, E. E., and Goodman, C. S. (1983). Muscle pioneers: large mesodermal cells that erect a scaffold for developing muscles and motoneurons in grasshopper embryos. *Nature* 301, 66–69. doi: 10.1038/301066a0
- Huang, A. H., Lu, H. H., and Schweitzer, R. (2015). Molecular regulation of tendon cell fate during development. *J. Orthop. Res.* 33, 800–812. doi: 10.1002/jor.22834
- Kardon, G. (1998). Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development* 125, 4019–4032.
- Kim, J. H., Ren, Y., Ng, W. P., Li, S., Son, S., Kee, Y.-S., et al. (2015). Mechanical tension drives cell membrane fusion. *Dev. Cell* 32, 561–573. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.005
- Kramer, S. G., Kidd, T., Simpson, J. H., and Goodman, C. S. (2001). Switching repulsion to attraction: changing responses to slit during transition in mesoderm migration. *Science* 292, 737–740. doi: 10.1126/science.1058766
- Lejard, V., Blais, F., Guerquin, M.-J., Bonnet, A., Bonnin, M.-A., Havis, E., et al. (2011). EGR1 and EGR2 involvement in vertebrate tendon differentiation. *J. Biol. Chem.* 286, 5855–5867. doi: 10.1074/jbc.M110.153106
- Leptin, M. (1991). Twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev.* 5, 1568–1576. doi: 10.1101/gad.5.9.1568
- Maqbool, T., Soler, C., Jagla, T., Daczewska, M., Lodha, N., Palliyil, S., et al. (2006). Shaping leg muscles in *Drosophila*: role of ladybird, a conserved regulator of appendicular myogenesis. *PLoS ONE* 1:e122. doi: 10.1371/journal.pone.0000122
- Medler, S., and Mykles, D. L. (2015). “Muscle structure, fiber types, and physiology,” in *Physiology, the Natural History of the Crustacean*, eds E. S. Chang and M. Thiel, (Oxford: Oxford University Press), 103–133.
- Miller, A. (1950). “The internal anatomy and histology of the imago of *Drosophila melanogaster*,” in *Biology of Drosophila* ed M. Demerec, (New York, NY: John Wiley & Sons), 420–531.
- Nabel-Rosen, H., Volohonsky, G., Reuveny, A., Zaidel-Bar, R., and Volk, T. (2002). Two isoforms of the *Drosophila* RNA binding protein, how, act in opposing directions to regulate tendon cell differentiation. *Dev. Cell* 2, 183–193. doi: 10.1016/S1534-5807(01)00118-6
- Piepenburg, O., Vorbrüggen, G., and Jäckle, H. (2000). *Drosophila* segment borders result from unilateral repression of hedgehog activity by wingless signaling. *Mol. Cell* 6, 203–209. doi: 10.1016/S1097-2765(05)00011-0
- Radnikow, G., and Bässler, U. (1991). Function of a muscle whose apodeme travels through a joint moved by other muscles: why the retractor unguis muscle in stick insects is tripartite and has no antagonist. *J. Exp. Biol.* 157, 87–99.
- Rochlin, K., Yu, S., Roy, S., and Baylies, M. K. (2010). Myoblast fusion: when it takes more to make one. *Dev. Biol.* 341, 66–83. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.024
- Roy, S., and VijayRaghavan, K. (1999). Muscle pattern diversification in *Drosophila*: the story of imaginal myogenesis. *BioEssays* 21, 486–498.
- Schnorrer, F., and Dickson, B. J. (2004). Muscle building: mechanisms of myotube guidance and attachment site selection. *Dev. Cell* 7, 9–20. doi: 10.1016/j.devcel.2004.06.010
- Schweitzer, R., Zelzer, E., and Volk, T. (2010). Connecting muscles to tendons: tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates. *Development* 137, 2807–2817. doi: 10.1242/dev.047498
- Soler, C., Daczewska, M., Da Ponte, J. P., Dastugue, B., and Jagla, K. (2004). Coordinated development of muscles and tendons of the *Drosophila* leg. *Development* 131, 6041–6051. doi: 10.1242/dev.01527
- Tixier, V., Bataillé, L., and Jagla, K. (2010). Diversification of muscle types: recent insights from *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* 316, 3019–3027. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.07.013
- Usui, K., Pistillo, D., and Simpson, P. (2004). Mutual exclusion of sensory bristles and tendons on the notum of dipteran flies. *Curr. Biol.* 14, 1047–1055. doi: 10.1016/j.cub.2004.06.026
- Volk, T. (1999). Singling out *Drosophila* tendon cells: a dialogue between two distinct cell types. *Trends Genet.* 15, 448–453. doi: 10.1016/S0168-9525(99)01862-4
- Volk, T., and VijayRaghavan, K. (1994). A central role for epidermal segment border cells in the induction of muscle patterning in the *Drosophila* embryo. *Development* 120, 59–70.
- Volohonsky, G., Edenfeld, G., Klämbt, C., and Volk, T. (2007). Muscle-dependent maturation of tendon cells is induced by post-transcriptional regulation of stripeA. *Development* 134, 347–356. doi: 10.1242/dev.02735
- Vorbrüggen, G., and Jäckle, H. (1997). Epidermal muscle attachment site-specific target gene expression and interference with myotube guidance in response to ectopic stripe expression in the developing *Drosophila* epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8606–8611. doi: 10.1073/pnas.94.16.8606
- Yarnitzky, T., Min, L., and Volk, T. (1997). The *Drosophila* neuregulin homolog Vein mediates inductive interactions between myotubes and their epidermal attachment cells. *Genes Dev.* 11, 2691–2700. doi: 10.1101/gad.11.20.2691

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Soler, Laddada and Jagla. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

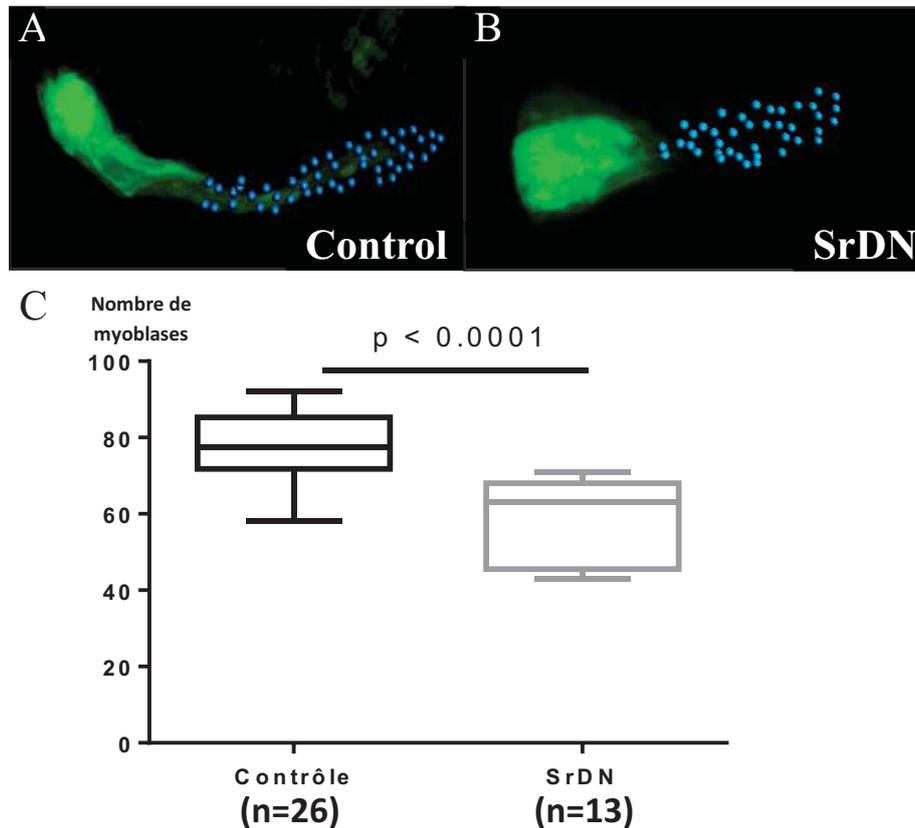


Figure 27: L'altération des tendons affecte le nombre de myoblastes associés au tendon. Focus sur le tendon du fémur dorsal (à 5hAPF) révélé par *Srgal4>UAS-GFP* (vert) et modélisation à l'aide du logiciel Imaris des myoblastes (en bleu) (visualisés par immunomarquage dirigé contre Twist). En contexte contrôle (A) et après expression de la forme dominante négative de Stripe (*UAS-SrDN*) (B). (C) Le calcul du nombre de myoblastes associés à ce tendon de disque de patte de 5h APF indique qu'en absence de développement normal du tendon le nombre de myoblastes qui lui sont normalement associés est significativement diminué. Statistique: Test de Mann-Whitney.

b. Impact sur la spécification et l'identité des myoblastes

Une question essentielle concerne l'implication des cellules précurseurs de tendons dans la spécification des myoblastes en tant que cellules fondatrices musculaires (FC) et/ou dans l'acquisition d'une identité musculaire via l'expression de gènes d'identité.

Pour tenter de répondre à ces questions j'ai analysé en contexte SrDN, l'expression du gène *ladybird* (*lb*) dont l'expression est requise dans les myoblastes pour l'acquisition de l'identité musculaire appendiculaire (Maqbool *et al.*, 2006).

Cette expérience consistant à affecter le développement des tendons ne m'a pas permis de montrer une influence significative sur l'expression des gènes *lbe/lbl*. Cependant, ce résultat est à nuancer sachant que différents niveaux d'expression de *Lbe/Lbl* sont requis pour les différents muscles appendiculaires (Maqbool *et al.*, 2006). Il conviendra donc à terme de comparer précisément le niveau d'expression de *Lbe/Lbl* dans ces myoblastes, dans le contexte contrôle et SrDN. Il est aussi prévu de regarder s'il y a un impact sur l'expression de d'autres gènes musculaires tel que *duf*, marqueur des FC. Pour ce faire il existe une lignée *Duf-lacZ* que je pourrais combiner de manière à reproduire l'expérience de SrDN et voir si l'altération des tendons a un effet sur l'expression du transgène *duf-lacZ*.

c. Impact sur l'apoptose et la prolifération des myoblastes

Bien que les expériences décrites ci-dessus semblent indiquer que l'altération des tendons dans les stades précoces semble n'avoir que peu ou pas d'impact sur l'identité (observation basée sur l'expression des gènes *lbe/lbl*), j'ai pu noter que dans le contexte SrDN à 5h APF, le nombre de myoblastes (*Twist* et *Lbe* positifs) associés au tendon affecté est significativement réduit par rapport au cas contrôle (**Fig.27**).

Pour expliquer la réduction de nombre de myoblastes, j'ai émis l'hypothèse que l'absence de contact entre les précurseurs de tendons et les myoblastes, entraînerait ces derniers dans un processus apoptotique ou éventuellement affecterait leur capacité de prolifération.

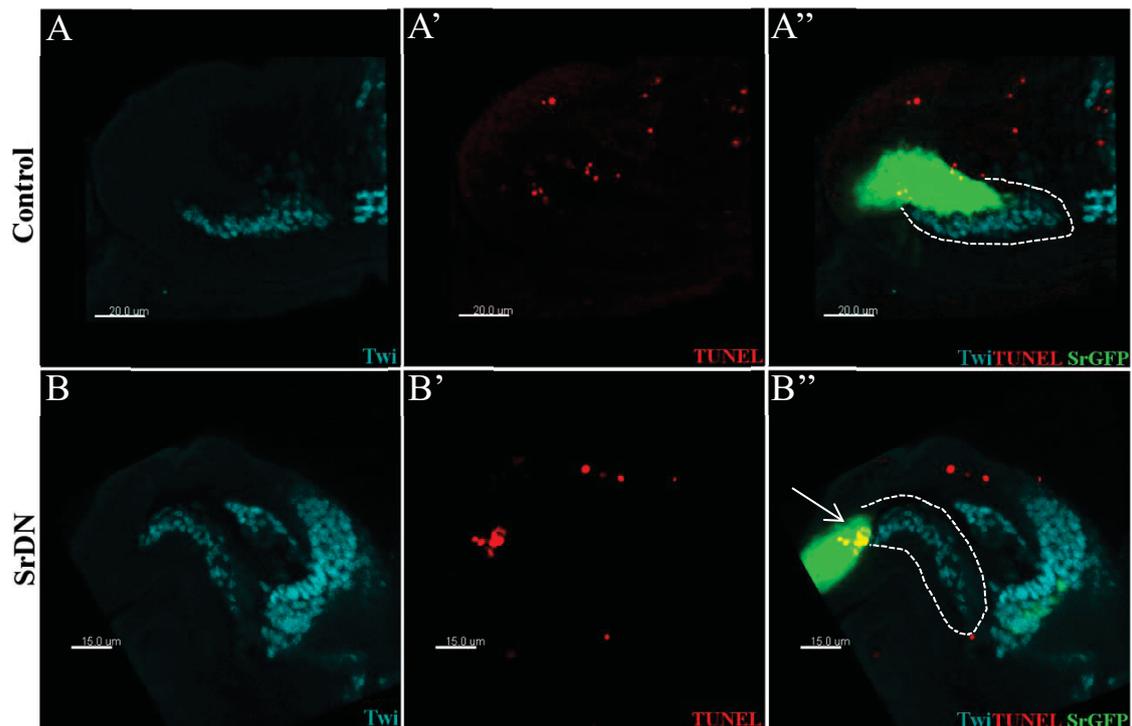


Figure 28: L'altération des tendons n'induit pas l'apoptose des myoblastes associés au tendon.
 (A-A'') Tendon du fémur dorsal d'un disque contrôle de 3h APF . Le marquage TUNEL ne colocalise pas avec les myoblastes (Cyan) indiquant l'absence d'apoptose dans ces cellules. (B-B'') Disque de patte à 3h APF après expression de la forme dominante négative de Stripe (Sr>SrDN), comme pour le contrôle nous n'observons pas une entrée en apoptose des myoblastes. A noter que dans le contexte SrDN quelques cellules tendons rentrent en apoptose (flèche). Les pointillés délimitent la population de myoblastes associés au tendon du fémur dorsal.

Afin de vérifier l'hypothèse d'une entrée en apoptose des myoblastes, j'ai effectué un marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling) sur les disques de pattes en contexte SrDN et contrôle. Le principe de cette technique est de marquer les cassures de l'ADN lors de sa fragmentation dans les cellules en apoptose. Ainsi des disques contrôles et SrDN, de différents stades (L3, 3h APF, 5hAPF) ont été analysés pour cette expérience. J'ai pu constater l'absence de myoblastes en apoptose aussi bien chez le contrôle que dans les conditions SrDN. (Fig. 28). J'en ai donc conclu que les processus apoptotiques ne semblaient pas être à l'origine de la réduction du nombre de myoblastes.

Par la suite, la prolifération cellulaire a été analysée grâce à un immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la protéine phosphorylée Phosphohistone H3 (PH3). Il est à noter qu'en contexte sauvage la plupart des événements de prolifération contribuant à la population totale de myoblastes ont lieu au cours des premiers stades larvaires et par conséquent les myoblastes prolifèrent peu après l'apparition des précurseurs de tendons (fin du second stade/début du troisième). Par conséquent et de manière assez logique, je n'ai pas constaté de différence de prolifération significative entre les disques contrôle et les disques SrDN aux stades observés (L3, 3h APF, 5hAPF).

L'entrée en apoptose ou une diminution de la prolifération cellulaire ne sont donc pas des hypothèses à même d'expliquer la différence du nombre de myoblastes observée entre les conditions SrDN et contrôle. Néanmoins, au regard de l'importance des tendons sur le positionnement des myoblastes, l'hypothèse d'une relocalisation des myoblastes dans une autre région du disque peut être formulée. Ainsi les myoblastes associés au tendon du fémur dorsal pourraient se localiser, voir migrer, de façon plus distale en absence de ce tendon, et dans ce cas-là se confondraient avec les myoblastes des segments adjacents. Des marqueurs spécifiques des différentes sous population de myoblastes à l'intérieur du disque de patte n'existant pas à ce jour, il est pour l'instant difficile de valider cette hypothèse.

Au-delà des étapes de positionnement et de spécification des myoblastes, la présence ou non de tendons pourrait avoir un impact sur la différenciation tardive des myoblastes en fibres musculaires matures (fusion des myoblastes, expression des gènes d'identités). Ces étapes critiques se déroulent à des stades avancés de la métamorphose, pendant laquelle les tissus deviennent difficilement accessibles à cause de la formation de la cuticule, ce qui rend les expériences d'immunomarquages difficiles. Il est donc prévu de combiner un certain nombre de marqueurs fluorescents (Mhc-GFP, Mef2-GFP) aux lignées utilisées pour nos analyses (Sr Gal4>UAS-SrDN) pour nous permettre d'observer l'influence de l'absence de tendon sur la formation des fibres musculaires et leur maturation à des stades plus avancées.

4. Influence des myoblastes sur le développement des tendons

A l'inverse, j'ai également testé l'impact de l'absence des myoblastes sur le développement des tendons. A ce sujet, il a été montré chez les vertébrés que le myotome, compartiment somitique à l'origine des précurseurs musculaires, est une source de signal nécessaire à la spécification du syndetome à partir duquel se différencieront les tendons axiaux (Brent *et al.*, 2003 ; Brent et Tabin, 2004). Dans le disque de patte chez la drosophile la présence de myoblastes à proximité des précurseurs de tendons peut laisser penser que ces précurseurs musculaires puissent être à l'origine de signaux influençant le développement et la morphogenèse des précurseurs de tendon. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai induit la mort cellulaire des myoblastes en exprimant le facteur pro-apoptotique Reaper.

Dans le but d'affecter spécifiquement les myoblastes du disque de patte, j'ai utilisé la lignée ; R32D05-Gal4 décrite précédemment. Cette dernière, permet d'induire l'expression de transgènes spécifiquement dans les myoblastes associés aux disques imaginaires dès le début du troisième stade larvaire sans affecter la myogenèse embryonnaire. Ainsi, l'expression de Reaper, induite spécifiquement

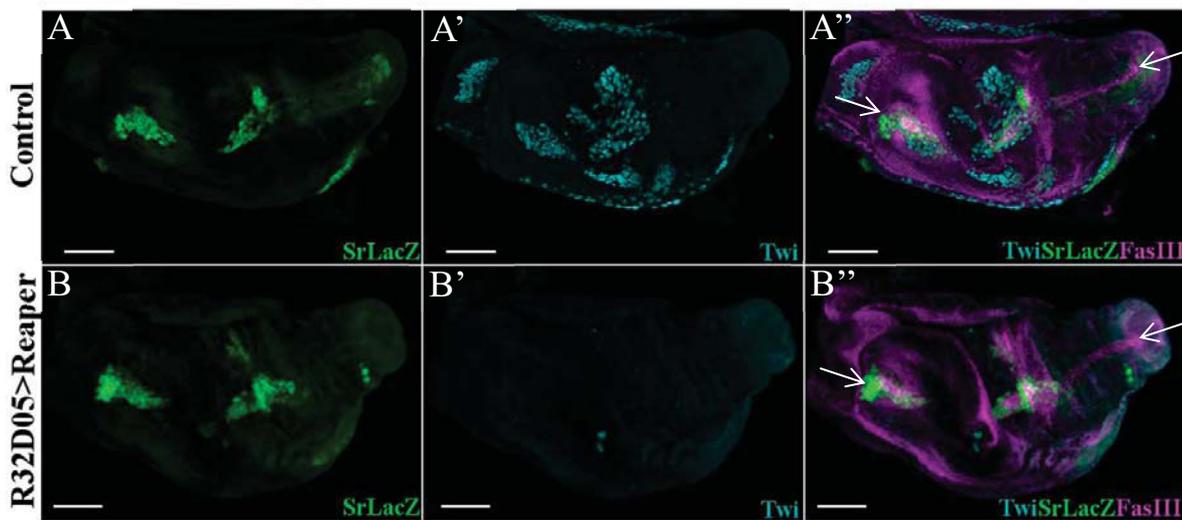


Figure 29: L'absence de myoblastes n'affecte pas le développement des tendons.

(A-A'') Disque de patte contrôle à 3h APF, les précurseurs de tendons sont visualisés avec Sr-LacZ (vert), les myoblastes avec un marquage anti-Twi (Cyan), l'accumulation de la Fascicline III (Magenta) met en évidence l'invagination des tendons (flèches) . (B-B'') Disque de 3h APF, l'expression de Reaper spécifiquement dans les myoblastes a pour conséquence la mort de ces cellules et donc l'absence de marquage Twi. L'expression de SrLacZ n'est pas affectée par l'absence de ces myoblastes.

dans les myoblastes, entraîne la perte de la quasi-totalité des myoblastes (vérifiée par l'immunomarquage dirigé contre Twist) sans pour autant affecter la spécification des précurseurs de tendons ni même leur développement précoce comme révélé par l'expression du gène rapporteur *sr-LacZ* dans les disques en début de métamorphose (Fig.29). Ce résultat indique que l'absence des myoblastes ne semble affecter ni la différenciation ni l'invagination des cellules tendons

Ces résultats laissent penser que, comme lors de la myogenèse embryonnaire, les étapes précoces de différenciation des cellules tendons seraient indépendantes de la présence des myoblastes. Cependant il reste à observer le devenir des tendons à des stades plus avancés (au-delà de 5h après formation de la puppe).

5. Analyses transcriptomiques des cellules précurseurs de tendons et des myoblastes appendiculaires.

Les données moléculaires concernant la spécification et la différenciation des précurseurs de tendons et des myoblastes associés au disque de pattes sont peu nombreuses. Afin de permettre l'identification de manière tissu-spécifique des gènes exprimés dans les précurseurs de tendons et les précurseurs de muscle de la patte à différents temps de développement, j'ai participé (avec Quentin L. pour son projet de M2) à la mise au point d'un protocole de tri-cellulaire par cytométrie en flux (FACS : Fluorescence Activated Cell-Sorting) en vue d'extraire les ARN messagers spécifiques des précurseurs de tendons et des myoblastes associés aux disques de pattes.

Pour acquérir des données génomiques globales spécifiques des cellules tendons, nous avons préalablement développé des outils afin de purifier un grand nombre de cellules tendons issues du disque de patte à un stade précis. En effet, afin d'obtenir une quantité suffisante de matériel pour réaliser des expériences de séquençage ARN, nous avons adapté à notre modèle d'étude les protocoles décrits par (Harzer *et al.*, 2013, Tauc *et al.*, 2014) pour l'extraction de population rares de cellules à partir de tissus larvaires disséqués (cellule souches intestinale et sous population neuronales). La difficulté a été de mettre au point un protocole

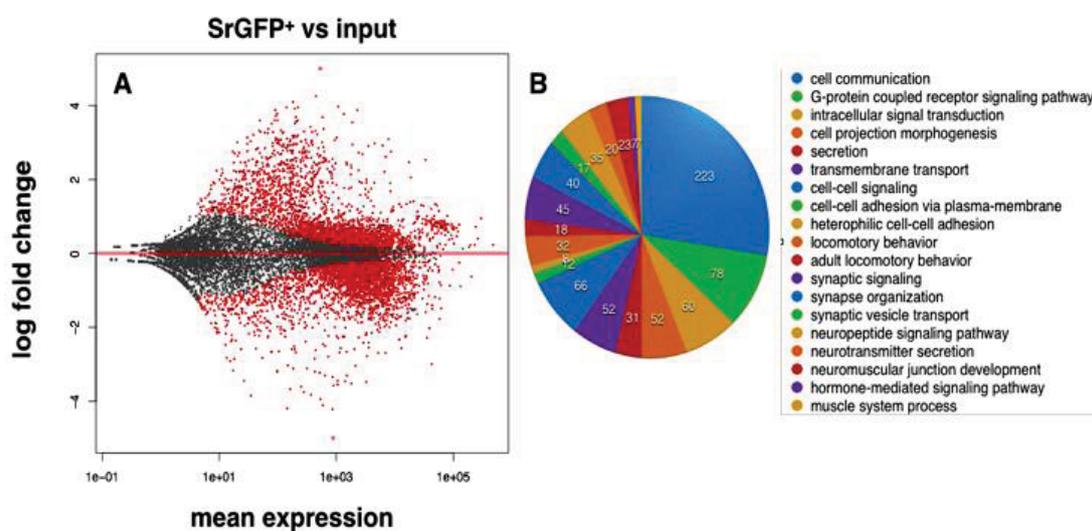


Figure 30 : Représentation des processus biologiques majoritairement représentés dans les données de transcriptomique des précurseurs de tendons.

(A) « Volcano plot » représentant la répartition de l'ensemble des gènes suivant leur niveau d'enrichissement ou d'appauvrissement d'expression dans les cellules SrGFP+ par rapport aux cellules totales du disque. (B) Les gènes dont l'expression est significativement enrichie (Fold Change > 2) sont regroupés suivant leur contribution dans différents processus biologiques (GO: biological process).

reproductible et rapidement exécutable afin de maintenir l'intégrité des cellules d'intérêt. Une des difficultés majeures étant que les cellules tendons à purifier représentent, à 0h APF, moins de 2% des cellules totales du disque de patte.

Je ne décrirai pas ici le protocole détaillé de la méthode développée, qui fait partie du travail de Quentin, ainsi que l'analyse détaillée des données transcriptomiques obtenues. Néanmoins, je prendrai le soin de préciser les outils utilisés et de mettre en évidence les données les plus pertinentes dans le cadre de mon travail sur l'étude des interactions entre précurseurs de tendons et myoblastes :

Méthode de tri cellulaire par cytométrie :

Après dissection des disques de patte exprimant la protéine *GFP* sous le contrôle de la lignée pilote *Sr-gal4*, au début de la métamorphose (0h APF), les cellules de disque ont été dissociées par digestion enzymatique (papaïne et collagénase). Les cellules *GFP+* et *GFP-* ont ensuite été triées par cytométrie en flux (FACS). Nous avons pris soin de collecter également un groupe de cellules totales du disque (ayant donc subi la dissociation et le passage par le cytomètre mais sans avoir été triées selon leur fluorescence) afin de servir de contrôle (Input). Enfin, les ARN de ces cellules ont été extraits afin de réaliser une analyse transcriptomique. Trois réplicats de cellules ont ainsi été obtenus pour chaque échantillon (*GFP+* ; *GFP-* et Input)

Suite à l'extraction des ARN totaux de chaque échantillon, la quantité et la qualité des ARN ont été analysées à l'aide d'un bio-analyseur par électrophorèse selon la méthode Agilent. Afin de valider l'efficacité du tri cellulaire, une série de RT-qPCR a été réalisée afin de confirmer l'enrichissement des gènes spécifiques tendons, ainsi que la déplétion des gènes normalement absents des tendons tels que les gènes musculaires (*twi* et *lbe*) et du système nerveux (*pros* et *elav*). Les résultats obtenus ont permis de confirmer la spécificité et la robustesse du processus méthodologique mis en place.

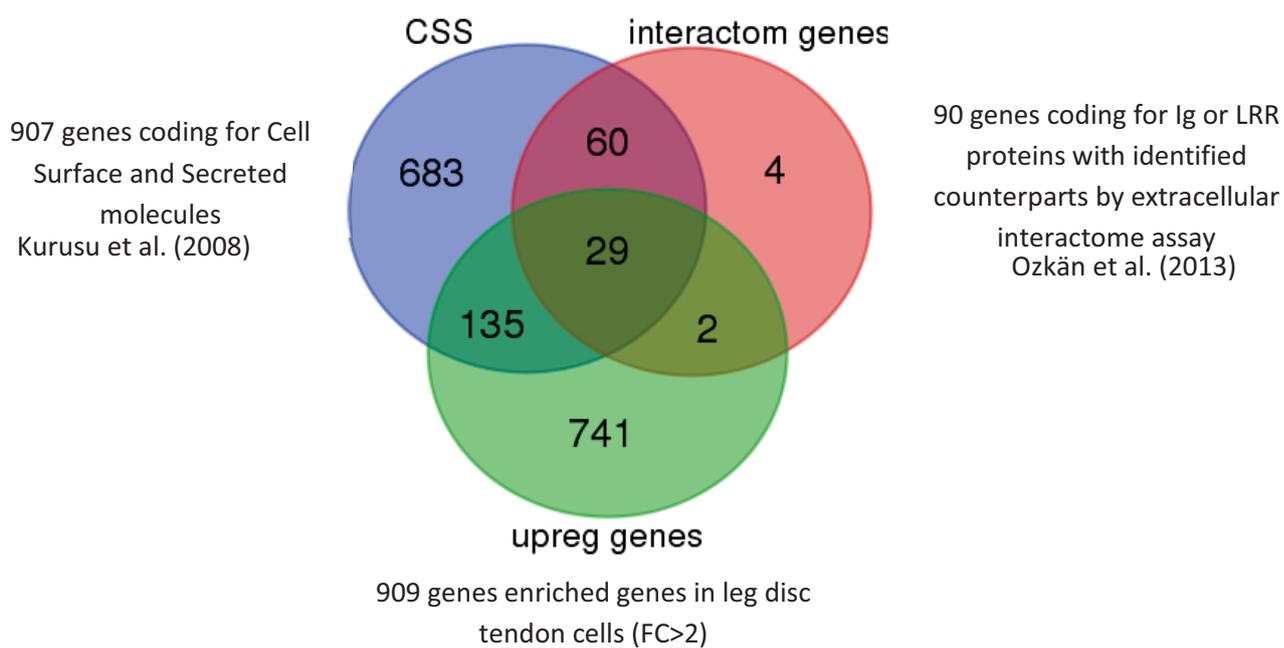


Figure 31 : Diagramme de Venn regroupant la liste des gènes enrichis (FC>2) dans nos données transcriptomiques tendons spécifiques (vert) croisée avec la liste de protéines putatives de surface ou sécrétées CSS (bleu) et la liste comprenant des gènes codant pour des protéines à domaine Ig ou LRR pour lesquelles les partenaires physiques (interacteurs) ont été déterminés *in vitro* (interactome).

Les échantillons ont par la suite été envoyés sur la plateforme génomique de l'EMBL (Heidelberg, Allemagne) pour un séquençage ARN haut débit (NextSeq 500/Illumina). Enfin, les données RNASeq ont été analysées par notre bioinformaticien le Dr. Yoan Renaud.

L'analyse de l'expression différentielle des données de RNA-Seq a montré un enrichissement d'un peu plus de 900 gènes dans les cellules Sr-GFP positives avec un Fold Change > 2 par rapport aux cellules issues de l'input (Fig.30). Parmi ces derniers, 814 ont un ou plusieurs orthologues chez les vertébrés (identifié par DIOPT : DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool). La classification par ontologie des gènes enrichis (Gene Ontology analyse) montre une forte représentation de GO associés à la communication cellulaire, à la voie de signalisation couplée aux protéines G, à la sécrétion, la signalisation cellulaire, l'adhésion, ainsi qu'à la locomotion et au processus liés au système musculaire (Fig.30).

Dans le cadre de mon étude sur les interactions cellules-cellules impliquant les précurseurs de tendons et les myoblastes, nous avons cherché à identifier des protéines de surface impliquées dans la reconnaissance, l'adhésion cellulaire (interactions homo/hétérophiles) ou des molécules type ligands/récepteurs. Dans cette optique, une première analyse a été faite en croisant la liste de gènes enrichis dans nos précurseurs de tendons avec plusieurs listes existantes (Fig. 31) :

- une liste établie par Kurusu *et al.*, (2008) comprenant 907 gènes codant pour des protéines putatives de surface ou sécrétées CSS (Cell Surface and Secreted molecules) chez la drosophile.
- une liste de 90 gènes codant pour des protéines possédant des domaines IgG ou LRR et pour lesquelles les partenaires physiques (interactome) ont été décrits et validés *in vitro* (Özkan *et al.*, 2013).

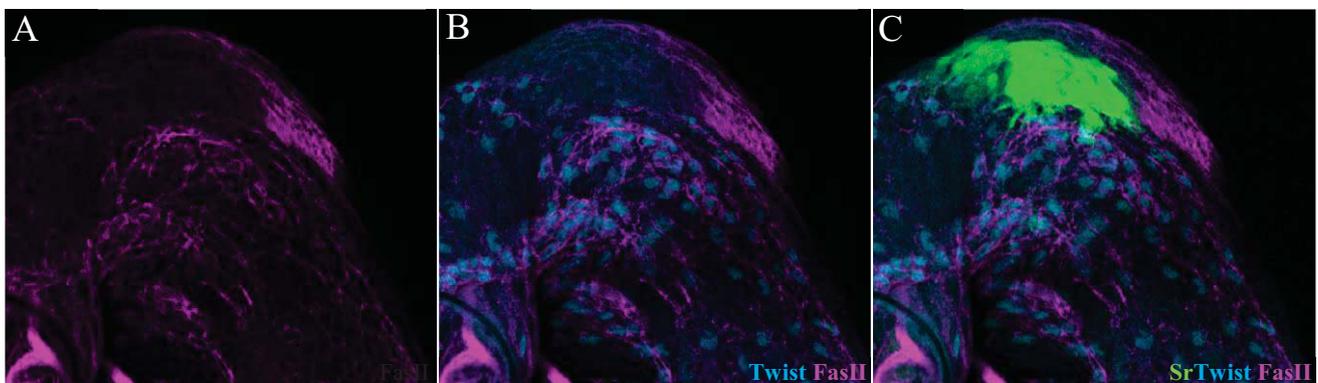


Figure 32: Profil d'expression de la Fasciline II dans une sous-région du disque de patte. (A) en magenta l'immunomarquage dirigé contre la Fasciline II dont l'expression correspond à la membrane de certains myoblastes marqués avec anti-Twi en cyan (B), le marquage est absent des cellules tendons visualisées avec Sr-gal4>UAS-GFP en vert (C).

Le croisement de ces listes a permis de mettre en évidence dans les précurseurs de tendons 164 gènes codant pour des protéines de type CSS (Annexe Tab.1). Parmi ceux-là, 29 font partis des protéines pour lesquelles des partenaires ont été testés.

Deux gènes jusque-là non décrits et codants potentiellement pour des protéines de la famille des IgG (CG15630 et CG33543) ont retenu notre attention. Ces 2 gènes sont d'une part fortement enrichis dans nos données (FC=9 et FC= 7,8 respectivement) et d'autre part capables d'interagir avec la protéine Fasciline II selon l'interactome établi par Ozkan et al. (2013). La protéine FasII a été décrite au niveau du système nerveux pendant les étapes de fasciculation, de reconnaissance et d'adhésion neuronale (interactions de type homophile). Disposant d'un anticorps dirigé contre la protéine FasII, j'ai réalisé un immunomarquage sur les disques de patte. J'ai ainsi pu montrer que cette dernière était bien exprimée à la surface de certains myoblastes (**Fig. 32**) mais absente des tendons adjacents. Ce résultat préliminaire soutient l'idée que FasII pourrait être impliquée dans les contacts myoblastes/tendons via des interactions hétérophiles avec les protéines codées par les gènes (CG15630 et CG33543). L'analyse fonctionnelle par l'utilisation de lignées RNAi et/ou des lignées mutantes pour ces différents acteurs ainsi que la vérification de la présence de leurs transcrits par hybridation *in situ* sont prévues afin de confirmer ou infirmer leur implication dans les interactions entre les précurseurs de tendons et les myoblastes.

Depuis la mise en place de cette méthode, nous sommes maintenant capables de trier à partir d'un seul échantillon de disques les cellules tendons et les myoblastes simultanément : les prochains séquençages ARN seront donc obtenus pour ces 2 populations aux mêmes stades de développement à partir des mêmes disques. L'analyse de ces données sera donc plus pertinente pour identifier les interactions entre les précurseurs de tendons et les myoblastes.

6. Matériels et Méthodes

a. Lignées de drosophile utilisées

Les drosophiles sont élevées et croisées sur un milieu standard (pour 25L de milieu : 162,50 g d'Agar, 2 kg levure de bière, 2 kg de farine de maïs, 250 mL d'éthanol à 48% de fongicide.). Sauf cas particulier mentionné au moment de la description de l'expérience, les individus sont élevés à une température de 25°C.

- Pour l'expérience visant à affecter les tendons :

La lignée enhancer-trap Sr-gal4/TM6b (don de G. Morata) a été combinée aux lignées Tub-Gal80 thermosensible et UAS-mCD8GFP pour donner la lignée : Tub Gal80_{ts}; Sr-gal4, UAS.mCD8GFP/TM6b. C'est cette lignée qui a été croisée avec la lignée : UAS.SrDN (Dominant Négatif) pour permettre d'altérer la formation des tendons à partir des stades larvaires sans altérer le développement des tissus embryonnaires. Le transgène UAS-SrDN est un don de G. Vorbrüggen, elle a été créée en remplaçant le domaine transactivateur du facteur de transcription Sr par le domaine répresseur du facteur Engrailed. Ainsi les gènes cibles normalement activés par Sr sont réprimés (Vorbrüggen et Jäckle, 1997). Les expériences contrôles ont été réalisées en croisant la lignée Tub Gal80_{ts}; Sr-gal4, UAS.mCD8GFP/TM6b avec la lignée UAS-LacZ obtenue auprès du centre de stock à Bloomington (BDSC 1776).

- Pour l'expérience visant à induire l'apoptose dans les myoblastes associés au disque de patte :

La lignée enhancer-trap Sr-lacZ/TM6b (11618, BDSC) a été combinée avec la lignée UAS-Reaper (5824, BDSC) puis croisée avec la lignée pilote R32D05-Gal4 (49712, BDSC).

- Pour l'expérience de GRASP (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners):

La lignée UAS-CD4::spGFP₁₋₁₀; LexAop-CD4::spGFP₁₁ (Gordon et Scott, 2009) a été utilisée pour exprimer les deux parties scindées complémentaires de la protéine GFP membranaire (split-GFP). Le premier fragment GFP₁₋₁₀ qui contient les premiers 214

résidus comprend 10 des 11 feuillet-bêta de la GFP. Le second, spGFP₁₁ composé uniquement de 16 résidus composant le dernier brin (Cabantous *et al.*, 2005).

Cette lignée a donc été croisée avec la lignée R32D0-LexA ; sr-Gal4/TM6b. La lignée R32D05LexA ayant été générée au laboratoire à partir de la construction R32D05-Gal4.

- **Pour les expériences de culture *ex vivo* de disque :**

Pour visualiser en parallèle les myoblastes et les précurseurs de tendon une lignée portant les transgènes suivant a été établie : UAS-CAAX::mCherry (CAAX= motif d'ancrage à la membrane), LexAopGFP::nls, R32D05LexA et Sr-Gal4/TM6b.

Pour les expériences de tri cellulaire :

Les cellules tendons ont été triées à partir des disques de patte de la lignée UAS-LifeActin::GFP ; Sr-Gal4/TM6B.

b. Les systèmes d'expression bipartite de la drosophile :

La majorité des expériences ont été réalisées en utilisant le système Gal4/UAS. Le facteur de transcription Gal4 (découvert chez la levure et naturellement absent chez la drosophile) se fixe au niveau de séquence spécifique UAS (Upstream Activated Sequence) et active l'expression des gènes en aval (Brand et Perrimon, 1993). La protéine Gal80 est un répresseur de Gal4. La forme thermosensible de cette protéine (Gal80ts) permet de contrôler de manière temporelle le Gal4 en modulant la température : à 18°C la protéine Gal80ts inhibe le facteur Gal4, alors qu'à 29°C, la protéine Gal80ts étant inactif, le facteur Gal4 peut activer l'expression des gènes sous contrôle de régions regulatrices UAS. Ce système a été utilisé pour les expériences visant à affecter les cellules tendons en exprimant UAS-SrDN sous le contrôle de Sr-Gal4. En effet, ce dernier s'exprimant aussi durant les stades embryonnaires l'expression de SrDN induit une létalité précoce. Afin de s'affranchir de cette létalité aux stades embryonnaires, la lignée Gal80ts a été combinée à la lignée Sr-Gal4 puis croisée avec la lignée UAS-SrDN, les individus issus de ce croisements sont ainsi à 18°C jusqu'à la fin du L3 (environ 6 jours à 18°C) puis ils sont transférés dans un incubateur à 29°C.

Pour les expériences de GRASP et d'imagerie *ex vivo*, où il a fallu contrôler l'expression de deux transgènes distincts dans deux types cellulaires différents (précurseurs de tendon et myoblastes), il a été nécessaire d'utiliser, en plus du système Gal4/UAS un autre système d'expression. Nous avons donc utilisé le système bactérien LexA/LexAOP (Szüts et Bienz 2000; Lai et Lee 2006; Pfeiffer *et al.*, 2010). Ce dernier est basé sur l'utilisation du domaine de liaison à l'ADN de la protéine LexA fusionné à un domaine transactivateur (domaine C-terminal du Vp16 ou du Gal4) de manière à activer l'expression des transgènes en aval de la séquence LexAOP (LexA operator-promoter).

c. Expériences d'immunomarquages

- Procédure expérimentale

Les disques ont été prélevés à différents stades selon les expériences réalisées. Ainsi, les larves ou les pupes stadées sont collectées et leur partie antérieure, où sont situés les disques imaginaux de pattes, est disséquée dans du PBS PBS 1X (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10nM Na₂HPO₄, pH7,5) à l'aide de pinces fines. Les parties disséquées sont transférées dans un tampon de fixation contenant 4% de paraformaldéhyde (PAF 4%) et incubées sous agitation pendant 20 minutes. Elles sont ensuite lavées 3 fois pendant 10 minutes dans du PBS Triton 0.5% (PBST) puis incubées dans une solution de blocage (PBST, sérum de cheval à 30%) pendant 1 heure à température ambiante. Cette étape est suivie de trois lavages au PBST. L'incubation avec les anticorps primaires, dilués dans du PBST, se fait sur la nuit à 4°C ou 2h à température ambiante. Trois lavages de 10 minutes dans du PBST sont réalisés après chaque bain d'anticorps. Les disques sont ensuite incubés avec les anticorps secondaires pendant 1 heure à température ambiante, à l'abri de la lumière, puis rincés 3 fois pendant 10 minutes dans du PBST. Les disques imaginaux de patte sont ensuite isolés précisément puis transférés dans un milieu de montage (Fluoromount-G® SouthernBiotech, 0100-01) avant d'être montés entre lame et lamelle dans une goutte de ce même milieu de montage. L'acquisition des images a été réalisée avec un microscope confocale inversé Leica TCS SP8.

- *Anticorps utilisés*

Les anticorps primaires utilisés sont résumés dans le tableau qui suit :

Anticorps contre	Espèce d'origine	Dilutio	Fournisseur
β -Galactosidase	Poulet	1/1000	Abcam
Fascicline II	Souris	1/500	DHSB
Fascicline III	Souris	1/500	DHSB
Ladybird	Souris	1/50	Jagla <i>et al.</i> , 1997
Notch intra-cellulaire	Souris	1/500	DHSB
Phospo-HistoneH3	Rat	1/500	MILLIPORE
Sr B	Cochon d'inde	1/2000	Don de T.Volk
Twist	Lapin	1/500	Figeac <i>et al.</i> ,2010
<i>In situ</i> Cell Death Detection kit TMR Red (12156792910)			Roche

Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants :

Anticorps contre	Fluorochrome	Espèce d'origine	Dilution	Fournisseur
Cochon d'inde	Alexa 488	Âne	1/500	Jackson
	Cy3	Âne	1/500	Jackson
Lapin	Alexa 488	Âne	1/500	Jackson
	Cy3	Âne	1/500	Jackson
	Cy5	Âne	1/500	Jackson
Poulet	Alexa 488	Âne	1/500	Jackson
	Cy3	Âne	1/500	Jackson
Rat	Cy5	Âne	1/500	Jackson
Souris	Alexa 488	Âne	1/500	Jackson
	Cy3	Âne	1/500	Jackson ImmunoResearch
	Cy5	Âne	1/500	Jackson ImmunoResearch
(Phalloïdine (F-actine))	633		1/500	Sigma

d. *Imagerie ex vivo*

Des pupes blanches (0h APF) sont collectées avec un pinceau humide pour être nettoyées pendant quelques secondes dans un bain d'éthanol 70%. Elles sont

ensuite placées dans du milieu de culture Shield and Sang M3 (Sigma-Aldrich) où elles seront disséquées. Les disques de pattes sont délicatement isolés puis directement transférés dans du milieu de culture Shield and Sang M3 cette fois-ci complétement (2% de FCS, 2ug/ml Ecdysone, 0,5% Penicillin-Streptomycin, 1% méthylcellulose). Par la suite les disques sont transférés, par pipetage avec environ 10µl du milieu, sur une lamelle sur laquelle a été collé préalablement un espaceur adhésif de 0.12 mm de profondeur (Secure-Seal™ Spacer, 70327-8s) créant ainsi un espace pour éviter d'écraser les disques. Ainsi, les disques de pattes, entourés par cet espaceur puis sont recouverts délicatement par une membrane permettant les échanges gazeux (Lumox 25 de Sarstedt). Le tout est scellé avec de l'huile Voltalef 10S pour prévenir la déshydratation de l'échantillon.

L'acquisition des images a été réalisée avec un microscope confocale inversé Leica TCS SP8. Après sélection d'une zone adéquate, le microscope est alors réglé pour prendre des images de cette zone toutes les 3 minutes pendant 5h pour observer la dynamique des filopodes, ou toutes les 10/15 min pendant 10/12h pour suivre le développement global du disque. L'image peut être composée de différents points selon l'axe en Z.

e. Tri cellulaire

- *Dissection et dissociation cellulaire.*

Plusieurs protocoles ont été testés avec différentes enzymes et temps d'incubation/agitation. Ici, est décrit le protocole optimisé final. Des pupes blanches (0h APF) sont utilisées. Elles sont lavées dans trois bains : de PBS 1X, d'éthanol 70% puis de PBS 1X. La dissection s'effectue en 1h maximum, dans du milieu de culture M3 complétement (M3 S3652 Sigma, Insuline 10X, FBS, Pénicilline/Streptomycine 100X, L-Glutamine 100X G7513 Sigma, L-Glutathione 0,04mg/ml G6013 Sigma) sur glace. En moyenne un total 200 à 300 disques de patte sont isolés en 1h. Les disques sont alors dissociés à 30°C pendant 1h30 dans 1ml un milieu de dissociation (M3 complétement, collagénase P4762 et papaïne C2674 à 20mg/ml, Sigma). Suite à la dissociation et après ajout de 150µl DNase (DN-25MG Sigma), les disques sont laissés conservés dans la glace.

- *Le tri cellulaire par la méthode FACS*

Le tri cellulaire a été réalisé par la plateforme de cytométrie en flux du CHU Estaing avec le cytomètre BD FACSAria™ à environ 2500 évènements par seconde. Avant passage au cytomètre les échantillons sont filtrés à travers un tamis (\varnothing 40 μ m). Les cellules collectées sont ensuite immédiatement centrifugées 5min à 5000rpm à 4°C, le surnageant est enlevé puis 300 μ l de Trizol® sont ajoutés. Les échantillons sont conservés à -80°C.

- *Extraction et Purification ARN*

L'extraction est réalisée à partir des cellules triées, en combinant l'équivalent de trois tri-cellulaires (environ 50 000 cellules pour les GFP positives) pour obtenir l'équivalent de 60ng total d'ARN. Les échantillons dans le Trizol® sont décongelés puis incubés 5min à température ambiante. Ensuite, 60 μ l de chloroforme sont ajoutés aux échantillons qui sont mélangés puis incubés 5min à RT avant d'être centrifugés 15min à 15000rpm. A partir d'environ 160 μ l de phase aqueuse, l'extraction de l'ARN des cellules GFP positives et négatives ainsi que l'input est effectuée à l'aide du kit de Quick-RNA™ Microprep (Zymo Reseach). L'échantillon ARN est conservé à -80°C ou utilisé directement pour analyse. La qualité des ARN est testée par bio-analyseur (Agilent Technologies).

II. L'étude de différenciation des tendons appendiculaires : Rôle de la voie Notch et des gènes *Odd-skipped* dans la spécification des tendons (Publication)

La musculature appendiculaire de la drosophile présente une architecture complexe dans laquelle des fibres musculaires s'organisent autour des longs tendons internes répartis dans les différents segments de la patte. Il est donc important, afin de permettre l'établissement correct de ce patron musculaire, de définir de manière précise la localisation des cellules tendons.

Du début du troisième stade au début de la métamorphose, sept domaines de cellules exprimant le marqueur de tendon *Stripe*, sont spécifiés au sein de l'épithélium du disque de patte. Ils sont disposés le long de l'axe proximo-distal de manière stéréotypée selon les axes dorso-ventral et antéro-postérieur. Par la suite, ces groupes de cellules *Sr* positives subissent une invagination et s'allongent pour finalement former de longues structures tubulaires conduisant à la mise en place de tendons internes. Il est clair qu'une fine régulation, spatiale et temporelle, de l'expression de *sr* est requise durant ce processus. Cependant, les voies de signalisation responsables de la régulation de l'expression de *sr* et de la formation des tendons dans le disque de patte restent à élucider.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence le rôle de la voie Notch dans l'initiation de l'expression de *sr* dans le disque de patte. En effet, la perte de fonction de Notch conduit à la suppression de l'expression de *sr* alors que l'activation ectopique de cette voie est capable d'induire localement *sr* et la formation de tendon ectopique.

De plus, nous montrons que les domaines d'expression de *sr* apparaissent parmi les cercles concentriques représentant les futurs « vrais joints » de la patte. Ces cellules présomptives de « vrais joints » sont caractérisées par l'expression des gènes

de la famille *odd-skipped*. Ces derniers sont également des cibles de Notch et sont connus pour être impliqués dans la formation des joints notamment en induisant les réarrangements cellulaires requis pour l'invagination des cellules. Nos résultats indiquent qu'en altérant l'expression ou l'activité des gènes de la famille *odd-skipped*, *sr* n'est pas exprimé mais que le gain de fonction des gènes de la famille *odd-skipped* n'est pas suffisant pour induire *sr*. Ainsi, nous proposons que l'expression des gènes de la famille *odd-skipped* permette de définir des territoires (joints) au sein desquels le gène *sr* est induit grâce à la signalisation Notch. Enfin, en absence de *Sr*, l'expression de *odd-skipped* n'est pas affectée. Cependant les cellules, bien que capable de s'invaginer, sont incapables de former un tube correspondant au tendon.

Pour résumer, nous avons établi que Notch est requis pour l'expression de *sr* et que les gènes de la famille *odd-skipped* agiraient en aval de Notch pour initier le processus d'invagination des cellules précurseurs de tendons. Par la suite, les facteurs *odd-skipped* coopèrent avec *Sr* pour initier le processus de tubulogenèse caractéristiques des tendons appendiculaires.

***Odd-skipped* and *stripe* act downstream of Notch to promote tendon-like connective tissue morphogenesis in *Drosophila* leg**

Laddada Lilia, Jagla Krzysztof and Soler Cédric

SUMMARY

Multiple tissue interactions take place during development of musculoskeletal system of the limb. While appendicular myogenesis has been extensively studied, development of connective tissue associated with muscles has received less attention. In developing *Drosophila* leg, tendon-like connective tissue arise from clusters of epithelial cells that invaginate into the leg cavity and then elongate to form internal tube-like structures along which muscle precursors are distributed. Here, we show that in *Drosophila*, *stripe*-positive appendicular tendon precursors are set up amongst intersegmental leg joint cells expressing *odd-skipped* genes and that Notch signalling is necessary and locally sufficient to trigger *stripe* expression. This study also indicate that *odd-skipped* genes and *stripe* are both required downstream of Notch to promote morphogenesis of tube-like connective tissue and formation of internal leg tendons.

Key words: connective tissue, tendon, leg disc, *Drosophila*, Notch pathway, myogenesis

INTRODUCTION

Skeletal muscles can only transmit force generated by their contraction to the skeleton if they are properly bundled and connected to the bones. In vertebrates, these functions are carried out by muscle-associated connective tissues (CTs), including tendons connecting the muscles to the skeleton and the muscle connective tissue (MCT) that wrap and assemble muscle fibres to ensure their cohesion. In addition to their structural roles, there are growing evidences that CTs are also an important source of extrinsic cues regulating skeletal muscle organization, growth, differentiation and regeneration (reviewed in Gaut and Duprez, 2015; Hasson, 2011; Huang, 2017; Nassari et al., 2017). However, the molecular mechanisms underlying CT specification and differentiation have not been completely elucidated.

In *Drosophila* (arthropods), although there is no proper CT described, the somatic muscles are anchored to the exoskeleton via specialized tendon-like ectodermal cells called muscle attachment sites (MAS) or apodemes. Because these cells ensure the transmission of muscle contractions to put the skeleton in motion, they are functionally equivalent to vertebrate tendons. Each extremity of a larval muscle is connected to a single MAS that is singled out from a cluster of ectodermal cells (Ball et al., 1985; Radnikow and Bäessler, 1991; Volk, 1999) and characterized by the expression of a zing-finger transcription factor Stripe (Sr). Sr is the earliest specific known marker of MAS precursors, (Frommer et al., 1996) and is essential to induce the differentiation of all tendon-like cells, including adult tendon precursors (Fernandes et al., 1996; Ghazi et al., 2003; Soler et al., 2004). Eventually, Sr is sufficient to initiate tendon gene expression ectopically in ectodermal cells and to make them competent to attract and attach migrating muscle fibres (Becker et al., 1997; Frommer et al., 1996; Vorbrüggen and Jäckle, 1997). Thus, in order to allow the establishment of a correct stereotyped muscle pattern, the location of Sr expressing cells has to be precisely defined.

Importantly, the vertebrate Sr orthologs, Egr 1 and Egr2, have also been shown to play a role during tendon cell differentiation (Lejard et al., 2011).

In embryo, while late expression and maintenance of the SrA isoform relied on the interaction with muscle fibres (Volohonsky et al., 2007), the early expression of the SrB isoform is muscle independent as shown by the persistence of *sr* expression in *twist* mutant lacking all

mesodermal tissues (Becker et al., 1997). Instead, initial induction of *sr* is rather triggered by ectodermic signals. For instance, in the ventral epidermis of embryo a repeated pattern of three rows of *sr* expressing cells is specified across each abdominal parasegment by a combination of three distinct secreted signalling proteins. The segmental border row (row 1) of *sr* positive cells is induced by Hedgehog (Hh) signal emanating from directly adjacent anterior cells whereas Wnt/Wingless and Spitz/EGF positively regulate *sr* in the second and third row respectively (Hatini and DiNardo, 2001). Piepenburg et al. (Piepenburg et al., 2000) showed that *sr* promoter region contains functional binding sites for dTCF/Pangolin and Cubitus interruptus (Ci), the effectors of Wnt and Hh signalling pathways. Remarkably, these two regulatory elements are required for *sr* expression and antagonize each other to insure an asymmetric activation of *sr* in row1 (Piepenburg et al., 2000). In the wing disc, flight muscle attachment sites arise from *sr* positive cells of the presumptive notum (Fernandes et al., 1996). Two separate studies have begun to decipher a complex regulatory system leading to *sr* expression in five distinct domains (Ghazi et al., 2003; Usui et al., 2004). They showed that *sr* activation depends on Notch pathway activity and that multiple regulatory elements including Wnt and Dpp pathways as well as the transcription factors Pnr, Ush and Acheate-scute cooperate to maintain the distinct spatial identities of *sr* domains. Thus, these studies on both larval and flight muscle tendon development underlined the complexity of *sr* transcription regulation. However, mechanisms regulating *sr* expression in leg disc are unknown. Adult leg segments contain interconnected tendon and muscle elements that are oriented and attached precisely to enable coordinated leg movements (Maqbool et al., 2006; Miller, 1950; Soler et al., 2004). Leg muscles develop from *twist* expressing myoblasts laying on the surface of leg discs (Bate et al., 1991; Broadie and Bate, 1991) whereas tendon precursors originate from subsets of epithelial leg disc cells (Soler et al., 2004). In total, seven clusters of *sr* expressing cells are specified during third instar larval and early pupa stage, They are distributed along the proximodistal axis at stereotyped dorsoventral and anteroposterior positions. Remarkably, these *sr*-positive cell clusters undergo invagination and become elongated to eventually form long tubes leading to the formation of internal tendons that have not been described in other body parts of the adult fly. Strikingly, muscle founder cells are distributed all along the invaginating tendon precursors prefiguring the formation of multifibre leg muscles (Soler et al., 2004). It has been suggested that tendon precursors provide positional information to adjacent muscle founders as disturbing tendon development affects spatial distribution of myoblasts (Soler et al., 2016). The mechanisms governing the specification and the development of these unique internal tendons remain to be elucidated.

Here, we show that tendon precursors are selected amongst narrow bands of cells expressing *odd-skipped* (*odd*) gene family members and prefiguring the future joints between presumptive leg segments (Hao et al., 2003; Ibeas and Bray, 2003). *Odd* genes encode zinc finger transcription factors acting downstream of Notch pathway and known to control invagination of the leg (Hao et al., 2003; Ibeas and Bray, 2003). In the absence of *sr*, *odd* expression is not affected but presumptive tendon cells, after initiating invagination, do not form tube-like structures indicating that both *sr* and *odd* are required for development of internal leg tendons. Because Notch initiates *sr* expression in a subset of *odd*-positive joint cells we propose that it plays a pivotal role in appendicular CT specification and morphogenesis by making joint cells competent to develop into tube-like internal leg tendons.

RESULTS and DISCUSSION

Stripe is expressed in a subset of Notch activated cells from presumptive true joint

The *Drosophila* leg is composed of nine segments separated by flexible joints. Joints are formed by constriction/folding of cells forming a concentric ring between each leg segment. Joint cellular rearrangement depends on Notch pathway activated in the most distal part of each segment by its ligands (Delta/Serrate) expressed in immediate adjacent proximal cells (Bishop et al., 1999; Celis et al., 1998; Mishra et al., 2001; Rauskolb, 2001; Rauskolb and Irvine, 1999; Suzanne, 2016). Two types of joints can be morphologically and functionally distinguished, the four tarsal joints between each tarsal segment (T1 to T5) and the “true” joints separating the segments from coxa-trochanter to the tibia-tarsi (T1) junctions and between the tarsus (T5) and pre-tarsus (claws). “True” joints are characterized by the expression of the four *odd-skipped* family genes, namely *odd*, *sob*, *drm* and *bowl* (Hao et al., 2003; Ibeas and Bray, 2003; Levine et al., 1997) and the insertion of internal tendons to which the leg muscle fibres are attached (Fristrom and Fristrom 1993; [Mirth and Akam, 2002](#); [Tajiri et al., 2010](#)). *Odd* family genes induce invagination of joint cells presumably by regulating cytoskeleton rearrangement (Hao et al., 2003; Ibeas and Bray, 2003). We have previously shown that most of *sr* positive cells co-expressed *odd* (Soler et al., 2004). This result suggested that internal leg tendons arise from cells that are part of the segmental joints. To explore this possibility we further characterized the expression of *sr* at different stages of leg disc development with respect to *odd* expression (**Fig. 1**). To follow expression of both tendon precursor markers we used the Sr-Gal4; UAS-GFP transgenic line crossed with a line carrying *odd-lacZ*^{K111} reporter transgene. Previous studies showed that all four *odd* family genes are similarly expressed and that *odd-lacZ*^{K111} allele recapitulates this expression in developing leg disc (Hao et al., 2003; Ibeas and Bray, 2003). A few Sr-Gal4; UAS-GFP cells are first detected in early third instar disc in a distal ring of *odd-lacZ* positive cells corresponding to the presumptive joint between T5 tarsal segment and pre-tarsus (Fig. 1A-C). At third instar larvae, true joint between T5 and pre-tarsus is clearly visible, with an increased number of tendon precursor cells expressing *sr*. that spatially rearrange to form a small ring at the surface of the epithelium (Fig.1 D-F). These cells invaginate into the tarsal cavity formed by the progressive evagination of the leg disc at the beginning of metamorphosis (Fig. 1 G-I). Eventually, they form a long internal tube with the apical pole facing the lumen that will extend from pre-tarsus to the femur by the end of leg development (this work and [Soler et al., 2004](#)). At early third instar, one supplementary ring of *odd-lacZ* positive cells can be detected, presumably at the future boundary between tibia and femur (Fig.1 A and C). Slightly later, as revealed by *sr* expression, a cluster of tendon precursors cells is specified at this boundary in dorsal position (Fig.1 E-F). Most of them also express *odd* and correspond to the future tibia levator tendon in the dorsal femur (for nomenclature see [Soler et al., 2004](#)). As for the long internal tendon in the tarsal segments, these cells also undergo invagination and form a tube that elongates within the presumptive femur. The same process operates progressively all along the five segmental boundaries that express *odd* with the specification of all internal leg tendon precursors (Fig. 1, data not shown). Thus, by the beginning of pupation, two clusters

of *sr* and *odd* positive cells (corresponding to the two future internal tendons in each segment) can be observed along each true joint (except in the pretarse-T5 boundary from which one unique tendon is formed). These observations suggest that *odd/sr*-positive tendon precursors are specified progressively following the proximo-distal segmentation of the leg and that *odd* expression precedes *sr* expression. As leg segmentation and expression of *odd* genes are Notch dependent (**refs**), we also examined expression of Notch using anti-Notch-intra antibodies and *Gbe+Su(H)GFP* Notch reporter line (de Navascués et al., 2012) combined with *sr-lacZ*^{P1618} enhancer trap line that recapitulates *sr* expression (Frommer et al., 1996; Usui et al., 2004). We observed that Notch protein localizes to the apical surface of tendon precursor cells which are also characterized by the accumulation of *Gbe+Su(H)GFP* (suppl. Fig. 1). As for *odd*, Notch pathway activation appears sequentially in the different tendon precursors and precedes *sr* expression. Noticeably, while tendons grow and develop, *Gbe+Su(H)GFP* expression progressively decreases suggesting that Notch activation could be restricted to the early stage of tendon specification.

***Stripe* acts downstream of Notch in appendicular tendon-like cells**

To analyse the relevance of Notch signalling for *sr* expression in tendon precursors, we first crossed *Sr-lacZ* flies with a line carrying a thermosensitive allele of Notch to reduce Notch activity in leg disc. This cross was set up at the permissive temperature of 22°C and hatching embryos allowed to develop until end of second larval instar. Then, we shifted them to the restrictive temperature of 31°C and analysed *Sr-lacZ* expression in late third instar leg disc. We could not detect any *lacZ* staining in these discs compared to control leg disc from larvae raised at 22°C until dissection where *Sr-lacZ* expression was unaffected (suppl. Fig. 2). Interestingly, when larvae were shifted to 31°C from mid third instar or later, *Sr-lacZ* expression was not affected either (data not shown) suggesting that Notch activity could be required to initiate but not to maintain *sr* expression in developing leg disc. To further test this possibility we attenuated Notch in already specified tendon precursors using *Sr-Gal4* crossed with different *UAS-NotchRNAi* lines and found that none of these lines had effect on *sr* expression in tendon precursors (data not shown). Thus, we concluded that, once *sr* expression is induced, Notch activity is no longer required for to maintain *sr* in presumptive tendon cells. To confirm the role of Notch in the initiation of *sr* expression we used *R10H12-Gal4* line generated by Flylight project (Jory et al., 2012; Pfeiffer et al., 2008). This line drives *Gal4* expression in the leg disc region that overlaps the area from which the dorsal femur tendon originates well before the induction of *sr* expression (Fig. 2A-B, suppl Fig. 3). We crossed *R10H12-Gal4* line carrying also *sr-lacZ* with *UAS-NotchRNAi* and *UAS-mCherryCAAX* (to reveal driver activity) and analysed *Sr-lacZ* and Notch expression in leg discs at 0h APF. In control leg discs, clusters of *Sr-lacZ* cells are present in the different leg segments and display accumulation of Notch protein at the apical membrane of invaginating tendon precursors. This is particularly visible for the long tendon that invaginates from the T5-pretarsus joint and gets across the tarsus segments (Fig. 2A-B). Cells contributing to this tendon do not express *R10H12-Gal4* contrary to the *sr-lacZ* positive cells of dorsal femur as revealed by *mCherryCAAX* expression (Fig. 2 C). Consequently, *NotchRNAi* is driven in tendon precursors of dorsal femur leading to the strongly reduced level of Notch protein. This down regulation includes the ring of Notch accumulation formed by the invaginating tendon precursors in the dorsal femur (Fig. 2D). In consequence, *sr-lacZ* expression is completely abolished in these cells whereas *sr-lacZ* and Notch expressions in the long tarsal and other

tendons remain intact (Fig. 2 D-F). In order to prove that endogenous *sr* gene expression is also induced by Notch and exclude any RNAi off-target effects, we expressed a Dominant Negative form of Notch (*UAS-NotchDN*) using *R10H12-Gal4* (suppl. Fig. 3). We found that Sr endogenous protein is absent from the dorsal femur region (suppl. Fig. 3D) and as revealed by anti-FasIII immunostaining, no tendon invagination could be detected in this part of the disc (suppl. Fig. 3E).

Overall these results demonstrate that Notch initiates *sr* expression in appendicular tendon precursors but is dispensable for maintenance of *sr* expression. Through the activation of *odd* family genes (Hao et al., 2003; Ibeas and Bray, 2003) Notch appears also involved in making leg tendon precursors competent for invagination. However, because tubular internal tendons are not properly formed when invaginating cells express dominant negative form of Sr (Soler et al., 2016), we hypothesize that completion of internal tendon formation is Sr dependent.

Notch activation is locally sufficient to promote Sr expression and ectopic tendon formation

The Notch signalling pathway is known to promote joint formation during leg disc development. Expression of a constitutively activated form of Notch (Nintra) in sub-domains of leg discs, can lead to the incomplete ectopic joint formation (Bishop et al., 1999; Celis et al., 1998; Rauskolb and Irvine, 1999). As we showed that tendon precursors are specified from true joint cells and that Notch is required to initiate *sr* expression, we tested whether Notch activation could also ectopically induce *sr* by expressing Nintra with the Dpp-Gal4 driver line (Staehling-Hampton et al., 1994) (Fig. 3). Strikingly, we found that although Dpp-Gal4 is expressed in a large antero-dorsal domain of the leg disc, Nintra could only induce *sr-lacZ* in a restricted area next to the tendon precursor in the dorsal femur (Fig. 3D-F). Staining of the apical surface of these cells by anti-FasIII shows that this new cluster of *sr* positive cells initiates invagination in the leg disc epithelium similar to that of endogenous tendon precursors (compare Fig. 3A and 3D). Epithelium folding has already been described upon ectopic expressions of *odd* genes and it has been proposed that these genes, under the control of Notch, can induce essential cell shape rearrangements that trigger the invagination of cells forming the true joints (Hao et al., 2003). In our experiment, *sr* expression is induced only in a subset of cells expressing an activated form of Notch that are in the vicinity of endogenous *sr* positive cells suggesting that other unknown signals could be required to trigger this expression. Ectopic *sr*-expressing cells that are immediate neighbours of endogenous ones could also contribute to the enlargement of the original tendon precursor size in the dorsal femur (Fig. 3D-F). To confirm the possibility that only precisely localized cells are likely to express *sr* after Notch pathway activation, we generated several small clusters of Nintra expressing cells using the Flip-out Gal4 technique (Ito et al., 1997). Although indentations of epithelium are often observed all along the proximo-distal axis when Nintra is ectopically expressed or in *odd* genes flip-out clones (Hao et al., 2003; Rauskolb and Irvine, 1999), only a few Nintra clones could express *sr-lacZ* and form tube-like internal invagination (Fig. 3G-H). Although, capacity of these cells to form these internal tendon-like invaginations can be dependant of the clone size, ectopic tendon-like structures are most commonly found in the vicinity of original tendon precursors.

Thus, we propose that each tendon precursor is specified at the intersection of rings of

Notch activation (true joints) and other local signals such as Hh, Wg or Dpp that establish the different leg discs axes (reviewed in [Estella et al., 2012](#)). The fact that different regulatory combinations of these morphogenes have been found to regulate *sr* expression in embryonic and wing disc epithelia ([Ghazi et al., 2003](#); [Hatini and DiNardo, 2001](#); [Piepenburg et al., 2000](#)), supports this view.

Both Odd-family and Stripe are required for internal leg tendon formation

As *odd* genes are targets of Notch signalling in leg disc ([Hao et al., 2003](#); [Ibeas and Bray, 2003](#)), we wondered whether the absence of these genes could affect *sr* expression. Potential redundancy between different members of this family ([Del Signore et al., 2012](#); [Hao et al., 2003](#)) makes difficult a complete loss of function, however we took advantage of an *UAS-Bowl RNAi* line that is predicted to have *sob* and *odd* as off-targets to reduce the expression of these three *odd* genes ([Del Signore et al., 2012](#)). In *R10H12-Gal4; UAS-Bowl RNAi* leg discs, number of cells expressing *sr* in the dorsal femur is severely reduced compared to the control, indicating that *odd* genes might be required for *sr* expression (Fig. 4). To confirm this, we ectopically expressed the gene *lines* by crossing *UAS-lines* and *R10H12-Gal4* flies. *Lines* and *odd* genes act antagonistically, Lines protein interacts and destabilizes Bowl protein whereas *Drm*, and to a less extent *Odd* and *Sob*, bind Lines to prevent Bowl degradation ([Del Signore et al., 2012](#); [Green et al., 2002](#); [Greenberg and Hatini, 2009](#); [Hatini et al., 2005](#)). Consequently, in leg discs expressing *UAS-lines*, *sr-lacZ* expression is completely abolished in the dorsal femur (suppl. Fig. 4).

One potential reason for *sr* expression being downregulated in *odd* attenuated context is that *odd* genes could act downstream of Notch to control *sr* expression. However, in wild type context not all *odd-lacZ* positive cells express *sr* ([Soler et al., 2004](#); Fig. 1) and more importantly we could not observe any ectopic tendon-like structure in our most recent experiments of *odd*, *sob* or *drm* gain of functions (data not shown) as it is the case when we ectopically express *Nintra* (Fig. 3). Furthermore, we notice that a small group of cells still shows a robust *Sr* expression in *UAS-lines* context (Fig. 4), these cells appear to express a very weak level of *odd-lacZ* in control leg discs (data not shown) suggesting that *sr* could be expressed even in absence of *odd-skipped* genes. Thus, an alternative hypothesis, would be that to induce *sr* expression and internal leg tendon formation, precursor cells should belong to a permissive zone with Notch and *odd* genes “on”. Initiation of *Sr* expression being under the control of Notch and other local extrinsic signals that remain to be identified.

In a previous attempt to disrupt internal leg tendon development, we expressed a dominant negative form of *Sr* (*SrDN*) using *Sr-Gal4* ([Soler et al., 2016](#)) and found that the invagination of internal tendons was severely affected. As this driver was generated by enhancer trap insertion it implies that endogenous *Sr* was expressed prior *SrDN*. In order to determine more precisely whether *Sr* is required for internal invagination of leg tendon precursors, we aimed to completely prevent *sr* expression by using *R10H12-Gal4* that drives *UAS-Sr RNAi* several hours before *sr* was induced in the tendon precursor of the dorsal femur (Fig. 5). As shown in Fig. 5 (A-B), at 5h APF *Sr* protein was completely absent in

dorsal femur while it is still present in other tendon precursors where R10H12-Gal4 is not expressed. In this presumptive area, where the tendon should develop, a bulk of *odd-lacZ* positive cells invaginates but remains in the continuity with the leg disc epithelium as revealed by FasIII staining (Fig. 5C-D'). Thus, *Sr* in CT cell clusters is required to make them competent for invagination and formation of tube-like internal leg tendons.

In summary, our data support a model in which Notch signalling is activated into concentric circles at the boundary between leg segments corresponding to the presumptive joint cells (Bishop et al., 1999; Celis et al., 1998; Mishra et al., 2001; Rauskolb, 2001; Rauskolb and Irvine, 1999) and that some of these cells are committed to tendon precursor fate also in a Notch dependent manner. This restricted induction in sub-domains of true joints suggests that other unidentified signals, most likely Wnt, Dpp and Hh, act in combination with Notch signalling in order to specify each tendon precursor. In our model, Notch pathway triggers expression of both *odd* genes and *sr*; *odd* expression precedes that of *sr* and triggers CT cell shape change prior their invagination; *Sr* is not required for *odd* expression but is subsequently essential to commit *odd*-positive CT cells as precursors of internal leg tendons able to invaginate and to form tube-like structures.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Drosophila stocks and culture

The following Drosophila stocks were used: Dpp-gal4 (BDSC 1553), R10H12-Gal4 (Pfeiffer et al. 2008, BDSC 48278), UAS-mCherryCAAX (BDSC59021), UAS-mCD8GFP (BDSC 32184), Gbe-Su(H)GFP (gift from S.Bray), UAS-Nintra, UAS-Notch^{DN} (gift from S. Artavanis-Tsakonas), UAS-NotchRNAi (BDSC 7078), UAS-BowlRNAi (VDRC 3774), UAS-lin (Greenberg and Hatini, 2009, BDSC 7074), UAS-StripeRNAi (BDSC 27701) and the enhancer trap lines Sr-Gal4^{md710} (Usui et al., 2004, BDSC 2663), sr-lacZ⁰³⁹⁹⁹ (BDSC 11618, Frommer et al., 1996) and odd-lacZ^{rK11} (gift from C.Rauskolb). Experiments using Gal4/UAS system (Brand and Perrimon, 1993) to induce RNAi or cDNA expression, were performed at 25 °C. In all experiments using RNAi to downregulate gene expression, UAS-RNAi lines were used in combination with UAS-Dicer2 allele (BDSC 24650).

For experiment using Notch^{ts1} (BDSC 2533), eggs were collected at 22°C and larvae maintained at this permissive temperature until L2. Larvae were then shifted to 31°C, a restrictive temperature for Notch thermosensitive allele, until dissection.

Flip-out Gal4 clones (Ito et al., 1997) were generated by using HS-Flp ; Tub-STOP-Gal4, UAS-mCD8-GFP line. This line was crossed with UAS-Nintra line, progeny was maintained at 25°C, and clones were induced at 48h-72h AEL for 30min at 37°C.

Immuno-histochemistry and confocal microscopy

Staged larvae and pupae were dissected in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature (for larvae and pupae up to 5h APF). They were then stained with the following primary antibodies: Rabbit anti-Twist (1/500, our lab); mouse anti-FasIII (DHSB, 1/500), chicken anti-lacZ (DHSB, 1/1000), mouse anti-Nintra (DHSB, 1/500), and guinea-pig anti-Stripe (1/1000, gift from T.Volk). The secondary antibodies (dilution 1/500) used were anti-mouse Cy5, anti-mouse Cy3, anti chicken Cy3, anti-chicken 488, anti-GP 488 and anti-rabbit Cy3 (molecular probes or Jackson Immunoresearch). Immuno-staining was visualised on an inverted SP8 Leica confocal microscope and images analysed with Imaris software 7.6.5.

REFERENCES

- Ball, E.E., Ho, R.K., and Goodman, C.S. (1985). Muscle development in the grasshopper embryo: I. Muscles, nerves, and apodemes in the metathoracic leg. *Dev. Biol.* *111*, 383–398.
- Bate, M., Rushton, E., and Currie, D.A. (1991). Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development* *113*, 79–89.
- Becker, S., Pasca, G., Strumpf, D., Min, L., and Volk, T. (1997). Reciprocal signaling between *Drosophila* epidermal muscle attachment cells and their corresponding muscles. *Development* *124*, 2615–2622.
- Bishop, S.A., Klein, T., Arias, A.M., and Couso, J.P. (1999). Composite signalling from Serrate and Delta establishes leg segments in *Drosophila* through Notch. *Development* *126*, 2993–3003.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* *118*, 401–415.
- Broadie, K.S., and Bate, M. (1991). The development of adult muscles in *Drosophila*: ablation of identified muscle precursor cells. *Dev. Camb. Engl.* *113*, 103–118.
- Celis, J.F. de, Tyler, D.M., Celis, J. de, and Bray, S.J. (1998). Notch signalling mediates segmentation of the *Drosophila* leg. *Development* *125*, 4617–4626.
- Del Signore, S.J., Hayashi, T., and Hatini, V. (2012). odd-skipped genes and lines organize the notum anterior-posterior axis using autonomous and non-autonomous mechanisms. *Mech. Dev.* *129*, 147–161.
- Estella, C., Voutev, R., and Mann, R.S. (2012). A Dynamic Network of Morphogens and Transcription Factors Patterns the Fly Leg. *Curr. Top. Dev. Biol.* *98*, 173–198.
- Fernandes, J.J., Celniker, S.E., and VijayRaghavan, K. (1996). Development of the indirect flight muscle attachment sites in *Drosophila*: role of the PS integrins and the stripe gene. *Dev. Biol.* *176*, 166–184.
- Frommer, G., Vorbrüggen, G., Pasca, G., Jäckle, H., and Volk, T. (1996). Epidermal egr-like zinc finger protein of *Drosophila* participates in myotube guidance. *EMBO J.* *15*, 1642–1649.
- Gaut, L., and Duprez, D. (2015). Tendon development and diseases. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* n/a-n/a.
- Ghazi, A., Paul, L., and VijayRaghavan, K. (2003). Prepattern genes and signaling molecules regulate stripe expression to specify *Drosophila* flight muscle attachment sites. *Mech. Dev.* *120*, 519–528.
- Green, R.B., Hatini, V., Johansen, K.A., Liu, X.-J., and Lengyel, J.A. (2002). Drumstick is a zinc finger protein that antagonizes Lines to control patterning and morphogenesis of the *Drosophila* hindgut. *Development* *129*, 3645–3656.
- Greenberg, L., and Hatini, V. (2009). Essential roles for lines in mediating leg and antennal proximodistal patterning and generating a stable Notch signaling interface at segment borders. *Dev. Biol.* *330*, 93–104.
- Hao, I., Green, R.B., Dunaevsky, O., Lengyel, J.A., and Rauskolb, C. (2003). The odd-skipped family of zinc finger genes promotes *Drosophila* leg segmentation. *Dev. Biol.* *263*, 282–295.
- Hasson, P. (2011). “Soft” tissue patterning: Muscles and tendons of the limb take their form. *Dev.*

Dyn. 240, 1100–1107.

Hatini, V., and DiNardo, S. (2001). Distinct signals generate repeating striped pattern in the embryonic parasegment. *Mol. Cell* 7, 151–160.

Hatini, V., Green, R.B., Lengyel, J.A., Bray, S.J., and DiNardo, S. (2005). The Drumstick/Lines/Bowl regulatory pathway links antagonistic Hedgehog and Wntless signaling inputs to epidermal cell differentiation. *Genes Dev.* 19, 709–718.

Huang, A.H. (2017). Coordinated development of the limb musculoskeletal system: Tendon and muscle patterning and integration with the skeleton. *Dev. Biol.* 429, 420–428.

Ibeas, J.M. de C., and Bray, S.J. (2003). Bowl is required downstream of Notch for elaboration of distal limb patterning. *Development* 130, 5943–5952.

Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., and Yamamoto, D. (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124, 761–771.

Jory, A., Estella, C., Giorgianni, M.W., Slattery, M., Lavery, T.R., Rubin, G.M., and Mann, R.S. (2012). A survey of 6,300 genomic fragments for cis-regulatory activity in the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Cell Rep.* 2, 1014–1024.

Lejard, V., Blais, F., Guerquin, M.-J., Bonnet, A., Bonnin, M.-A., Havis, E., Malbouyres, M., Bidaud, C.B., Maro, G., Gilardi-Hebenstreit, P., et al. (2011). EGR1 and EGR2 Involvement in Vertebrate Tendon Differentiation. *J. Biol. Chem.* 286, 5855–5867.

Levine, A., Weiss, C., and Wides, R. (1997). Expression of the pair-rule gene odd Oz (odz) in imaginal tissues. *Dev. Dyn.* 209, 1–14.

Maqbool, T., Soler, C., Jagla, T., Daczewska, M., Lodha, N., Palliyil, S., VijayRaghavan, K., and Jagla, K. (2006). Shaping leg muscles in *Drosophila*: role of ladybird, a conserved regulator of appendicular myogenesis. *PloS One* 1, e122.

Miller, A. (1950). The internal anatomy and histology of the imago of *Drosophila melanogaster*. In *Biology of Drosophila*, (New York: John Wiley & Sons), pp. 420–531.

Mirth, C., and Akam, M. (2002). Joint Development in the *Drosophila* Leg: Cell Movements and Cell Populations. *Dev. Biol.* 246, 391–406.

Mishra, A., Agrawal, N., Banerjee, S., Sardesai, D., Dalal, J.S., Bhojwani, J., and Sinha, P. (2001). Spatial regulation of DELTA expression mediates NOTCH signalling for segmentation of *Drosophila* legs. *Mech. Dev.* 105, 115–127.

Nassari, S., Duprez, D., and Fournier-Thibault, C. (2017). Non-myogenic Contribution to Muscle Development and Homeostasis: The Role of Connective Tissues. *Front. Cell Dev. Biol.* 5.

de Navascués, J., Perdigoto, C.N., Bian, Y., Schneider, M.H., Bardin, A.J., Martínez-Arias, A., and Simons, B.D. (2012). *Drosophila* midgut homeostasis involves neutral competition between symmetrically dividing intestinal stem cells. *EMBO J.* 31, 2473–2485.

Pfeiffer, B.D., Jenett, A., Hammonds, A.S., Ngo, T.-T.B., Misra, S., Murphy, C., Scully, A., Carlson, J.W., Wan, K.H., Lavery, T.R., et al. (2008). Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9715–9720.

Piepenburg, O., Vorbrüggen, G., and Jäckle, H. (2000). *Drosophila* Segment Borders Result from

- Unilateral Repression of Hedgehog Activity by Wingless Signaling. *Mol. Cell* 6, 203–209.
- Radnikow, G., and Bässler, U. (1991). Function of a Muscle Whose Apodeme Travels Through a Joint Moved by Other Muscles: Why the Retractor Unguis Muscle in Stick Insects is Tripartite and has no Antagonist. *J. Exp. Biol.* 157, 87–99.
- Rauskolb, C. (2001). The establishment of segmentation in the *Drosophila* leg. *Development* 128, 4511–4521.
- Rauskolb, C., and Irvine, K.D. (1999). Notch-Mediated Segmentation and Growth Control of the *Drosophila* Leg. *Dev. Biol.* 210, 339–350.
- Soler, C., Daczewska, M., Da Ponte, J.P., Dastugue, B., and Jagla, K. (2004). Coordinated development of muscles and tendons of the *Drosophila* leg. *Dev. Camb. Engl.* 131, 6041–6051.
- Soler, C., Laddada, L., and Jagla, K. (2016). Coordinated Development of Muscles and Tendon-Like Structures: Early Interactions in the *Drosophila* Leg. *Front. Physiol.* 7.
- Stahling-Hampton, K., Jackson, P.D., Clark, M.J., Brand, A.H., and Hoffmann, F.M. (1994). Specificity of bone morphogenetic protein-related factors: cell fate and gene expression changes in *Drosophila* embryos induced by decapentaplegic but not 60A. *Cell Growth Differ.* 5, 585.
- Suzanne, M. (2016). Molecular and cellular mechanisms involved in leg joint morphogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 55, 131–138.
- Tajiri, R., Misaki, K., Yonemura, S., and Hayashi, S. (2010). Dynamic shape changes of ECM-producing cells drive morphogenesis of ball-and-socket joints in the fly leg. *Development* 137, 2055–2063.
- Usui, K., Pistillo, D., and Simpson, P. (2004). Mutual exclusion of sensory bristles and tendons on the notum of dipteran flies. *Curr. Biol. CB* 14, 1047–1055.
- Volk, T. (1999). Singling out *Drosophila* tendon cells: a dialogue between two distinct cell types. *Trends Genet. TIG* 15, 448–453.
- Volohonsky, G., Edenfeld, G., Klämbt, C., and Volk, T. (2007). Muscle-dependent maturation of tendon cells is induced by post-transcriptional regulation of stripeA. *Dev. Camb. Engl.* 134, 347–356.
- Vorbrüggen, G., and Jäckle, H. (1997). Epidermal muscle attachment site-specific target gene expression and interference with myotube guidance in response to ectopic stripe expression in the developing *Drosophila* epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8606–8611.

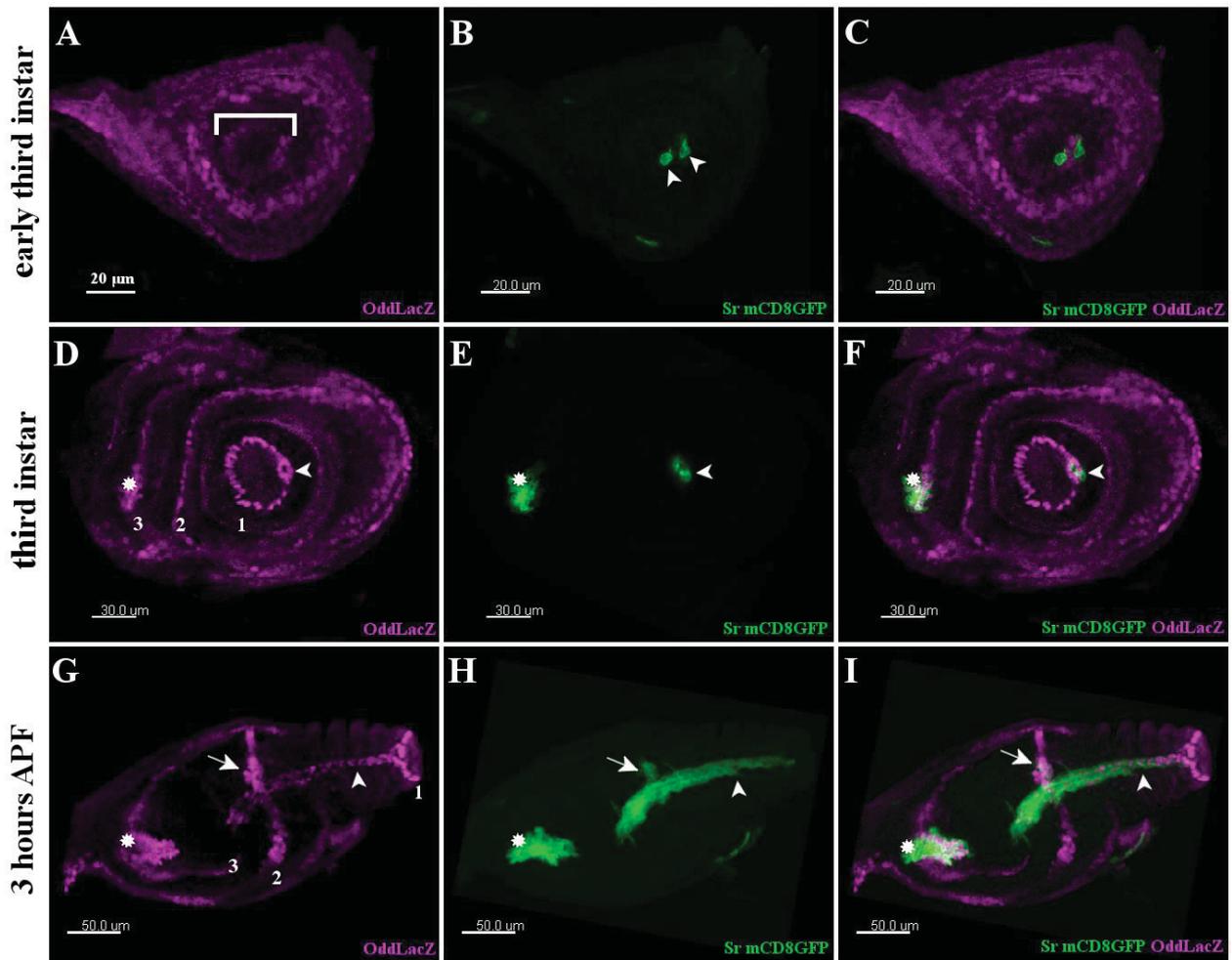


Figure 1: Tendon precursors arise from odd-skipped positive cells.

Confocal images of leg imaginal discs, tendon precursors are revealed by Stripe-Gal4>UAS-mCD8GFP (green) with respect to odd^{RK11lacZ} expression in segmental true joints (magenta). (A-C) Early third instar leg disc. Expression of Sr>GFP is first detected in a few cells (arrowheads) in a distal ring of Odd-lacZ expressing cells at the presumptive junction between pre-tarsus and T5 tarsus (bracket). (D-F) During the third larval instar leg disc, additional tendon precursors expressing Sr>GFP appear while leg segmentation progresses with the apparition of new rings of Odd-lacZ cells. In these optical sections, true joint between pre-tarsus and T5 is clearly visible (Odd-lacZ ring 1 in D), along this true joint a group of cells form a small ring surrounding a lumen (arrowhead in D and F), they express Sr>GFP and correspond to the long internal tendon of tarsi (arrowhead in E and F), note that only cells at the surface are visible on these sections. At this stage, Sr>GFP expression is not detected yet along the true joint between tibia and T1 tarsus (ring 2 in D), whereas Sr>GFP expression has begun in a group of cells in the dorsal femur (stars in E and F) at femur-tibia junction (Odd-lacZ ring 3 of in D), these cells will form the future tendon in the dorsal femur. (G-I) In everting leg disc at 3 hours after pupae formation, all tendon precursors of leg muscles have been set up, they all co-expressed Sr>GFP and Odd-lacZ. In these selected optical sections, we can discern the two earliest tendons: the long invaginating tendon (arrowhead) that arises from most distal true joint (Odd-lacZ ring 1 in G) and runs through the tarsus segment up to the femoral segment (see Soler et al. 2004) and the tendon precursor (stars) associated to the femur-tibia true joint (Odd-lacZ ring 3 in G) beginning to invaginate. Note also the nascent tendon precursor expressing Sr>GFP (arrows) along the tibia-tarsus T1 true joint (Odd-lacZ ring 2 in G).

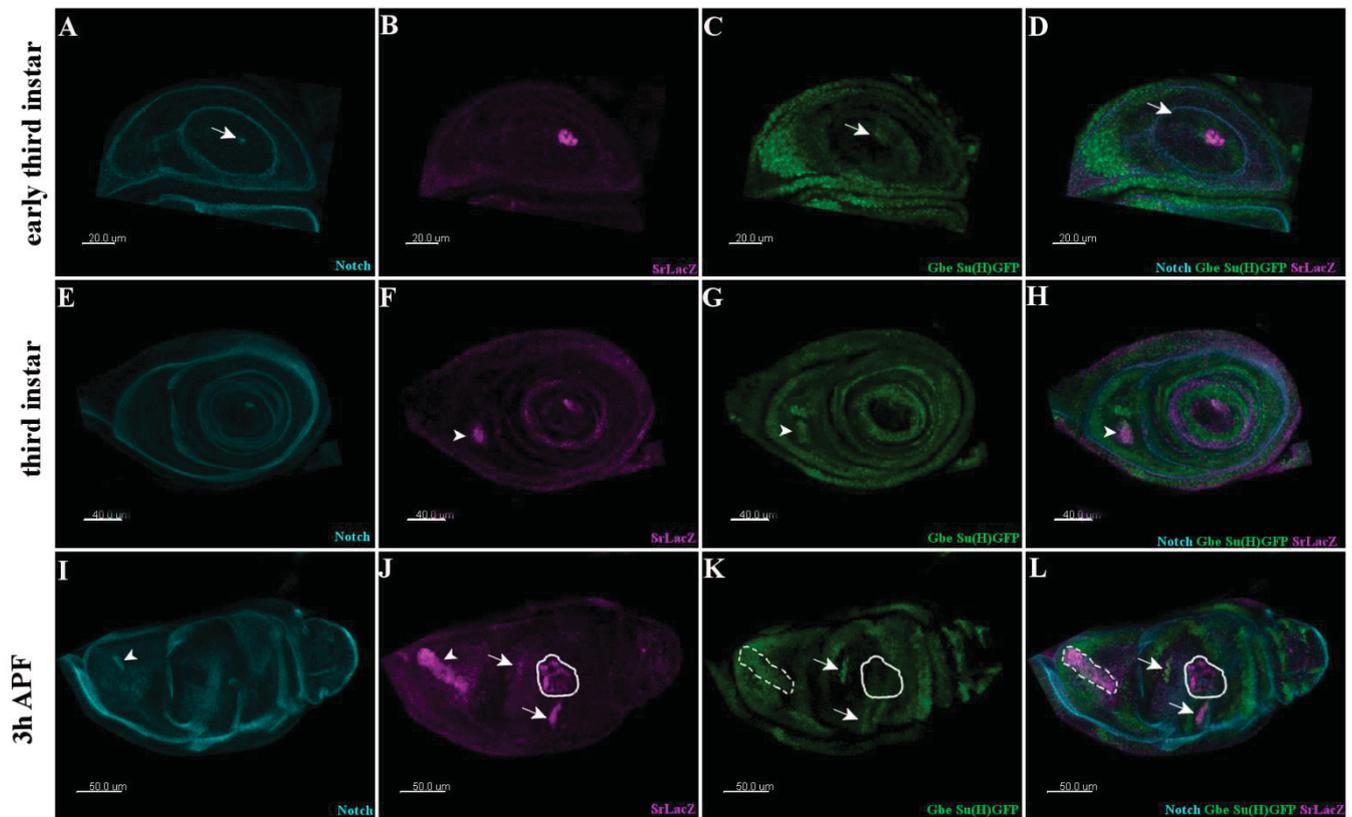


Figure supplemental 1: Notch pathway activity in tendon precursors.

Expression of Notch (cyan), Sr-lacZ (magenta) and Gbe-Su(H)-GFP (green) in leg imaginal discs. (A-D) in early third instar, Notch protein (arrow in A) is detected in a small ring in the centre of the disc corresponding to the apical surface of a group of Sr-LacZ positive cells (B), these cells express the reporter of Notch pathway activity Gbe-Su(H)-GFP (arrow in C and D). (E-H) From mid third instar Sr-lacZ accumulates in developing tendon of dorsal femur following expression of Notch protein and Gbe-Su(H)-GFP (arrowheads). (I-L) during metamorphosis, Notch expression at the apical surface of Sr-lacZ positive cells in dorsal femur outlines the lumen formed by the invagination of the tendon precursors (arrowhead in I and J), these cells show Notch positive activity (dotted circled area in K and L). Other later tendon precursors accumulating Gbe-Su(H)-GFP appear in other segments (arrows in J-L) while Gbe-Su(H)-GFP expression decreases in the earliest developing tendon in tarsi, only cells at the extremity of this tendon are visible in these sections (circled area in J-L).

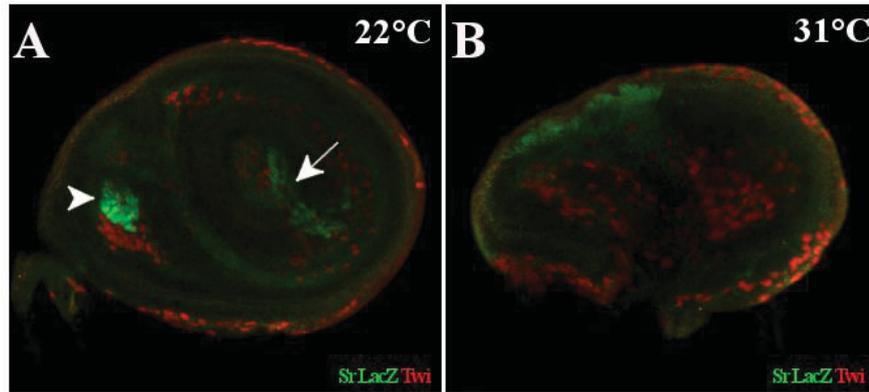


Figure supplemental 2: Reduction of Notch pathway activity affects Stripe expression. (A) Sr-lacZ expression (green) in dorsal femur tendon (arrowhead) and in long tendon of tarsi (arrow) in Notch^{ts} mid third instar leg disc raised at permissive temperature (22°C). (B) In leg disc raised at non-permissive temperature (31°C), Sr-lacZ expression is completely abolished. Staining against Twist shows myoblasts.

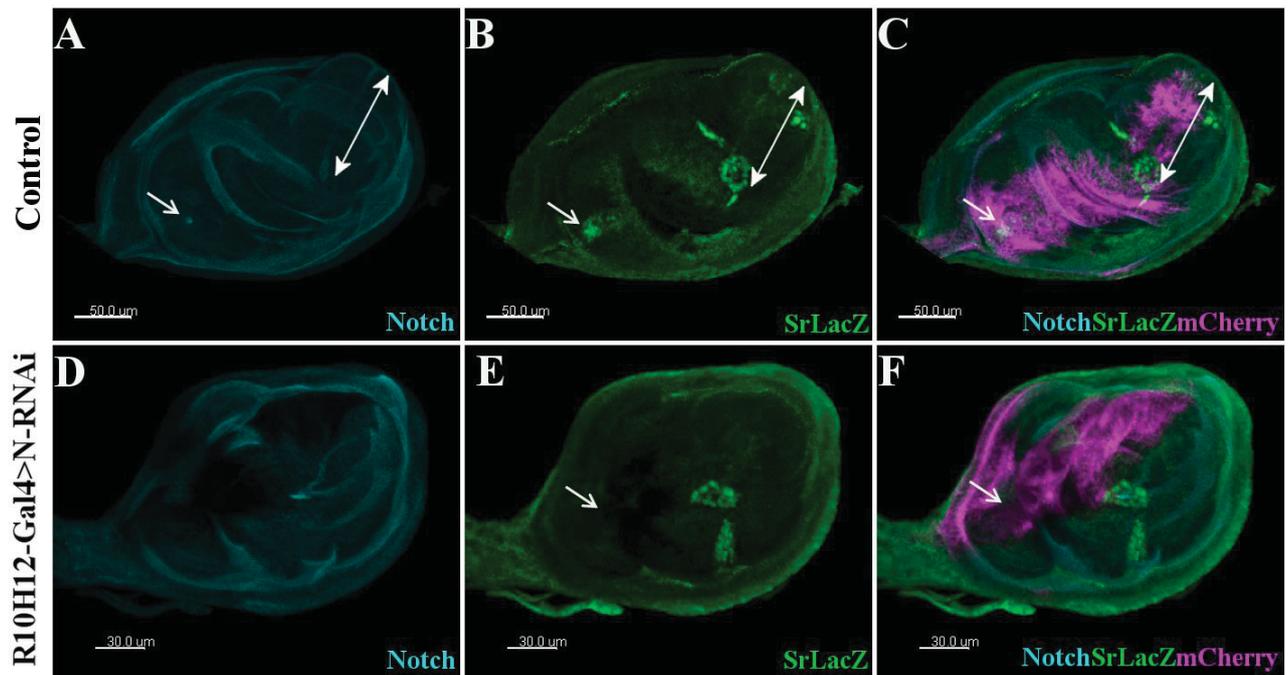


Figure 2: Notch signalling is required for Stripe expression.

Notch expression (cyan) and Sr-lacZ expression (green) in control leg disc R10H12-Gal4>UAS-mcherryCAAX (magenta), (A-C) and in R10H12-Gal4>UAS-mcherryCAAX, UAS-Notch-RNAi leg disc (D-F) at 0h APF. (A-C) In shown optical sections, Notch protein is detected in invaginating tendons, note the internal tube form by the long tendon from pre-tarsus/T5 junction (double arrow) and the ring formed by the lumen aperture in the dorsal femur (arrow). R10H12-gal4 pattern overlap with the tendon precursor in the dorsal femur but not with long tendon in the tarsi (merge in C). (D-F) expression of UAS Notch-RNAi strongly repressed Notch expression in R10H12-gal4 pattern (D and merge in F), in this region Sr-lacZ expression is not detected anymore (arrow in E and F).

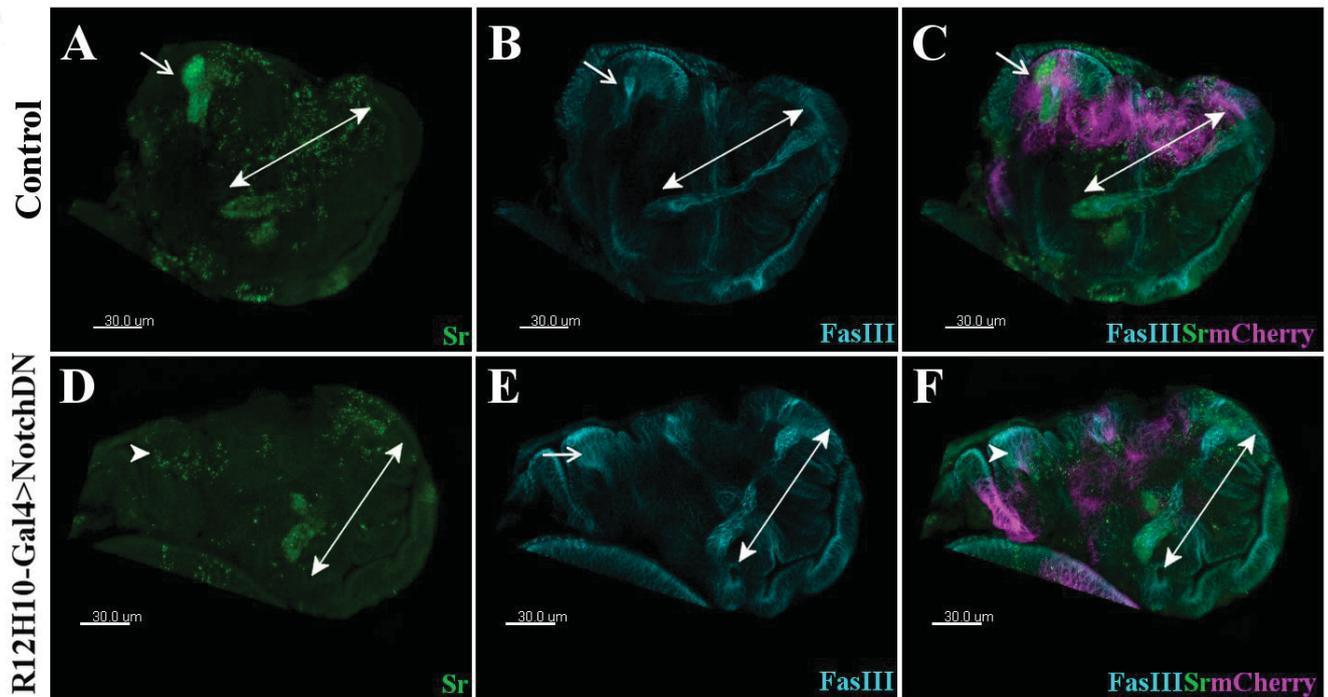


Figure supplemental 3: Expression of a dominant negative form of Notch receptor leads to downregulation of Stripe protein.

Immunostaining against Stripe protein (green) and FasIII protein (cyan) in R10H12-Gal4>UAS-mcherryCAAX (magenta) leg disc at 0h APF. (A-C) In control leg disc, tubes formed by invagination of Sr positive cells in dorsal femur (arrow) and tarsi (double arrow) are prominently displayed with FasIII staining. (D-F) in leg disc expressing UAS-NotchDN in R10H12-Gal4 pattern, Sr expression is absent in dorsal femur (arrowhead in D and F), arrow in E indicates FasIII accumulation at apical region of cells that failed to create an internal tube. Note that R10H12-Gal4 is not expressed in tendon precursors in the tarsi and consequently Sr and Fas III expression are not affected and these cells can form a long internal tube (double arrow in D-F).

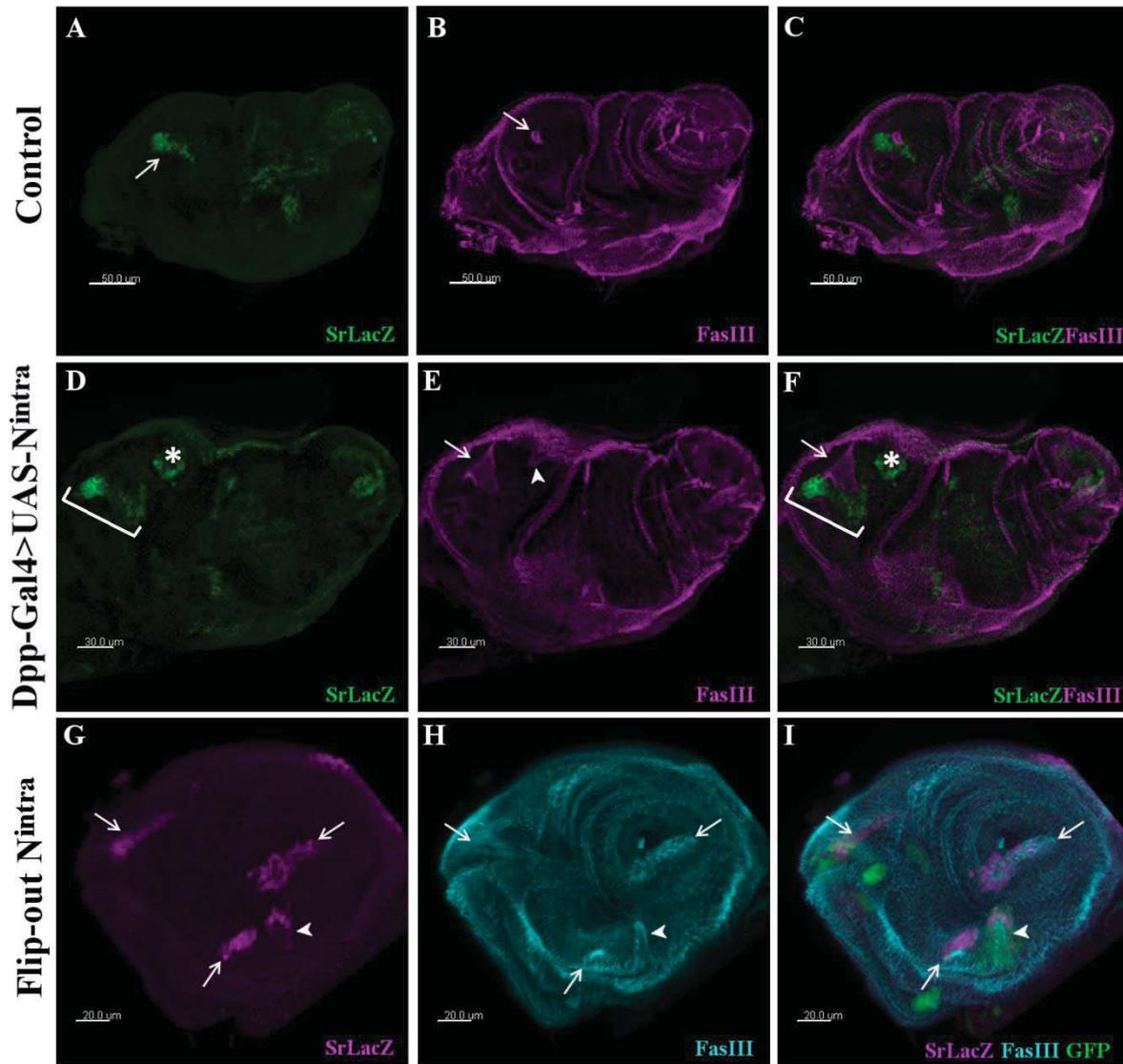


Figure 3: Expression of an activated form of Notch causes ectopic expression of Sr-LacZ and leads to ectopic tendon formation.

(A-C) Confocal sections of a control leg disc at 0h APF, arrow indicates Sr-lacZ positive cells (green) forming the tendon precursor in the dorsal femur, accumulation of FasIII (magenta) at the apical surfaces of these cells outlines the lumen formation. (D-F) Confocal sections of a leg disc at 0h APF expressing activated Notch (N^{intra}) in a large antero-dorsal domain (Dpp-gal4>UAS-N^{intra}), a greater number of Sr-lacZ positive cells participate to the tendon precursor in the dorsal femur (bracket in D and F) compared to control (A) and consequently a wider lumen aperture is formed from these cells as revealed by FasIII staining (arrow in E and F). In the dorsal femur expression of N^{intra} induces SrlacZ expression in a new group of cells (star in D and F) that invaginate and start to form a new tube (arrowhead in E). (G-I) Clone of cells ectopically expressing N^{intra}, marked by coexpression of GFP (green in I) in third larval instar leg disc. Sr-lacZ marked original tendon precursors (arrows) and is also induced in one clone in dorsal femur that undergoes invagination and tubulogenesis (arrowheads). Note the presence of N^{intra} clones that do not express Sr-LacZ.

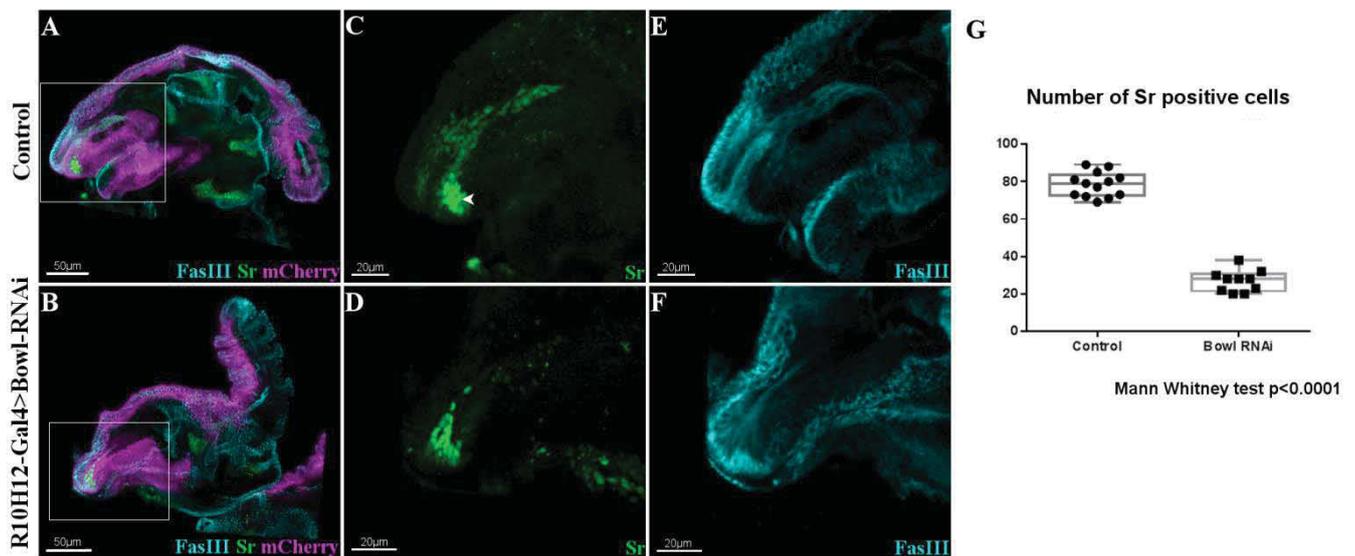


Figure 4: Down-regulation of *odd-skipped* genes affects *stripe* expression.

Confocal sections of R10H12-Gal4>UAS-mcherryCAAX (magenta) leg discs at 5h APF immunostained with anti-Sr (green) and anti-FasIII (cyan). (A) Control leg disc and (B) leg disc expressing UAS-BowlRNAi. (C) and (E) higher magnifications from (A) showing Sr expressing cells forming a long internal tube that elongates into the dorsal femur cavity, note the group of cells expressing high level of Sr at the base of the tendon (arrowhead in C). (D) and (F) higher magnifications from (B), number of cells expressing Sr is significantly reduced after Bowl-RNAi expression (D), remaining Sr positive cells can still invaginate and forms a tube reduced in size (compare F with E). (G) Box-plot diagram comparing the number of Sr positive cells in the tendon precursor of dorsal femur, in control and after expression of UAS-BowlRNAi, 13 and 11 leg discs were analysed respectively.

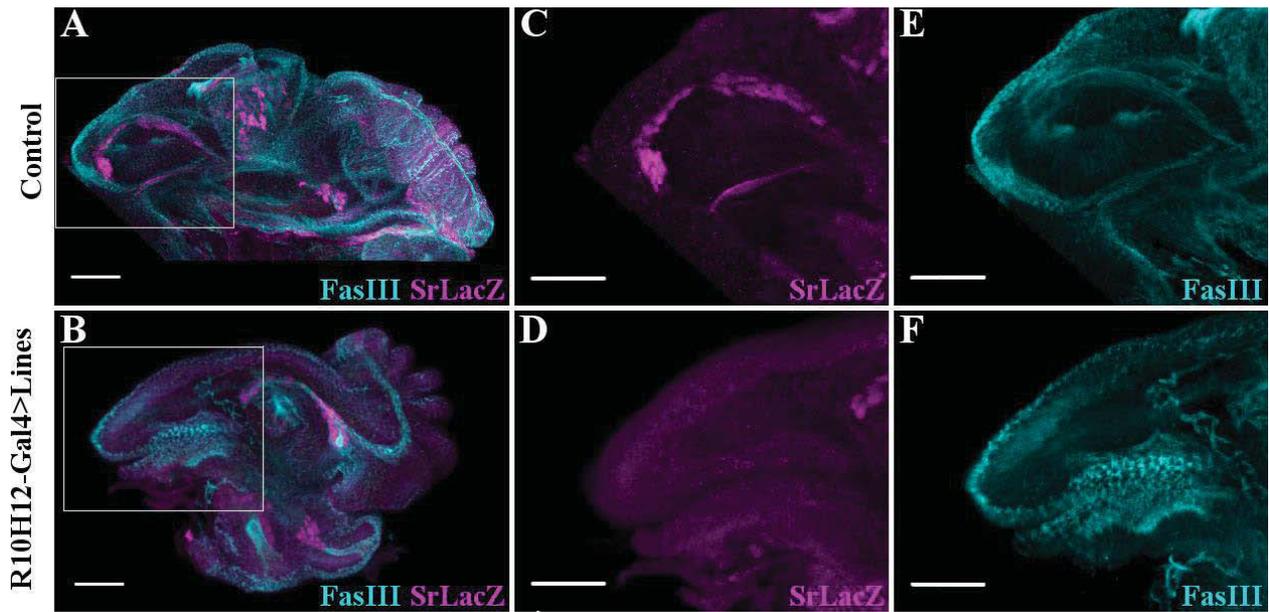


Figure supplemental 4: expression of *Lines* disrupts *stripe-lacZ* expression

Confocal sections of R10H12-Gal4 ; Sr-lacZ leg discs at 5h APF immunostained with anti-lacZ (magenta) and anti-FasIII (cyan). (A) Control leg disc and (B) leg disc expressing UAS-*Lines*. (C) and (E) higher magnifications from (A) showing Sr-LacZ expression in cells forming a long internal tube that elongates into the dorsal femur cavity. (D) and (F) higher magnifications from (B), Sr-LacZ expression is completely abolished in dorsal femur after *Lines* expression (D), no invaginating tube can be formed from the epithelial cells in the dorsal femur cavity (compare F with E).

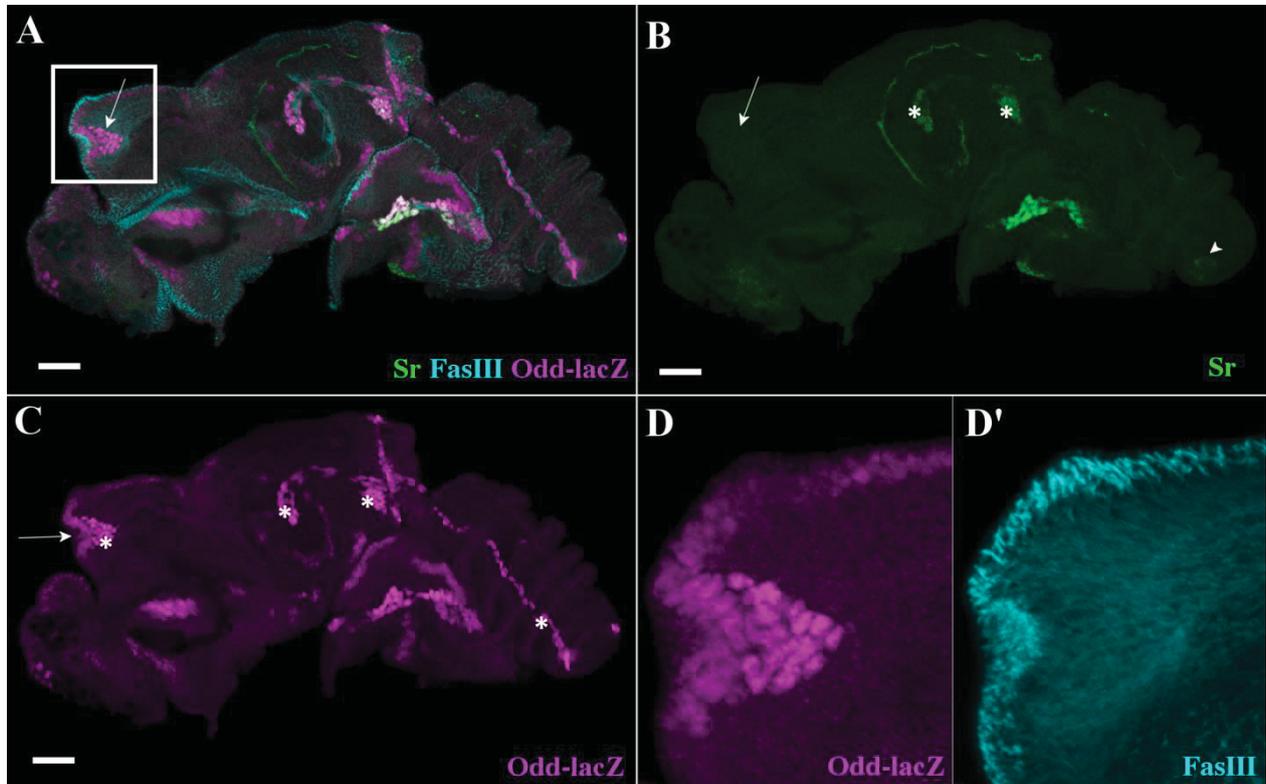


Figure 5 : Odd-LacZ cells cannot undergo tubulogenesis without *stripe* expression.

(A) Confocal sections of R10H12-Gal4;odd-lacZ>UAS-SrRNAi leg discs at 5h APF immunostained with anti-lacZ (magenta) and anti-FasIII (cyan) and anti-Sr (green). (B) Single channel showing complete absence of Sr expression in dorsal femur where R10H12-Gal4 drives UAS-SrRNAi expression (arrow in A and B). Inversely, Sr is still expressed in other tendon precursors (stars), note that Sr expression starts to decrease at this stage in the late long tendon of tarsi (arrowheads). (C) Single channel showing odd-lacZ expression, odd-lacZ is maintained in all tendon precursors (stars) and in true joints. In the dorsal femur, odd-lacZ expressing cells invaginate but cannot form a tube (arrow). (D) and (D') High magnification from (A) for odd-lacZ and FasIII channels respectively. FasIII accumulation at disc surface indicates that odd-lacZ cells trigger the folding of the epithelium but remain part of it and do not form a tube. Scale bar 30 μ m.

Discussion

“ ...Les plus grands défis ne sont pas surmontés quand nos prédictions sont exactes, mais quand elles ne le sont pas ! Nous découvrons alors de nouvelles informations qui nous obligent à modifier tout ce que nous croyions savoir. ”

Stephen Hawking/Georges et le Big Bang 2011

Interactions muscle-tendon au cours du développement chez les vertébrés et chez la drosophile

Lors du développement, les interactions entre les précurseurs des différents tissus composant un même organe sont nécessaires au bon déroulement des étapes ultérieures de sa formation. Ainsi, des expériences menées sur des embryons de poulet ont mis en évidence que les signaux impliqués dans la différenciation et l'organisation des muscles et des tendons provenaient en partie des interactions réciproques entre ces deux tissus (Kardon, 1998 ; Brent *et al.*, 2003).

Chez les vertébrés, les progéniteurs des tendons axiaux proviennent d'un sous-domaine dorsal du sclérotome, appelé syndetome, qui est immédiatement adjacent au myotome d'où proviennent les cellules myogéniques (Brent *et al.*, 2003). La proximité du myotome et du syndetome reflète la dépendance de ce dernier aux signaux émanant du myotome qui sont en l'occurrence les signaux FGF (Brent et Tabin, 2004; Brent *et al.*, 2005; Chen et Galloway, 2014). Les interactions entre les progéniteurs tendineux et musculaires interviennent donc très précocement dans les premières étapes du développement des tendons axiaux chez les vertébrés. D'autre part, les progéniteurs des tendons des membres et des muscles cranio-faciaux émergent indépendamment des progéniteurs musculaires (Kardon, 1998, Schweitzer *et al.*, 2010). Cependant, plus tardivement les muscles sont requis pour la différenciation finale et le maintien des tendons (Edom-Vovard *et al.*, 2002; Grenier *et al.*, 2009).

Inversement, l'influence des tendons sur le développement des muscles a aussi été montrée. Des expériences d'ablation des progéniteurs tendineux menées chez le poulet ont pour conséquence la formation de fibres musculaires ectopiques, indiquant que les tendons peuvent participer à la délimitation des régions où peuvent se former les muscles (Kardon, 1998).

Ainsi chez les vertébrés, aussi bien aux stades précoces que tardifs du développement, la formation du système musculo-squelettique repose en partie sur des interactions entre les muscles et les tendons.

Chez la drosophile, les interactions muscles-tendons sont aussi observées lors de la myogenèse embryonnaire ; les précurseurs de tendons sécrètent des molécules de signalisation impliquées dans le guidage et la fixation des muscles. Ainsi le ligand Slit, exprimé par certains précurseurs tendineux, interagit avec ses récepteurs Robo 1 et 2 situés sur la membrane des myotubes permettant leur migration vers leurs sites d'attachement (Kramer *et al.*, 2001; Volohonsky *et al.*, 2007). Réciproquement, les fibres musculaires produisent le ligand au récepteur EGFR ; Vein, qui active la voie EGF dans les cellules tendons ce qui permet leur différenciation terminale et l'établissement de la jonction myotendineuse (Yarnitzky *et al.*, 1997). Au cours de la myogenèse adulte, certains auteurs ont émis l'hypothèse que la spécification des cellules fondatrices des muscles de vol pourrait nécessiter la mise en place d'interactions précoces entre les myoblastes et les précurseurs de tendons (Dutta *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a clairement été démontré que l'ancrage des myotubes à leurs sites d'attachement était requis pour permettre les premières contractions à l'origine de la formation et de l'assemblage des myofibrilles composant les muscles indirects de vol (Weitkunat *et al.*, 2014 ; 2017).

Lors de la myogenèse appendiculaire, l'association temporelle et spatiale étroite du développement des muscles et des tendons suggère la présence d'interactions précoces entre ces deux tissus (Soler *et al.*, 2004). Afin de démontrer la présence de telles interactions puis de les caractériser, mon travail de thèse a consisté, d'une part à élaborer de nouveaux outils permettant de suivre et visualiser ces interactions potentielles, et d'autre part tester leur fonction au cours du développement musculaires.

Mise en place des outils pour caractériser les interactions entre les précurseurs de tendons et les myoblastes

Une partie de mon travail de thèse a été de développer les outils nécessaires à l'observation de ces interactions et ainsi caractériser le positionnement des précurseurs l'un par rapport à l'autre et mettre en évidence leur proximité spatiale lors du développement du disque de patte. Contrairement aux expériences d'immunomarquages classiquement utilisées reposant principalement sur de l'imagerie à partir de tissu fixé correspondant à un temps T du développement, l'imagerie *ex vivo* m'a permis pour la première fois d'observer en temps réel les étapes précoces du développement des précurseurs de tendons et des myoblastes au sein du disque de patte en culture. La mise en place d'un tel protocole à partir de culture de disque de patte *ex vivo*, m'a permis de confirmer la présence de nombreuses projections cytoplasmiques à l'extrémité basale des tendons en cours d'invagination et de pouvoir observer pour la première fois leur dynamique. Ces fines projections riches en actine et relativement longues (jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres) s'apparentent à des filopodes.

De telles structures ont été décrites dans de nombreux types cellulaires. Ainsi lors de la formation des myotubes, des filopodes sont émis à chaque extrémité de ce dernier et ont un rôle de senseurs de l'environnement afin de repérer les sites d'attachement (Schnorrer et Dickson, 2004). Dans notre modèle, les myoblastes n'ont pas encore fusionné et les filopodes observés sont émis par les cellules des précurseurs de tendon. De manière intéressante, j'ai pu noter que non seulement ces filopodes étaient orientés en direction des myoblastes, mais aussi qu'au fur et à mesure que le tendon se développait, ils se situaient préférentiellement sur la face le long de laquelle se positionnent les myoblastes. Ces observations nous incitent donc fortement à penser que ces structures ont un rôle à jouer dans les interactions tendon-myoblastes. L'une de nos hypothèses est que ces filopodes pourraient être le vecteur d'informations nécessaires à la spécification et ou à la différenciation des myoblastes.

Ce type de filopodes spécialisés à base d'actine et médiateur d'une voie de signalisation sont appelés cytonèmes (Ramirez-Weber et Kornberg, 1999; Kornberg, 2014).

Les cytonèmes sont décrits dans plusieurs modèles comme étant responsables de la distribution spatiale et temporelle précise de molécules de signalisation. Par exemple, lors de l'établissement de l'axe antéro-postérieur du disque d'aile, des cytonèmes du côté antérieur du disque, sont orientés vers une source de signal Dpp (TGF β) (Hsiung *et al.*, 2005). A l'extrémité de ces cytonèmes, se trouve la protéine Thickvein, récepteur de Dpp (Hsiung *et al.*, 2005). Dans un autre exemple, également dans le disque d'aile et plus précisément dans la partie notum, les cytonèmes se projettent à partir de précurseurs de trachées « air sac primordium » (ASP) en réponse aux signaux Dpp et FGF (Sato et Kornberg, 2002; Roy *et al.*, 2014). Les points de contact produits par ces cytonèmes ont aussi pu être caractérisés par la méthode GRASP (Roy *et al.*, 2014). Cette méthode a aussi été utilisée *in vivo* dans une étude récente montrant l'implication des cytonèmes dans la propagation de la signalisation Hh (Gonzalez-Mendez *et al.*, 2017).

Au cours de ma thèse nous avons également développés les outils nécessaires à l'utilisation de la méthode GRASP dans nos tissus. Cette méthode m'a d'ailleurs permis de montrer que les membranes des précurseurs de tendons et des myoblastes étaient suffisamment proches pour permettre localement l'établissement d'une signalisation. A l'avenir, il sera tout à fait envisageable de combiner le protocole d'imagerie *ex vivo* avec cette méthode GRASP pour mettre en évidence les points de contacts, de manière dynamique (transitoire), potentiellement établis par les filopodes.

Cependant dans le but de mieux caractériser et étudier ces filopodes, il conviendra de développer ou d'adapter les outils numériques existants pour mesurer différents paramètres, tels que leur longueur moyenne et au cours du temps, leur durée de vie, leurs vitesses d'allongement/rétraction. Une fois ces outils mis en place il est prévu d'altérer l'expression de certains acteurs régulant la polymérisation d'actine à l'origine de la formation de filopodes. Pour ce faire, il est possible par

exemple de cibler par ARN interférence les gènes impliqués dans la nucléation et/ou la croissance du cytosquelette d'actine tels que les gènes de la famille des formines impliqués dans la croissance des filaments d'actine (*diaphanous*, *DAAM*...), certaines *rhoGTPases* (*Cdc42*) ou encore les gènes du type *ena* ou codant pour les protéines du complexe Arp2/3.

Impact de l'altération des précurseurs de tendon sur les myoblastes et réciproquement

En parallèle nous avons réalisé des expériences afin de tester si la présence des précurseurs de tendons pouvait avoir une influence sur les myoblastes et inversement. Le but de ces expériences était de déterminer si des interactions sont en effet nécessaires pour le développement correct de chacun de ces tissus, ou bien si chaque tissu peut se développer indépendamment l'un de l'autre. Ainsi, nous avons observé le comportement des myoblastes dans un contexte où le développement des tendons est altéré, et réciproquement, analyser le développement des tendons en absence de myoblastes. Ces expériences montrent qu'à des stades précoces, l'altération du développement des tendons entraîne une désorganisation spatiale des myoblastes environnants. Nous avons aussi voulu vérifier si cela avait un impact sur la spécification des cellules fondatrices caractérisées par l'expression du récepteur *Dumbfounded* (Ruiz-Gomez *et al.*, 2012) pouvant jouer sur les événements de fusion ultérieurs. Nos résultats préliminaires montrent que dans le contexte *Sr-gal4>UAS-SrDN*, l'expression de du transgène rapporteur *duf-LacZ* ne semble pas affecté.

Cependant il est prévu de reconcevoir ces expériences de manière à prévenir totalement la spécification des cellules tendons. Pour cela nous disposons maintenant de lignées pilotes *Gal4 (R10H12-gal4)* pouvant induire l'expression dès le 2eme stade larvaire d'un transgène (*SrDN* ou *SrRNAi*) dans la région dorsale du disque, en incluant la zone où les précurseurs de tendon du fémur dorsal doivent être spécifiés. Avec cette lignée nous pouvons donc exprimer l'ARN interférent dirigé contre *sr* avant l'induction de ce dernier et empêcher la spécification des cellules de l'épithélium du disque en cellules tendons, et ainsi s'assurer qu'aucun contact n'a pu s'établir avec les myoblastes. Dans ce contexte, nous pourrions déterminer précisément si l'absence des tendons a un impact sur la spécification des myoblastes

entant que cellules fondatrices. Ce type d'expériences nous permettra également, à travers l'expression des gènes d'identité *ladybird* au niveau des myoblastes (Maqbool *et al.*, 2006), d'observer si cette absence complète de précurseurs de tendon a un impact sur l'identité des myoblastes.

Une autre expérience intéressante dans ce contexte est la création de tendons ectopiques. Une expérience pilote avait déjà été réalisée au sein du laboratoire, elle a consisté à utiliser la technique de clone d'expression (Ito *et la.*, 1997) dans le but de créer des tendons ectopiques. Cette technique permet d'analyser des groupes (clones) de cellules exprimant ectopiquement le gène *sr* dans le disque de patte. La difficulté étant de créer des clones de tailles adéquates dans un timing précis. Les résultats obtenus alors étaient relativement compliqués à interpréter, avec des clones de taille trop importante et par conséquent souvent très proches des tendons endogènes. Depuis, mon travail sur la voie Notch et la création de clones d'expression Notch m'ont permis d'affiner cette méthode et nous sommes maintenant capables de créer des tendons ectopiques adaptés pour ce genre d'analyse (cf résultats deuxième partie). Nos résultats les plus récents laissent penser que certains myoblastes pourraient s'associer aux tendons nouvellement formés. Ceci suggère que les tendons pourraient avoir la capacité d'attirer/retenir les myoblastes dans leur voisinage,

Enfin, au cours de ma thèse, j'ai testé si l'absence de myoblastes pouvait impacter le développement précoce des tendons. Nos résultats ont montré que l'absence des myoblastes ne semble pas affecter ni la spécification, ni le développement précoce (invagination/élongation) des précurseurs de tendons. En effet, jusqu'à 5h APF, l'expression de *sr* n'est pas affectée et le développement des tendons semble tout à fait normal.

Par ailleurs, il serait intéressant de regarder la dynamique des filopodes en absence des myoblastes. En effet, en partant du principe que les filopodes véhiculent un ligand/récepteur, leur dynamique pourrait être modulée en fonction de la disponibilité du ligand/récepteur en question (Hsiung *et al.*, 2005).

Analyse transcriptomique des interactions myoblastes/précurseurs de tendon

Dans le but de caractériser plus précisément les acteurs des interactions entre les myoblastes et les précurseurs de tendons, l'acquisition des données génomiques spécifiques des précurseurs de tendons et des myoblastes s'avère d'une grande utilité. D'autant plus que les données moléculaires concernant la spécification et la différenciation des précurseurs de tendons et des myoblastes associés au disque de pattes sont quasi inexistantes.

Nous avons pris en considération les différentes approches, déjà développées au laboratoire, pour déterminer la mieux adaptée à notre modèle, tels que la technique de TRAP (Translating Ribosome Affinity Purification) (Heiman *et al.*, 2008), ou encore le TU-Tagging (Miller *et al.*, 2009). Cependant, chacune de ces techniques nécessite une lignée pilote spécifique du tissu d'intérêt dans notre cas les précurseurs de tendon du disque de patte. Or le pilote Sr-Gal4 s'exprime aussi dans les autres cellules tendons (disque d'aile en particulier). Une étape de dissection est donc nécessaire pour isoler les disques de patte, cette étape (longue et laborieuse) n'est pas compatible avec ces différents techniques qui demandent en grande quantité de matériel.

Ainsi, nous avons opté pour la mise au point d'un protocole de tri-cellulaire par cytométrie en flux. Cependant, pour se faire il est nécessaire de dissocier les cellules des disques de patte en utilisant un traitement enzymatique. Cette étape est donc délicate car la dissociation peut affecter la viabilité cellulaire, perturbant potentiellement les profils transcriptionnels des cellules. Cependant, le profil d'expression des cellules tendons (GFP+) a été comparé avec le profil d'expression des cellules dites contrôle (Input), qui correspondent à un échantillon de l'ensemble des cellules de disque (GFP+ et GFP-) ayant subi les mêmes étapes de dissociation et le passage en cytométrie. Ceci nous permet donc théoriquement de nous affranchir en parti des variations d'expression liées à ces manipulations des cellules (dissociation, tri...).

Dans un premier temps, nous avons mis au point la technique en triant uniquement les cellules tendons. En effet, étant les plus difficiles à trier de par leur nombre restreint, il a fallu s'assurer qu'à l'issue des différentes étapes, on puisse obtenir une quantité d'ARN suffisante et de bonne qualité. A ce jour, nous avons ainsi obtenu le profil d'expression des précurseurs de tendons à 0h APF.

La liste de gènes tendons spécifique obtenue contient plusieurs candidats impliqués dans la communication cellulaire, ainsi que dans la voie de signalisation couplée aux protéines G. Il est donc prévu de réaliser les analyses fonctionnelles sur ces différents candidats, afin de déterminer leur potentielle implication dans les mécanismes de développement des tendons et/ou lors des interactions myoblastes/tendons. Ces données sont aussi exploitées par Quentin Laurichesse qui vise à identifier des nouveaux facteurs de transcription tendons spécifiques à travers un crible RNAi. Parmi ces gènes candidats on retrouve le facteur *dar1* (Dendritic arbor reduction 1/Krüppel-Like Factor) déjà décrit comme jouant un rôle dans l'extension des dendrites neuronales (Bing *et al.*, 2011), ou encore *esg* décrit comme régulant l'activité de la voie Noth (Korzelius *et al.*, 2014; Ramat *et al.*, 2016).

Enfin, à terme il est prévu de trier à partir des mêmes disques de patte les cellules tendons et les myoblastes simultanément. Les prochains séquençages ARN seront donc obtenus pour ces 2 populations aux mêmes stades de développement à partir des mêmes disques. L'analyse de ces données devrait être plus pertinente dans notre tentative d'identification des molécules impliquées dans les interactions entre les précurseurs de tendons et les myoblastes.

Les mécanismes de régulation de l'expression de *stripe*

L'expression de stripe au cours du développement des tendons est Notch dépendante et nécessite la présence des gènes de la famille odd-skipped

Nous avons démontré que les cellules précurseurs de tendons sont spécifiées au sein des cellules des futurs joints, caractérisées par l'expression des gènes de la famille *odd-skipped*. Nos expériences indiquent que Notch joue un rôle clé dans l'expression de *sr*. En effet, les expériences de perte de fonction de la voie Notch montrent que cette voie de signalisation est indispensable pour induire son expression. En parallèle, nous avons démontré qu'en affectant l'expression des gènes *odd-skipped* l'expression de *sr* était affectée. L'ensemble de ces résultats nous permet d'émettre deux hypothèses non exclusives:

- Dans la première, les gènes *odd-skipped*, connus pour être des cibles directes de Notch, seraient impliqués dans l'induction de l'expression de *sr* en aval de Notch. En effet, comme l'expression de *sr* dans le disque de patte est induite principalement dans les cellules déjà *odd-skipped* positives, nous pouvons penser que le rôle de Notch est d'induire les gènes *odd-skipped* qui à leur tour induiraient *sr*. Cependant, les gènes *odd-skipped* ne semblent pas être suffisants pour l'induction de *sr*. En effet, toutes les cellules du joint présumé expriment les gènes *odd-skipped* (Hao *et al.*, 2003 ; de Celis *et al.*, 1998) mais seulement quelques-unes expriment *sr*. De plus l'expression ectopique de Odd, de Drm ou de Bowl ne semblent pas être capables d'induire l'expression de *sr* en dehors des zones où ces gènes sont déjà présents et ne sont ainsi pas capables d'induire la formation de tendons ectopiques comme nous l'observons lors du gain de fonction pour la voie Notch. En particulier aucun des clones d'expression de *odd* analysés n'a jamais permis d'observer une induction de *sr*. Cependant, ceci pourrait être dû à une régulation post-traductionnelle par la protéine Lines, connues pour interagir de manière antagoniste avec les membres de la famille *odd-skipped* (Green *et al.*, 2002; Hatini *et al.*, 2005; Greenberg et Hatini 2009; Del Signore *et al.*, 2012). A ce titre nos tous derniers résultats semblent indiquer que l'expression du transgène

UAS-LinesRNAi avec la lignée pilote dpp-gal4 pourrait augmenter le nombre des cellules Sr positives.

- La deuxième hypothèse impliquerait que les facteurs odd-skipped définiraient des régions permissives au niveau desquelles *sr* peut être induit, sans directement être impliqués dans son expression. Un moyen de vérifier cette hypothèse serait de réaliser une expérience consistant à induire des clones de surexpression de Notch dans le disque de patte dans un contexte de perte de fonction des gènes *odd-skipped* (Bowl-RNAi ou Drm-RNAi ou encore UAS-Lines) afin de voir si Notch est toujours capable d'induire *sr* en absence des gènes odd-skipped. Si c'est le cas, nous pourrions conclure que Notch induit directement *sr* et que les gènes *odd-skipped* sont plutôt nécessaires aux étapes ultérieures de la formation des tendons.

D'autres signaux sont nécessaires à l'induction de stripe :

Comme nous l'avons vu précédemment, parmi les cellules constituant les futurs joints uniquement quelques-unes ont la capacité d'exprimer *sr* et de former de longs tendons. De plus, dans nos expériences de gain de fonction de Notch, nous avons pu constater que Notch avait la capacité d'induire de manière ectopique *sr* mais seulement dans certaines zones du disque de patte. L'ensemble de ces observations suggéreraient qu'en plus de l'activité de Notch, d'autres signaux seraient nécessaires pour permettre l'induction de *sr* uniquement à certains endroits du disque de patte.

Tous les domaines d'expression de *sr* sont distribués au niveau des vrais joints (selon l'axe proximo-distal donc) mais dans différents territoires selon les axes antero-postérieur et dorso-ventral du disque de patte. Notre hypothèse principale est que les signaux additionnels responsables de son induction sont les mêmes que ceux impliqués dans la mise en place des différents axes de polarité du disque de patte. Tel que Hh et En pour la mise en place de l'axe antéro-postérieur, ou de Dpp et Wg pour l'axe dorso-ventral (Basler et Struhl, 1994). Ces différents signaux pourraient collaborer avec Notch pour activer l'expression de *sr*.

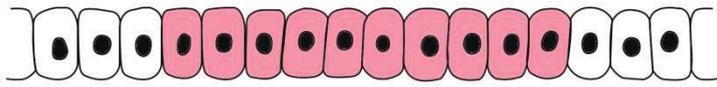
Ainsi, Notch joue un rôle important dans la détermination, le long de l'axe P/D, de sous-domaines concentriques dans lesquels les gènes *odd-skipped* sont exprimés. L'intersection de ces domaines répondant à Notch, avec les autres signaux déterminants les axes D/V et A/P pourraient déterminer les différents domaines d'expression de *sr*. De plus, la combinaison de différents types de signaux a déjà été décrite pour activer l'expression de *sr* en embryon, en effet la voie Wg interfère avec le signal Hh pour assurer l'induction du gène *sr* dans des zones précises (Hatini et Dinardo, 2001). Par ailleurs, une synergie entre la voie Notch et d'autres signaux a été décrite dans plusieurs modèles ; notamment les voies Notch et Wg agissent de concert dans le disque d'aile pour établir des domaines d'expression de certains gènes tel que *collier* (Glise *et al.*, 2002).

Enfin, de manière générale il est admis que la voie Notch confère la capacité qu'ont certaines cellules à répondre à d'autres signaux de différenciation, contrôlant ainsi indirectement leur destin cellulaire (Go *et al.*, 1998).

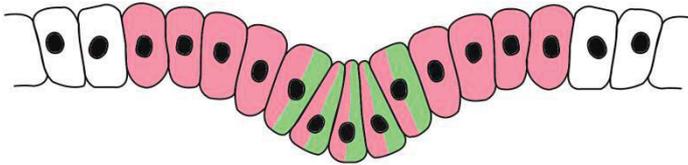
Stripe et les gènes odd-skipped pourraient coopérer pour induire la morphogenèse des tendons appendiculaires

Une des caractéristiques des précurseurs de tendons appendiculaires, en comparaison avec l'ensemble des autres tendons chez la drosophile, est leur faculté à former de longues structures tubulaires. Ceci nécessite d'une part, l'invagination des cellules à partir de l'épithélium du disque, et d'autre part leur progression/élongation au sein du disque de patte pour former un tube à l'intérieur de la future patte. Nous savons d'ores et déjà que Sr participe à la formation de cette structure, en effet l'expression de SrDN en utilisant la lignée pilote Sr-gal4 altère fortement cette morphogenèse (Soler *et al.*, 2016). J'ai depuis confirmé ce résultat en réprimant complètement la spécification des cellules tendons par expression du transgène UAS-SrRNAi sous le contrôle du pilote R10H12-gal4. Cependant dans ce contexte, bien que la formation d'un long tube soit abolie, on peut observer une constriction apicale correspondant au début d'une invagination mais sans la formation d'une structure tubulaire, ceci est cohérent avec le maintien de l'expression de odd-LacZ observé. Inversement la perte de fonction des gènes *odd-*

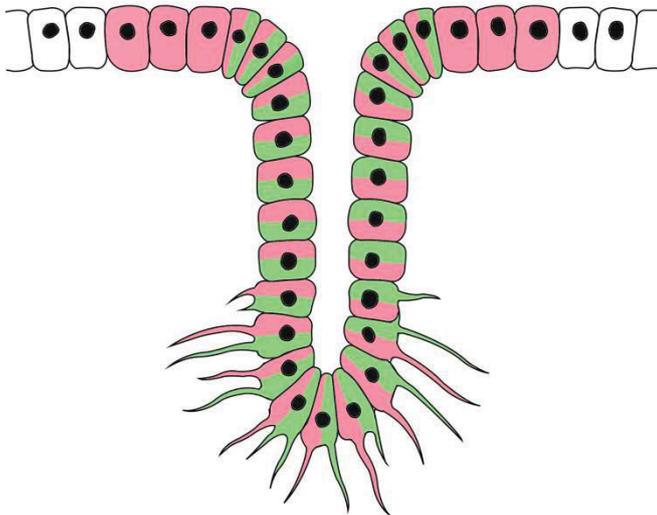
A



B



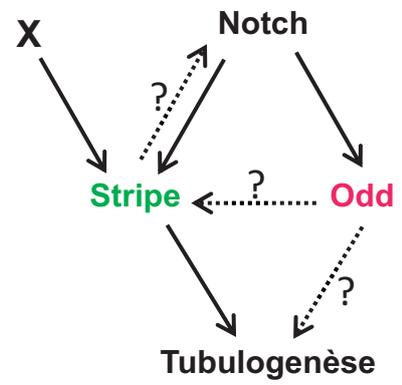
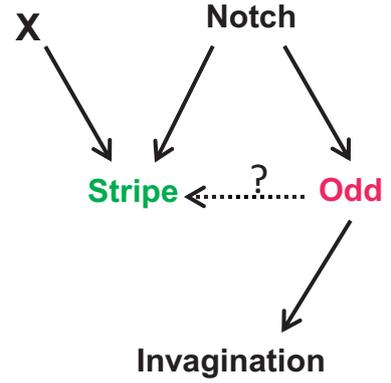
C



Notch



Odd



skipped (en utilisant les lignées UAS-Drm-RNAi et UAS-Bowl RNAi) affecte la formation des tendons et la tubulogénèse soit de manière directe en affectant la capacité des cellules à entreprendre les réarrangement cellulaire nécessaires à l'invagination et donc subséquemment à la tubulogénèse et/ou en affectant l'expression de *Sr*, étant donné qu'on constate une diminution significative des cellules *Sr* positives dans le contexte DrmRNAi et Bowl RNAi, ainsi qu'une absence complète de ces cellules après la surexpression de *Lines*.

Notre hypothèse principale est que le rôle des gènes *odd-skipped* serait ainsi d'initier l'invagination des cellules de l'épithélium au niveau des joints et de participer avec *sr* au processus de tubulogénèse dans les précurseurs de tendons (Fig.33). En accord avec cette idée, les gènes de la famille *odd-skipped* ne sont pas exprimés dans les précurseurs de tendons du disque d'ailes et ces derniers ne subissent pas une morphogénèse semblable à celle des tendons appendiculaires.

En plus de leur rôle connu dans l'invagination des cellules de l'épithélium du disque de patte (Hao *et al.*, 2003 ; de Celis *et al.*, 1998), les gènes de la famille *odd-skipped* sont impliqués dans plusieurs processus développementaux impliquant des réarrangements cellulaires et/ou tubulogénèse dans différents modèles d'études. Ainsi, *Odd1* (homologue de *Odd*) est impliqué lors de la différenciation et la morphogénèse de l'intestin chez *Caenorhabditis elegans* (Buckley *et al.*, 2003). Chez la drosophile, il a été observé que les réarrangements et plissements cellulaires nécessaires à la formation de l'intestin sont fortement affectés chez les mutants *drm*, *bowl* et *lines* (Johansen *et al.*, 2003). Enfin, *Drm*, *Sob* et *Odd* sont impliqués dans la morphogénèse des tubules rénaux chez la drosophile (Jung *et al.*, 2005 ; Tena *et al.*, 2007).

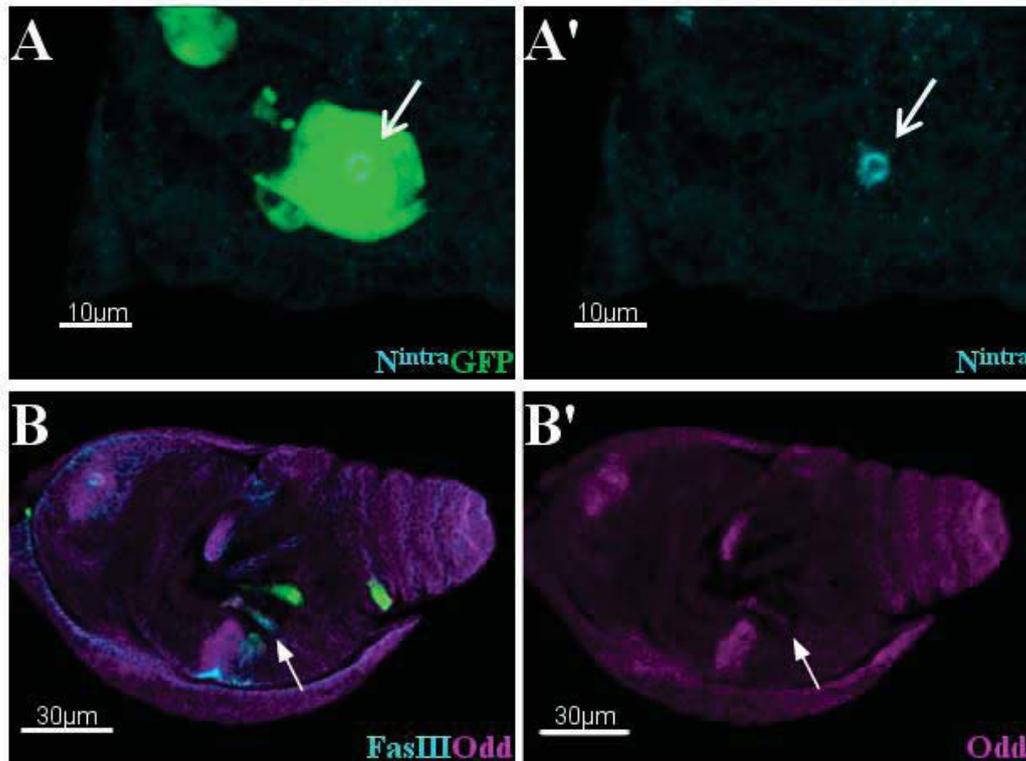


Figure 34: L'expression ectopique de *stripe* entraîne une accumulation de la protéine Notch et est capable d'induire l'expression de Odd. (A-A') Zoom sur un clone d'expression de SrB (GFP) dans un disque de patte, notez l'accumulation de Notch à la membrane apicale (flèche) au centre du clone observé grâce à un marquage anti-Notch (Cyan). (B-B') Différents clones d'expression de SrB (GFP) dans disque de patte 2h APF. Notez l'induction de Odd (magenta) dans l'un clone (flèche) l'accumulation de la Fascicline III (Cyan) indique une possible invagination.

- Un rétrocontrôle positif de Stripe sur la voie Notch et odd ?

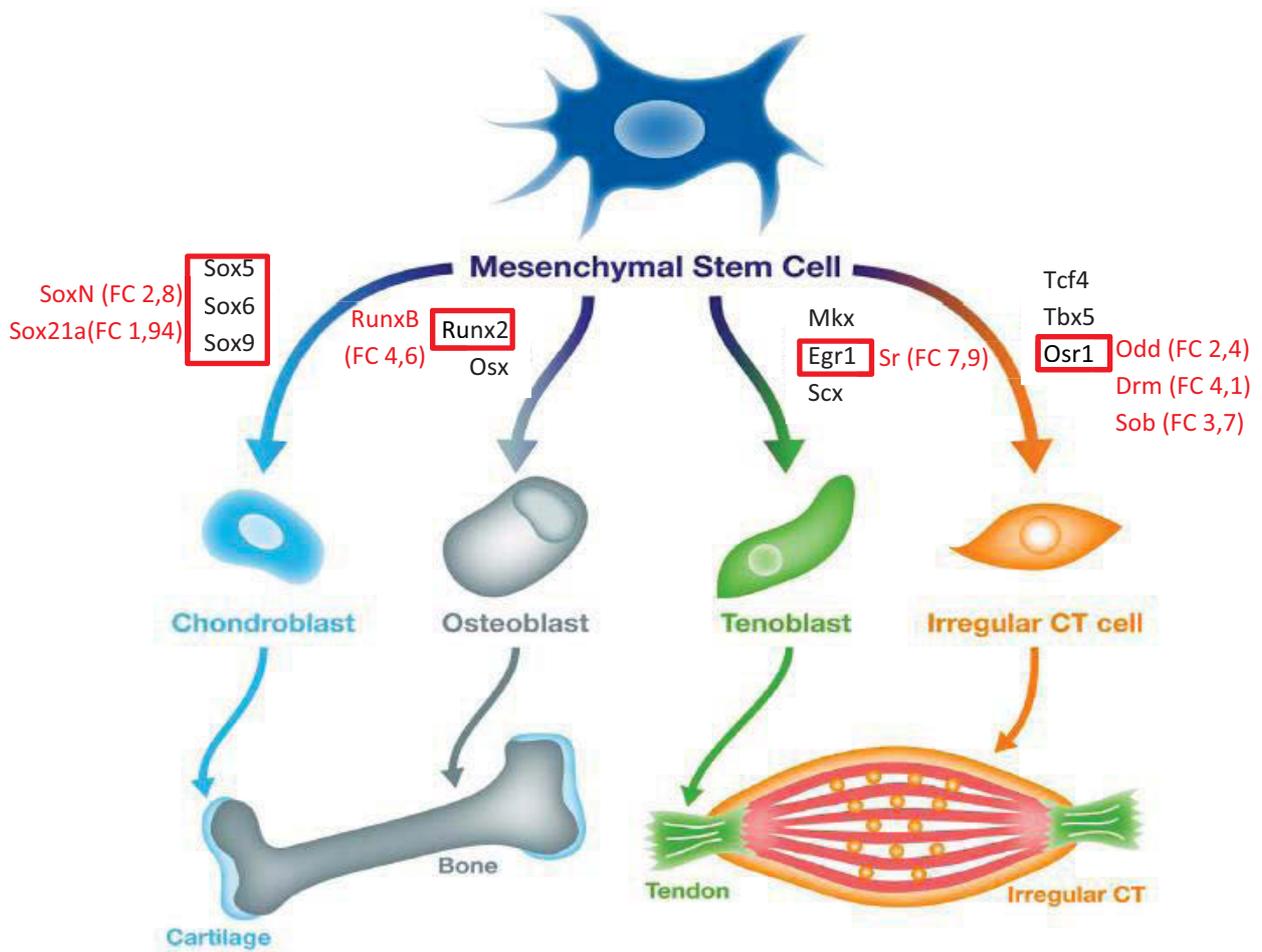
De manière intéressante, l'expression ectopique de *sr* via le système Gal4/UAS ou la création de clones d'expression, affecte l'expression, aussi bien de Odd que celle de Notch. En effet, lors de l'induction de clones *sr* dans le disque de patte, on observe une accumulation apicale de Notch similaire à celle observée dans les cellules tendons endogènes, et une induction de l'expression de Odd (Fig. 34). Ces résultats suggéreraient l'existence potentielle d'un rétrocontrôle de Sr sur Notch qui activerait à son tour les gènes *odd-skipped* afin de permettre l'invagination du tendon et la tubulogénèse. Ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse que, une fois exprimé, Sr maintiendrait l'expression des gènes *odd-skipped* de manière indirecte afin de permettre la morphogénèse des tendons.

Les apodèmes appendiculaires : tissu(s) conjonctif(s) primitifs associé(s) aux muscles ?

Chez les vertébrés le système musculo-squelettique est constitué de nombreux tissus. On retrouve au sein du système, le muscle, associé à différents types de tissus conjonctifs : les tissus conjonctifs spécialisés représentés par les os et les cartilages. Ainsi que des tissus conjonctifs dits réguliers, tels que les tendons, ou irréguliers qui regroupent l'ensemble des tissus enveloppant les muscles (epimysium, endomysium, périmysium) et les tendons. Chacun de ces tissus est caractérisé par l'expression de nombreux facteurs clés, au cours du développement, permettant leur mise en place au sein du système musculosquelettique (**Fig. 35**).

Comme nous l'avons décrit précédemment, à la différence des vertébrés, la musculature des invertébrés n'est pas associée à un squelette interne mais à un exosquelette. Ce dernier est en connexion avec les muscles par le biais de cellules spécialisées d'origine ectodermique, les apodèmes. Nous l'avons vu, ces apodèmes possèdent une analogie aussi bien fonctionnelle (transmission des forces de contraction musculaire au squelette) que génétique (expression de *sr*, l'orthologue des gènes *Egr*) avec les tendons des vertébrés et il est généralement admis qu'ils représentent l'équivalent de ces tendons chez les invertébrés. Les apodèmes ou tendons de la patte chez la drosophile présentent la particularité de former de longues structures internes autour desquelles s'organisent les fibres musculaires, formant ainsi une sorte « d'ossature » à l'intérieur de la patte. De plus, bien que ne formant pas de membrane enveloppant les fibres musculaires, cette structure permet de regrouper plusieurs fibres musculaires afin de former un muscle fonctionnel multifibrillaire (Soler *et al.*, 2004). Enfin, ces structures prennent naissance au niveau des futures cellules de joint qui formeront les articulations entre chaque segment de l'appendice.

Ainsi il est intéressant d'imaginer que ces apodèmes appendiculaires puissent représenter une sorte de tissu conjonctif musculaire primitif remplissant non



seulement le rôle de tendon mais également une partie des différentes fonctions assurées chez les vertébrés par les différents tissus conjonctifs du système musculo-squelettique.

A ce titre les données génétiques (connues et nos propres données de transcriptomiques) pourraient soutenir ce postulat. En effet, on retrouve dans ces cellules l'expression de plusieurs facteurs dont les orthologues chez les vertébrés sont exprimés et/ou impliqués dans le développement de l'ensemble des différents tissus conjonctifs cités ci-dessus (**Fig. 35**):

En tout premier lieu, le facteur de transcription *Sr*, dont les orthologues *Egr1* et *Egr2* sont impliqués dans la formation des tendons des vertébrés en régulant notamment l'expression du composant principal des tendons qu'est la collagène de type I (Lejard *et al.*, 2011 ; Guerquin *et al.*, 2015). Mais également les gènes de la famille *odd-skipped* dont les orthologues chez les vertébrés *Osr1* et *Osr2* sont impliqués dans la différenciation des tissus conjonctifs irréguliers entourant les muscles (Vallecillo-García *et al.*, 2017), mais aussi dans la formation des joints synoviaux (Gao *et al.*, 2011). De plus dans nos résultats de transcriptomiques, nous avons identifié le gène *dar1* appartenant à la famille des Kruppel-like factors, dont *KLF2* et *KLF4* sont retrouvés dans les précurseurs des tissus conjonctifs irréguliers entourant les tendons (Orgeur *et al.*, 2018). Ainsi que le gène *Runxb*, orthologue de *Runx2* impliqué dans la régulation de la différenciation des ostéoblastes (Komori, 2006), et enfin, *Soxb*, dont les orthologues (*Sox9*, *Sox5* et *Sox6*) sont des acteurs clés dans la régulation de la spécification du cartilage (Lefebvre *et al.*, 2001).

Toutes ces observations soulignent l'utilité de l'étude du système musculo-squelettique de la drosophile, en effet l'analyse et la compréhension du développement de ce système permettra de mieux comprendre le rôle des tissus conjonctifs au cours du développement et dans le maintien de l'homéostasie musculaire.

Annexe

Tableau 1 : Liste de gènes codant pour des CSS (Cell Surface and Secreted molecules) (Kurusu *et al.*, 2008) enrichis (Fold Change>2) dans nos données transcriptomiques tendons spécifiques.

Annotation Symbol	Symbol	FlyBase ID	Annotation Symbol	Symbol	FlyBase ID	Annotation Symbol	Symbol	FlyBase ID
CG10095	dpr15	FBgn0037993	CG1887	dsb	FBgn0035290	CG42343	DIP-beta	FBgn0259245
CG10145	mspo	FBgn0020269	CG2040	hig	FBgn0010114	CG42573	2mit	FBgn0260793
CG10152	beat-IV	FBgn0039089	CG2105	Corin	FBgn0033192	CG42613	CG42613	FBgn0261262
CG10186	Hasp	FBgn0032797	CG2114	FMRFaR	FBgn0035385	CG42796	5-HT2B	FBgn0261929
CG10287	Gasp	FBgn0026077	CG2346	FMRFa	FBgn0000715	CG42829	CadN2	FBgn0262018
CG10483	CG10483	FBgn0035649	CG2872	AstA-R1	FBgn0266429	CG43225	axo	FBgn0262870
CG10493	Phlpp	FBgn0032749	CG30040	jeb	FBgn0086677	CG43745	MsR2	FBgn0264002
CG10593	Acer	FBgn0016122	CG30106	CCHa1-R	FBgn0050106	CG44153	CG44153	FBgn0265002
CG10626	Lkr	FBgn0035610	CG31096	Lgr3	FBgn0039354	CG4778	obst-B	FBgn0027600
CG10650	CG10650	FBgn0046302	CG31190	Dscam3	FBgn0261046	CG4838	beat-Ic	FBgn0028644
CG10823	SIFaR	FBgn0038880	CG31298	beat-Vb	FBgn0038092	CG4846	beat-Ia	FBgn0013433
CG11051	Nplp2	FBgn0040813	CG31361	dpr17	FBgn0051361	CG4926	Ror	FBgn0010407
CG11062	Actbeta	FBgn0024913	CG31619	nolo	FBgn0051619	CG5423	robo3	FBgn0041097
CG11064	apolpp	FBgn0087002	CG31646	DIP-theta	FBgn0051646	CG5811	RYa-R	FBgn0004842
CG11136	Lrt	FBgn0034540	CG31665	wry	FBgn0051665	CG5911	ETHR	FBgn0038874
CG11326	Tsp	FBgn0031850	CG31708	DIP-zeta	FBgn0051708	CG6371	Hug	FBgn0028374
CG1168	7B2	FBgn0041707	CG31814	CG31814	FBgn0051814	CG6438	amon	FBgn0023179
CG12143	Tsp42Ej	FBgn0033132	CG32019	bt	FBgn0005666	CG6440	Ms	FBgn0011581
CG12191	dpr20	FBgn0035170	CG32085	CG32085	FBgn0052085	CG6456	Mip	FBgn0036713
CG12214	mlt	FBgn0265512	CG32183	Ccn	FBgn0052183	CG6495	CG6495	FBgn0027550
CG12484	CG12484	FBgn0086604	CG32206	CG32206	FBgn0052206	CG6496	Pdf	FBgn0023178
CG12594	CG12594	FBgn0037941	CG32209	serp	FBgn0260653	CG6515	TkR86C	FBgn0004841
CG12789	santa-maria	FBgn0025697	CG32227	gogo	FBgn0052227	CG6669	klg	FBgn0017590
CG12839	Tsp42En	FBgn0033135	CG32432	CG32432	FBgn0052432	CG6739	CG6739	FBgn0031926
CG12840	Tsp42Ei	FBgn0033134	CG32540	CCKLR-17D3	FBgn0030954	CG6749	CG6749	FBgn0036040
CG12841	Tsp42Ek	FBgn0033133	CG32547	CG32547	FBgn0052547	CG6867	CG6867	FBgn0030887
CG12913	CG12913	FBgn0033500	CG32600	dpr8	FBgn0052600	CG6919	Octbeta1R	FBgn0038980
CG12950	CG12950	FBgn0037736	CG32647	CG32647	FBgn0052647	CG7050	Nrx-1	FBgn0038975

CG13094	Dh31	FBgn0032048	CG32843	Dh31-R	FBgn0052843	CG7105	Proc	FBgn0045038
CG13229	CG13229	FBgn0033579	CG33126	NLaz	FBgn0053126	CG7166	CG7166	FBgn0037107
CG13317	Ilp7	FBgn0044046	CG33147	Hs3st-A	FBgn0053147	CG7250	Toll-6	FBgn0036494
CG13432	qsm	FBgn0028622	CG33202	dpr11	FBgn0053202	CG7285	AstC-R1	FBgn0036790
CG13439	dpr1	FBgn0040726	CG33344	CCAP-R	FBgn0039396	CG7395	sNPF-R	FBgn0036934
CG13532	CG13532	FBgn0034788	CG33507	dpr2	FBgn0261871	CG7422	Snmp2	FBgn0035815
CG13633	AstA	FBgn0015591	CG33512	dpr4	FBgn0053512	CG7431	TyrR	FBgn0038542
CG13702	AstC-R2	FBgn0036789	CG33516	dpr3	FBgn0053516	CG7644	beat-Ib	FBgn0028645
CG13772	Nlg2	FBgn0031866	CG33543	CG33543	FBgn0053543	CG7851	Segalpha	FBgn0032013
CG13968	sNPF	FBgn0032840	CG33958	CG33958	FBgn0053958	CG7887	TkR99D	FBgn0004622
CG13995	CG13995	FBgn0031770	CG33976	Octbeta2R	FBgn0038063	CG7890	Hs3st-B	FBgn0031005
CG14010	DIP-eta	FBgn0031725	CG33996	dpr13	FBgn0034286	CG7908	Tace	FBgn0039734
CG14024	CG14024	FBgn0031697	CG34113	CG34113	FBgn0083949	CG8348	Dh44	FBgn0012344
CG14064	beat-VI	FBgn0039584	CG34114	CG34114	FBgn0083950	CG8403	SP2353	FBgn0034070
CG14162	dpr6	FBgn0040823	CG34127	Nlg3	FBgn0083963	CG8422	Dh44-R1	FBgn0033932
CG14185	CG14185	FBgn0036936	CG34139	Nlg4	FBgn0083975	CG8784	PK2-R1	FBgn0038140
CG14390	beat-Vc	FBgn0038084	CG34353	CG34353	FBgn0085382	CG8827	Ance	FBgn0012037
CG14396	Ret	FBgn0011829	CG34357	CG34357	FBgn0085386	CG8909	CG8909	FBgn0030706
CG14593	CCHa2-R	FBgn0033058	CG34370	CG34370	FBgn0085399	CG8985	MsR1	FBgn0035331
CG14762	CG14762	FBgn0033250	CG34381	TrissinR	FBgn0085410	CG9538	Ag5r	FBgn0015010
CG1504	CG1504	FBgn0031100	CG34385	dpr12	FBgn0085414	CG9704	Nrt	FBgn0004108
CG15520	Capa	FBgn0039722	CG34391	DIP-delta	FBgn0085420	CG17716	CG17716	FBgn0000633
CG15630	CG15630	FBgn0031627	CG3441	Nplp1	FBgn0035092	CG17739	CG17739	FBgn0033710
CG15671	cv-2	FBgn0000395	CG3915	Drl-2	FBgn0033791	CG18657	NetA	FBgn0015773
CG15765	CG15765	FBgn0029814	CG40041	Gpb5	FBgn0063368	CG42242	beat-VII	FBgn0250908
CG16766	TyrRII	FBgn0038541	CG4007	Nrk	FBgn0020391	CG42244	Octbeta3R	FBgn0250910
CG16857	bd1	FBgn0028482	CG4096	CG4096	FBgn0029791	CG42313	CG42313	FBgn0259213
CG1744	chp	FBgn0267435	CG4192	kek3	FBgn0028370			

Références bibliographiques

- Abu-Shaar, M., Mann, R.S., 1998. Generation of multiple antagonistic domains along the proximodistal axis during *Drosophila* leg development. *Development* 125, 3821–3830.
- Anant, S., Roy, S., Raghavan, K.V., 1998. Twist and Notch negatively regulate adult muscle differentiation in *Drosophila*. *Development* 125, 1361–1369.
- Aradhya, R., Zmojdzian, M., Ponte, J.P.D., Jagla, K., 2015. Muscle niche-driven Insulin-Notch-Myc cascade reactivates dormant Adult Muscle Precursors in *Drosophila*. *eLife Sciences* 4, e08497. <https://doi.org/10.7554/eLife.08497>
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., Lake, R.J., 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770–776.
- Artero, R.D., Castanon, I., Baylies, M.K., 2001. The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. *Development* 128, 4251–4264.
- Atreya, K.B., Fernandes, J.J., 2008. Founder cells regulate fiber number but not fiber formation during adult myogenesis in *Drosophila*. *Developmental Biology* 321, 123–140. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.06.023>
- Azpiazu, N., Frasch, M., 1993. tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev.* 7, 1325–1340.
- Basler, K., Struhl, G., 1994. Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* 368, 208. <https://doi.org/10.1038/368208a0>
- Bataillé, L., Boukhatmi, H., Frenco, J.-L., Vincent, A., 2017. Dynamics of transcriptional (re)-programming of syncytial nuclei in developing muscles. *BMC Biol* 15. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0386-2>
- Bataillé, L., Delon, I., Da Ponte, J.P., Brown, N.H., Jagla, K., 2010. Downstream of identity genes: muscle-type-specific regulation of the fusion process. *Dev. Cell* 19, 317–328. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.07.008>
- Bate, M., 1990. The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* 110, 791–804.

- Bate, M., Broadie, K., 1995. Wiring by fly: The neuromuscular system of the drosophila embryo. *Neuron* 15, 513–525. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90141-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90141-8)
- Bate, M., Rushton, E., Currie, D.A., 1991. Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development* 113, 79–89.
- Bate, M., Rushton, E., Frasch, M., 1993. A dual requirement for neurogenic genes in *Drosophila* myogenesis. *Dev. Suppl.* 149–161.
- Baylies, M.K., Bate, M., 1996. twist: A Myogenic Switch in *Drosophila*. *Science* 272, 1481–1484. <https://doi.org/10.1126/science.272.5267.1481>
- Becam, I., Fiuza, U.-M., Arias, A.M., Milán, M., 2010. A Role of Receptor Notch in Ligand cis-Inhibition in *Drosophila*. *Current Biology* 20, 554–560. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.01.058>
- Becker, S., Pasca, G., Strumpf, D., Min, L., Volk, T., 1997. Reciprocal signaling between *Drosophila* epidermal muscle attachment cells and their corresponding muscles. *Development* 124, 2615–2622.
- Beckett, K., Baylies, M.K., 2007. 3D analysis of founder cell and fusion competent myoblast arrangements outlines a new model of myoblast fusion. *Dev. Biol.* 309, 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.06.024>
- Bernard, F., Lalouette, A., Gullaud, M., Jeantet, A.Y., Cossard, R., Zider, A., Ferveur, J.F., Silber, J., 2003. Control of apterous by vestigial drives indirect flight muscle development in *drosophila*. *Developmental Biology* 260, 391–403. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00255-0](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00255-0)
- Bishop, S.A., Klein, T., Arias, A.M., Couso, J.P., 1999. Composite signalling from Serrate and Delta establishes leg segments in *Drosophila* through Notch. *Development* 126, 2993–3003.
- Bothe, I., Deng, S., Baylies, M., 2014. PI(4,5)P2 regulates myoblast fusion through Arp2/3 regulator localization at the fusion site. *Development* 141, 2289–2301. <https://doi.org/10.1242/dev.100743>
- Bour, B.A., Chakravarti, M., West, J.M., Abmayr, S.M., 2000. *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev* 14, 1498–1511.

- Bour, B.A., O'Brien, M.A., Lockwood, W.L., Goldstein, E.S., Bodmer, R., Taghert, P.H., Abmayr, S.M., Nguyen, H.T., 1995. Drosophila MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev.* 9, 730–741.
- Brand, A.H., Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.
- Brennan, K., Baylies, M., Arias, A.M., 1999. Repression by Notch is required before Wingless signalling during muscle progenitor cell development in Drosophila. *Curr. Biol.* 9, 707–710.
- Brent, A.E., Braun, T., Tabin, C.J., 2005. Genetic analysis of interactions between the somitic muscle, cartilage and tendon cell lineages during mouse development. *Development* 132, 515–528. <https://doi.org/10.1242/dev.01605>
- Brent, A.E., Schweitzer, R., Tabin, C.J., 2003. A Somitic Compartment of Tendon Progenitors. *Cell* 113, 235–248. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00268-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00268-X)
- Broadie, K.S., Bate, M., 1991. The development of adult muscles in Drosophila: ablation of identified muscle precursor cells. *Development* 113, 103–118.
- Brückner, K., Perez, L., Clausen, H., Cohen, S., 2000. Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* 406, 411. <https://doi.org/10.1038/35019075>
- Buckley, M.S., Chau, J., Hoppe, P.E., Coulter, D.E., 2004. odd-skipped homologs function during gut development in *C. elegans*. *Dev Genes Evol* 214, 10–18. <https://doi.org/10.1007/s00427-003-0369-x>
- Campbell, G., 2002. Distalization of the Drosophila leg by graded EGF-receptor activity. *Nature* 418, 781–785. <https://doi.org/10.1038/nature00971>
- Campbell, G., Tomlinson, A., 1998. The roles of the homeobox genes *aristales* and *Distal-less* in patterning the legs and wings of Drosophila. *Development* 125, 4483–4493.
- Campbell, G., Weaver, T., Tomlinson, A., 1993. Axis specification in the developing Drosophila appendage: The role of *wingless*, *decapentaplegic*, and the homeobox gene *aristales*. *Cell* 74, 1113–1123. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90732-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90732-6)
- Carmena, A., Bate, M., Jiménez, F., 1995. Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during Drosophila

- embryogenesis. *Genes Dev.* 9, 2373–2383.
<https://doi.org/10.1101/gad.9.19.2373>
- Carmena, A., Murugasu-Oei, B., Menon, D., Jiménez, F., Chia, W., 1998. *inscuteable* and *numb* mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev.* 12, 304–315.
- Chanana, B., Graf, R., Koledachkina, T., Pflanz, R., Vorbrüggen, G., 2007. α PS2 integrin-mediated muscle attachment in *Drosophila* requires the ECM protein Thrombospondin. *Mechanisms of Development* 124, 463–475.
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2007.03.005>
- Chaturvedi, D., Reichert, H., Gunage, R.D., VijayRaghavan, K., 2017. Identification and functional characterization of muscle satellite cells in *Drosophila*. *eLife Sciences* 6, e30107. <https://doi.org/10.7554/eLife.30107>
- Chen, J.W., Galloway, J.L., 2014. The development of zebrafish tendon and ligament progenitors. *Development* 141, 2035–2045.
<https://doi.org/10.1242/dev.104067>
- Ciechanska, E., Dansereau, D.A., Svendsen, P.C., Heslip, T.R., Brook, W.J., 2007. *dAP-2* and defective proventriculus regulate *Serrate* and *Delta* expression in the tarsus of *Drosophila melanogaster*. *Genome* 50, 693–705.
<https://doi.org/10.1139/G07-043>
- Cohen, S.M., 1990. Specification of limb development in the *Drosophila* embryo by positional cues from segmentation genes. *Nature* 343, 173.
<https://doi.org/10.1038/343173a0>
- Cohen, S.M., Brönner, G., Küttner, F., Jürgens, G., Jäckle, H., 1989. *Distal-less* encodes a homoeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. *Nature* 338, 432. <https://doi.org/10.1038/338432a0>
- Córdoba, S., Estella, C., 2014. The bHLH-PAS Transcription Factor *Dysfusion* Regulates Tarsal Joint Formation in Response to Notch Activity during *Drosophila* Leg Development. *PLoS Genet* 10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004621>
- Coulter, D.E., Swaykus, E.A., Beran-Koehn, M.A., Goldberg, D., Wieschaus, E., Schedl, P., 1990. Molecular analysis of *odd-skipped*, a zinc finger encoding segmentation gene with a novel pair-rule expression pattern. *EMBO J* 9, 3795–3804.

- Currie, D.A., Bate, M., 1991. The development of adult abdominal muscles in *Drosophila*: myoblasts express twist and are associated with nerves. *Development* 113, 91–102.
- Dahmann, C., Basler, K., 2000. Opposing Transcriptional Outputs of Hedgehog Signaling and Engrailed Control Compartmental Cell Sorting at the *Drosophila* A/P Boundary. *Cell* 100, 411–422. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80677-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80677-7)
- de Celis, J.F., Tyler, D.M., de Celis, J., Bray, S.J., 1998. Notch signalling mediates segmentation of the *Drosophila* leg. *Development* 125, 4617–4626.
- Del Signore, S.J., Hayashi, T., Hatini, V., 2012. odd-skipped genes and lines organize the notum anterior-posterior axis using autonomous and non-autonomous mechanisms. *Mech Dev* 129, 147–161. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.05.001>
- Diaz-Benjumea, F.J., Cohen, B., Cohen, S.M., 1994. Cell interaction between compartments establishes the proximal-distal axis of *Drosophila* legs. *Nature* 372, 175. <https://doi.org/10.1038/372175a0>
- Dixit, R., Vijayraghavan, K., Bate, M., 2008. Hox genes and the regulation of movement in *Drosophila*. *Dev Neurobiol* 68, 309–316. <https://doi.org/10.1002/dneu.20589>
- Dutta, D., Anant, S., Ruiz-Gomez, M., Bate, M., VijayRaghavan, K., 2004. Founder myoblasts and fibre number during adult myogenesis in *Drosophila*. *Development* 131, 3761–3772. <https://doi.org/10.1242/dev.01249>
- Dutta, D., Shaw, S., Maqbool, T., Pandya, H., VijayRaghavan, K., 2005. *Drosophila* Heartless Acts with Heartbroken/Dof in Muscle Founder Differentiation. *PLoS Biol* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030337>
- Edom-Vovard, F., Schuler, B., Bonnin, M.-A., Teillet, M.-A., Duprez, D., 2002. Fgf4 positively regulates scleraxis and tenascin expression in chick limb tendons. *Dev. Biol.* 247, 351–366.
- Estrada, B., Gisselbrecht, S.S., Michelson, A.M., 2007. The transmembrane protein Perdido interacts with Grip and integrins to mediate myotube projection and attachment in the *Drosophila* embryo. *Development* 134, 4469–4478. <https://doi.org/10.1242/dev.014027>
- Feinberg, E.H., VanHoven, M.K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R.D., Shen, K., Bargmann, C.I., 2008. GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP)

- Defines Cell Contacts and Synapses in Living Nervous Systems. *Neuron* 57, 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.030>
- Fernandes, J., Bate, M., Vijayraghavan, K., 1991. Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*. *Development* 113, 67–77.
- Fernandes, J.J., Celniker, S.E., VijayRaghavan, K., 1996. Development of the indirect flight muscle attachment sites in *Drosophila*: role of the PS integrins and the stripe gene. *Dev. Biol.* 176, 166–184. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0125>
- Fernandes, J.J., Keshishian, H., 1996. Patterning the dorsal longitudinal flight muscles (DLM) of *Drosophila*: insights from the ablation of larval scaffolds. *Development* 122, 3755–3763.
- Figeac, N., Daczewska, M., Marcelle, C., Jagla, K., 2007. Muscle stem cells and model systems for their investigation. *Dev. Dyn.* 236, 3332–3342. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21345>
- Figeac, N., Jagla, T., Aradhya, R., Ponte, J.P.D., Jagla, K., 2010. *Drosophila* adult muscle precursors form a network of interconnected cells and are specified by the rhomboid-triggered EGF pathway. *Development* 137, 1965–1973. <https://doi.org/10.1242/dev.049080>
- Fogerty, F.J., Fessler, L.I., Bunch, T.A., Yaron, Y., Parker, C.G., Nelson, R.E., Brower, D.L., Gullberg, D., Fessler, J.H., 1994. Tiggrin, a novel *Drosophila* extracellular matrix protein that functions as a ligand for *Drosophila* alpha PS2 beta PS integrins. *Development* 120, 1747–1758.
- Fortini, M.E., 2009. Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev. Cell* 16, 633–647. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.03.010>
- Frasch, M., 1995. Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 374, 464–467. <https://doi.org/10.1038/374464a0>
- Fristrom DK, Fristrom JW (1993) The metamorphic development of the adult epidermis. In: Bate M, Martinez Arias A, editors. *The development of Drosophila melanogaster*. New York: Cold Spring Harbor. 843–897. - Open Access Library [WWW Document], n.d. URL <http://www.oalib.com/references/11827736> (accessed 11.28.17).

- Frommer, G., Vorbrüggen, G., Pasca, G., Jäckle, H., Volk, T., 1996. Epidermal egr-like zinc finger protein of *Drosophila* participates in myotube guidance. *The EMBO Journal* 15, 1642.
- Galindo, M. i., Bishop, S. a., Couso, J. p., 2005. Dynamic EGFR-Ras signalling in *Drosophila* leg development. *Dev. Dyn.* 233, 1496–1508. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20452>
- Galindo, M.I., Bishop, S.A., Greig, S., Couso, J.P., 2002. Leg Patterning Driven by Proximal-Distal Interactions and EGFR Signaling. *Science* 297, 256–259. <https://doi.org/10.1126/science.1072311>
- Ghazi, A., Anant, S., Raghavan, K.V., 2000. Apterous mediates development of direct flight muscles autonomously and indirect flight muscles through epidermal cues. *Development* 127, 5309–5318.
- Ghazi, A., Paul, L., VijayRaghavan, K., 2003. Prepattern genes and signaling molecules regulate stripe expression to specify *Drosophila* flight muscle attachment sites. *Mechanisms of Development* 120, 519–528. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(03\)00042-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(03)00042-X)
- Glise, B., Jones, D.L., Ingham, P.W., 2002. Notch and Wingless Modulate the Response of Cells to Hedgehog Signalling in the *Drosophila* Wing. *Developmental Biology* 248, 93–106. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0720>
- Go, M.J., Eastman, D.S., Artavanis-Tsakonas, S., 1998. Cell proliferation control by Notch signaling in *Drosophila* development. *Development* 125, 2031–2040.
- Godt, D., Laski, F.A., 1995. Mechanisms of cell rearrangement and cell recruitment in *Drosophila* ovary morphogenesis and the requirement of *bric a brac*. *Development* 121, 173–187.
- González-Crespo, S., Abu-Shaar, M., Torres, M., Martínez-A, C., Mann, R.S., Morata, G., 1998. Antagonism between *extradenticle* function and Hedgehog signalling in the developing limb. *Nature* 394, 196. <https://doi.org/10.1038/28197>
- González-Méndez, L., Seijo-Barandiarán, I., Guerrero, I., n.d. Cytoneme-mediated cell-cell contacts for Hedgehog reception. *eLife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.24045>
- Gordon, M.D., Scott, K., 2009. Motor control in a *Drosophila* taste circuit. *Neuron* 61, 373–384. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.033>

- Goto, S., Hayashi, S., 1997. Specification of the embryonic limb primordium by graded activity of Decapentaplegic. *Development* 124, 125–132.
- Gotwals, P.J., Fessler, L.I., Wehrli, M., Hynes, R.O., 1994. Drosophila PS1 integrin is a laminin receptor and differs in ligand specificity from PS2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11447–11451.
- Green, R.B., Hatini, V., Johansen, K.A., Liu, X.-J., Lengyel, J.A., 2002. Drumstick is a zinc finger protein that antagonizes Lines to control patterning and morphogenesis of the Drosophila hindgut. *Development* 129, 3645–3656.
- Greenberg, L., Hatini, V., 2011. Systematic expression and loss-of-function analysis defines spatially restricted requirements for Drosophila RhoGEFs and RhoGAPs in leg morphogenesis. *Mechanisms of Development* 128, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2010.09.001>
- Greenberg, L., Hatini, V., 2009. Essential roles for lines in mediating leg and antennal proximodistal patterning and generating a stable Notch signaling interface at segment borders. *Dev Biol* 330, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.03.014>
- Grenier, S., Sandig, M., Mequanint, K., 2009. Smooth muscle alpha-actin and calponin expression and extracellular matrix production of human coronary artery smooth muscle cells in 3D scaffolds. *Tissue Eng Part A* 15, 3001–3011. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0057>
- Guerquin, M.-J., Charvet, B., Nourissat, G., Havis, E., Ronsin, O., Bonnin, M.-A., Ruggiu, M., Olivera-Martinez, I., Robert, N., Lu, Y., Kadler, K.E., Baumberger, T., Doursounian, L., Berenbaum, F., Duprez, D., 2013. Transcription factor EGR1 directs tendon differentiation and promotes tendon repair. *Journal of Clinical Investigation* 123, 3564–3576. <https://doi.org/10.1172/JCI67521>
- Gunage, R.D., Dhanyasi, N., Reichert, H., VijayRaghavan, K., 2017. Drosophila adult muscle development and regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Skeletal Muscle Development on the 30th Anniversary of MyoD* 72, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.017>
- Gunage, R.D., Reichert, H., VijayRaghavan, K., 2014. Identification of a new stem cell population that generates Drosophila flight muscles. *eLife Sciences* 3, e03126. <https://doi.org/10.7554/eLife.03126>

- Guo, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1996. Control of Daughter Cell Fates during Asymmetric Division: Interaction of Numb and Notch. *Neuron* 17, 27–41. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80278-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80278-0)
- Hao, I., Green, R.B., Dunaevsky, O., Lengyel, J.A., Rauskolb, C., 2003. The odd-skipped family of zinc finger genes promotes *Drosophila* leg segmentation. *Developmental Biology* 263, 282–295. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.07.011>
- Haralalka, S., Shelton, C., Cartwright, H.N., Guo, F., Trimble, R., Kumar, R.P., Abmayr, S.M., 2014. Live Imaging Provides New Insights on Dynamic F-Actin Filopodia and Differential Endocytosis during Myoblast Fusion in *Drosophila*. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114126>
- Hart, M.C., Wang, L., Coulter, D.E., 1996. Comparison of the Structure and Expression of odd-skipped and Two Related Genes That Encode a New Family of Zinc Finger Proteins in *Drosophila*. *Genetics* 144, 171–182.
- Harzer, H., Berger, C., Conder, R., Schmauss, G., Knoblich, J.A., 2013. FACS purification of *Drosophila* larval Neuroblasts for next generation sequencing. *Nat Protoc* 8, 1088–1099. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.062>
- Hatini, V., DiNardo, S., 2001. Divide and conquer: pattern formation in *Drosophila* embryonic epidermis. *Trends in Genetics* 17, 574–579. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02448-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02448-9)
- Hatini, V., Green, R.B., Lengyel, J.A., Bray, S.J., DiNardo, S., 2005. The Drumstick/Lines/Bowl regulatory pathway links antagonistic Hedgehog and Wingless signaling inputs to epidermal cell differentiation. *Genes Dev.* 19, 709–718. <https://doi.org/10.1101/gad.1268005>
- Heiman, M., Schaefer, A., Gong, S., Peterson, J.D., Day, M., Ramsey, K.E., Suárez-Fariñas, M., Schwarz, C., Stephan, D.A., Surmeier, D.J., Greengard, P., Heintz, N., 2008. A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. *Cell* 135, 738–748. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.028>
- Hessinger, C., Technau, G.M., Rogulja-Ortmann, A., 2017. The *Drosophila* Hox gene *Ultrabithorax* acts in both muscles and motoneurons to orchestrate formation of specific neuromuscular connections. *Development* 144, 139–150. <https://doi.org/10.1242/dev.143875>
- Horton, E.R., Humphries, J.D., James, J., Jones, M.C., Askari, J.A., Humphries, M.J., 2016. The integrin adhesome network at a glance. *J Cell Sci* 129, 4159–4163. <https://doi.org/10.1242/jcs.192054>

- Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K., Hotta, Y., 1995. Glial cells missing: A binary switch between neuronal and glial determination in drosophila. *Cell* 82, 1025–1036. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90281-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90281-3)
- Hsiung, F., Ramirez-Weber, F.-A., Iwaki, D.D., Kornberg, T.B., 2005. Dependence of *Drosophila* wing imaginal disc cytonemes on Decapentaplegic. *Nature* 437, 560–563. <https://doi.org/10.1038/nature03951>
- Ibeas, J.M. de C., Bray, S.J., 2003. Bowl is required downstream of Notch for elaboration of distal limb patterning. *Development* 130, 5943–5952. <https://doi.org/10.1242/dev.00833>
- Inaki, M., Shinza-Kameda, M., Ismat, A., Frasch, M., Nose, A., 2010. *Drosophila* Tey represses transcription of the repulsive cue Toll and generates neuromuscular target specificity. *Development* 137, 2139–2146. <https://doi.org/10.1242/dev.046672>
- Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K., Levine, M., 1992. dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 6, 1518–1530. <https://doi.org/10.1101/gad.6.8.1518>
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., Yamamoto, D., 1997. The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124, 761–771.
- Iyengar, A., Wu, C.-F., 2014. Flight and seizure motor patterns in *Drosophila* mutants: Simultaneous acoustic and electrophysiological recordings of wing beats and flight muscle activity. *J Neurogenet* 28, 316–328. <https://doi.org/10.3109/01677063.2014.957827>
- Jagla, T., Bellard, F., Lutz, Y., Dretzen, G., Bellard, M., Jagla, K., 1998. ladybird determines cell fate decisions during diversification of *Drosophila* somatic muscles. *Development* 125, 3699–3708.
- Jaramillo, M.S., Lovato, C.V., Baca, E.M., Cripps, R.M., 2009. Crossveinless and the TGF β pathway regulate fiber number in the *Drosophila* adult jump muscle. *Development* 136, 1105–1113. <https://doi.org/10.1242/dev.031567>
- Johansen, K.A., Green, R.B., Iwaki, D.D., Hernandez, J.B., Lengyel, J.A., 2003. The Drm-Bowl-Lin relief-of-repression hierarchy controls fore- and hindgut patterning and morphogenesis. *Mech. Dev.* 120, 1139–1151.

- Jory, A., Estella, C., Giorgianni, M.W., Slattery, M., Lavery, T.R., Rubin, G.M., Mann, R.S., 2012. A Survey of 6,300 Genomic Fragments for cis-Regulatory Activity in the Imaginal Discs of *Drosophila melanogaster*. *Cell Reports* 2, 1014–1024. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.09.010>
- Jung, A.C., Denholm, B., Skaer, H., Affolter, M., 2005. Renal Tubule Development in *Drosophila*: A Closer Look at the Cellular Level. *JASN* 16, 322–328. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004090729>
- Kardon, G., 1998. Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development* 125, 4019–4032.
- Karim, F.D., Guild, G.M., Thummel, C.S., 1993. The *Drosophila* Broad-Complex plays a key role in controlling ecdysone-regulated gene expression at the onset of metamorphosis. *Development* 118, 977–988.
- Kim, M.E., Shrestha, B.R., Blazeski, R., Mason, C.A., Grueber, W.B., 2012. Integrins establish dendrite-substrate relationships that promote dendritic self-avoidance and patterning in *Drosophila* sensory neurons. *Neuron* 73, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.033>
- Knirr, S., Azpiazu, N., Frasch, M., 1999. The role of the NK-homeobox gene *slouch* (*S59*) in somatic muscle patterning. *Development* 126, 4525–4535.
- Kojima, T., 2004. The mechanism of *Drosophila* leg development along the proximodistal axis. *Development, Growth & Differentiation* 46, 115–129. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2004.00735.x>
- Kojima, T., Sato, M., Saigo, K., 2000. Formation and specification of distal leg segments in *Drosophila* by dual Bar homeobox genes, *BarH1* and *BarH2*. *Development* 127, 769–778.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., Kishimoto, T., 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755–764.
- Korzelius, J., Naumann, S.K., Loza-Coll, M.A., Chan, J.S., Dutta, D., Oberheim, J., Gläßer, C., Southall, T.D., Brand, A.H., Jones, D.L., Edgar, B.A., 2014. *Escargot* maintains stemness and suppresses differentiation in *Drosophila* intestinal stem cells. *EMBO J.* 33, 2967–2982. <https://doi.org/10.15252/embj.201489072>
- Kozopas, K.M., Nusse, R., 2002. Direct Flight Muscles in *Drosophila* Develop from Cells with Characteristics of Founders and Depend on DWnt-2 for Their

- Correct Patterning. *Developmental Biology* 243, 312–325. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0572>
- Kramer, S.G., Kidd, T., Simpson, J.H., Goodman, C.S., 2001. Switching repulsion to attraction: changing responses to slit during transition in mesoderm migration. *Science* 292, 737–740. <https://doi.org/10.1126/science.1058766>
- Kubota, K., Goto, S., Eto, K., Hayashi, S., 2000. EGF receptor attenuates Dpp signaling and helps to distinguish the wing and leg cell fates in *Drosophila*. *Development* 127, 3769–3776.
- Kubota, K., Goto, S., Hayashi, S., 2003. The role of Wg signaling in the patterning of embryonic leg primordium in *Drosophila*. *Developmental Biology* 257, 117–126. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00062-9](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00062-9)
- Kurusu, M., Cording, A., Taniguchi, M., Menon, K., Suzuki, E., Zinn, K., 2008. A screen of cell-surface molecules identifies leucine-rich repeat proteins as key mediators of synaptic target selection in the *Drosophila* neuromuscular system. *Neuron* 59, 972–985. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.037>
- Lahaye, L.L., Wouda, R.R., Jong, A.W.M. de, Fradkin, L.G., Noordermeer, J.N., 2012. WNT5 Interacts with the Ryk Receptors Doughnut and Derailed to Mediate Muscle Attachment Site Selection in *Drosophila melanogaster*. *PLOS ONE* 7, e32297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032297>
- Lai, S.-L., Lee, T., 2006. Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nature Neuroscience* 9, 703–709. <https://doi.org/10.1038/nn1681>
- Landgraf, M., Thor, S., 2006. Development and Structure of Motoneurons, in: *International Review of Neurobiology, The Fly Neuromuscular Junction: Structure and Function Second Edition*. Academic Press, pp. 33–53. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(06\)75002-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)75002-4)
- Lee, J.C., VijayRaghavan, K., Celniker, S.E., Tanouye, M.A., 1995. Identification of a *Drosophila* muscle development gene with structural homology to mammalian early growth response transcription factors. *PNAS* 92, 10344–10348.
- Lefebvre, V., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., 2001. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthr. Cartil.* 9 Suppl A, S69-75.
- Lejard, V., Blais, F., Guerquin, M.-J., Bonnet, A., Bonnin, M.-A., Havis, E., Malbouyres, M., Bidaud, C.B., Maro, G., Gilardi-Hebenstreit, P., Rossert, J., Ruggiero, F., Duprez, D., 2011. EGR1 and EGR2 Involvement in Vertebrate

- Tendon Differentiation. *J. Biol. Chem.* 286, 5855–5867.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.153106>
- Leptin, M., Bogaert, T., Lehmann, R., Wilcox, M., 1989. The function of PS integrins during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* 56, 401–408.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90243-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90243-2)
- Leptin, M., Grunewald, B., 1990. Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* 110, 73–84.
- Liotta, D., Han, J., Elgar, S., Garvey, C., Han, Z., Taylor, M.V., 2007. The Him Gene Reveals a Balance of Inputs Controlling Muscle Differentiation in *Drosophila*. *Curr Biol* 17, 1409–1413. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.039>
- Lovato, T.L., Benjamin, A.R., Cripps, R.M., 2005. Transcription of Myocyte enhancer factor-2 in adult *Drosophila* myoblasts is induced by the steroid hormone ecdysone. *Developmental Biology* 288, 612–621.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.09.007>
- Mandaron, P., 1971. Sur le mécanisme de l'évagination des disques imaginaux chez la *Drosophile*. *Developmental Biology* 25, 581–605.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(71\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(71)90007-8)
- Maqbool, T., Soler, C., Jagla, T., Daczewska, M., Lodha, N., Palliyil, S., VijayRaghavan, K., Jagla, K., 2006. Shaping Leg Muscles in *Drosophila*: Role of ladybird, a Conserved Regulator of Appendicular Myogenesis. *PLoS ONE* 1.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000122>
- Mardon, G., Solomon, N.M., Rubin, G.M., 1994. dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* 120, 3473–3486.
- Mauro, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 493–495.
- McKay, D.J., Estella, C., Mann, R.S., 2009. The origins of the *Drosophila* leg revealed by the cis-regulatory architecture of the *Distalless* gene. *Development* 136, 61–71. <https://doi.org/10.1242/dev.029975>
- Miller, A.C., Lyons, E.L., Herman, T.G., 2009. cis-Inhibition of Notch by Endogenous Delta Biases the Outcome of Lateral Inhibition. *Current Biology* 19, 1378–1383. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.042>

- Miller, M.R., Robinson, K.J., Cleary, M.D., Doe, C.Q., 2009. TU-tagging: cell type specific RNA isolation from intact complex tissues. *Nat Methods* 6, 439–441. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1329>
- Mirth, C., Akam, M., 2002. Joint development in the *Drosophila* leg: cell movements and cell populations. *Dev. Biol.* 246, 391–406. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0593>
- Mojica-Vázquez, L.H., Benetah, M.H., Baanannou, A., Bernat-Fabre, S., Deplancke, B., Cribbs, D.L., Bourbon, H.-M., Boube, M., 2017. Tissue-specific enhancer repression through molecular integration of cell signaling inputs. *PLoS Genet.* 13, e1006718. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006718>
- Monier, B., Gettings, M., Gay, G., Mangeat, T., Schott, S., Guarner, A., Suzanne, M., 2015. Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding. *Nature* 518, 245. <https://doi.org/10.1038/nature14152>
- Morata, G., 2001. How *drosophila* appendages develop. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 89. <https://doi.org/10.1038/35052047>
- Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D.J., Ray, W.J., Kopan, R., 2000. A Ligand-Induced Extracellular Cleavage Regulates γ -Secretase-like Proteolytic Activation of Notch1. *Molecular Cell* 5, 197–206. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80416-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80416-5)
- Nabel-Rosen, H., Volohonsky, G., Reuveny, A., Zaidel-Bar, R., Volk, T., 2002. Two Isoforms of the *Drosophila* RNA Binding Protein, How, Act in Opposing Directions to Regulate Tendon Cell Differentiation. *Developmental Cell* 2, 183–193. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00118-6](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00118-6)
- Nassari, S., Duprez, D., Fournier-Thibault, C., 2017. Non-myogenic Contribution to Muscle Development and Homeostasis: The Role of Connective Tissues. *Front. Cell Dev. Biol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00022>
- Neyt, C., Jagla, K., Thisse, C., Thisse, B., Haines, L., Currie, P.D., 2000. Evolutionary origins of vertebrate appendicular muscle. *Nature* 408, 82. <https://doi.org/10.1038/35040549>
- Ordan, E., Volk, T., 2015. Cleaved Slit directs embryonic muscles. *Fly (Austin)* 9, 82–85. <https://doi.org/10.1080/19336934.2015.1102808>
- Orgeur, M., Martens, M., Leonte, G., Nassari, S., Bonnin, M.-A., Börno, S.T., Timmermann, B., Hecht, J., Duprez, D., Stricker, S., 2018. Genome-wide strategies identify downstream target genes of connective tissue-associated

- transcription factors. *Development* dev.161208.
<https://doi.org/10.1242/dev.161208>
- Özkan, E., Carrillo, R.A., Eastman, C.L., Weiszmann, R., Waghray, D., Johnson, K.G., Zinn, K., Celniker, S.E., Garcia, K.C., 2013. An extracellular interactome of Immunoglobulin and LRR proteins reveals receptor-ligand networks. *Cell* 154, 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.006>
- Piepenburg, O., Vorbrüggen, G., Jäckle, H., 2000. *Drosophila* Segment Borders Result from Unilateral Repression of Hedgehog Activity by Wingless Signaling. *Molecular Cell* 6, 203–209. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(05\)00011-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(05)00011-0)
- Pierre, S.E.S., Galindo, M.I., Couso, J.P., Thor, S., 2002. Control of *Drosophila* imaginal disc development by rotund and roughened eye: differentially expressed transcripts of the same gene encoding functionally distinct zinc finger proteins. *Development* 129, 1273–1281.
- Postigo, A.A., Ward, E., Skeath, J.B., Dean, D.C., 1999. zfh-1, the *Drosophila* Homologue of ZEB, Is a Transcriptional Repressor That Regulates Somatic Myogenesis. *Mol Cell Biol* 19, 7255–7263.
- Pueyo, J.I., Couso, J.P., 2011. Tarsal-less peptides control Notch signalling through the Shavenbaby transcription factor. *Developmental Biology* 355, 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.03.033>
- Pueyo, J.I., Couso, J.P., 2004. Chip-mediated partnerships of the homeodomain proteins Bar and Aristaless with the LIM-HOM proteins Apterous and Lim1 regulate distal leg development. *Development* 131, 3107–3120. <https://doi.org/10.1242/dev.01161>
- Ramat, A., Audibert, A., Louvet-Vallée, S., Simon, F., Fichelson, P., Gho, M., 2016. Escargot and Scratch regulate neural commitment by antagonizing Notch activity in *Drosophila* sensory organs. *Development* 143, 3024–3034. <https://doi.org/10.1242/dev.134387>
- Ranganayakulu, G., Zhao, B., Dokidis, A., Molkenin, J.D., Olson, E.N., Schulz, R.A., 1995. A Series of Mutations in the D-MEF2 Transcription Factor Reveal Multiple Functions in Larval and Adult Myogenesis in *Drosophila*. *Developmental Biology* 171, 169–181. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1269>
- Rauskolb, C., Irvine, K.D., 1999. Notch-Mediated Segmentation and Growth Control of the *Drosophila* Leg. *Developmental Biology* 210, 339–350. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9273>

- Rebeiz, M., Reeves, N.L., Posakony, J.W., 2002. SCORE: A computational approach to the identification of cis-regulatory modules and target genes in whole-genome sequence data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9888–9893. <https://doi.org/10.1073/pnas.152320899>
- Richardson, B.E., Beckett, K., Nowak, S.J., Baylies, M.K., 2007. SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development* 134, 4357–4367. <https://doi.org/10.1242/dev.010678>
- Rivlin, P.K., Schneiderman, A.M., Booker, R., 2000. Imaginal Pioneers Prefigure the Formation of Adult Thoracic Muscles in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 222, 450–459. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9676>
- Rochlin, K., Yu, S., Roy, S., Baylies, M.K., 2010. Myoblast fusion: When it takes more to make one. *Developmental Biology, Special Section: Morphogenesis* 341, 66–83. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.024>
- Roy, S., Huang, H., Liu, S., Kornberg, T.B., 2014. Cytoskeleton-mediated contact-dependent transport of the *Drosophila* Decapentaplegic signaling protein. *Science* 343, 1244624. <https://doi.org/10.1126/science.1244624>
- Roy, S., VijayRaghavan, K., 1999. Muscle pattern diversification in *Drosophila*: the story of imaginal myogenesis. *Bioessays* 21, 486–498. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199906\)21:6<486::AID-BIES5>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199906)21:6<486::AID-BIES5>3.0.CO;2-M)
- Ruiz-Gómez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M.V., Bate, M., 2000. *Drosophila* Dumbfounded: A Myoblast Attractant Essential for Fusion. *Cell* 102, 189–198. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00024-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00024-6)
- Sandstrom, D.J., Bayer, C.A., Fristrom, J.W., Restifo, L.L., 1997. Broad-Complex Transcription Factors Regulate Thoracic Muscle Attachment in *Drosophila*. *Developmental Biology* 181, 168–185. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.8469>
- Sandstrom, D.J., Restifo, L.L., 1999. Epidermal tendon cells require Broad Complex function for correct attachment of the indirect flight muscles in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci* 112, 4051–4065.
- Sato, M., Kornberg, T.B., 2002. FGF is an essential mitogen and chemoattractant for the air sacs of the *drosophila* tracheal system. *Dev. Cell* 3, 195–207.
- Schnorrer, F., Dickson, B.J., 2004. Muscle Building: Mechanisms of Myotube Guidance and Attachment Site Selection. *Developmental Cell* 7, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.06.010>

- Schnorrer, F., Kalchhauser, I., Dickson, B.J., 2007. The Transmembrane Protein Kon-tiki Couples to Dgrip to Mediate Myotube Targeting in *Drosophila*. *Developmental Cell* 12, 751–766. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.02.017>
- Schönbauer, C., Schnorrer, F., Dodt, H.-U., Distler, J., Frasch, M., Radolf, M., Jährling, N., 2011. Spalt mediates an evolutionarily conserved switch to fibrillar muscle fate in insects. *Nature* 479, 406. <https://doi.org/10.1038/nature10559>
- Schultz, E., Gibson, M.C., Champion, T., 1978. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: An EM and radioautographic study. *J. Exp. Zool.* 206, 451–456. <https://doi.org/10.1002/jez.1402060314>
- Schweitzer, R., Zelzer, E., Volk, T., 2010. Connecting muscles to tendons: tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates. *Development* 137, 3347–3347. <https://doi.org/10.1242/dev.057885>
- Sens, K.L., Zhang, S., Jin, P., Duan, R., Zhang, G., Luo, F., Parachini, L., Chen, E.H., 2010. An invasive podosome-like structure promotes fusion pore formation during myoblast fusion. *J Cell Biol* 191, 1013–1027. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006006>
- Shilagardi, K., Li, S., Luo, F., Marikar, F., Duan, R., Jin, P., Kim, J.H., Murnen, K., Chen, E.H., 2013. Actin-propelled Invasive Membrane Protrusions Promote Fusogenic Protein Engagement During Cell-Cell Fusion. *Science* 340, 359–363. <https://doi.org/10.1126/science.1234781>
- Smith D.S., 1961. The structure of insect fibrillar flight muscle. *The journal of biophysical and biochemical cytology* • VOLUME 10, 123–158.
- Soler, C., Daczewska, M., Ponte, J.P.D., Dastugue, B., Jagla, K., 2004. Coordinated development of muscles and tendons of the *Drosophila* leg. *Development* 131, 6041–6051. <https://doi.org/10.1242/dev.01527>
- Soler, C., Taylor, M.V., 2009. The Him gene inhibits the development of *Drosophila* flight muscles during metamorphosis. *Mechanisms of Development* 126, 595–603. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2009.03.003>
- Soustelle, L., 2004. Terminal tendon cell differentiation requires the glide/gcm complex. *Development* 131, 4521–4532. <https://doi.org/10.1242/dev.01290>
- Speicher, S., Fischer, A., Knoblich, J., Carmena, A., 2008. The PDZ protein Canoe regulates the asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts and muscle progenitors. *Curr. Biol.* 18, 831–837. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.072>

- Stathopoulos, A., Tam, B., Ronshaugen, M., Frasch, M., Levine, M., 2004. pyramus and thisbe: FGF genes that pattern the mesoderm of *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* 18, 687–699. <https://doi.org/10.1101/gad.1166404>
- Struhl, G., Adachi, A., 1998. Nuclear Access and Action of Notch In Vivo. *Cell* 93, 649–660. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81193-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81193-9)
- Strünkelnberg, M., Bonengel, B., Moda, L.M., Hertenstein, A., Couet, H.G. de, Ramos, R.G.P., Fischbach, K.-F., 2001. rst and its paralogue kirre act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* 128, 4229–4239.
- Subramanian, A., Prokop, A., Yamamoto, M., Sugimura, K., Uemura, T., Betschinger, J., Knoblich, J.A., Volk, T., 2003. Shortstop recruits EB1/APC1 and promotes microtubule assembly at the muscle-tendon junction. *Current biology* 13, 1086–1095.
- Subramanian, A., Wayburn, B., Bunch, T., Volk, T., 2007. Thrombospondin-mediated adhesion is essential for the formation of the myotendinous junction in *Drosophila*. *Development* 134, 1269–1278. <https://doi.org/10.1242/dev.000406>
- Sudarsan, V., Anant, S., Guptan, P., VijayRaghavan, K., Skaer, H., 2001. Myoblast Diversification and Ectodermal Signaling in *Drosophila*. *Developmental Cell* 1, 829–839. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00089-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00089-2)
- Swan, L.E., Schmidt, M., Schwarz, T., Ponimaskin, E., Prange, U., Boeckers, T., Thomas, U., Sigrist, S.J., 2006. Complex interaction of *Drosophila* GRIP PDZ domains and Echinoid during muscle morphogenesis. *The EMBO Journal* 25, 3640–3651. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601216>
- Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z., Kornberg, T.B., 1995. Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development* 121, 3359–3369.
- Tajiri, R., Misaki, K., Yonemura, S., Hayashi, S., 2010. Dynamic shape changes of ECM-producing cells drive morphogenesis of ball-and-socket joints in the fly leg. *Development* 137, 2055–2063. <https://doi.org/10.1242/dev.047175>
- Tauc, H.M., Tasdogan, A., Pandur, P., 2014. Isolating intestinal stem cells from adult *Drosophila* midguts by FACS to study stem cell behavior during aging. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/52223>
- Taylor, M.V., 2002. Muscle Differentiation: How Two Cells Become One. *Current Biology* 12, R224–R228. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00757-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00757-1)

- Taylor, M.V., Beatty, K.E., Hunter, H.K., Baylies, M.K., 1995. *Drosophila* MEF2 is regulated by twist and is expressed in both the primordia and differentiated cells of the embryonic somatic, visceral and heart musculature. *Mech. Dev.* 50, 29–41.
- Tena, J.J., Neto, A., de la Calle-Mustienes, E., Bras-Pereira, C., Casares, F., Gómez-Skarmeta, J.L., 2007. Odd-skipped genes encode repressors that control kidney development. *Developmental Biology* 301, 518–531. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.063>
- The Origin, Location, and Projections of the Embryonic Abdominal Motorneurons of *Drosophila* | Journal of Neuroscience [WWW Document], n.d. URL <http://www.jneurosci.org.gate2.inist.fr/content/17/24/9642.long> (accessed 12.21.17).
- Theisen, H., Haerry, T.E., O'Connor, M.B., Marsh, J.L., 1996. Developmental territories created by mutual antagonism between Wingless and Decapentaplegic. *Development* 122, 3939–3948.
- Tixier, V., Bataillé, L., Jagla, K., 2010. Diversification of muscle types: Recent insights from *Drosophila*. *Experimental Cell Research* 316, 3019–3027. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.07.013>
- Vallecillo-García, P., Orgeur, M., Vom Hofe-Schneider, S., Stumm, J., Kappert, V., Ibrahim, D.M., Börno, S.T., Hayashi, S., Relaix, F., Hildebrandt, K., Sengle, G., Koch, M., Timmermann, B., Marazzi, G., Sassoon, D.A., Duprez, D., Stricker, S., 2017. Odd skipped-related 1 identifies a population of embryonic fibro-adipogenic progenitors regulating myogenesis during limb development. *Nat Commun* 8, 1218. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01120-3>
- Volk, T., 1999. Singling out *Drosophila* tendon cells: a dialogue between two distinct cell types. *Trends in Genetics* 15, 448–453. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01862-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01862-4)
- Volohonsky, G., Edenfeld, G., Klämbt, C., Volk, T., 2007. Muscle-dependent maturation of tendon cells is induced by post-transcriptional regulation of stripeA. *Development* 134, 347–356. <https://doi.org/10.1242/dev.02735>
- Vorbrüggen, G., Jäckle, H., 1997. Epidermal muscle attachment site-specific target gene expression and interference with myotube guidance in response to ectopic stripe expression in the developing *Drosophila* epidermis. *PNAS* 94, 8606–8611.

- Wang, L., Coulter, D.E., 1996. bowel, an odd-skipped homolog, functions in the terminal pathway during *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J* 15, 3182–3196.
- Wayburn, B., Volk, T., 2009. LRT, a tendon-specific leucine-rich repeat protein, promotes muscle-tendon targeting through its interaction with Robo. *Development* 136, 3607–3615. <https://doi.org/10.1242/dev.040329>
- Weitkunat, M., Brasse, M., Bausch, A.R., Schnorrer, F., 2017. Mechanical tension and spontaneous muscle twitching precede the formation of cross-striated muscle in vivo. *Development* 144, 1261–1272. <https://doi.org/10.1242/dev.140723>
- Weitkunat, M., Kaya-Çopur, A., Grill, S.W., Schnorrer, F., 2014. Tension and Force-Resistant Attachment Are Essential for Myofibrillogenesis in *Drosophila* Flight Muscle. *Current Biology* 24, 705–716. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.02.032>
- Yarnitzky, T., Min, L., Volk, T., 1997. The *Drosophila* neuregulin homolog Vein mediates inductive interactions between myotubes and their epidermal attachment cells. *Genes & development* 11, 2691–2700.
- Yoshikawa, S., McKinnon, R.D., Kokel, M., Thomas, J.B., 2003. Wnt-mediated axon guidance via the *Drosophila* Derailed receptor. *Nature* 422, 583. <https://doi.org/10.1038/nature01522>

