



HAL
open science

Le collagène XXII dans la formation et la fonctionnalité de la jonction myotendineuse chez le poisson zèbre, de l'embryon à l'âge adulte

Marilyne Malbouyres

► To cite this version:

Marilyne Malbouyres. Le collagène XXII dans la formation et la fonctionnalité de la jonction myotendineuse chez le poisson zèbre, de l'embryon à l'âge adulte. Biologie animale. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1224 . tel-02869390

HAL Id: tel-02869390

<https://theses.hal.science/tel-02869390>

Submitted on 16 Jun 2020

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.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1224

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie

Soutenue publiquement le 12/11/2018, par :
Marilyne Malbouyres

Le collagène XXII dans la formation et la fonctionnalité de la jonction myotendineuse chez le poisson zèbre, de l'embryon à l'âge adulte

Devant le jury composé de :

Dr. Julie Batut, CR CNRS, Université de Toulouse, France	Rapporteuse
Dr. Krzysztof Jagla, DR INSERM, Université de Clermont Ferrand, France	Rapporteur
Dr. Christel Lefrançois, MCF-HDR, Université de La Rochelle, France	Examinatrice
Pr. Ulrich Valcourt, PU, Université de Lyon, France	Examineur
Dr. Florence Ruggiero, DR CNRS, Université de Lyon, France	Directrice de thèse



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1224

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie

Soutenue publiquement le 12/11/2018, par :
Marilyne Malbouyres

Le collagène XXII dans la formation et la fonctionnalité de la jonction myotendineuse chez le poisson zèbre, de l'embryon à l'âge adulte

Devant le jury composé de :

Dr. Julie Batut, CR CNRS, Université de Toulouse, France	Rapporteuse
Dr. Krzysztof Jagla, DR INSERM, Université de Clermont Ferrand, France	Rapporteur
Dr. Christel Lefrançois, MCF-HDR, Université de La Rochelle, France	Examinatrice
Pr. Ulrich Valcourt, PU, Université de Lyon, France	Examineur
Dr. Florence Ruggiero, DR CNRS, Université de Lyon, France	Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mé-
rieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

A ma fille Margaux et mon mari

En mémoire de mes grands-parents

« Croyez en vos rêves et ils se réaliseront peut-être. Croyez en vous et ils se réaliseront sûrement. »

Martin Luther King

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier Julie Batut, Krzysztof Jagla, Christel Lefrançois et Ulrich Valcourt d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Florence,

mon parcours professionnel n'aurait vraisemblablement pas été le même sans toi. Je ne saurais jamais comment te remercier pour toute la confiance que tu m'as accordée et pour tes précieux conseils. Ton enthousiasme inébranlable, la quantité astronomique et la qualité de ton travail, bref ta passion pour ton métier sont un fabuleux exemple. Ton soutien n'a jamais cessé et nos discussions scientifiques et personnelles m'ont toujours précieusement guidée... Cette thèse est aussi la tienne, et tout simplement... MERCI.

Bien évidemment, cette thèse n'aurait pas été possible sans l'équipe et ses membres passés et présents ! Sandrine et Elisabeth, vous avez été mes piliers au quotidien que ce soit pour vos précieux conseils, pour nos discussions scientifiques mais aussi pour toute la bonne humeur et le recul que vous m'avez permis de prendre face aux obstacles classiques de la thèse et de la vie en générale ! Mention spéciale à Elisabeth dont le rire illumine nos manips et à Sandrine pour nos échanges musicaux et culinaires (vive nos revues bibliographiques sur le thème des recettes Thermomix). Une pensée également pour Dominique, Christelle et Elise, anciens membres de l'équipe, qui ont partagé avec moi plusieurs belles années de travail dans la bonne humeur.

Je remercie également Christel Lefrançois et Bruno Allard pour nos collaborations riches d'enseignements pour moi.

Christel, je n'aurai pas pu rêver mieux, dès le premier coup de fil, j'ai su que j'étais en de très bonnes mains. Merci pour toute l'aide avant, pendant et après les manips et pour tous nos échanges. J'espère que nous continuerons à travailler ensemble. Un très grand merci.

Bruno, je suis impressionnée par tes astucieux montages qui m'ont permis de mesurer avec précisions les contractions musculaires de mes larves. Merci pour ta disponibilité, ta pédagogie et ton aide précieuse. Je reste fébrile face à tes transducteurs mécano-électriques et tes minuties mais je promets d'essayer d'en casser le moins possible !

Je tiens à remercier mes collègues des plateaux d'imagerie et particulièrement Annie Rivoire pour tout ce qu'elle m'a appris en microscopie électronique, Christophe Chamot (merci aussi pour tes précieux conseils pour les concours) et Claire Lionnet pour la microscopie optique.

Merci Christelle pour tes prestations de service mais aussi pour tout ce que l'on a partagé ensemble et que l'on partagera encore. Merci Aurélie pour tes belles coupes via Novotec et tout le reste...chaque moment passé avec toi est un super moment...

A tous les étudiants passés et présents que j'ai croisé au cours de mon parcours professionnel et qui ont de près ou de loin contribué à ma motivation pour suivre leur exemple.

Certains, m'ont largement soutenu dans ma démarche en m'affirmant que « moi aussi je pouvais y arriver !! » Je pense à Aurélie (ma louloute, tu sais quelle place privilégiée tu tiens dans mon cœur), Muriel, Mickaël, Benjamin (et oui l'histoire du XXII a commencé avec toi ! **Il n'est scientifiquement pas prouvé que le poisson développe l'intelligence mais il stimule incontestablement l'imagination du pêcheur.**), Hannah, Emilie, Steven et plus récemment Paulines, Ruth, Fabien (j'aurai aimé que notre binôme perdure plus longtemps, ponctué par quelques mojitos !), Mélanie, Jonathan et ses sandwiches (tu me fais trop rire, ne changes rien !), Laure...Pauline, merci pour ton aide à divers moments clés de ma thèse, pour tes conseils précieux pour la rédaction mais aussi pour m'avoir associé à ta publication. Je ne doute pas que la qualité de ton travail fera de toi une grande scientifique. Mélanie, ton arrivée dans l'équipe, à une période un peu difficile, a été pour moi une véritable bulle d'oxygène. Merci pour ton aide précieuse pour les expériences de Q-PCR et pour nos discussions scientifiques et plus personnelles. Ton rire fait concurrence à Elisabeth, quel bonheur ! Je ne doute pas que la quantité et la qualité de ton travail finira par porter ses fruits. J'ai passé et je passe encore tellement de bons moments à la fois de travail et de rigolades avec vous tous...merci.

Mention spéciale pour Alex : j'ai énormément appris à ton contact et je te dois beaucoup. Je regrette souvent notre binôme ! Tu es à l'origine de l'aventure CRISPR au labo... Je me suis rendue compte lors de ton départ que j'avais les bonnes bases pour prendre mon envol et c'est beaucoup grâce à toi ! Ta grande pédagogie, ta rigueur scientifique ont été un bel exemple à suivre. Je te dois la quasi-totalité de mon savoir en biologie moléculaire. Merci pour ta pédagogie et pour nos échanges même après ton départ du labo et jusqu'au moment du dépôt ! Merci pour tes relectures aux heures les plus tardives !! Je te souhaite le meilleur pour la suite, tu le mérites. La seule chose qu'il faudrait revoir...hum...tes goûts musicaux... ! « Mais t'es pas là...mais t'es où ? »

J'aimerais aussi remercier l'IGFL pour son environnement de travail si agréable, dynamique et stimulant. Merci à l'équipe administrative et en particulier Sonia, Martine et Fabienne, qui travaillent dans l'ombre mais qui sont tellement indispensables au quotidien.

Merci au PRECI ! Robert pour ton aide bricolage des tunnels de nage et ton travail au PRECI. Et un énorme merci tout particulier à Laure : tu es une superbe responsable d'animalerie, à l'écoute des utilisateurs, et ton aide dans ce projet et bien d'autres est inestimable, le tout avec ta bonne humeur et tes gaffes qui me font bien rire ! **Si les poissons sont muets, les poissonnières sont bavardes pour eux, Georg Christoph Lichtenberg.** Merci à Mathilde pour son expertise du μ CTscan, sa gentillesse et sa disponibilité.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans la décharge de travail dont j'ai bénéficié les deux dernières années quant à ma responsabilité de la microscopie à l'IGFL. Je remercie donc Nicolas Labert mais aussi tout particulièrement Marilyne Duffrais (j'espère que tu seras IE comme tu le mérites amplement le plus vite possible) et Pierre Godement. Une pensée pour mon ancienne collègue microscopiste, Chantal Domenget.

Mon travail de thèse n'aurait pas été possible non plus sans l'aide financière de la formation continue du CNRS et je tiens à remercier particulièrement Sylvie Rouxel et Liliane Gomet pour nos nombreux échanges sur l'avancée de mes travaux, pour leur flexibilité et leur compréhension. Merci également à la cellule VAE de l'UCBL et plus particulièrement à Nicolas Lenne. Je tiens aussi à remercier Françoise Moneger et Mathias Faure qui ont été d'un précieux soutien lors de la dernière année de cette thèse.

Je voudrais bien sûr remercier mes ami(e)s : celles de la première heure (Carole, Nadine, Lucie, Audrey), le trio infernal de l'IUT (Steph, mon binôme de galère et Isa, mon binôme d'expérimentation animale), les copin(e)s de l'IBCP (Géraldine, à toi de jouer ! Marielle, Emeline) et de l'IGFL (cité(e)s précédemment et Séverine, Anne, Zofia,...) mais aussi les amitiés plus récentes mais si prometteuses (la folle équipe de parents des charmilles ... !) qui m'ont permis de trouver tout le soutien et tout l'alcool nécessaire pour oublier pourquoi on se lance dans une thèse !!!!! La bonne nouvelle est que l'on va ENFIN pouvoir passer plus de temps ensemble. Merci à nounou clémentine et les remplaçantes pour l'aide pour garder Margaux...je vous promets un peu moins d'heures supplémentaires !

Je voudrais remercier du fond du cœur mes parents pour m'avoir donné tellement d'amour pour réussir ce challenge. Seuls mes parents connaissent la phrase qui était écrite ici « allez spéciale dédicace papa-maman, je vous aime fort !! » Je voudrais aussi remercier mes frère, sœur, neveux et nièces et ma belle-famille pour tout leur soutien et leurs encouragements et particulièrement ma Sissi, je regrette déjà ton absence le jour J mais je sais que tu seras avec moi très fort par la pensée et via je ne sais quelle application !!!

A toi mon amoureux, mon mari, qui m'a prouvé à tellement de reprises qu'à cœur vaillant, rien n'est impossible. Encore une épreuve que l'on aura su traverser ensemble... Tu es l'élément déterminant qui m'a fait prendre conscience de ma « valeur ». Tu es ma force et ma faiblesse tout à la fois. J'espère que l'on saura trouver la zen-attitude qui est la seule chose qui nous manque... Je t'aime pour la vie. A nous Ténérife...**L'amour est un poisson d'avril, Joseph-Guillaume Barthe**

Je crois que cette folie de faire une thèse c'était sûrement une démarche un peu égoïste (pour une fois !), mais c'était avant tout pour me prouver que j'en étais capable et pour réaliser un de mes rêves : c'était une aventure extraordinaire. Et, s'il le fallait, je recommencerais sans hésiter. Je me sens grandie scientifiquement et humainement, j'ai même l'impression de mieux me connaître !

Et je crois Margaux, que tout ça, c'est aussi tellement pour que tu sois fière de ta maman... Crois en toi et oses réaliser tes rêves.

Je t'aime si fort ma puce, tu restes ma plus belle réussite. **Petit poisson deviendra grand.**
Jean de La Fontaine

Avant-propos

Réaliser un doctorat en VAE, un projet (pas) comme les autres...

Le manuscrit que vous allez parcourir ici est l'aboutissement de plusieurs années de travail puisque ma procédure de VAE a officiellement commencé en 2012 par mon dossier de faisabilité. Cependant, il représente plus largement l'évolution de mes fonctions après 18 années d'expériences professionnelles en tant que technicienne, en 2000, puis assistante ingénieur en 2009 et enfin ingénieur d'études en 2017.

Figurant parmi les premiers candidats lyonnais à prétendre à l'obtention d'un doctorat par VAE, les règles du jeu de ce projet se sont précisées entre 2012 et 2014. Ce qui au départ, ne devait être qu'une évaluation et une reconnaissance de mes capacités à mener un projet scientifique de A à Z, et ce, argumenté entre autres, par les publications dans lesquelles je figurais déjà comme co-auteur, s'est transformé officiellement en 2014. En effet, à cette date, l'école doctorale BMIC ayant reçu plusieurs demandes de VAE, a souhaité juger de la faisabilité pédagogique des projets. Dans mon cas, le jury a émis un avis favorable sous la condition que ma thèse comporte une publication scientifique en premier auteur. Ce qui devait être une procédure VAE s'est donc finalement transformée en une thèse plus « classique » avec les mêmes prérogatives que tout autre doctorant, à la différence près qu'elle intègre en partie mes travaux de recherche antérieurs.

Il me semble important dans cette introduction de vous repreciser mon parcours professionnel en insistant sur l'évolution de mes fonctions et sur mes motivations pour mener à bien ce projet, avant que le manuscrit reprenne une forme plus conventionnelle !

•Parcours professionnel

Recrutée au CNRS par concours externe en 2002 en tant que technicienne de recherche, puis promue Assistante Ingénieur par concours interne en 2009, j'ai travaillé 8 ans au sein de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines de Lyon (UMR5086). J'ai alors acquis une double compétence en microscopie optique et électronique qui m'a valu d'être associée à de nombreux projets de recherche et de devenir un acteur incontournable de l'imagerie du petit animal au sein de l'Institut. Je me suis particulièrement impliquée dans les travaux de l'équipe du Dr. F. Ruggiero. Aussi, en 2010, j'ai émis le souhait d'être affectée dans son équipe qui rejoignait l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL, ENS de Lyon, UMR5242 CNRS- UCBL) alors dirigé par le Pr. V. Laudet. Rejoindre l'IGFL représentait une

réelle opportunité pour mettre à profit mes compétences en imagerie et mon expertise de l'imagerie du poisson zèbre. J'ai ainsi intégré ce nouvel institut en 2011, en tant qu'assistante ingénieur pour mettre en place un plateau d'imagerie optique et pour effectuer des travaux de recherche au sein de l'équipe « Biologie et Pathologie des Matrices Extracellulaires » dirigée par le Dr. F. Ruggiero.

Mes missions à l'IGFL

1/ Responsabilité du plateau d'imagerie

2/ Travaux de recherche

3/ Projet de recherche portant sur le collagène XXII :

évolution de mon implication

1/ Concernant le plateau d'imagerie, j'ai, tout d'abord, en 2011-2012, entièrement rédigé l'appel d'offre européen d'imagerie pour équiper l'ensemble de l'IGFL. Cet appel d'offre (700 000 €) comprenait 38 microscopes des plus simples au plus complexes. Mon travail a ensuite consisté à analyser les offres reçues et à choisir le matériel le plus approprié. Mon rôle, après notre installation (septembre 2012) dans les nouveaux locaux, a consisté à rendre les 6 microscopes les plus complexes fonctionnels, à former les utilisateurs et les assister sur les divers appareils mais aussi d'en assurer leur bon fonctionnement et réglages. Pour cela, j'ai mis en place (organisation de réunions, répartition des tâches, formation...) une petite équipe de 5 personnes chacun co-responsable avec moi d'un des 6 microscopes. J'ai coordonné et facilité les interventions de mes collègues ITAs qui ont mis en réseau les microscopes, mis en place un planning de réservation en ligne des appareils et nous avons optimisé l'aménagement des pièces. Afin de réaliser une veille technologique, j'ai suivi des formations de façon régulière (formation à la microscopie corrélative en 2009, MIFOBIO en 2008 et 2010). J'ai consacré beaucoup de temps à former (en anglais le plus souvent) le personnel de l'institut sur ces microscopes et j'ai organisé et coordonné également des formations en imagerie et analyse d'images via nos fournisseurs de microscope (sociétés Leica et Zeiss). Progressivement, ma procédure de VAE a requis toute mon énergie et tout mon temps. Aussi, nous avons convenu, avec ma direction, de limiter pour environ deux ans mon activité sur le plateau d'imagerie pour me consacrer presque entièrement à mon projet de recherche. J'ai alors conservé uniquement la responsabilité du microscope confocal (le plus complexe) de l'institut et mon rôle de « conseillère » auprès des différents personnels (achat, technique à utiliser, partage de protocoles, redirection au sein des réseaux de microscopistes). Ceci a été rendu possible grâce au Dr. P. Godement qui a accepté provisoirement la responsabilité du plateau d'imagerie.

2/ J'ai aujourd'hui acquis 18 années d'expérience en imagerie se déclinant principalement en une double compétence en microscopies optique et électronique. Mes compétences scientifiques et techniques me permettent d'intervenir à différents niveaux : depuis l'élaboration d'un projet (choix des techniques à employer...) jusqu'à sa publication en passant par la préparation des échantillons, les observations et l'analyse d'images. Mes compétences concernant la préparation des échantillons couvrent le traitement des échantillons biologiques de la fixation à l'inclusion en résines, l'ultra-microtomie sur échantillons inclus en résine ou congelés, différentes colorations histologiques, l'immunomarquage ou encore la détection des ARNm par hybridation *in situ*. En ce qui concerne l'observation, je pilote un large répertoire de zoom-microscopes, vidéo-microscopes, microscopes confocaux ou encore des microscopes électroniques à balayage et à transmission.

Ma mission dans l'équipe « Biologie et pathologie des matrices extracellulaires » a d'abord été d'accompagner les membres de l'équipe dans leurs travaux d'histologie et d'imagerie. A ce titre, j'ai été associée à divers travaux de recherche portant sur le rôle des collagènes, super famille de protéines de la matrice extracellulaire, au cours du développement de 2 organismes modèles (souris et poisson zèbre) et leurs implications dans certaines pathologies comme le syndrome d'Ehlers Danlos ou les myopathies.

Au fil des années, je me suis de plus en plus impliquée dans les projets de recherche du laboratoire, et, à ma demande, Florence Ruggiero m'a confié un projet de recherche dans le cadre de la formation que j'ai suivie à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE), soutenue par la formation continue du CNRS, et qui s'est concrétisée par l'obtention d'un diplôme EPHE de niveau BAC+5 en 2008. Cette expérience a montré mes capacités à mener à bien un sujet de recherche de façon autonome. De plus, les enseignements que j'ai suivis lors de cette formation m'ont permis de parfaire mes connaissances en biologie et ainsi d'aller plus loin dans mon raisonnement scientifique (environ 300 heures d'enseignements répartis en Biologie cellulaire, Biologie du développement, Dynamique et plasticité cellulaires, Epithélium et Cancer, et enfin Communication et documentation). De plus, cette formation inclut la réalisation de documents de synthèse bibliographique argumentée concernant un thème en lien avec les cours et choisi par l'enseignant, permettant d'acquérir de bonnes bases rédactionnelles scientifiques. Ce travail dirigé par le Pr. Le Guellec, a fait l'objet d'un mémoire que j'ai soutenu le 10 janvier 2008. Le titre d'ingénieur de l'EPHE m'a été attribué avec la mention Très Bien. Cela a été aussi le point de départ à la réalisation de projets collaboratifs avec d'autres chercheurs utilisant le même modèle animal (poisson zèbre). En leur apportant mes

compétences et mon expérience dans le domaine de l'imagerie, j'ai pu contribuer efficacement à leurs projets de recherche (2 publications).

Après l'obtention de ce diplôme, mon implication dans les projets de recherche de l'équipe de F. Ruggiero n'a eu de cesse de croître, ponctuée par ma participation à des formations et des congrès tels que les ateliers de microscopie MIFOBIO organisés par le GDR 2588, la XVème réunion annuelle de la Société Française du Tissu Conjonctif (prix du meilleur poster scientifique en 2006) ou encore ma participation au congrès EFOR (Etudes Fonctionnelles sur les Organismes modèles) en janvier 2012. J'ai appris à effectuer des recherches bibliographiques ciblées, à initier et organiser des expériences, à rédiger des protocoles et des rapports en anglais, à présenter en français ou en anglais mes résultats lors de réunions internes, de réunions de suivi de contrats européens, ou de congrès.

En 2010, mes compétences en biologie de la matrice extracellulaire et ma grande expertise du modèle poisson zèbre ont incité F. Ruggiero à me confier l'intégralité d'un projet de recherche en collaboration avec l'équipe du Dr. Laurent Muller (Collège de France, Paris) portant sur l'étude du rôle d'une enzyme matricielle, la lysyl-oxydase like-2 (LL2A) dans le développement du réseau vasculaire chez le poisson zèbre. Mon rôle a alors consisté à élucider la fonction de l'enzyme LL2A au cours du développement du poisson zèbre. Mes résultats confrontés à ceux obtenus *in vitro* et dans des systèmes cellulaires par cette équipe ont permis de publier un article dans le journal Blood en 2011 (IF 10.5).

3/Je tiens à revenir ici sur l'évolution de mon implication dans l'étude fonctionnelle du collagène XXII utilisant le modèle du poisson zèbre, qui témoigne de l'évolution de mes responsabilités scientifiques au sein de l'équipe.

Dans un premier temps (2007), mon travail a surtout consisté à utiliser mes connaissances dans l'imagerie *in vivo* de la formation du système myotendineux chez le poisson zèbre, pour assister puis compléter les travaux d'un étudiant en thèse (Benjamin Charvet, thèse soutenue le 5 avril 2011). Je me suis donc impliquée de plus en plus dans cette thématique de recherche, pour laquelle le champ d'investigation est largement ouvert puisque la fonction de ce nouveau collagène était totalement inconnue au départ de l'étude.

Aussi, Florence m'a proposé de prendre la suite de ces recherches de façon autonome lors du départ du doctorant puis en tandem avec un post-doctorant nouvellement arrivé au laboratoire, prenant en charge, lui, la partie biologie cellulaire, moléculaire et mécanistique du projet et moi-même effectuant la partie fonctionnelle *in vivo* chez le poisson zèbre.

En 2012, j'ai initié une nouvelle étape dans ma carrière en démarrant mon projet de thèse en VAE. J'ai travaillé en lien étroit avec le post-doctorant Alexandre Guiraud. Pour cela, j'ai proposé de me former aux techniques de biologie moléculaire et de biochimie que je ne pratiquais pas jusqu'alors afin de réaliser un travail de recherche encore plus complet. J'ai suivi une formation théorique en 2015 pour mettre à jour mes connaissances, puis j'ai été intensivement formée, en interne, par les membres de mon équipe. Depuis 2015, je suis la seule à travailler sur ce projet dans l'équipe. Aujourd'hui, je maîtrise parfaitement les techniques d'extraction, purification, détection ou encore d'amplification des acides nucléiques. De ce fait, je me suis entièrement consacrée à la création de poissons KO pour des gènes de collagènes en utilisant la technologie CRISPR-Cas9 (établie pour la première fois en 2013 chez le poisson zèbre) pour répondre à nos questions biologiques. Cette technique, bien que décrite comme simple d'utilisation et révolutionnaire, demande une expertise théorique et pratique pour sa conception et sa mise en œuvre. Devenue experte dans l'utilisation de cette technique chez le poisson zèbre, j'ai été sollicitée en 2017 pour participer à une formation sur cette technique en tant que formatrice. J'ai également présenté mes résultats en anglais, à plusieurs reprises, comme lors de la 8^{ième} réunion annuelle d'EFOR (Réseau d'Etudes Fonctionnelles sur les ORganismes modèles) à Paris ou encore lors de séminaires internes.

•Activités transversales

La transmission de mon savoir en imagerie prend déjà une part non négligeable de mon temps mais je pense avoir démontré à maintes reprises mon volontarisme pour m'impliquer encore d'avantage dans des tâches d'intérêt collectif. J'ai notamment, dans mon précédent laboratoire, réalisé l'évaluation des risques pour le CHS (Comité d'Hygiène et Sécurité). J'ai été représentante des ITAs de catégorie B au conseil de laboratoire de l'IBCP de 2003 à 2007. Je me suis également fortement investie dans 2 plateaux d'imagerie : le PLATEAU Technique Imagerie/Microscopie (PLATIM) et le Centre Technologique des Microstructures (CTμ). En plus d'être une utilisatrice régulière et autonome du PLATIM pour diverses applications (micro-injection, microscopie confocale et vidéo-microscopie, analyses d'image à l'aide des logiciels Métamorph et ImageJ...), j'ai assuré la responsabilité de la vidéo-microscopie (développement, formation et assistance des utilisateurs) et de la macroscopie. Pour assurer ces responsabilités, j'étais présente sur le plateau chaque mercredi de 2006 à fin 2011. Utilisatrice régulière et autonome du CTμ de l'Université Lyon I, pour différents travaux (ombrage rotatif, ultra-microtomie, microscopies électroniques à balayage et à transmission...), j'ai également été représentante des utilisateurs de 2006 à 2010 et ai donc participé à ce titre aux

conseils de gestion du centre. Soucieuse de m'investir dans les réseaux nationaux de microscopie, j'ai co-animé un atelier de microscopie corrélative en 2010 lors de l'école thématique MIFOBIO du CNRS. Je suis enseignante vacataire pour les étudiants du Master Imagerie de l'UCBL depuis 2009 (16 heures de TP par an). Je suis membre des réseaux de microscopie RCCM (Réseau des Centres Communs de Microscopie) et du GDR2588 (Microscopie Fonctionnel du Vivant du CNRS). De par mes nouvelles compétences, j'interviens également maintenant dans une formation portant sur la technologie CRISPR-Cas9 et intervient régulièrement dans le groupe de travail portant sur cette technologie, à l'IGFL.

- Valorisation des résultats

Je suis une ingénieure passionnée par mon métier, et j'espère vous avoir convaincu de mon dynamisme et de ma constante volonté de progression.

Mon travail m'a valu d'être associée comme co-auteur dans 23 publications (dont 8 comme deuxième auteur).

J'ai participé au concours pour la meilleure image scientifique organisé par le périodique EMBO journal en 2007. Mon image de la peau d'un embryon de poisson zèbre observé en microscopie électronique à balayage a gagné le premier prix du concours et a ainsi fait l'objet de la couverture en mars 2007, et a été intégré dans la réalisation d'un calendrier promotionnel. Le prix du meilleur poster m'a été attribué lors de la XVème réunion annuelle de la Société Française du Tissu Conjonctif, à Lyon, en mai 2006.

Aussi, lorsque j'ai discuté, avec mon directeur de recherche et le directeur de mon unité, de la possibilité de valoriser mes divers travaux de recherche par une démarche de Validation des Acquis de l'Expérience sous la forme d'un doctorat, j'ai tout de suite reçu un appui très favorable. J'ai été extrêmement déterminée à mener à bien ce projet qui valorisera mes acquis et me permettra peut-être d'évoluer dans ma carrière au sein du CNRS, que ce soit à l'occasion de concours internes (Ingénieur de Recherche) ou lors de nos évaluations annuelles. J'espère vous convaincre à la lecture de mon manuscrit que ce diplôme de doctorat constituera une juste reconnaissance de mes compétences.

Sommaire

Résumé	20
Liste des tables et figures	23
Liste des abréviations	27
Introduction	32
1. Les matrices extracellulaires	33
1.1 Un nouvel outil: le matrisome	35
1.2 Le matrisome du poisson zèbre	36
1.3 Le « core-matrisome » : focus sur les collagènes	38
• Signature structurale des collagènes	38
• Les sous familles	39
1.4 Biosynthèse des collagènes	43
1.5 La sous-famille des FACITs	45
1.6 Les collagènes XXI et XXII	49
1.7 Le collagène XXII	50
• Le collagène XXII chez le poisson zèbre	52
2. L'appareil myotendineux : structure et mise en place	53
2.1 Le muscle squelettique	53
• Présentation générale	53
• Les différents types de fibres musculaires squelettiques	54
• Les cascades moléculaires régulant le développement du muscle	56
• Les fibres musculaires squelettiques du poisson zèbre	57
• La myogenèse chez le poisson zèbre	61
• La dynamique des cellules souches dans la régénération musculaire chez le poisson zèbre	63

2.2 Le tendon	65
• Présentation générale	65
• L'organisation des tendons	65
• La fibrillogenèse	68
• Les marqueurs du tendon	69
• La formation du syndétome	70
• Les tendons chez le poisson zèbre	71
2.3 Les interactions entre muscle et tendon	72
• L'interaction physique entre muscle et tendon : la jonction myotendineuse et les systèmes d'ancrage	72
▪ Le complexe DAPC	78
▪ Le système d'ancrage dépendant de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$	81
• Les interactions chimiques entre muscle et tendon: importance au cours du développement	82
▪ La mise en place des progéniteurs musculaires et tendineux	82
▪ La mise en place de la JMT	83
• L'implication du TC dans l'homéostasie musculaire chez l'adulte	85
2.4 Pathologies du système musculo-tendineux	87
• Les dystrophies musculaires congénitales (DMCs)	87
• La myopathie de Bethlem (MB)	90
• Les arthrogryposes	90
3. Le poisson zèbre : un bon modèle pour étudier les pathologies du muscle	92
3.1 Origine	92

3.2 Intérêts du modèle	94
3.3 Les grandes étapes du développement	95
3.4 Des premières contractions à la nage	95
• Contractions spontanées	96
• Contractions en réponse à un stimulus tactile	96
• Nage	97
3.5 Le poisson adulte	97
• Le système musculo-squelettique	99
3.6 De l'invalidation transitoire à la création de lignées stables	100
• L'édition de génome par la méthode CRISPR/Cas9	103
• CRISPR/Cas9 chez le poisson zèbre	105
3.7 Le poisson zèbre, un modèle de choix pour l'étude des pathologies du muscle	108
3.8 Mutants poisson zèbre de pathologies musculaires	109
• Mutations des composants des complexes de la JMT	110
▪ Dystrophine	110
▪ Laminine α 2	113
▪ Laminine β 2	117
▪ Dystroglycan	118
▪ La kinase liée aux intégrines (ilk)	121
• Autres mutants poissons zèbres présentant des pathologies musculaires	124
3.9 Analyse de l'activité musculaire du poisson zèbre	128
• Mesures de forces de contractions	128
• Evaluation des performances de nage	129
▪ Les différents types de nage	129
▪ Les tests de nage	130
▪ Critères mesurés au cours des tests de performance de nage par paliers	131

▪Concept de Fry	132
▪Taux métabolique standard, taux métabolique actif et registre métabolique aérobie	132
▪Sources potentielles d'artéfacts pour les tests de performance de nage	133
Matériels et méthodes	135
Protocole n°1: Conditions d'élevage des poissons zèbre au laboratoire	137
Protocole n°2: Stratégie Knockdown par injection de morpholinos	139
Protocole n°3: Synthèse et injection des ARNsg	141
Protocole n°4: Test d'efficacité de mutagenèse	144
Protocole n°5: Génotypage des lignées <i>col22a1</i> ^{-/-}	146
Protocole n°6: Rétro-transcription et PCR quantitative	150
Protocole n°7: Biréfringence	153
Protocole n°8: Immunofluorescence <i>in toto</i>	154
Protocole n°9: Vidéo-microscopie	158
Protocole n°10: Microscopie électronique à transmission	159
Protocole n°11: Mesure de l'amplitude des contractions musculaires après électrostimulation	162
Protocole n°12: Test de performance de nage/ Histologie	164
Résultats	170
Synopsis de la publication n°1	171
Charvet, B., Guiraud, A., Malbouyres, M., Zwolanek, D., Guillon, E., Bretaud, S., Monnot, C., Schulze, J., Bader, H.L., Allard, B., et al. (2013). Knockdown of <i>col22a1</i> gene in zebrafish induces a muscular dystrophy by disruption of the myotendinous junction. <i>Development</i> 140, 4602–4613.	

Synopsis de la publication n°2	173
Malbouyres, M., Guiraud, A., Lefrançois, C., Salamito, M., Mauroy, P., Bernard, L., Allard, B. and Ruggiero, F. En préparation.	
Variable expressivity of col22a1 null-mutations in zebrafish results in mild to severe muscular dystrophic phenotype associated with postural defects and reduced swimming performance	
Discussion générale et perspectives	175
Bibliographie	191
Annexes	211
Annexe 1	212
Breton, S., Nauroy, P., Malbouyres, M and Ruggiero, F. Fishing for collagen function: about development, regeneration and disease. SCDB, 2018.	
Annexe 2	213
Charvet, B., Malbouyres, M., Pagnon-Minot, A., Ruggiero, F., and Le Guellec, D. (2011). Development of the zebrafish myoseptum with emphasis on the myotendinous junction. <i>Cell Tissue Res.</i> 346, 439–449.	
Annexe 3	215
Bignon, M., Pichol-Thievend, C., Hardouin, J., Malbouyres, M., Bréchet, N., Nasciutti, L., Barret, A., Teillon, J., Guillon, E., Etienne, E., et al. (2011). Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. <i>Blood</i> 118, 3979–3989.	
Annexe 4	216
Centre de ressources et aides en lignes	
Annexe 5	218
Evaluation des performances de nage	
Annexe 6	221
Le cycle de vie du poisson zèbre	

Résumé

Résumé

Le collagène XXII (COLXXII) a été décrit, en 2004, comme un marqueur des jonctions tissulaires chez la souris. En particulier, la jonction myotendineuse (JMT) est une matrice extracellulaire spécialisée qui assure une liaison structurale entre le muscle squelettique et le tendon et permet la transmission des forces de contraction au squelette. Mon projet de thèse a visé à caractériser le rôle de COLXXII *in vivo* ; le modèle du poisson zèbre a été choisi.

Chez le poisson zèbre, *col22a1* code pour COLXXII dont l'expression débute dans tout le somite, puis, se restreint progressivement aux extrémités des fibres musculaires au niveau de la JMT, où est déposée la protéine. Utilisant la technique de morpholino-knockdown, nous avons montré que les morphants développent un phénotype dystrophique et que le COLXXII fait très probablement partie du complexe d'ancrage intégrine $\alpha7\beta1$. Cependant, compte-tenu de la durée d'efficacité réduite des morpholinos, notre étude était limitée. Utilisant la technologie CRISPR-Cas9, nous avons donc généré deux lignées invalidées pour *col22a1*. L'analyse ultra-structurale des poissons *col22a1*^{-/-}, de la jeune larve à l'adulte, montre que les interdigitations du sarcolemme, caractéristiques de la JMT, sont pratiquement absentes chez les mutants (comme chez les morphants), pouvant impacter la transmission des forces et/ou l'attachement du muscle aux myoseptes (tendons).

De façon intéressante, pour les deux lignées, la même proportion de larves présente un phénotype très sévère entraînant la mort vers 2 semaines post-fécondation (spf). Les autres larves, elles, survivent et ne montrent pas de phénotype global particulier. En revanche, une forte réduction des interdigitations de la JMT est constatée et dans de rares cas, après challenge des poissons, une rupture musculaire est observée. Une première approche de q-PCR par gène candidat a été réalisée et il semble possible que les différences phénotypiques soient liées à des événements conjoints d'expressivité variable et de compensation génique.

Enfin, utilisant un système original de test de nage à contre-courant par palier, j'ai montré que les poissons *col22a1*^{-/-} âgés de 6 mois ont une capacité de nage très diminuée et consomment d'avantage d'O₂ pendant l'effort comparés aux animaux sauvages. L'efficacité du système musculo-squelettique semble donc moindre en l'absence de collagène XXII.

Nos résultats devraient permettre de considérer *COL22A1* comme un gène candidat pour les cas de dystrophies musculaires dont la cause génétique est non élucidée.

Mots clés: poisson zèbre, collagène XXII, jonction myotendineuse, morpholinos, CRISPR-Cas9, dystrophie musculaire, performance de nage.

Summary

Collagen XXII (COLXXII) was described, in 2004, as a marker of tissue junctions in mice. Notably, the myotendinous junction (MTJ) is a specialized extracellular matrix which structurally connects skeletal muscle and tendon and thus allows the transmission of muscle forces to bones. My thesis project aimed at characterizing the *in vivo* role of COLXXII using the zebrafish as a model.

The zebrafish *col22a1* gene encodes COLXXII whose expression begins in the entire somite, and is then restricted gradually to the extremities of the myofibers at the MTJ, where the protein is deposited. Using a morpholino-knockdown strategy, we showed that morphants develop a dystrophic phenotype and that COLXXII is likely a member of the integrin $\alpha7\beta1$ anchoring complex. However, because morpholinos are efficient only few days after injection, our study was limited to early stages of zebrafish development. Using the CRISPR-Cas9 technology, we generated two mutant lines invalidated for *col22a1*. The ultra-structural analysis of *col22a1*^{-/-} fish shows that the typical sarcolemmal interdigitations of the MTJ are almost absent in mutants, from larvae to adult (as in morphants), which could impact the force transmission and/or the muscle attachment to myosepta (tendons).

Interestingly, the two mutant lines present the same proportion of larvae displaying a severe phenotype leading to fish death at about 2 weeks post-fertilization. On the contrary, other larvae survive and do not display any obvious general phenotype. However, we observed a strong reduction of the MTJ interdigitations and in rare cases, when fish are challenged, a muscular disruption. A first candidate genes approach was realized by qPCR and tends to show that the phenotypic differences may be due to both, variable expressivity and genetic compensation.

Finally, using an innovative system of swimming test, I have shown that 6 months *col22a1*^{-/-} fish show a highly decreased swimming capacity (Ucrit) and consume more O₂ during effort compared to wild type animals. Thus, we conclude that the musculoskeletal system efficiency seems altered in absence of COLXXII.

Our results should allow considering COL22A1 as a candidate gene for muscular dystrophies with unclarified genetic cause.

Keywords: zebrafish, collagen XXII, myotendinous junction, morpholinos, CRISPR-Cas9, muscular dystrophy, swimming performance.

Liste des tables et figures

Liste des tables et figures

Figure 1: Représentation schématique des matrices extracellulaires, de leurs composants majeurs et de leurs récepteurs à la surface cellulaire.

Figure 2: Organisation de la matrice extracellulaire dans des tissus conjonctifs selon la proportion et la composition en collagène.

Figure 3: Les matrisomes humain et murin.

Figure 4: Les matrisomes humain, murin et du poisson zèbre.

Figure 5: Proportion des gènes du matrisome humain et du poisson zèbre par rapport au génome entier.

Figure 6: Classification, composition, distribution et structures caractéristiques des collagènes chez les vertébrés.

Figure 7: Fibre de collagène en microscopie électronique à transmission.

Figure 8: Dépôt d'une fibre de collagène dans la matrice.

Figure 9: Organisation structurale des FACITs.

Figure 10: Expression du collagène XXII chez la souris et organisation de la protéine recombinante purifiée.

Figure 11: Organisation structurale du collagène XXII chez *Danio rerio*.

Figure 12: Anatomie du muscle strié squelettique.

Figure 13: Schéma montrant les différences de distribution des synapses selon le type de fibre et l'espèce animale.

Figure 14 : Schémas montrant l'organisation de muscle squelettique dans le tronc chez le poisson zèbre.

Figure 15: Les muscles lents et rapides chez le poisson zèbre.

Figure 16: Ultrastructure des sarcomères et des compartiments membranaires associés chez les mammifères et le poisson zèbre.

Figure 17: Mécanisme de réparation du muscle de larve de poisson zèbre.

Figure 18: Organisation des tendons.

Figure 19: Modèle de formation du syndétome établi chez le poulet.

Figure 20: La jonction myotendineuse humaine (JMT) en microscopie électronique à transmission, sections longitudinales.

Figure 21: Reconstruction 3D de la jonction myotendineuse humaine.

Figure 22: Collagène XXII et dystrophine à la JMT humaine (tendon gracilis) après marquages des collagènes XII, XIV et XXII et de la dystrophine.

Figure 23: Deux complexes protéiques constituent le lien mécanique principal entre le cytosquelette d'actine et la MEC chez le poisson zèbre.

Figure 24: Représentation schématique des protéines formant les costamères dans les muscles squelettiques.

Figure 25: Le complexe des protéines associées à la dystrophine.

Figure 26: Régulateurs importants du signaling médié par les intégrines à la JMT.

Figure 27: Le poisson zèbre sauvage à travers le monde.

Table 1: Liste de lignées de poissons zèbres sauvages reconnues par le ZIRC.

Figure 28: Evolution du nombre de publication utilisant le modèle poisson zèbre de 1951 à nos jours.

Figure 29: Comportements locomoteurs au cours du développement du poisson zèbre.

Figure 30: Anatomie d'un poisson zèbre à l'âge de 6 mois.

Figure 31: La colonne vertébrale.

Figure 32: Le système musculo-squelettique.

Figure 33: Caractéristiques des muscles dystrophiques de poisson zèbre.

Figure 34: Les morpholinos®.

Figure 35: Les techniques d'édition du génome

Figure 36. La technologie CRISPR-Cas9.

Figure 37: Représentation schématique des différentes étapes nécessaires à l'obtention de mutants par la technologie CRISPR/Cas9 chez le poisson zèbre.

Figure 38: Stratégies knock-in au cours du développement embryonnaire précoce du poisson zèbre.

Figure 39: Myofibrilles du muscle squelettique humain (34 ans) et de poisson zèbre adulte de 6 mois en microscopie électronique à transmission.

Table 2: Lignées de poissons zèbres modèles pour des pathologies musculaires.

Figure 40: Les mutants *sapje* développent des lésions des muscles squelettiques.

Figure 41: Analyse MET de muscle provenant d'une lignée de chats dont le gène codant la laminine $\alpha 2$ est invalidé.

Figure 42: Analyse en MET des myoseptes verticaux des mutants *caf* comparés aux embryons sauvages de 72 et 120 hpf.

Figure 43: Myoseptes anormaux et détachement des myofibres chez les poissons déficients pour la laminine- $\alpha 2$

Figure 44: Analyse en MET des myoseptes verticaux à 3 jpf.

Figure 45: Le mutant *patchytail*.

Figure 46: Analyse en MET de muscles squelettiques de poissons sauvage et mutant *dag1* à 3 et 7 jpf.

Figure 47: Ultrastructure des tubules-t chez les poissons sauvages et mutants *dag1*

Figure 48: Mutants et morphants dystrophiques chez le poisson zèbre.

Figure 49: Analyse en MET du muscle squelettique d'un patient présentant une mutation du gène *POPDC1*.

Figure 50: Le poisson zèbre mutant *popdc1S191F* présente une dystrophie musculaire.

Figure 51: Schéma de la mesure des contractions musculaires chez la larve de poisson zèbre de 2 semaines.

Figure 52: Les différents types de nage chez les téléostéens en fonction de la vitesse de nage et du temps avant la fatigue.

Figure 53: Le test de nage par palier.

Figure 54: La capacité métabolique aérobie en trois compartiments.

Figure 55: La consommation d'oxygène pendant le test de nage et en phase de récupération.

Figure 56: Communication bidirectionnelle entre muscle et tendon ?

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AChR: AcetylCholin Receptor (récepteur à l'acétylcholine)

AD: Arthrogrypose Distale

ADAMs: A Disintegrin And Metalloprotease (protéines possédant un domaine désintégrine et métalloprotéase)

ADAMTs: A Disintegrin-like And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 motif (protéines possédant un domaine désintégrine, métalloprotéase et un motif thrombospondine)

ADNg: ADN génomique

Akt: ou protéine kinase B appartenant à la famille de protéines sérine thréonine kinase

AMC: Arthrogrypose Multiple Congénitale

AMR: Active Metabolic Rate (taux métabolique actif)

AMS: Aerobic Metabolic Scope (registre aérobie)

APAF-1: Apoptotic Peptidase Activating Factor 1 (peptidase, facteur d'activation de l'apoptose)

ARNsg: ARN simple guide

ATP: Adénosine TriPhosphate

BMP: Bone Morphogenetic Protein

BMz: Basement Membrane Zone (zone élargie de la lame basale)

Cas 9: CRISPR associated protein 9

COL: domaine collagénique

COMP: Collagen Oligomeric Matrix Component

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CS: Cellules Satellites

DAG: Dystroglycan

DAPC: Dystrophin-Associated Protein Complex

DDRs: Discoïdin Domain Receptors (récepteurs à domaine discoïdine)

DGC: Dystrophin-associated Glycoprotein Complex

DMB: Dystrophie Musculaire de Becker

DMCs: Dystrophies Musculaires Congénitales

DMD: Dystrophie Musculaire de Duchenne

DTN: dystrobrevine

DYS: dystrophine

ECL: External Cellular Layer (couche cellulaire externe)

Egr1: Early growth response protein 1

ENU: N-nitroso-N-éthylurée

FACIT: Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices

FAK: Focal Adhesion Kinase

FAPs: Fibro/Adipogenic progenitors (progéniteurs fibro-adipogéniques)

FF: Fast Fibers (fibres rapides)

FGF: fibroblast growth factor (facteur de croissance fibroblastique)

FIB-SEM: Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscopy (microscopie électronique à balayage par faisceau d'ions focalisés)

fMyHC: fast Myosin Heavy chain (isoforme rapide des chaînes lourdes de myosine)

fMyLC : fast Myosin Light Chain (isoforme rapide des chaînes légères de myosine)

FNIII : domaine fibronectine de type III

GAG: glycosaminoglycanes

GF: Growth Factor (facteur de croissance)

GFP: green fluorescent protein

GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 β

HA: hyaluronan

HDR: Homology Directed Repair

HIS: Hybridation *In Situ*

HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (Carcinome à cellules squameuses de la tête et du cou)

HRMA: High Resolution Melting Analysis (analyse des courbes de fusion à haute résolution)

hpf: heure post fécondation

ILK : Integrin-Linked Kinase (kinase liée à l'intégrine)

JMT: Jonction MyoTendineuse

JNM: Jonction NeuroMusculaire

JOT: Jonction OstéoTendineuse

jpj: jours post fécondation

jve: jour de vie embryonnaire

KD: knockdown ou sous expression

KI: Knock-In ou introduction d'un gène d'intérêt dans le locus

KO: Knock Out ou invalidation d'un gène

LC : Longueur Corporelle

LGMD 1C : Limb-Girdle Muscular Dystrophy 1C (dystrophie musculaire des ceintures 1C)

LOXL: Lysyl OXydase Like

MB: Myopathie de Bethlem

MEC: Matrice ExtraCellulaire

MET: Microscopie Electronique à Transmission

MDC1A: Merosin-Deficient Congenital muscular dystrophy 1A (dystrophie musculaire congénitale dite à mérosine négative)

MFF: Medial Fast Fibers (fibres rapides médianes)

MIDAS: Metal Ion-Dependant Adhesion Site

MMEJ: Microhomology-Mediated End Joining

MMPs: Matrix MetalloProteinases (métalloprotéases de la matrice)

MO : morpholinos

MO₂: consommation d'oxygène

MP: Muscle Pioneer (fibres pionnières)

mpf : mois post fécondation

mPT: mitochondrial membrane Permeability Transition (perméabilité transitoire des membranes mitochondriales)

mPTP: mitochondrial Permeability Transition Pore (pores mitochondriaux de perméabilité transitoire)

MRFs : Myogenic Regulatory Factors (facteurs de régulation myogénique)

MS: mismatch

MTE-Blot : Multiple tissue expression-Blot

mtor : Mammalian target of rapamycin

Myf5: Myogenic factor 5

MyoD : Myogenic Differentiation protein

NC: domaine Non Ccollagénique

NHEJ: Non-homologous End Joining

NOS: Nitric Oxyde Synthase (oxyde nitrique synthase)

N-RAP: Nebulin-Related Actin-binding Protein

OSCC: Oral Squamous Cell Carcinoma (carcinome à cellules squameuses oral)

PAM: Protospacer Adjacent Motif

pax : paired box gene

pb: paire de base

PBS: Phosphate Buffer Salin

PBT: PBS-Tween

PDZ: initiales correspondant aux premières lettres des 3 premières protéines découvertes comme porteuses de ce domaine: Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), et Zonula occludens-1 protein (zo-1)

PG: protéoglycane

PH: Pleckstrin Homology domain

PICs: PW1-positive Interstitial Cells
PINCH: Particularly INteresting Cys-His-rich protein
PITPNA: Phosphatidylinositol Transfer ProtéiNe- α
Pi3K: Phosphatidyl Inositol 3-kinase
RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SCX: Scleraxis
SERCA: Sarco(Endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase
SG: sarcoglycan
Shh: Sonic hedgehog
SLRP: Small Leucine-Rich Proteoglycans (petits protéoglycanes riches en leucine)
SMR: Standard Metabolic Rate (taux métabolique standard)
Smyhc1: Slow myosin heavy chain 1
SNC: Système Nerveux Central
SNT: syntrophine
spf: semaine post fécondation
SSF: Superficial Slow Fibers (fibres superficielles lentes)
SSPN: sarcospan
Stripe: Early growth response-like transcription factor
TALEN: Transcription Activator-Like Effector Nucleases
TC: Tissu Conjonctif
TGF- β : Transforming Growth Factor β
TSPN: Thrombospondin-N-terminal-like domain
TS-WGD: Teleost-Specific Whole Genome Duplication
U_{crit}: vitesse de nage critique
UCMD: Ulrich Congenital Muscular Dystrophy (dystrophie musculaire congénitale d'Ulrich)
uPAR: urokinase receptor
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
vWA: von Willebrand factor A
Wnt: Wingless integration site
ZFNs: Zinc Finger Nucleases (nucléases à doigt de zinc)
ZFIN : ZebraFish Information Network (réseau d'information sur le poisson zèbre)

Introduction

1. Les matrices extracellulaires

La matrice extracellulaire (MEC) est définie comme l'ensemble des composants non-cellulaires d'un tissu ou d'un organe chez les organismes multicellulaires. Chez les vertébrés, on distingue trois grands types de protéines matricielles: les protéoglycanes, les glycoprotéines (fibronectines, laminines...) et les protéines fibreuses telles que les collagènes et l'élastine. Ce sont ces protéines fibreuses qui s'organisent en échafaudages dans lesquels les protéoglycanes viennent « remplir » les interstices en formant une sorte de gel hydraté, grâce à leur capacité à capturer les molécules d'eau (Frantz et al., 2010). D'autres protéines sont présentes dans la MEC et contribuent également à la régulation de sa structure et à sa fonction (Theocharis et al., 2016). La MEC peut prendre deux formes : la lame basale (matrice péri-cellulaire), et les matrices interstitielles (Figure 1).

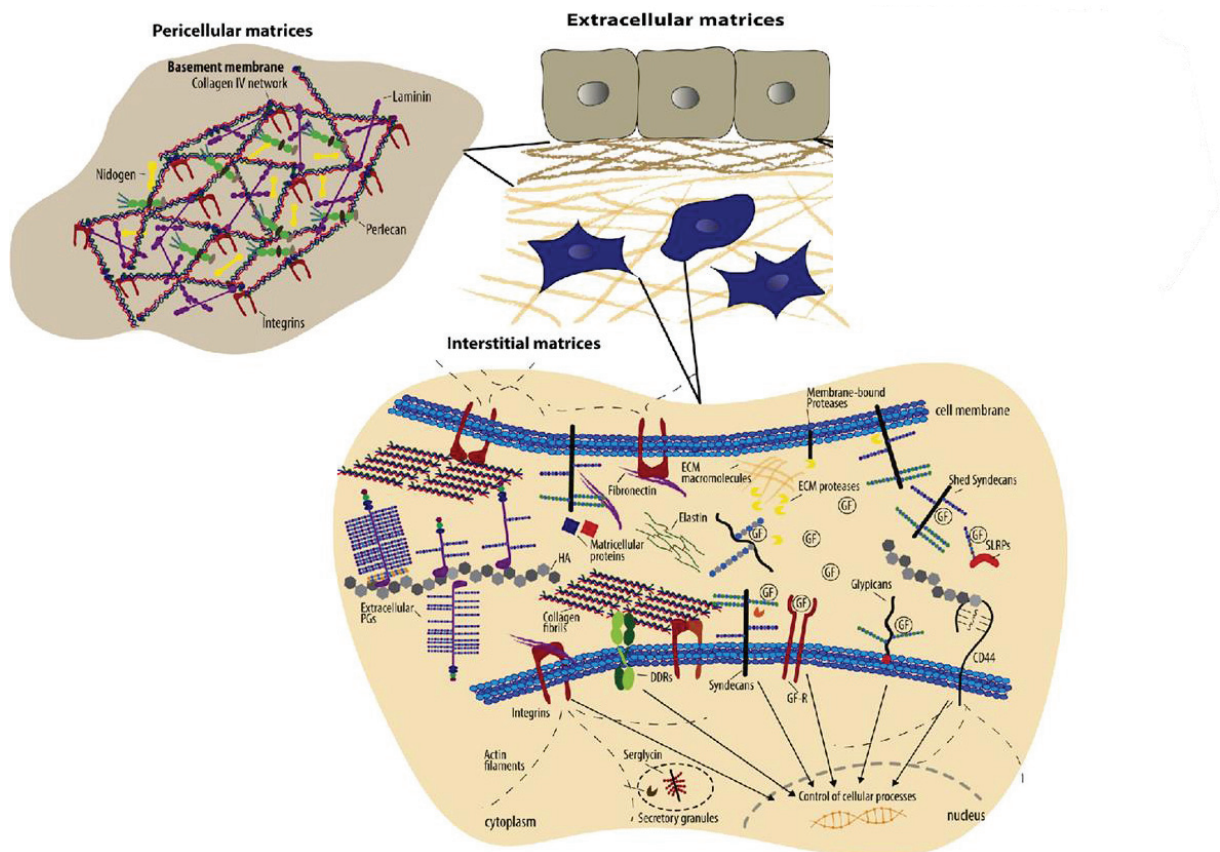


Figure 1: Représentation schématique des matrices extracellulaires, de leurs composants majeurs et de leurs récepteurs à la surface cellulaire.

Modifié d'après Theocharis et al., 2016.

Les lames basales sont des structures hautement organisées que l'on retrouve dans la plupart des organismes multicellulaires, invertébrés et vertébrés, à l'interface entre deux tissus différents et autour d'une variété de types cellulaires. Ainsi, les lames basales délimitent tous les épithélia, entourent les cellules endothéliales, les cellules de Schwann et

les myofibres des muscles, et sont retrouvées entre les adipocytes du tissu adipeux. Toutes les lames basales sont constituées de quatre composants majeurs: la laminine, le collagène IV, le nidogène et le perlecan. Mais une variété de composants mineurs (fibuline, agrine...) définit la spécificité de chacune d'elle et leur confère des propriétés particulières (Jayadev and Sherwood, 2017). Par exemple, la lame basale épidermique se situe entre les cellules épithéliales et le tissu conjonctif et est composée de deux réseaux qui se superposent, l'un constitué de laminine, l'autre de collagène IV, qui sont reliés par d'autres composants de la MEC dont le nidogène et le perlecan. D'autres collagènes mineurs tels que les collagènes XV et XVIII sont aussi présents. Les matrices interstitielles ou tissus conjonctifs sont présent(e)s dans tous les tissus à l'exception du sang et entourent généralement les cellules. Elles sont composées de collagènes, d'élastine, de protéoglycanes (PGs), d'acide hyaluronique (HA) ainsi que de protéines matricellulaires comme les ténascines ou les thrombospondines. Ces protéines interagissent entre elles pour créer un réseau tridimensionnel dynamique. Les cellules se lient aux composants de la MEC via des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules tels que les intégrines, les PGs membranaires, les syndécans et glypicans, le récepteur à l'HA et les récepteurs à domaine discoïdine qui possèdent une activité tyrosine kinase (DDR). Ils transduisent les signaux extracellulaires aux cellules, régulant ainsi de nombreuses fonctions cellulaires. Les facteurs de croissance (GF) peuvent être séquestrés au sein de la MEC via des liaisons aux composants de la MEC tels que les PGs ; et peuvent être libérés après dégradation de la MEC pour se lier à des récepteurs spécifiques (GF-R) et des co-récepteurs (syndécans et glypicans) pour activer des cascades signalétiques de nature variée. Les MECs peuvent être dégradées par plusieurs enzymes protéolytiques, comme les métalloprotéases de la matrice (MMPs), les protéines possédant un domaine désintégrine et métalloprotéases (ADAMs), les ADAMs possédant un motif thrombospondine (ADAMTs), les cathépsines, les activateurs du plasminogène et les enzymes de dégradation des glycosaminoglycanes (GAG), telles que les héparinases et hyaluronidases. Le protéoglycane intracellulaire, serglycine est également présent dans les granules de sécrétion du cytoplasme; en association avec des molécules bioactives comme les protéases et est sécrété dans la MEC au cours des processus inflammatoires ou du remodelage tissulaire. Les enzymes de dégradation de la MEC jouent donc un rôle critique dans le remodelage « normal » des tissus mais aussi lors de pathologies.

La composition de la MEC et sa topologie sont hautement spécifiques et uniques pour chaque tissu (Figure 2) (Frantz et al., 2010).

Alors qu'elle a très longtemps été considérée comme une structure inerte servant d'échafaudage aux cellules, aujourd'hui, de par les propriétés décrites ci-dessus, la MEC est

clairement identifiée comme une structure participant à de nombreux processus biologiques essentiels à des programmes cellulaires variés comme la survie, la différenciation ou encore les mouvements cellulaires au sein d'un organisme.

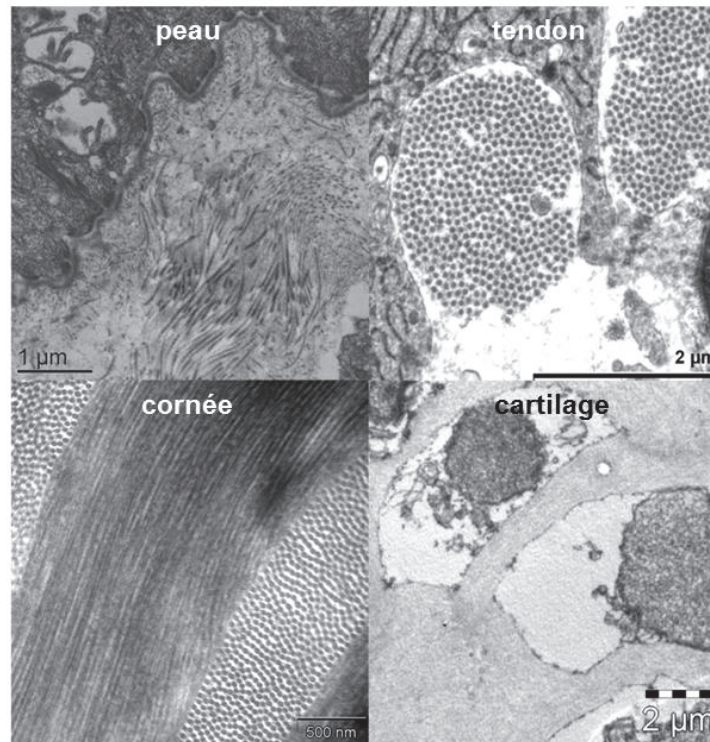


Figure 2: Organisation de la matrice extracellulaire dans des tissus conjonctifs selon la proportion et la composition en collagène. Dans la peau, les fibres du derme sont composées d'un mélange de collagène I et III et de faibles quantités de collagène V. La lame basale forme un réseau hexagonal dont le collagène IV est l'un des constituants majeur. Ce réseau présente un assemblage intra- et extracellulaire unique. Le tendon contient de larges faisceaux de fibres à orientation parallèle, composés essentiellement de collagène I et de faibles quantités de collagènes III et V. Les arrangements orthogonaux des fines et régulières fibrilles de collagène assurent la transparence de la cornée et contiennent une proportion élevée de collagène V. Les fines fibres non orientées du cartilage (ici cartilage hypertrophique du poisson zèbre) sont composées de collagènes II/XI et IX. Clichés M.Malbouyres et F.Ruggiero.

1.1 Un nouvel outil: le matrisome

En 2012, Naba et ses collaborateurs proposent une caractérisation exhaustive de l'ensemble des protéines matricielles, appelée matrisome, qui regroupe par définition toutes les protéines qui sont sécrétées. Le matrisome définit 2 grandes catégories. On distingue le « core matrisome » qui contient les collagènes, protéoglycanes et glycoprotéines du « matrisome-associated » qui contient les protéines associées à la MEC (Figure 3). Les gènes codants les protéines dites structurales font partie des « core matrisome genes »

tandis que les « matrisome-associated genes » comprennent les gènes codants les enzymes ayant pour substrat la MEC, les facteurs de croissance et cytokines extracellulaires, et d'autres protéines sécrétées dans l'espace extracellulaire (Hynes and Naba, 2012; Naba et al., 2012b, 2012a, 2016). Pour caractériser les matrisomes humain, murin et de poisson zèbre, des approches par protéomique (extraction tissulaire et analyse par spectrométrie de masse) ont été utilisées (Naba et al., 2012a) mais également des approches *in silico* (définition de domaines caractéristiques et non caractéristiques des protéines de la MEC) (Naba et al., 2012b; Nauroy et al., 2018a).

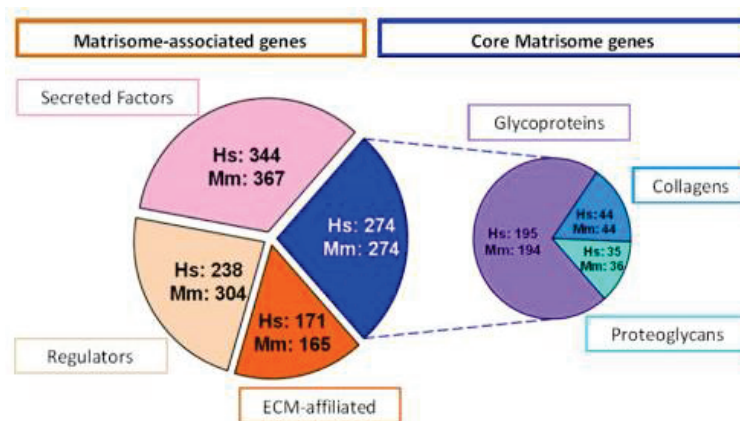


Figure 3: Les matrisomes humain et murin. Graphique circulaire représentant la répartition du nombre de gènes humains (Hs) et murins (Mm) présents dans les différentes catégories du matrisome. Extrait de Naba et al., 2016.

1.2 Le matrisome du poisson zèbre

Le matrisome humain est codé par 1027 gènes alors que celui de la souris est codé par 1110 gènes (Naba et al., 2016) et celui du poisson zèbre par 1002 gènes (Nauroy et al., 2018a) (Figure 4). La même proportion du génome (environ 5%) de l'homme, de la souris et du poisson zèbre concerne le matrisome et la majorité des gènes du matrisome est identifiée dans les 3 espèces bien que le nombre de gènes impliqués augmente entre l'homme (696 gènes), la souris (710 gènes) et le poisson zèbre (985 gènes), ce qui n'est pas surprenant si l'on considère le nombre total de gènes codants chaque espèce : 20 441 chez l'homme, 22 621 chez la souris et 25 832 chez le poisson zèbre (Nauroy et al., 2018a). Seize gènes du matrisome ne sont détectés que chez l'homme et le poisson zèbre et pas chez la souris et parmi ceux-ci, six (dont *col21a1*) appartiennent au « core matrisome ». A l'inverse, seul un gène (*hyal6* codant pour la hyaluronidase 6) du matrisome est présent chez la souris et le poisson zèbre et non chez l'homme.

		Hs	Mm	Dr (predicted by orthology)
Complete matrisome		1027	1110	1002
Core matrisome	ECM glycoproteins	195	194	233
	Collagens	44	44	58
	Proteoglycans	35	36	42
Total		274	274	333
Matrisome-associated	ECM-affiliated Proteins	171	165	145
	ECM regulators	238	304	219
	Secreted factors	344	367	305
Total		753	836	669

Figure 4: Les matrisomes humain, murin et du poisson zèbre. Les chiffres indiquent le nombre de gènes dans les différentes catégories du matrisome. « Hs » indique les gènes du génome humain, « Mm » ceux du génome murin, « Dr » ceux du *Danio rerio*. Extrait de Nauroy et al., 2018a.

Il y a 320 à 350 millions d'années, les téléostéens, dont fait partie le poisson zèbre, ont subi une duplication de leur génome, évènement appelé TS-WGD (teleost-specific whole genome duplication). Divers mécanismes ont aboutis à la perte ou au maintien de ces gènes dupliqués (invalidation, sous-fonction, nouvelle fonction). Cet évènement explique grandement l'augmentation du nombre global de gène codant des protéines chez les poissons zèbres comparés aux mammifères. 71.4 % du génome humain possède au moins un orthologue chez le poisson zèbre, il en va de même pour les gènes du matrisome (68.8 %). Toutefois, si l'on s'intéresse cette fois séparément au « core matrisome » et aux protéines associées au matrisome, seulement 13.5% des gènes du « core matrisome » sont spécifiques à l'homme contre 37.6% pour les gènes codant pour les protéines associées (Figure 5). Il semble donc que le « core matrisome » soit mieux conservé entre les espèces que l'« associated matrisome ».

Repartition of human genes in respect of their relationships with zebrafish orthologs		Hs vs Dr			No orthologs found in Dr	Total genes
		One-to-one	One-to-two	One-to-many		
Global genome	Hs genes	9528	Not determined	3105	5856	20479
(Howe et al. 2013)	Percentage	46.5%		15.2%	28.6%	100%
Complete matrisome	Hs genes	459	229	22	317	1027
(This study)	Percentage	44.4%	22.3%	2.1%	31.2%	100%
Core matrisome	Hs genes	154	79	4	37	274
	Percentage	56.2%	28.8%	1.5%	13.5%	100%
ECM glycoproteins	Hs genes	107	54	3	31	195
	Percentage	54.9%	27.7%	1.5%	15.9%	100%
Collagens	Hs genes	25	15	1	3	44
	Percentage	56.8%	34.1%	2.3%	6.8%	100%
Proteoglycans	Hs genes	22	10	0	3	35
	Percentage	62.9%	28.6%	0%	8.6%	100%
Matrisome-associated	Hs genes	305	150	18	280	753
	Percentage	40.1%	19.9%	2.4%	37.6%	100%
ECM-affiliated Proteins	Hs genes	59	36	3	73	171
	Percentage	34.5%	21.1%	1.8%	42.7%	100%
ECM regulators	Hs genes	104	45	9	80	238
	Percentage	43.7%	18.9%	3.8%	33.6%	100%
Secreted factors	Hs genes	139	69	6	130	344
	Percentage	40.4%	20.1%	1.7%	37.8%	100%

Figure 5: Proportion des gènes du matrisome humain et du poisson zèbre par rapport au génome entier. Nombre de gènes et pourcentage correspondant pour les différentes catégories des matrisomes humain (Hs) et de poisson zèbre (Dr) : « core-matrisome », protéines associées au matrisome et matrisome complet. La proportion « One-to-many » signifie qu'un gène humain possède plus de deux paralogues chez le poisson zèbre. Hs : *Homo sapiens*. Dr : *Danio rerio*. Extrait de Nauroy et al., 2018a.

Il est important de noter que, le matrisome du poisson zèbre étant uniquement fondé sur des analyses *in silico*, il est probable que celui-ci ne soit pas complet d'autant plus que l'assemblage du génome du poisson zèbre reste perfectible (voir paragraphe III-5) et que le statut de certains gènes demeure incertain (pseudogènes ou gènes codant pour des protéines...).

1.3 Le « core-matrisome » : focus sur les collagènes

Les protéines les plus abondantes de la MEC sont les collagènes. Ils représentent 30% de la masse protéique totale des organismes multicellulaires (Naba et al., 2016; Nauroy et al., 2018a). Le terme collagène signifie « gènère de la colle » (du grec kolla signifiant « colle »). D'ailleurs, la plus ancienne colle connue qui date de 6 000 ans av. J.-C est faite de collagène, obtenu à partir de bouillies de tissus conjonctifs. Au début du 20ème siècle, « le » collagène est utilisé dans les produits de beauté ou comme additif dans certains aliments, ses autres propriétés étant inconnues (Van der Rest and Garrone, 1991). Depuis, il s'est avéré que « les » collagènes sont en réalité une famille de 28 protéines distinctes aux propriétés multiples. L'objectif de notre équipe est de comprendre la fonction de ces collagènes dans leur pluralité structurale et fonctionnelle. C'est pourquoi je m'intéresse ici tout particulièrement à cette famille de protéines.

- Signature structurale des collagènes

Les collagènes forment une super-famille et sont codés par 44 gènes chez l'Homme et la souris et 58 gènes chez le poisson zèbre. Ces gènes codent de longues chaînes polypeptidiques appelées chaînes α qui s'assemblent pour former des molécules trimériques. Les collagènes peuvent former des homotrimères (3 chaînes α identiques) ou des hétérotrimères (2 ou 3 chaînes α distinctes). L'assemblage des chaînes α en triple hélice se fait grâce aux domaines collagéniques (COL) que l'on appelle aussi domaines en triple-hélice. Leur séquence est caractérisée par une répétition du triplet (Gly-X-Y)_n où X est souvent une proline et Y une hydroxyproline. La trimérisation est initiée en général au niveau de la partie C-terminale de la molécule et est stabilisée par la présence des répétitions (Gly-Pro-Hyp). Les collagènes contiennent également des domaines non-collagéniques (NC) qui peuvent correspondre à des régions « linker » d'une vingtaine d'acides aminés qui lient les différents domaines COL ou à des domaines situés en N- ou C-terminal du collagène tels que des « Trombospondin-N-terminal-like domain » (TSPN) ou des répétitions de domaines

fibronectine de type III (FNIII) ce qui leur confère des propriétés supplémentaires (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005; Ricard-Blum, 2011).

- Les sous-familles

Outre leur signature structurale commune, les collagènes présentent des caractéristiques structurales distinctes et forment des agrégats supramoléculaires différents. Ils peuvent ainsi être classés en sept sous-familles (Figure 6).

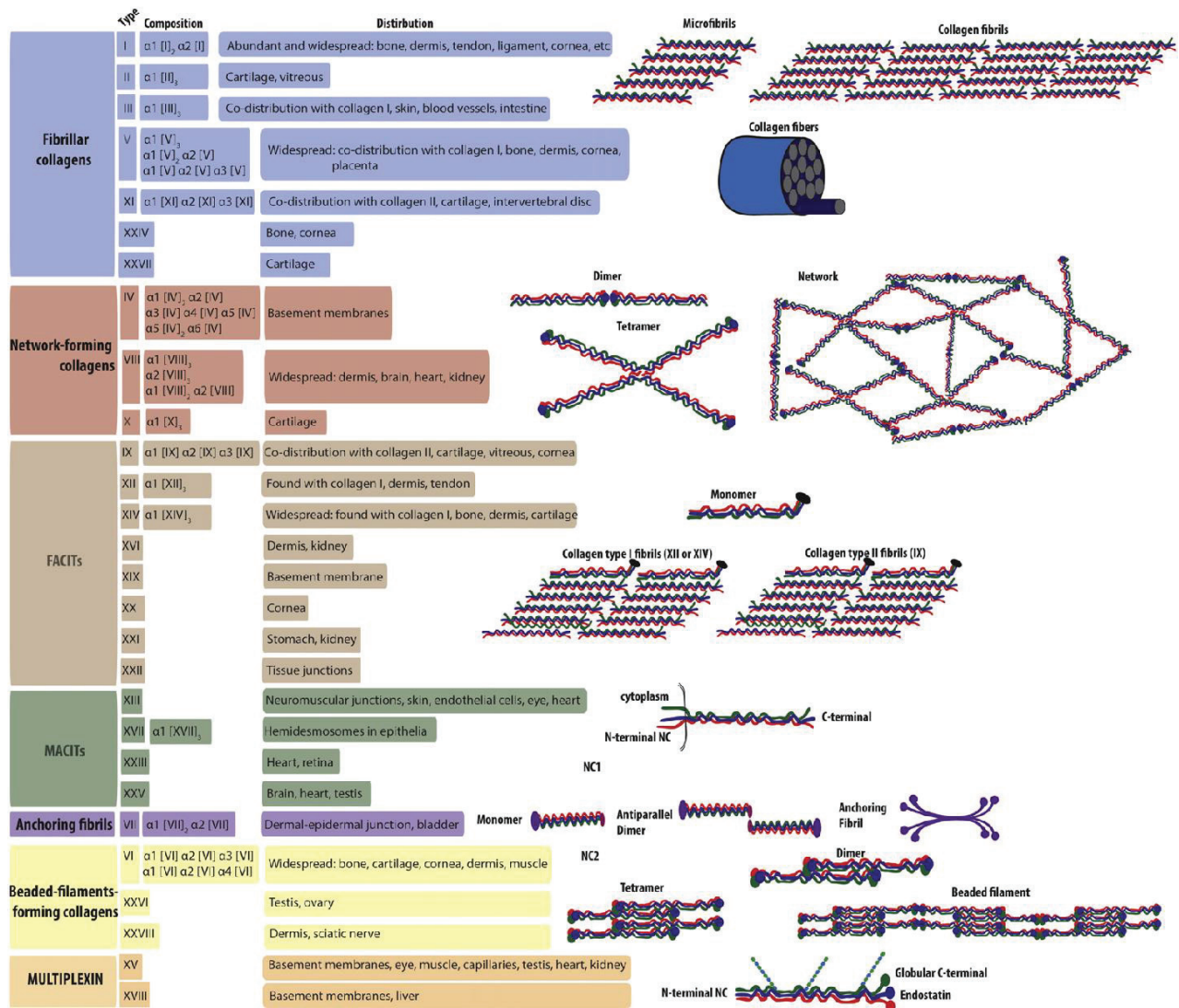


Figure 6: Classification, composition, distribution et structures caractéristiques des collagènes chez les vertébrés. Les collagènes s'assemblent en différents agrégats supramoléculaires spécifiques selon leur appartenance à une sous-famille.

Extrait de Theocharis et al.. 2016.

On distingue ainsi les collagènes fibrillaires, les collagènes formant des réseaux, les collagènes associés aux collagènes fibrillaires avec interruption de la triple hélice (FACIT),

les collagènes transmembranaires (MACIT), un collagène formant des fibres d'ancrage, les collagènes formant des filaments perlés et les multiplexines. Les collagènes sont numérotés en chiffre romain dans l'ordre de leur découverte. Ainsi, les collagènes fibrillaires (I, II et III), ont été découverts en premier dans les années 1960s, car ce sont des protéines abondantes dans les tissus conjonctifs (Van der Rest and Garrone, 1991). Ils sont composés d'un large domaine collagénique flanqué en N et C-terminal par deux courtes extensions globulaires. Ils partagent la propriété unique de co-aggréger pour former des fibres majoritairement composées de collagène I dans les os ou la peau, de collagène II dans le cartilage, ou de collagène III dans les gros vaisseaux sanguins. Sur le plan ultrastructural, en microscopie électronique à transmission, les fibres de collagène présentent une organisation typique caractérisée par une alternance de bandes sombres et claires du fait de leur organisation moléculaire (Figure 7) (Kadler, 2017).

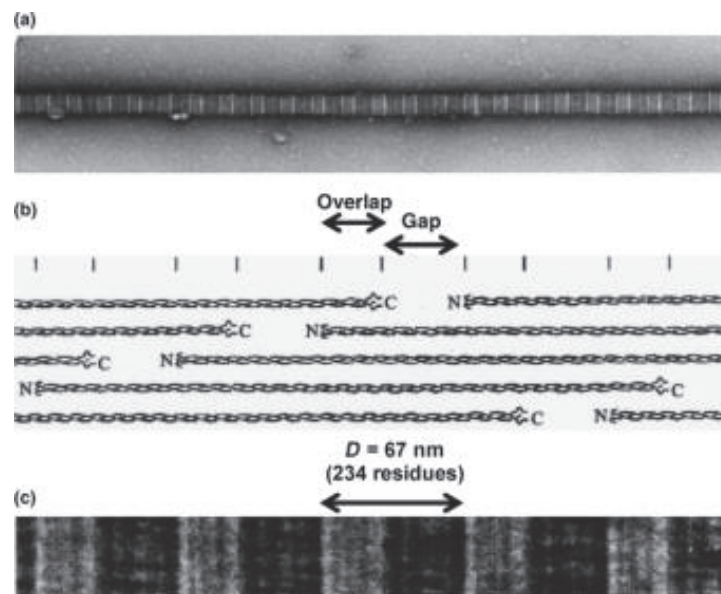


Figure 7: Fibre de collagène en microscopie électronique à transmission. (a) Fibre individuelle de collagène provenant de tendon de métatarse de poussin de 18 jours, après contraste négatif à l'acétate d'uranyl 2% mettant en évidence une striation périodique caractéristique des fibres de collagène. (b) Représentation schématique de l'arrangement axial des molécules de collagène au sein de la fibre. Chaque molécule de collagène est représentée par 3 chaînes entrelacées où N et C indiquent respectivement les extrémités amino et carboxy-terminales. Chaque molécule est de 4.4 D en longueur, où D égale 67nm. Le décalage D des molécules entre elles conduit à la formation d'un espace (Gap) dans la structure axiale. (c) Patron caractéristique des fibrilles de collagène après coloration négative au phosphotungstate de sodium 1% à pH neutre. Extrait de Kadler, 2017.

Ces fibres ont une organisation tridimensionnelle tissu-spécifique et peuvent, par exemple, former des feuillets dont l'organisation strictement orthogonale contribue à la transparence de la cornée. Majoritaires quantitativement, les collagènes fibrillaires jouent un rôle clé dans l'architecture des tissus et contribuent largement à leurs propriétés mécaniques et à leurs formes. Plusieurs mutations affectant des collagènes fibrillaires entraînent des pathologies sévères telles que l'ostéogénèse imparfaite (collagène I) ou le syndrome Ehlers-Danlos classique (collagène V) ou vasculaire (collagène III). Les deux derniers collagènes fibrillaires caractérisés sont les collagènes XXIV (Koch et al., 2003) et XXVII (Boot-Handford et al., 2003). Ils sont caractérisés par une petite imperfection dans la triple hélice qui les rend uniques par rapport aux autres collagènes fibrillaires de vertébrés mais ils peuvent cependant s'assembler en fines fibrilles.

La famille des collagènes formant des réseaux est composée des collagènes IV, VIII et X. Le collagène IV est l'un des constituants majeurs des lames basales, il présente un assemblage intra et extracellulaire unique (Cescon et al., 2015). Les collagènes VIII et X forment des réseaux hexagonaux. Le collagène VIII est principalement exprimé par les cellules endothéliales et intervient ainsi dans l'angiogenèse et le remodelage vasculaire mais est également responsable d'une dystrophie endothéliale de la cornée (Biswas, 2001; Hansen et al., 2016). Enfin, le collagène X est exprimé par les chondrocytes hypertrophiques et des mutations sur le gène codant pour cette protéine peuvent causer une chondrodysplasie métaphysaire de Schmid (Bateman et al., 2005; Gordon and Hahn, 2011).

Je reviendrai plus en détails sur les FACITs dans le chapitre ci-après puisque le collagène XXII au centre de mes travaux appartient à cette sous-famille.

Concernant les collagènes transmembranaires, le collagène XVII, composant des hémidesmosomes, est le plus étudié. Il contribue à la stabilité de la jonction épiderme-derme (Powell et al., 2005). Les domaines intracellulaires des collagènes XIII, XXIII et XXV sont plus courts que celui du collagène XVII. Le collagène XIII est important pour la fonction des muscles squelettiques et des vaisseaux et également au cours de l'inflammation (Heikkinen et al., 2012). Enfin, le collagène XXV est retrouvé dans les plaques amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (Hashimoto et al., 2002). Il est également nécessaire à l'innervation intramusculaire, en particulier lors de la formation de la jonction neuromusculaire (Sumiyoshi et al., 2004; Tanaka et al., 2014).

Le collagène VII, seul représentant de la sous-famille formant des fibres d'ancrage est un composant clé de la zone élargie des lames basales, appelée « basement membrane zone »

(BMz). Des mutations sur ce gène sont responsables de l'épidermolyse bulleuse, qui conduit à un détachement anormal de l'épiderme du derme.

Les collagènes formant des filaments perlés sont au nombre de 3: les collagènes VI, XXVI et XXVIII. Le collagène VI a été énormément étudié du fait de son assemblage moléculaire unique mais également car des mutations identifiées sur 3 des 5 gènes humains, *COL6A1*, *COL6A2* et *COL6A3* induisent des myopathies regroupées sous le nom de «collagen VI-related myopathies» et qui comprennent des maladies présentant un spectre de pathologie de sévérité croissante: de la myopathie de Bethlem à la dystrophie congénitale d'Ullrich.

Le collagène XXVI découvert en 2002 est spécifiquement exprimé dans les gonades, et sa fonction est pour le moment non élucidée (Sato et al., 2002). Enfin, le collagène XXVIII est exprimé dans le système nerveux des souris alors que ses deux orthologues chez le poisson zèbre sont exprimés de façon plus diffuse dans les larves et les juvéniles (Gebauer et al., 2016; Grimal et al., 2010). Sa fonction n'est également pas élucidée.

Enfin, les multiplexines sont composées des collagènes XV et XVIII, tous deux retrouvés au niveau de la BMz. La partie C-terminale de ces 2 collagènes peut être clivée pour libérer les facteurs anti-angiogéniques appelés respectivement la restine et l'endostatine. Ces deux protéines portent des chaînes GAG qui participent à leurs fonctions tissulaires: majoritairement du chondroïtine sulfate pour le collagène XV et de l'héparane sulfate pour le XVIII (Gordon and Hahn, 2011).

Aucune mutation du collagène XV n'a été identifiée chez l'Homme malgré le fait que les souris *Col15a1^{-/-}* présentent une myopathie squelettique modérée et des défauts cardiovasculaires et nerveux (Eklund et al., 2001; Rasi et al., 2010). Notre laboratoire a montré que l'absence de collagène XV-A chez le poisson zèbre par injection de morpholinos (MO) provoque des défauts dans le muscle en lien avec la voie de signalisation Shh (Pagnon-Minot et al., 2008). L'absence de collagène XV-B chez le poisson zèbre quant à elle conduit à des défauts de trajectoires des axones moteurs (Guillon et al., 2016).

L'histoire de la découverte des fonctions *in vivo* du collagène XVIII est une belle illustration de l'utilité de la diversité des modèles animaux pour comprendre l'entièreté des fonctions des collagènes (Bretaud et al., en révision). L'inactivation de *Col18a1* chez la souris a d'abord été décrit comme n'ayant aucun phénotype. Puis, des mutations de son orthologue chez *C. elegans* ayant été associées à des défauts de guidage axonal (Ackley et al., 2001), cela a permis de faire un lien avec des mutations de *COL18A1*, qui conduisent, chez l'homme, au syndrome de Knobloch, une maladie génétique caractérisée par un détachement de la rétine et un encéphalocèle (Heljasvaara et al., 2017). Le phénotype des souris knockout pour *Col18a1* a alors pu être revisité. En particulier, le collagène XVIII semble jouer un rôle

important dans le développement de l'œil. L'ensemble des études utilisant divers modèles animaux a aussi permis de déterminer d'autres fonctions structurales et biologiques du collagène XVIII, telles que le maintien de l'intégrité de la lame basale et son rôle émergent dans la régulation de la survie cellulaire, le maintien des cellules souches et progénitrices, les processus de différenciation et d'inflammation (Heljasvaara et al., 2017).

1.4 Biosynthèse des collagènes (Annexe 1)

Seule la biosynthèse des collagènes fibrillaires est bien documentée. Comme évoqué précédemment, l'assemblage des chaînes α en triple hélice se fait grâce aux domaines collagéniques (Gly-X-Y) et la trimérisation est initiée en général au niveau de la partie C-terminale de la molécule et est stabilisée par la présence des répétitions (Gly-Pro-Hyp). Les collagènes fibrillaires sont synthétisés sous forme de chaînes pro- α qui sont soumises à diverses modifications post-traductionnelles jusqu'à l'initiation de la trimérisation (Myllyharju and Kivirikko, 2004). La formation de la triple hélice nécessite l'enzyme 4- prolyl-hydroxylase et des protéines chaperonnes telles que HSP47 et BIP jouent un rôle primordial de « contrôle-qualité » (Makareeva and Leikin, 2007; Myllyharju, 2003). Les trois chaînes de la molécule de procollagène sont stabilisées par des ponts disulfures inter-chaînes dans la région C-terminale (les C-propeptides), avant le transport dans l'appareil de Golgi. Alors, les molécules de collagène commencent à s'agréger longitudinalement pendant le transport vers l'espace extracellulaire (Figure 8). En 2004, Kadler et ses collaborateurs réalisent une reconstruction tridimensionnelle d'une section de tendon embryonnaire de poulet, après observation d'une série de coupes ultrafines en microscopie électronique à transmission. Ils montrent alors que la membrane plasmique forme des invaginations contenant de fines fibrilles de collagène (Canty et al., 2004) et appellent ces structures des fibripositors (acronyme de 'fibril' et 'depositors'). Les fibripositors se projettent en canaux intercellulaires stabilisés par des jonctions contenant des cadhérines-11 (Richardson et al., 2007) et sont des structures dépendantes de l'actine (Canty et al., 2006). En effet, pour démontrer le rôle du cytosquelette dans la coordination de l'assemblage de la MEC, Canty et ses collaborateurs ont utilisé de la cytochalasine pour désorganiser les filaments d'actine ou du nocodazole (ou de la colchicine) pour désassembler les microtubules. Ainsi, la désorganisation des microtubules retarde le transport de pro-collagène via le système de sécrétion mais le nombre de fibripositor est inchangé. Au contraire, la désorganisation des filaments d'actine provoque une diminution rapide du nombre de fibripositors. La sécrétion de pro-collagène n'est pas affectée par le traitement à la cytochalasine mais le parallélisme des fibres de collagène extracellulaires est altéré. Dans ce cas, une proportion significative de fibres de collagène n'est plus orientée selon l'axe du tendon. Leurs résultats suggèrent

donc que le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans l'alignement et l'organisation de la MEC collagénique du tendon embryonnaire.

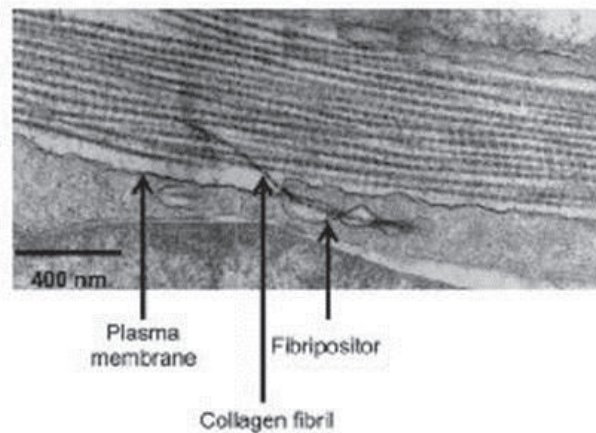


Figure 8: Dépôt d'une fibre de collagène dans la matrice. Microscopie électronique à transmission montrant un "fibripositor" dans un fibroblaste de tendon embryonnaire déposant une fibrille de collagène dans la MEC. Extrait de Kadler, 2017.

Jusqu'alors fastidieuse, la progression des techniques associées à la microscopie électronique à transmission a rendu l'obtention de coupes ultrafines en série plus aisée et il a ainsi été montré que les fibripositors sont le site d'assemblage des fibres dans le tendon et que la myosine II non-musculaire est nécessaire au transport et à la formation des fibres (Kalsou et al., 2013). Des structures similaires aux fibripositors appelées keratopodia existent dans les kératocytes, cellules du stroma cornéen (Young et al., 2014).

Taylor et ses collaborateurs démontrent en 2015 que le dépôt des fibrilles de collagène par les fibripositors nécessite, à la naissance des souris, l'intervention de la métalloprotéinase matricielle 14 (MMP14). En effet, le premier stade de développement du tendon murin nécessite la formation de fibres de collagène, attachées dans un premier temps aux fibripositors. Puis, peu de temps après la naissance des souris, les fibripositors disparaissent et les fibres de collagène déposées dans la MEC deviennent plus longues et plus larges. Taylor et ses collaborateurs démontrent par MET que MMP14 joue un rôle crucial au cours des premiers stades de développement du tendon en détachant les fibres de collagène des fibripositors. MMP14 ne clive pas les chaînes collagéniques elles-mêmes mais une autre protéine associée aux fibres de collagène du tendon, la fibronectine. MMP14 favorise également la formation de nouvelles fibres de collagène.

1.5 La sous-famille des FACITs

La sous famille des FACITs (Figure 9, A) pour « Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices » regroupe à ce jour 8 membres (les collagènes IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI et XXII). Comme l'acronyme l'indique, les FACITs sont capables de s'associer aux collagènes fibrillaires (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005) et sont caractérisés par la présence de domaines collagéniques (COL) interrompus par de courts domaines non collagéniques (NC), ainsi que de régions linkers. Ces interruptions de la triple hélice procurent des points de flexibilité à la molécule. La signature moléculaire des FACITs est la présence de deux imperfections du triplet [Gly-X-Y] dans le domaine COL1 et de deux cystéines séparées par quatre acides aminés (CXXXXC) à la jonction entre les domaines NC1 et COL1 (Figure 9, B). Ce motif est nécessaire à l'initiation de la trimérisation des chaînes α (Mazzorana et al., 2001). Enfin, tous les FACITs possèdent, au minimum, un sous-domaine TSPN (thrombospondin-1 like N-terminal domain) en N-terminal (Figure 9). Mais les extensions en N-terminal peuvent être extrêmement longues et comprendre une succession de sous-domaines. C'est le cas par exemple du collagène XII qui ne comprend pas moins que 18 sous-domaines fibronectine de type III (FnIII), quatre domaines von Willebrand factor A (vWA) et un domaine TSPN (Figure 9, A).

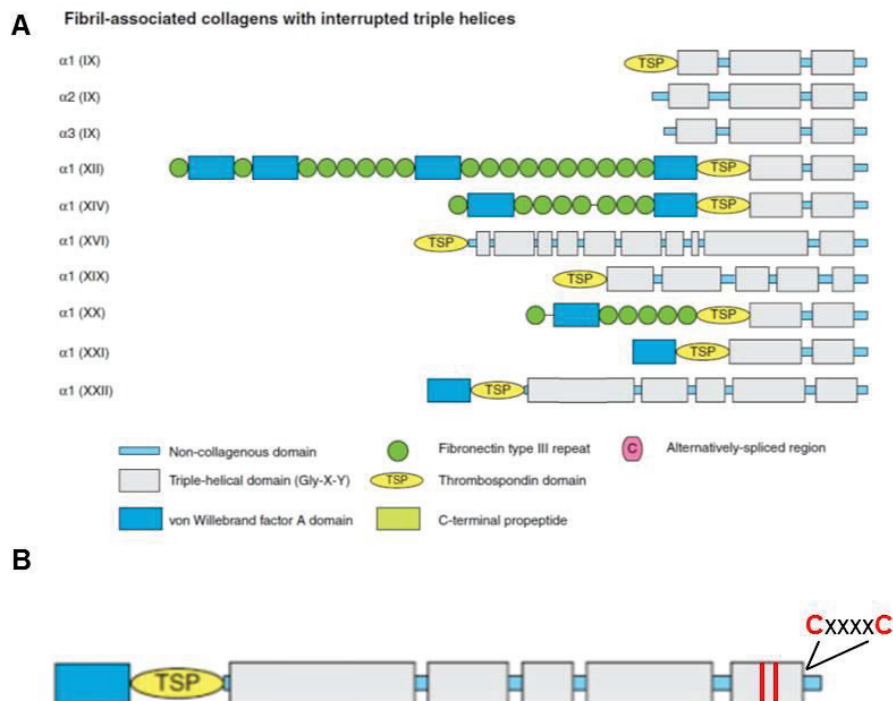


Figure 9: Organisation structurale des FACITs. (A) Domaines et assemblages supramoléculaires des FACITs. COL : domaine collagénique en triple hélice, NC : domaine non collagénique. Ces domaines sont numérotés du C vers le N terminal, Modifié d'après Ricard Blum, 2011. (B) Exemple du collagène XXII. Les deux traits rouges signalent les deux imperfections du triplet [Gly-X-Y] dans le domaine COL1.

En dépit de leurs caractéristiques structurales communes, les FACITs sont impliqués dans des fonctions diverses. Cette variabilité peut s'expliquer au moins en partie par la diversité de composition de leur partie N-terminale. Les FACITs ne forment pas de fibres eux-mêmes mais se retrouvent à leur surface, ce qui n'est vraiment démontré que pour les collagènes IX, XII et XIV. Le collagène IX, premier FACIT découvert en 2002, est le seul à être lié au niveau des domaines collagéniques COL1 et 2 de manière covalente aux molécules de collagène II qui constituent les fibres de collagène dans le cartilage (Olsen, 1997). Le domaine NC4 quant à lui se projette dans la matrice cartilagineuse. Le collagène IX porte une chaîne chondroïtine sulfate (CS) ancrée dans la région charnière NC3 (Theocharis et al., 2016). Le collagène IX est indispensable à l'intégrité du cartilage. Ainsi, les souris déficientes pour la chaîne $\alpha 1$ du collagène IX présentent une dégénérescence du cartilage similaire à celle observée chez les patients atteints d'ostéo-arthrite (Fässler et al., 1994). Si plusieurs mutations affectant le collagène IX conduisent à des pathologies articulaires (Luo et al., 2017; Nakata et al., 1993), tous les autres FACITs semblent, eux, localisés autour de la zone de la membrane basale (BMz) ou aux jonctions tissulaires.

Les collagènes XII et XIV ont notamment été étudiés au sein de notre équipe. Très proches structurellement, ces deux collagènes présentent des distributions tissulaires et des fonctions distinctes. Lors de l'embryogenèse le collagène XII est principalement exprimé par les cellules mésenchymateuses au cours du développement des os, ligament, tendon, cartilage, muscles lisses et de la peau (Wälchli et al., 1994). Après la naissance, les fibroblastes constituent les principaux producteurs de collagène XII, qui est exprimé de façon restreinte au niveau de la cornée, du ligament parodontal et du derme. Le collagène XII s'associe aux collagènes I et II, alors que le collagène XIV co-localise avec le collagène I de façon indirecte, via les chaînes dermatane sulfate (DS) de la décorine, qui s'associent elles-mêmes aux fibrilles de collagène I (Font et al., 1993 and 1996). Le collagène XII formerait des ponts moléculaires flexibles entre des fibres de collagène adjacentes ou entre des fibres de collagène et des glycoprotéines (Font et al., 1993 and 1996). Chez la souris, le collagène XII est impliqué dans l'organisation des fibres de collagènes et régule la polarité des ostéoblastes et leur communication au cours de l'ostéogenèse (Chiquet et al., 2014; Izu et al., 2011). Ainsi, le phénotype des souris invalidées pour *Col12a1* est caractérisé par une faiblesse musculaire et une forte désorganisation de la matrice osseuse, suggérant que le collagène XII améliore l'absorption des contraintes de cisaillement dans ce tissu, et protège ainsi les organes d'éventuelles distorsions mécaniques (Marro et al., 2016). En accord avec ces résultats, des liens ont été faits entre des mutations du collagène XII retrouvées chez l'Homme et la souris et une pathologie au phénotype croisé entre syndrome d'Ehlers-Danlos et myopathie (Hicks et al., 2014; Zou et al., 2014). Chez le poisson zèbre, le collagène XII

est présent dans tous les fascias mais également au niveau de la BMz au cours du développement (Bader et al., 2009). Du fait de sa localisation, Bader et ses collaborateurs proposent que le collagène XII soit impliqué dans la cohésion tissulaire en stabilisant les fascia et en liant les fascia aux lames basales (Bader et al., 2009). Il a également été montré que la voie de signalisation du TGF- β pourrait directement ou indirectement induire la production des collagènes I et XII au cours de la régénération cardiaque chez le poisson zèbre, après cryo-blessure de la paroi du myocarde (Marro et al., 2016). Il contribue également à la régénération de la moelle épinière chez l'adulte (Wehner et al., 2017).

La distribution tissulaire du collagène XIV, quant à elle, a d'abord été décrite chez le poulet et les bovins puis chez l'homme et la souris. Il est fortement exprimé dans le derme du poulet, des bovins, de la souris et des embryons humains mais aussi dans la peau humaine adulte. La protéine est également présente au cours du développement du tendon (chez le poulet et les bovins), de la cornée (chez le poulet), des muscles cardiaques (chez le poulet, la souris et l'homme) et squelettiques (chez le poulet et les bovins). Enfin, le collagène XIV est souvent associé à la BMz. Chez la souris, le knockout *Col14a1* permet de montrer que le collagène XIV contribue aux propriétés biomécaniques du tendon en régulant la fibrillogenèse, et qu'il participe aussi aux propriétés biomécaniques de la peau (Ansorge et al., 2009). Ce même knock-out permet de mettre en évidence un rôle du collagène XIV dans le développement du cœur (Tao et al., 2013). Plusieurs études s'intéressent particulièrement aux propriétés du domaine fibronectine FN8 en position N-terminale et proposent que FN8 régule la balance entre prolifération, quiescence et différenciation cellulaire (Gerecke et al., 2004). Chez le poisson zèbre, deux paralogues *col14a1a* et *col14a1b* ont été identifiés (Bader et al., 2013). Le collagène XIV-A est ainsi fortement exprimé entre 24 et 48 hpf puis diminue entre 72 et 120 hpf au niveau de différents épithélia indifférenciés tels que les nageoires mais également au niveau des BMz où la protéine persiste même après l'arrêt de l'expression du gène. L'utilisation de MO montre que le collagène XIV-A est impliqué dans la mise en place de la BMz de l'épiderme au cours de l'embryogenèse. Le collagène XIV-A est également impliqué dans la régénération de la nageoire caudale (Nauroy et al., 2018b). En effet, l'absence de collagène XIV-A chez les morphants au niveau du site d'amputation ou chez les poissons *col14a1a*^{-/-} amputés conduit, après régénération de la nageoire caudale, à la mise en place d'une lame basale plus fine mais plus rigide (Nauroy et al., 2018b). Notre laboratoire propose ainsi le collagène XIV-A comme un régulateur clé dans la formation des lames basales, en agissant comme un « espaceur » moléculaire requis transitoirement mais spécifiquement, pour une organisation tridimensionnelle fonctionnelle des lames basales, lors des processus de régénération de la nageoire caudale (Nauroy et al., 2018b).

L'association des FACITs avec les fibres de collagène peut dépendre du contexte tissulaire, c'est le cas du collagène XVI, dont une seule isoforme est connue, et qui s'associe avec les fibres hétérotypiques II/XI dans la matrice cartilagineuse mais qui, dans le derme papillaire, ne s'associe pas aux fibres collagéniques mais aux microfibrilles élastiques composées de fibrilline-1 (Kassner et al., 2003). Le collagène XVI agirait comme un adaptateur pour connecter et organiser les réseaux matriciels et ainsi réguler l'intégrité et la stabilité de la MEC. Produit par les myofibroblastes au niveau de l'intestin, sa synthèse est augmentée au niveau de la paroi intestinale en cas d'inflammation, les myofibroblastes multipliant alors les adhésions focales en contact avec le collagène XVI. L'intégrine $\alpha 1$ est ensuite recrutée au niveau des adhésions focales, et les cellules vont alors s'étaler sur leur substrat. Ce phénomène participe probablement au maintien des myofibroblastes au niveau des régions intestinales enflammées et favorise la fibrose du tissu. Il a également été démontré que les sous-unités $\alpha 1/\alpha 2$ des intégrines interagissent avec le collagène XVI via un site de liaison situé au niveau des domaines COL 1–3 (Grässel and Bauer, 2013). Le collagène XVI sert également de substrat pour l'adhésion et l'invasion des cellules tumorales dans les tissus conjonctifs. Ainsi, le collagène XVI induit l'expression de la métalloprotéase matricielle MMP-9 en modulant l'expression du facteur de transcription AP-1 (protéine activatrice 1) et facilite ainsi l'invasion des cellules tumorales chez les patients atteints de carcinome à cellules squameuses oral (OSCC) (Bedal et al., 2014). Bedal et ses collaborateurs proposent en 2015 que le domaine NC11 du collagène XVI humain soit utilisé comme biomarqueur dans les cas d'OSCC, celui-ci déclenchant dans les tumeurs malignes *in vitro* le processus de mimétisme vasculaire qui est induit par une régulation positive des récepteurs endothéliaux VEGFR1 (vascular endothelial growth factor receptor), VEGFR2 et uPAR (urokinase receptor) (cultures cellulaires bidimensionnelle et tridimensionnelle). Il a aussi été montré que le collagène XVI module l'activation de l'intégrine- $\beta 1$ via une up-régulation de la kindlin-1 (protéine des adhésions focales) dans les cas de glioblastome (tumeurs cérébrales les plus fréquentes), facilitant ainsi l'invasion des cellules tumorales (Grässel and Bauer, 2013). Le collagène XVI est donc un acteur important de la formation de tumeur et de l'inflammation (Grässel and Bauer, 2013).

Le collagène XIX, lui, est capable, à la fois de créer des liens structuraux entre les fibres de collagène et d'autres partenaires matriciels (Boudko et al., 2008), mais aussi de s'assembler en oligomères au niveau des BMz et des tissus conjonctifs interstitiels (Myers et al., 2003). Chez la souris, les homozygotes *Col19a1^{-/-}* sont plus petits que les contrôles et meurent au moment du sevrage, du fait de défauts dans la morphologie et la physiologie des muscles de l'œsophage (Sumiyoshi et al., 2004). En 2010, Su et ses collaborateurs montrent également que le collagène XIX est exprimé par plusieurs types d'interneurones de l'hippocampe et qu'il

est ainsi nécessaire à l'organisation normale des synapses de l'hippocampe (Su et al., 2010). Cette étude constitue non seulement une avancée significative dans la compréhension des mécanismes de synaptogenèse mais elle balaye également l'idée que les collagènes sont absents et ne contribuent pas au développement du cerveau des mammifères. Enfin, le collagène XIX a récemment été décrit comme une protéine d'ancrage liant les cellules tumorales à leur microenvironnement (Oudart et al., 2017). L'intégrine $\alpha\beta3$ a été identifiée comme un récepteur du domaine NC1 du collagène XIX (NC1(XIX)). De plus, NC1(XIX) inhibe la voie FAK/PI3K/Akt/mTOR, en diminuant la phosphorylation et l'activité de protéines indispensables de cette voie. D'autre part, NC1(XIX) induit une augmentation de l'activité GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 beta) en diminuant son degré de phosphorylation. Oudart et ses collaborateurs proposent NC1(XIX) comme une nouvelle molécule thérapeutique pouvant être étudiée pour le traitement de cancer. Des traitements ciblant cette voie de signalisation sont d'ailleurs à l'étude pour soigner des patients atteints de mélanomes.

Le collagène XX a été identifié chez le poulet (Koch et al., 2001) mais le gène humain présente une interruption au sein du premier domaine collagénique et ne code probablement pas une protéine (Gordon and Hahn, 2011). Ainsi, il n'est pas retrouvé dans le matrisome du poisson zèbre (Nauroy et al., 2018a) mais possède un orthologue chez la souris, *Col20a1*.

Enfin, nous allons nous intéresser aux deux derniers FACITS, les collagènes XXI et XXII, très proches structuralement, pour nous focaliser finalement sur le collagène XXII qui fait l'objet de cette étude.

1.6 Les collagènes XXI et XXII

Le collagène XXII est un homotrimère composé de trois chaînes $\alpha1$ identiques. Chaque chaîne α est composée de cinq domaines COL, entrecoupés par six domaines NC. Le domaine NC6 en N-terminal est relativement court pour un FACIT puisqu'il n'est composé que de deux sous-domaines : TSPN et vWA (Figure 9).

Le collagène XXI est structurellement très proche du collagène XXII mais il est plus court car il ne comporte que les deux premiers domaines COL.

La littérature concernant le collagène XXI est peu documentée. Deux publications (Chou and Li, 2002; Fitzgerald and Bateman, 2001) révèlent un patron d'expression relativement controversé chez l'homme. Il a été montré par MTE-Blot (Multiple Tissue Expression) et

Northern Blot dans l'étude de Fitzgerald et Bateman que le collagène XXI est fortement exprimé dans le cœur, le placenta, l'estomac, le rein, les poumons, le pancréas et le muscle squelettique. Par RT-PCR et Northern Blot, Chou et Li ne retrouvent une forte expression du collagène XXI que dans la trachée, les testicules/l'utérus et dans le placenta. Une expression modeste est détectée dans le cerveau, les poumons, le colon, la prostate, la moelle épinière et les glandes salivaires. Enfin, à la grande différence de la première étude, aucune expression n'est détectée dans le cœur adulte, les reins et les muscles squelettiques. . Alors que le gène *col21a1* est présent dans le génome du poisson zèbre et du poulet, il n'est pas retrouvé dans le génome de deux espèces de rongeurs : la souris et le rat (Fitzgerald and Bateman, 2004). La perte de ce gène chez certains rongeurs serait une conséquence d'un réarrangement chromosomique au cours de l'évolution. Au cours de ma thèse, j'ai pu confirmer l'existence du collagène XXI et déterminer sa séquence chez le poisson zèbre. J'ai également pu montrer par RT-PCR que *col21a1* est exprimé maternellement (détecté au stade 2 cellules). Indétectable après 3hpf, son expression réapparaît entre 12 et 18hpf, augmente fortement entre 18 et 48 hpf et diminue entre 5 et 6 jpf. Malgré plusieurs tentatives, le patron d'expression n'a pas pu être clairement déterminé par hybridation *in situ* (HIS) (Malbouyres et al., résultats non publiés).

1.7 Le collagène XXII

Contrairement au collagène XXI, l'expression du collagène XXII est restreinte. Elle a été décrite pour la première fois en 2004 par Koch et ses collaborateurs au niveau des jonctions tissulaires (Koch et al., 2004) (Figure 10). En effet, chez la souris, le collagène XXII est présent à la jonction entre le cartilage articulaire et la cavité synoviale, et à la jonction myotendineuse (JMT). Il est déposé spécifiquement à la surface extérieure de la lame basale des cellules musculaires au niveau de leur point d'ancrage sur la JMT. Contrairement à la plupart des FACITs, il ne co-localise pas avec les fibres de collagène I. De plus, il est aussi bien exprimé au stade embryonnaire qu'à l'âge adulte. Il a également été montré que les lignées de kératinocytes HACAT (Zwolanek et al., 2014) et de fibroblastes WI 26 adhèrent sur le collagène XXII (Koch et al., 2004). L'intégrine $\alpha 2\beta 1$, principal récepteur des collagènes fibrillaires et notamment du collagène I, serait responsable de cette interaction *via* les motifs GLQGER et GFKGER (Zwolanek et al., 2014). Ceci a été démontré par des essais en phase solide et par résonance plasmonique de surface (Biacore). De plus, des analyses par immunofluorescence mettent en évidence une co-localisation partielle du collagène XXII

avec les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 11\beta 1$ à la jonction myotendineuse sur des coupes de membres antérieurs de souris nouveaux nés.

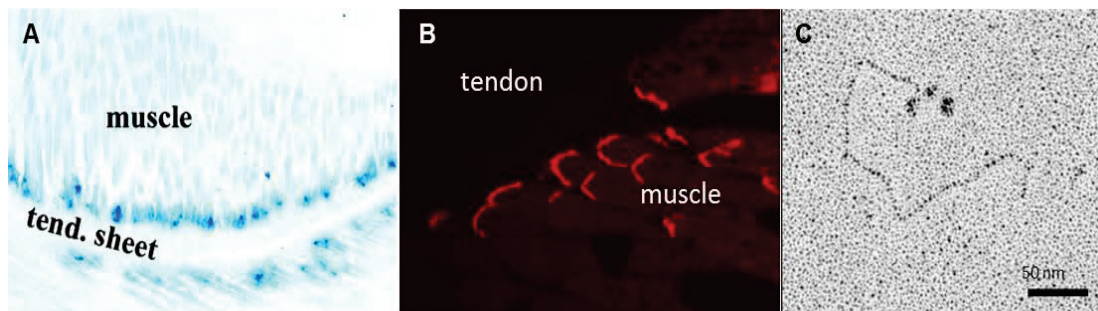


Figure 10: Expression du collagène XXII chez la souris et organisation de la protéine recombinante purifiée. (A) Par hybridation *in situ*, les ARNm du collagène XXII sont notamment détectés au site d'attachement des muscles sur le tendon de souris. (B) De même, en immunofluorescence, l'expression du collagène XXII est limitée à la JMT. (C) Molécule de collagène XXII recombinant, observé en microscopie électronique à transmission après ombrage tournant. La fine structure linéaire correspond aux domaines collagéniques. Les coudes de la molécule représentent les interruptions des domaines COL (domaines NC) qui confèrent une certaine flexibilité à la molécule. Le domaine N-terminal contient trois domaines globulaires (un pour chaque chaîne α). Modifié d'après Koch et al., 2004.

NC6 porte un domaine VWA, connu pour médier des interactions protéines-protéines via son motif MIDAS (Metal Ion-Dependant Adhesion Site). Ces interactions sont dépendantes des ions divalents comme Mg^{2+} (Lacy et al., 2004).

Du point de vue fonctionnel, une publication (Misawa et al., 2014) présente les collagènes XXII et XXIV comme des marqueurs pronostics chez les patients atteints du cancer de la tête et du cou (HNSCC). La plupart des cancers de la tête et du cou débutent au niveau des cellules squameuses formant la paroi des voies aérodigestives et autres cavités. On les appelle carcinomes à cellules squameuses ou carcinomes épidermoïdes. Ce type de cancer affecte environ 500 000 personnes dans le monde chaque année. Or, les collagènes sont le principal constituant de la matrice extracellulaire des tumeurs solides et jouent un rôle crucial dans leur développement. Ainsi, l'étude montre que les taux d'ARNm *COL22A1* et *COL24A1* sont significativement supérieurs dans les tissus HNSCC comparativement aux tissus sains. Plus particulièrement, les taux d'ARNm *COL22A1* seraient un bon indicateur du stade de la pathologie HNSCC et de la présence de métastases au niveau des ganglions lymphatiques; une forte expression indiquerait une diminution de la survie du patient (Misawa et al., 2014). Il est intéressant de noter ici que les taux d'ARNm *COL21A1* sont, pour leur part, significativement inférieurs dans les tissus HNSCC comparés aux tissus sains mais qu'il n'y a pas de corrélation significative entre les taux d'ARNm *COL21A1* et la survie

du patient atteint. Les auteurs postulent donc que la régulation négative du collagène XXI est un élément nécessaire mais insuffisant au processus de carcinogenèse. La présence du collagène XXII aux jonctions tissulaires et son up-régulation associée au mauvais pronostic des pathologies HNSCC et à la présence de métastases permettent d'envisager ce collagène comme une protéine servant de véritable pont moléculaire entre la MEC et les tissus environnants. On pourrait donc proposer le collagène XXII comme un acteur de la plasticité des matrices interstitielles.

- Le collagène XXII chez le poisson zèbre

Une première partie de mon travail a consisté à étudier la fonction *in vivo* du collagène XXII (Figure 11) dans le développement du poisson zèbre (Publication n°1). Le manque d'informations concernant le développement du myosepte freinait l'interprétation de nos résultats, c'est pourquoi nous avons entrepris au préalable de réaliser un atlas ultra-structural détaillant la formation du système myo-tendineux (Annexe 2).

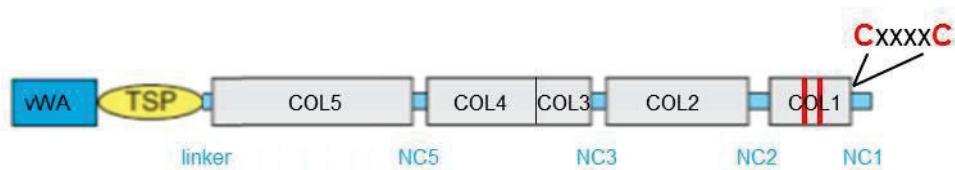


Figure 11: Organisation structurale du collagène XXII chez *Danio rerio*. Le collagène XXII du poisson zèbre présente les mêmes caractéristiques structurales que le collagène XXII humain à l'exception du domaine NC4, absent chez le poisson zèbre.

2. L'appareil myotendineux: structure et mise en place

La revue présentée en Annexe 2 décrit l'organisation structurale ainsi que le développement de la jonction myotendineuse (JMT) chez le poisson zèbre. Cette structure est à l'interface entre le muscle et le tendon et permet la transmission de la force générée par les muscles au tendon. La formation de la JMT résulte d'une coopération morphologique et signalétique entre muscle et tendon, c'est pourquoi nous décrivons tout d'abord le muscle et le tendon avant d'aborder plus spécifiquement la JMT.

2.1 Le muscle squelettique

- Présentation générale

Le mot muscle vient du latin *musculus* qui signifie « petite souris » dont l'origine pourrait provenir de la forme de certains muscles. Le corps humain comprend environ 600 muscles différents qui représentent environ 40 à 50 % du poids total d'un être humain. Les muscles peuvent être considérés comme les « moteurs » de l'organisme, excitables, contractiles et élastiques, ce qui leur permet de générer forces et mouvements. Dérivés du mésoderme, trois grands types de muscle se différencient au cours de la myogenèse: les muscles striés squelettiques, le muscle cardiaque et les muscles lisses. Seuls les muscles striés squelettiques sont soumis à un contrôle volontaire via le système nerveux central (SNC). Les muscles cardiaques et lisses, eux, sont soumis à un contrôle involontaire exercé par le système nerveux végétatif. Le muscle cardiaque, capable de contractions rythmées et continues, permet le pompage régulier du sang. Les muscles lisses, eux, tapissent certains organes comme l'intestin ou de gros vaisseaux sanguins, permettant des contractions longues et soutenues. Les muscles squelettiques, quant à eux, génèrent des forces capables d'engendrer un mouvement en actionnant les structures osseuses par l'intermédiaire des tendons (Figure 12). Les principales cellules les constituant sont les fibres musculaires, mais d'autres cellules résident dans le muscle comme les fibroblastes ou les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Les fibres musculaires sont rendues solidaires par des enveloppes élastiques: l'endomysium entoure chaque fibre musculaire, le périnysium assemble en faisceaux les différentes fibres musculaires, l'épinysium recouvre l'ensemble du muscle. Chaque fibre musculaire est délimitée par une membrane (le sarcolemme), présente de nombreux noyaux et mitochondries répartis à la périphérie de la cellule, et contient dans son sarcoplasme des myofibrilles qui sont responsables de la contraction musculaire. Les myofibrilles présentent une structure filamentaire régulière, les myofilaments, qui donne au muscle son aspect strié au microscope. Les myofilaments fins sont des filaments d'actine, tandis que les filaments épais sont des filaments de myosine.

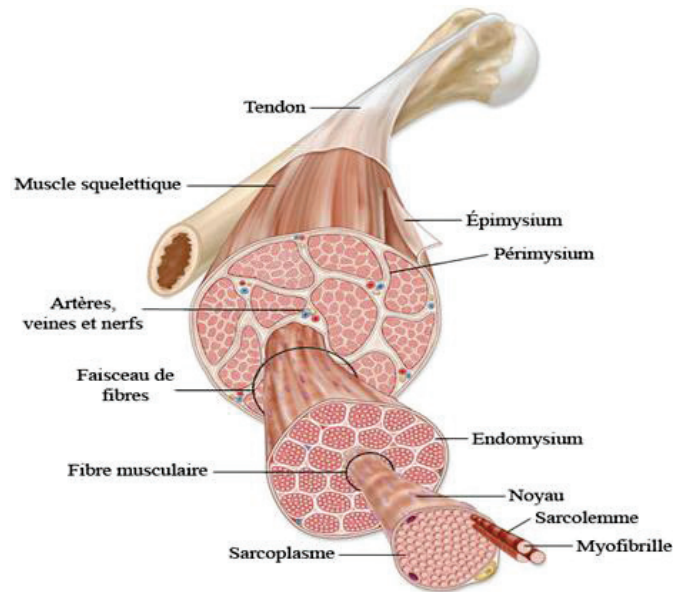


Figure 12: Anatomie du muscle strié squelettique. Un muscle squelettique est entouré de plusieurs couches de tissus conjonctif. L'endomysium entoure chaque fibre musculaire. Le périmysium assemble en faisceaux les différentes fibres musculaires. L'épimysium recouvre l'ensemble du muscle. Après avoir traversé l'épimysium, les vaisseaux sanguins (artérioles et veinules) qui assurent la vascularisation du muscle, donnent naissance à un fin réseau de capillaires qui gagne le périmysium puis l'endomysium pour irriguer chaque fibre musculaire. Les prolongements des nerfs gagnent également le périmysium. Ils se terminent en arborisation dont les ramifications aboutissent à la jonction neuromusculaire pour innerver les différentes myofibrilles. <https://bacsciencedanslepoche.weebly.com/le-fonctionnement-du-muscle-squelettique.html>

- Les différents types de fibres musculaires squelettiques

L'étude du fonctionnement du muscle strié squelettique a permis de mettre en évidence deux grands types de fibres musculaires : les fibres lentes et les fibres rapides. Le terme de muscle lent communément utilisé pour faire référence à la fois aux mammifères et non-mammifères est source de beaucoup de confusions dans les études passées et présentes (Luna et al., 2015). Ainsi, les fibres dites lentes ou toniques chez la grenouille sont assez différentes des fibres lentes décrites chez les mammifères. Chez la grenouille, une différence importante entre fibres toniques (lentes) et phasiques (rapides) est leur capacité à propager des potentiels d'action: seules les fibres phasiques sont capables de propager les potentiels d'actions. Les fibres toniques ne génèrent pas de potentiels d'action, les muscles lents de grenouille ne se contractent pas. Au contraire, chez les mammifères, les fibres lentes sont capables de propager des potentiels d'actions et l'on parle de fibres « slow-twitch » pour le muscle lent ou « fast-twitch » pour le muscle rapide.

L'étude des propriétés contractiles en lien avec le métabolisme énergétique mis en jeu a également permis de caractériser le type de fibres musculaires : on parle de type I ou de type II respectivement interchangeables avec les termes lent et rapide. Ainsi, plusieurs protéines sont spécifiquement retrouvées dans les fibres de type I (l'isoforme SERCA2a, une ATPase calcium dépendante du réticulum sarcoplasmique, est prédominante ou unique) ou II (la parvalbumine; l'isoforme SERCA1a est prédominante ou unique chez les mammifères adultes) (Lamboley et al., 2014). Plus particulièrement les chaînes lourdes de myosine présentent différentes isoformes que l'on va retrouver spécifiquement dans l'un ou l'autre type. Mais, encore une fois, les propriétés contractiles et les capacités métaboliques oxydatives des muscles lents sont extrêmement variables selon les espèces. Ainsi, chez les mammifères, on décrit communément 3 grands types de fibres :

○ les fibres lentes ou S (« slow ») ou fibres de type I à contraction lente (slow-twitch) encore appelées fibres rouges: ce sont les premières à se contracter, elle ne développent pas une force importante, mais elles peuvent rester contractées longtemps. Les myocytes de type I (muscle lent, cellules aérobies) sont très riches en mitochondries et contiennent peu de glycogène. Les mitochondries apportent l'énergie nécessaire à la contraction sous forme d'ATP. Elles sont également riches en myoglobine, capable de fixer l'oxygène plus fortement que l'hémoglobine, et qui leur donne une couleur rouge caractéristique. Ces fibres dites peu fatigables sont les fibres utilisées lors d'exercices peu puissants et prolongés (maintien de la posture par exemple), de l'endurance, elles sont fines et développées lors de la pratique du cyclisme et du VTT entre autres. Elles n'ont qu'un faible potentiel hypertrophique.

○ les fibres rapides FR (« fast and resistant » ou encore « fast-twitch ») ou fibres IIa: elles développent une force plus importante mais sont moins durantes que les fibres de type I, Les fibres musculaires de type IIa sont toutefois plus rapides dans leur contraction, plus volumineuses et plus fortes. Elles ont également la capacité de produire un mouvement explosif et puissant sur une courte période de temps. Ce type de fibres utilise moins l'oxygène pour générer de l'énergie, mais compense avec le glycogène musculaire pour sa production d'ATP. Ces fibres musculaires sont sollicitées dans des sports qui nécessitent un mélange d'activation neurologique et métabolique, comme le hockey, les sports de raquettes et le ski alpin.

○ les fibres FF (fast and fatigable également appelées « fast-twitch ») ou fibres IIb: ce sont les fibres développant la force musculaire la plus importante mais elles se fatiguent très vite, elles sont donc mises en jeu lors d'un effort important et ponctuel comme un saut. Les myocytes de type II (muscle rapide, cellules anaérobies) sont plus pauvres en mitochondries et en myoglobine. Elles sont par contre beaucoup plus riches en glycogène et en enzyme

glycolytiques d'où une couleur blanche. Elles peuvent facilement développer une hypertrophie.

Si l'on compare l'innervation des fibres rapides aux fibres lentes de différentes espèces (Figure 13), on retrouve à nouveau de nombreuses différences inter-espèces. Ainsi, l'innervation des fibres dites « lentes » se fait au niveau des myoseptes (équivalents des tendons) chez le poisson zèbre.

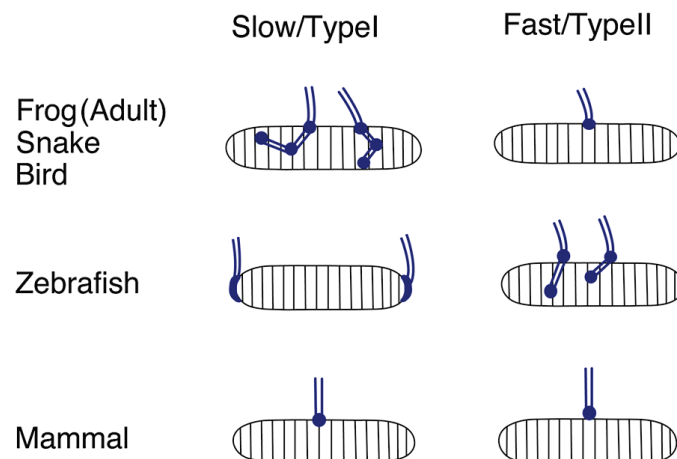


Figure 13: Schéma montrant les différences de distribution des synapses selon le type de fibre et l'espèce animale. Extrait de Luna et al., 2015.

- Les cascades moléculaires régulant le développement du muscle

Chez les mammifères, la myogenèse se produit en plusieurs phases qui se chevauchent parfois. La première phase est la phase de myogenèse embryonnaire où les cellules progénitrices embryonnaires forment les fibres musculaires primaires constituant l'échafaudage des muscles. Au cours de la seconde phase dite de myogenèse fœtale, les progéniteurs fusionnent entre eux et avec les fibres primaires pour former des fibres secondaires permettant la croissance musculaire. Après la naissance, une troisième vague de myogenèse peut être activée en cas de dommage du muscle. Cette étape de régénération sollicite des cellules souches appelées cellules satellites qui fusionnent avec les fibres musculaires existantes ou génèrent de nouvelles fibres musculaires (Nassari et al, 2017). Une fibre musculaire résulte donc de la fusion de plusieurs cellules non différenciées à noyau unique appelées myoblastes. Le myotube, formé lors de la fusion des myoblastes, est caractérisé par la présence de noyaux en position centrale. Puis, après différenciation du myotube en fibre musculaire, le système contractile mis en place occupe tout le sarcoplasme et les noyaux se retrouvent en périphérie de la cellule musculaire.

Cette formation progressive des muscles s'accompagne de l'activation successive de gènes spécifiques de la différenciation musculaire. Ainsi, la myogenèse requiert les gènes *Pax3* et *Pax7*, appartenant à la famille « paired-box » Pax. Chez les souris double mutantes *Pax3/Pax7* les cellules somitiques n'entrent pas dans le programme myogénique et les muscles squelettiques sont donc défailants (Nassari et al., 2017). L'acquisition d'un devenir myogénique dépend d'un second groupe de facteurs de transcription, appelés facteurs de régulation myogénique (MRFs), qui sont de type « basic Helix-Loop-Helix » (bHLH). Les MRFs déclenchent la différenciation musculaire squelettique des cellules non-musculaires *in vitro* et *in vivo* (Nassari et al., 2017). *MyoD* (également connu sous le nom de *Myod1*), *Myf5* et *Myf6* (ou *Mrf4*) sont considérés comme des facteurs de détermination musculaires. En effet, *Myf 5* et *Myf 6* régulent l'entrée de cellules progénitrices dans le programme myogénique. Puis le facteur *MyoG* (Myogenin) est associé à la différenciation musculaire. Cependant, le rôle de ces facteurs ne se limitent pas aux premières étapes de la différenciation, puisque par exemple *MyoD* et *Myf6* sont également requis pour la différenciation terminale du muscle. Enfin, l'expression précoce de *MyoD* dépend de *Myf5*, *Myf6*, et *Pax3*. Ainsi, chez le triple mutant *Myf5/Myf6/Pax3*, l'expression de *MyoD* est altérée et les muscles squelettiques ne se forment pas dans le tronc et les membres. Chez les vertébrés le programme myogénique dans les muscles de la tête diffère de celui du tronc (Nassari et al., 2017).

Les facteurs myogéniques sont cruciaux pour un développement correct du muscle mais de nombreuses études soulignent que l'initiation et la régulation de la myogenèse dépendent également de facteurs sécrétés provenant des tissus adjacents. L'influence du tube neural, des cellules des crêtes neurales de la notochorde et de l'ectoderme a notamment été démontrée et souligne l'importance des signaux extracellulaires Hedgehog (HH), « bone morphogenetic protein » (BMP), Wnt (qui se lie aux récepteurs Frizzled), « fibroblast growth factor » (FGF) et des protéines Notch pour la myogenèse axiale et des membres.

- Les fibres musculaires squelettiques du poisson zèbre

Le muscle squelettique est l'organe le plus volumineux du poisson zèbre, représentant environ 80 % du poids total d'un individu. Son rôle est évidemment de permettre les mouvements du poisson mais il a également un rôle fondamental dans l'homéostasie métabolique. En effet, le muscle est à la fois une source d'énergie et participe au stockage de l'énergie. La plus grande partie du muscle squelettique se trouve dans le tronc du poisson zèbre. Chez l'embryon, après la segmentation, une succession de myotomes délimités par des feuilletts tendineux qui deviendront les myoseptes verticaux, constitue les prémices des

futurs muscles du tronc (Figure 14). Le myotome est alors constitué de 4 types de fibres musculaires : les fibres superficielles lentes (SSF) et les fibres pionnières (MP) sont à contractions lentes, alors que les fibres rapides (FF) et les fibres rapides médiales (MPF) sont à contractions rapides. Chaque type de fibres a une localisation spécifique : les fibres musculaires lentes longitudinales (fusiformes) et mononucléées (SSF) sont à la périphérie du myotome et sont organisées en une monocouche, immédiatement sous le dermomyotome formé d'une couche de cellules épithéliales indifférenciées, alors que les fibres rapides obliques multinucléées (FF) sont au cœur des somites (Figures 14 et 15). Les SSFs représentent environ 20 fibres par hémisegment somitique (moitié droite ou gauche d'un somite) à 24 hpf et sont des cellules fusiformes dont la majeure partie du cytoplasme est occupée par l'appareil contractile caractéristique des cellules musculaires striées. Elles possèdent un noyau unique situé au centre de la fibre, à la différence des cellules musculaires striées squelettiques présentes chez les autres vertébrés supérieurs, qui sont des syncytia résultant de la fusion de myoblastes. Les SSFs sont caractérisées par l'expression d'isoformes spécifiques de plusieurs protéines de l'appareil contractile. La plus connue est « Slow myosin heavy chain 1 » (Smyhc1), une isoforme de la chaîne lourde de myosine spécifique du lignage lent, utilisée comme marqueur principal des fibres lentes. Les synapses (Figure 15) sont retrouvées au niveau des myoseptes verticaux délimitant les somites. Au niveau de la fibre individuelle, ces synapses se retrouvent aux extrémités de la fibre. Les récepteurs à l'acétylcholine (AChR) sont localisés au niveau de ces synapses et n'ont pas de sous-unités λ or ϵ . Elles génèrent des contractions lentes.

Les MPs forment un groupe de 2 à 6 fibres lentes par hémisegment (à 24 hpf) localisées médialement dans le somite (Figure 14). Elles se distinguent des SSFs par une forte expression de *engrailed 1* et *engrailed 2*, deux facteurs de transcription à homeobox de la famille *Engrailed* (Eng). Ces fibres sont impliquées dans la formation du myosepte horizontal, une structure riche en matrice extracellulaire, qui subdivise le myotome en deux moitiés, dorsale et ventrale, et qui est responsable de la forme en chevron caractéristique du myotome (Stickney et al., 2000).

Comme dit précédemment, les FFs constituent le cœur du myotome. A 24 hpf, elles sont environ 80 par hémisegment. Ce sont des fibres syncytiales classiques dont les noyaux multiples sont alignés dans le sens de la fibre, en périphérie de l'appareil contractile. Au niveau moléculaire, elles se caractérisent par l'expression d'isoformes rapides des chaînes lourdes (fMyHC) et légères (fMyLC) de myosine, communément utilisées comme marqueurs du lignage rapide. Les synapses (Figure 15) peuvent être observées sous forme de spots au niveau de chaque fibre. Les AChRs contiennent des sous unités λ or ϵ et déclenchent des contractions rapides.

Les MFFs ont été décrites par Wolff et ses collaborateurs en 2003, comme des fibres musculaires rapides Eng-positives. Elles sont au nombre de 2 à 6 par hémisegment (à 24 hpf). Localisées sur le pourtour des MPs, elles expriment les facteurs Eng en plus faible quantité que ces dernières (Wolff et al., 2003). Aucune fonction ne leur est attribuée à ce jour dans la littérature.

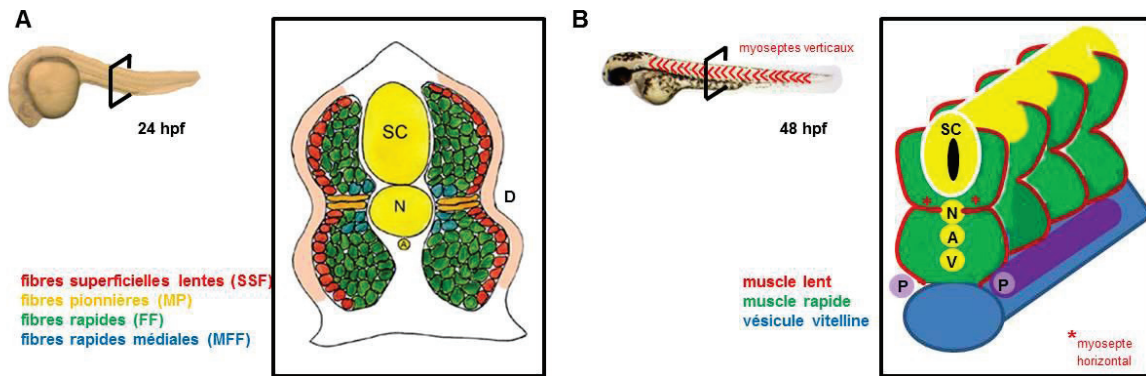


Figure 14 : Schémas montrant l'organisation du muscle squelettique dans le tronc chez le poisson zèbre. (A) Coupe transversale intra-somitique d'un embryon de 24 hpf (fin de la segmentation). (B) Organisation des somites à 48 hpf. Les muscles rapides en vert ont une position centrale alors que les muscles lents en rouge sont à la périphérie. SC= spinal cord (moelle épinière), N=notochorde, A=aorte, D=dermomyotome, V=veine, P=pronephros (reins). Schéma A tiré de la thèse d'E.Guillon.

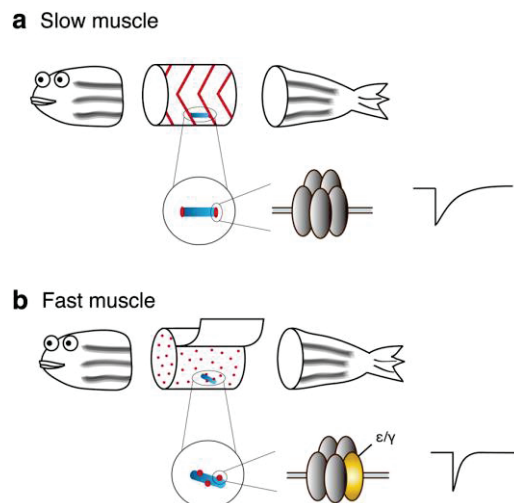


Figure 15: Les muscles lents et rapides chez le poisson zèbre. a. Les SSFs : une fibre isolée est montrée en bleu, immédiatement sous la peau. Les synapses (en rouge) sont retrouvées au niveau des myoseptes verticaux (chevrons) délimitant les somites. Au niveau de la fibre individuelle, ces synapses se retrouvent aux extrémités de la fibre. Les AChR sont localisés au niveau de ces synapses et déclenchent des contractions lentes. b. Les FFs : une fibre isolée est montrée en bleu, sont localisées dans les couches plus profondes. Les synapses (en rouge) peuvent être observées sous forme de ronds spots au niveau de chaque fibre. Les AChRs contiennent des sous unités λ or ϵ (en jaune) et déclenchent des contractions rapides. Extrait de Luna et al., 2015.

Chez le poisson zèbre, la proportion de muscles rapides est bien supérieure à celle d'autres espèces (comme les espèces de mammifères par exemple). Cela leur permet de produire des mouvements explosifs et puissants de manière ponctuelle, notamment pour échapper aux prédateurs.

Dans le tronc du poisson zèbre, chaque fibre est ancrée, à chaque extrémité, à un feuillet tendineux qui relie les muscles entre eux, le myosepte vertical. Chez le poisson zèbre, les sarcomères, unités contractiles du muscle, présentent une organisation tout à fait semblable à celle des mammifères (Sanger et al., 2009) à la différence près que les tubules-T ne sont pas distribués de la même façon. Ainsi, les tubules T sont à l'aplomb des stries Z chez le poisson zèbre (et la grenouille) alors qu'ils sont à l'aplomb de chaque jonction bande A/bande I chez les mammifères. Il y a donc globalement deux fois moins de tubule T chez le poisson zèbre que chez les mammifères (Figure 16).

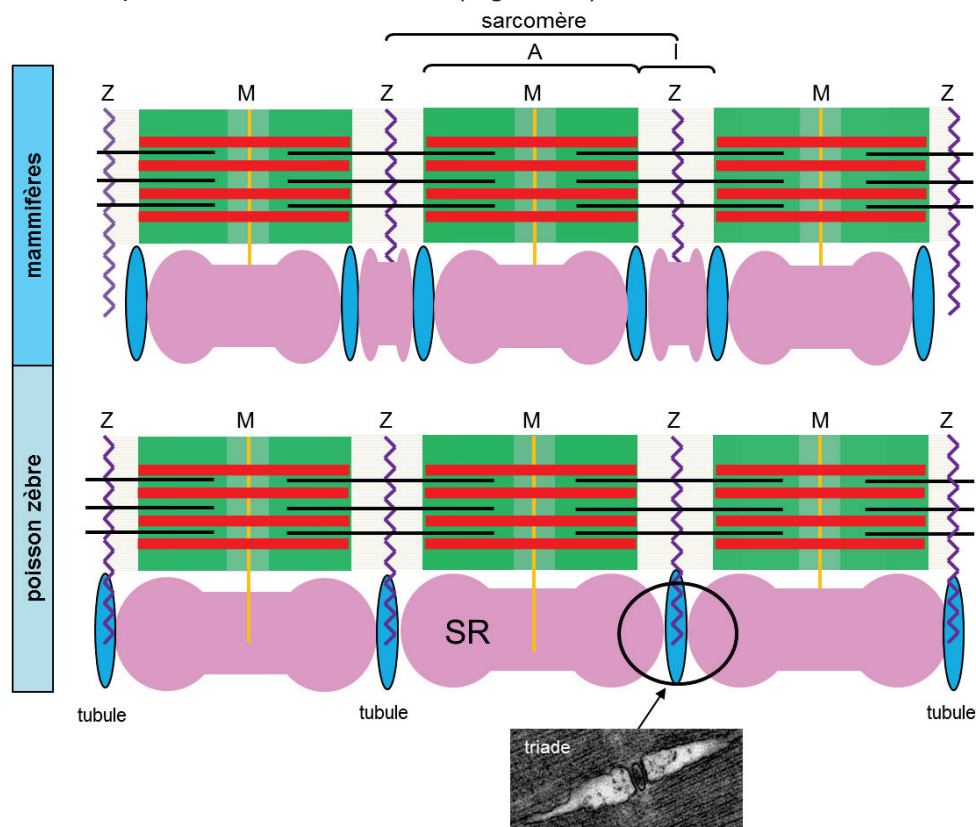


Figure 16: Ultrastructure des sarcomères et des compartiments membranaires associés chez les mammifères et le poisson zèbre. On peut noter ici la forte similarité d'organisation entre les sarcomères de mammifère et de poisson zèbre, malgré la différence de distribution des tubules T en regard des stries Z chez les poissons zèbres ou encadrant les bandes A et I chez les mammifères. Les filaments d'actine sont schématisés en noir et les filaments de myosine en rouge. SR= réticulum sarcoplasmique. Inspiré d'un schéma de B. Allard (INMG, Lyon).

- La myogenèse chez le poisson zèbre

Contrairement aux vertébrés supérieurs, la myogenèse du poisson zèbre commence dans les cellules adaxiales avant même la formation des somites. Par exemple, chez la souris, la myogenèse primaire commence à 11 jours de vie embryonnaire (jve) alors que la somitogenèse a déjà commencé (8 jve). Les cellules adaxiales, progénitrices du muscle lent, forment une sous population du mésoderme présomitique localisées immédiatement au contact de la notochorde. La différenciation des progéniteurs musculaires est dépendante d'une famille de facteurs de transcription appelés les facteurs de régulation de la myogenèse ou MRFs (myogenic regulatory factors de type « basic helix-loop-helix »).

La spécification des différents types de fibres musculaires présentes dans le myotome repose sur l'établissement de gradients de signalisation précis (HH pour le contrôle du devenir lent *versus* rapide, FGF et BMP dans la différenciation des MPs). Les molécules de la MEC peuvent contribuer à l'établissement de ces gradients notamment par séquestration de facteurs diffusibles (Sarrazin et al., 2011). Cependant, chez le poisson zèbre, très peu de données existent concernant la contribution des molécules de la MEC dans la régulation des voies de signalisation orchestrant la formation du myotome. Les travaux menés dans notre laboratoire ont montré que le collagène XV pourrait réguler la diffusion de facteurs HH sécrétés par la notochorde (Pagnon-Minot et al., 2008). La notochorde est entourée d'une matrice extracellulaire complexe structurée en un manchon périchordal dans lequel le collagène XV est fortement exprimé (détection des transcrits entre 10 et 24 hpf). La désorganisation de cet échafaudage matriciel à 10 hpf après inhibition de l'expression du collagène XV dans l'embryon, provoque une dérégulation de la diffusion de SHH se traduisant par une augmentation du domaine d'expression de *patched-1* (*ptc1*) et du nombre de MFFs. Nous n'avons malheureusement pas pu démontrer une interaction physique entre COL XV et HH faute d'outils adaptés.

La différenciation des fibres musculaires lentes nécessite donc le facteur HH produit par les cellules de la notochorde (Hirsinger et al., 2004) mais le tout premier facteur exprimé par les cellules adaxiales et qui marque le début de la différenciation des progéniteurs musculaires est *myoD*. Les cellules exprimant *myoD* vont s'allonger et migrer radialement pour former les fibres lentes superficielles (SSF). Par ailleurs, la détermination du nombre de cellules adaxiales à se différencier par la suite en SSF versus MP dépend d'un double gradient de signalisation FGF et BMP (Nguyen-Chi et al., 2012). L'activation de ces deux voies de signalisation inhibe l'expression d'*Engrailed* (*Eng*) et donc le devenir MP. Il existe un gradient antéro-postérieur de signalisation FGF et un gradient dorso-ventral de signalisation BMP dans le somite au moment de la formation des MPs. Les travaux de Nguyen-Chi et ses

collaborateurs ont permis d'établir, en 2012, le modèle selon lequel l'absence d'activation de la voie des FGFs dans la partie antérieure du somite et de la voie des BMPs dans la partie centrale du somite permettrait de définir une région antéro-centrale où la différenciation en MP est possible. Les MPs s'allongent le long du somite au cours de sa formation et séparent, plus tard au cours du développement, les domaines dorsaux et ventraux du myotome: on parle de myosepte horizontal.

La différenciation des fibres musculaires rapides, elle, se produit plus tard, après la formation des somites. Les MFFs dérivent d'une seconde vague d'expression de *myoD*, dans la moitié postérieure de chaque nouveau somite formé, alors que les fibres rapides latérales dérivent des cellules du dermomyotome exprimant *Pax 3/7* (Stellabotte et al., 2007). Les MFFs expriment aussi *Eng* mais à un niveau beaucoup plus bas que les MP. Les myoblastes les plus proches de la notochorde donneront donc naissance aux MFFs alors que les myoblastes latéraux donneront naissance aux fibres rapides (FF). En effet, sous l'impulsion des cellules adaxiales qui migrent au travers du myotome, les cellules progénitrices des muscles rapides vont commencer à se différencier puis fusionner entre elles pour former les fibres rapides multinucléées (FF). La différenciation des fibres rapides médiales est dépendante de *Pax3/7* et de la voie *HH*. La différenciation des cellules musculaires rapides, elle, est dépendante de *myoD* mais indépendante de la voie *HH* au contraire des fibres lentes. Elle nécessite l'activation des voies de signalisation des FGFs (Stellabotte et al., 2007). Comment les co-régulateurs transcriptionnels tels que les arginines méthyltransférases PRMT4/CARM1 et PRMT5 contrôlent la myogenèse *in vivo* chez le poisson zèbre ? Grâce à des expériences de perte de fonction conduites à l'aide de MOs dirigés contre PRMT4/CARM1 et PRMT5, combinées à des hybridations *in situ*, des q-PCR et des expériences d'immunohistochimie, Batut et ses collaborateurs montrent que PRMT5 régule l'expression de *myod*, *myf5* et la *myogénine*, la formation des fibres rapides et ne contrôle pas la formation des fibres lentes. En revanche, PRMT4/CARM1 est nécessaire pour le positionnement des *Smyhc*. Les co-régulateurs PRMT4/CARM1 et PRMT5 participent donc à la myogenèse du poisson zèbre (Batut et al., 2011).

Le développement des muscles coïncide avec la formation des somites. Ainsi, il y a un décalage dans la différenciation des cellules musculaires entre les somites antérieurs qui se développent en premier, et les somites plus « jeunes » en partie postérieure. Les premières contractions spontanées sont observées à 17 hpf (paragraphe « des premières contractions à la nage »). A 21 hpf, les embryons commencent à bouger spontanément. Ces fonctions musculaires précoces dépendent des fibres musculaires lentes tandis que les fibres rapides sont toujours en cours de différenciation. Le muscle squelettique du poisson zèbre est totalement différencié dès 48 hpf.

- La dynamique des cellules souches dans la régénération musculaire chez le poisson zèbre

L'imagerie *in vivo* de différents modèles permet d'aborder la dynamique des cellules souches dans la régénération musculaire qui se met en place lorsque des cellules musculaires sont endommagées (Ratnayake and Currie, 2017). Dans le cas du poisson zèbre, les cellules souches musculaires migrent vers la zone altérée (Figure 17). Une fois sur le site, elles s'associent sous forme circulaire avec les myofibrilles endommagées et se divisent de façon asymétrique pour générer d'une part des cellules progénitrices myogéniques et d'autre part des cellules souches musculaires qui reconstituent le stock de cellules souches. Les cellules progénitrices myogéniques s'étalent et interagissent physiquement en migrant ensemble, puis se séparent. Les fibres musculaires jouxtant le tissu endommagé étendent des filopodes qui entrent en contact avec les cellules progénitrices myogéniques et les guident précisément vers la zone endommagée. Alors, les cellules progénitrices s'alignent le long des fibres musculaires saines puis les cellules s'allongent et se différencient en fibres musculaires.

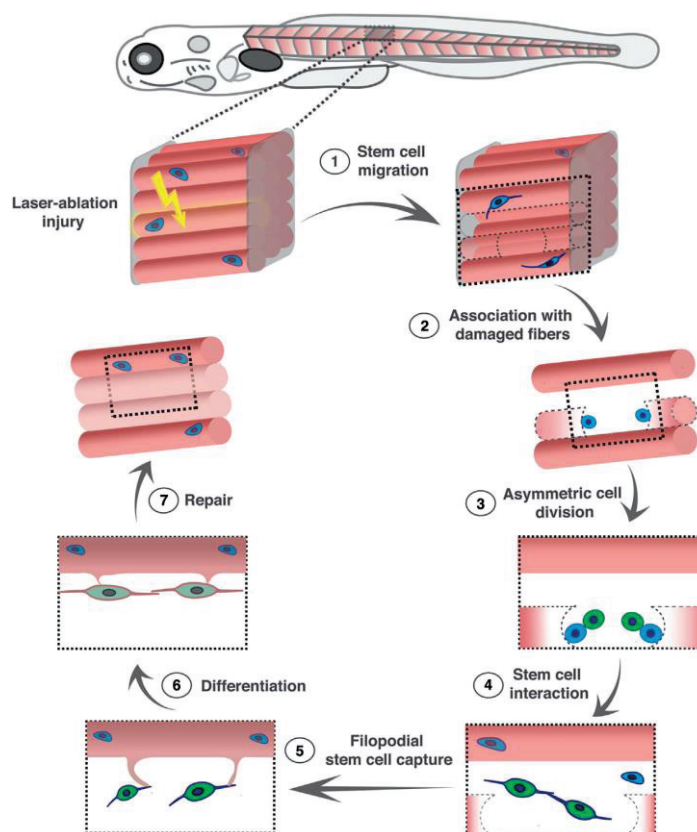


Figure 17: Mécanisme de réparation du muscle de larve de poisson zèbre. L'imagerie *in vivo* après ablation laser (flèche jaune) de muscle squelettique de poisson zèbre (myofibrilles en rose, myoseptes verticaux en gris et cellules souches musculaires en bleu) permet la visualisation de la régénération musculaire. Les cellules progénitrices myogéniques sont schématisées en vert; les cellules progénitrices différenciées en vert et rose et les nouvelles fibres musculaires en rose pâle). D'après Ratnayake and Currie, 2017.

La régénération musculaire est donc fondée sur l'activation des cellules satellites (CS) qui confèrent aux amniotes de fortes capacités régénératives. Les CS sont des cellules souches adultes quiescentes résidant dans une région spécialisée, appelée « niche », au-dessous de la lame basale qui entoure les fibres musculaires (Figeac et al., 2007). Ces cellules sont identifiées par l'expression de divers marqueurs: le facteur de transcription paired-box Pax 7, le récepteur au facteur de croissance hépatocytaire Hgf, *cmet* et le facteur myogénique Myf5 (Ratnayake and Currie, 2017). Pax 7 est le marqueur universel des CS murines. Le poisson zèbre, lui, possède deux paralogues *pax7a* et *pax7b*. Chez le poisson zèbre, *pax7* n'est pas spécifique des cellules souches de la régénération, il est aussi exprimé dans la couche cellulaire externe (ECL), un pool de cellules progénitrices externes au myotome qui contribue à la croissance musculaire du poisson, tout au long de sa vie. Chez *Danio rerio*, les marqueurs *cmet* et *pax7a*, qui caractérisent les CS amniotes, marquent tous deux un petit groupe de cellules en profondeur du myotome. L'expression de *cmet* commence à 4 jpf et persiste à l'âge adulte en maintenant une « niche » associée aux fibres musculaires. Ces cellules, qui expriment aussi l'inhibiteur B de la kinase 4 dépendant de la cycline et restent quiescentes en conditions homéostatiques, sont nécessaires à la régénération musculaire. En effet, elles se différencient en progéniteurs myogéniques qui facilitent la myogenèse *de novo* après dommage musculaire. Le poisson zèbre possède donc une population de cellules souches spécifiques à la régénération musculaire qui est génétiquement et morphologiquement distinctes des progéniteurs musculaires nécessaires à la croissance musculaire. Ce compartiment de cellules souches spécifiques à la régénération est comparable au CS des amniotes.

Même si *pax7* n'est pas exprimé que par les cellules souches spécifiques à la régénération musculaire, il peut être utilisé comme marqueur général de ces cellules au cours de la régénération. Ainsi, Pipalia et al., en 2016, démontrent que les cellules exprimant *pax7a* se comportent différemment des cellules exprimant *pax7b* après dommage musculaire (Pipalia et al., 2016). Les cellules *pax7a* positives initient la formation de myofibres alors que les cellules positives pour *pax7b* favorisent la croissance des fibres. Le type de lésion musculaire semble également influencer la réponse cellulaire. Ainsi, chez le poisson zèbre, les cellules *pax7a*⁺ ne participent pas à la régénération de petites lésions localisées mais participent lors de blessures plus vastes (Knappe et al., 2015). Le stade de développement influence aussi la cinétique des cellules souches et le taux de régénération musculaire. L'utilisation d'une lignée transgénique *pax7a:eGFP* marquant les cellules régénératives a permis de démontrer, après blessure du myotome à l'aide d'une aiguille, que le taux de

cellules GFP⁺ migrant vers le site de blessure est plus faible et donc la régénération est plus lente chez les animaux plus âgés (Knappe et al., 2015).

2.2 Le tendon

- Présentation générale

Une des fonctions des tissus conjonctifs (TCs) est de supporter et connecter les différents organes entre eux ou de séparer deux tissus. Les TCs sont essentiellement composés de fibroblastes et de MEC. On peut distinguer les TCs spécialisés (os et cartilage) des TCs denses. Les TCs denses sont sous-divisés en TCs denses réguliers (tendon et ligament) et denses irréguliers (TC entourant les organes). Les tendons forment de véritables câbles biologiques, reliant le plus souvent les os aux muscles. Il existe en effet des tendons reliant deux muscles. C'est le cas par exemple des insertions tendineuses reliant les muscles du flanc chez le cheval, les muscles abdominaux chez l'Homme et les muscles du tronc chez les larves de poisson zèbre. On parle alors de feuillet tendineux.

Les tendons sont de couleur blanche, et d'aspect plutôt large et épais, ils possèdent une forte résistance due à leur structure en larges faisceaux de fibres de collagène toutes orientées parallèlement, et permettent la transmission au squelette des forces générées par les muscles. L'ensemble muscle-tendon-os forme ainsi une structure dynamique permettant les mouvements. Le tendon, seul, est incapable d'induire un mouvement, on parle ainsi d'un acteur passif. Le ligament, lui, relie deux os dans une articulation, comme les fameux ligaments croisés du genou. Il possède une structure très proche de celle du tendon et provient d'ailleurs de la même origine embryonnaire, cependant, les ligaments sont constitués de courtes bandes de tissu conjonctif et ils ont pour rôle de limiter ou empêcher certains mouvements, protégeant ainsi les articulations de traumatismes tels que des entorses ou des luxations lors de mouvements forcés.

La structure des tendons n'est pas homogène, elle diffère selon la région du tendon et le type de tendon. L'histologie permet de visualiser les liens entre muscle et tendon (i.e. la JMT) d'une part et tendon et os (i.e. jonction ostéotendineuse JOT ou enthèse) d'autre part.

- L'organisation des tendons

Le tendon correspond au tissu conjonctif compris entre la JMT et la JOT et est composé de fibres collagéniques entre lesquelles on retrouve des rangées de fibroblastes tendineux

appelés ténocytes (Figure 18). Les faisceaux de collagène peuvent atteindre plusieurs millimètres de longueur et de quelques nanomètres à plus de trois cent nanomètres de diamètre (Screen et al., 2016). Ils sont séparés les uns des autres par l'endoténon (Figure 18), un tissu conjonctif lâche d'épaisseur variable qui permet aux fibres de glisser les unes contre les autres. C'est au niveau de l'endoténon que sont retrouvés les vaisseaux sanguins ainsi que les nerfs. La MEC dense des tendons contient entre 55 et 70% d'eau selon les espèces, le genre, le stade de développement, le site anatomique, l'hydratation et la condition physiologique du tissu. La quantité d'eau joue un rôle important en influençant les propriétés mécaniques et fonctionnelles du tendon, bien que ce soit surtout les collagènes (60 à 85% de la masse sèche du tendon) qui contrôlent sa capacité à résister à de très grandes tensions (Screen et al., 2016).

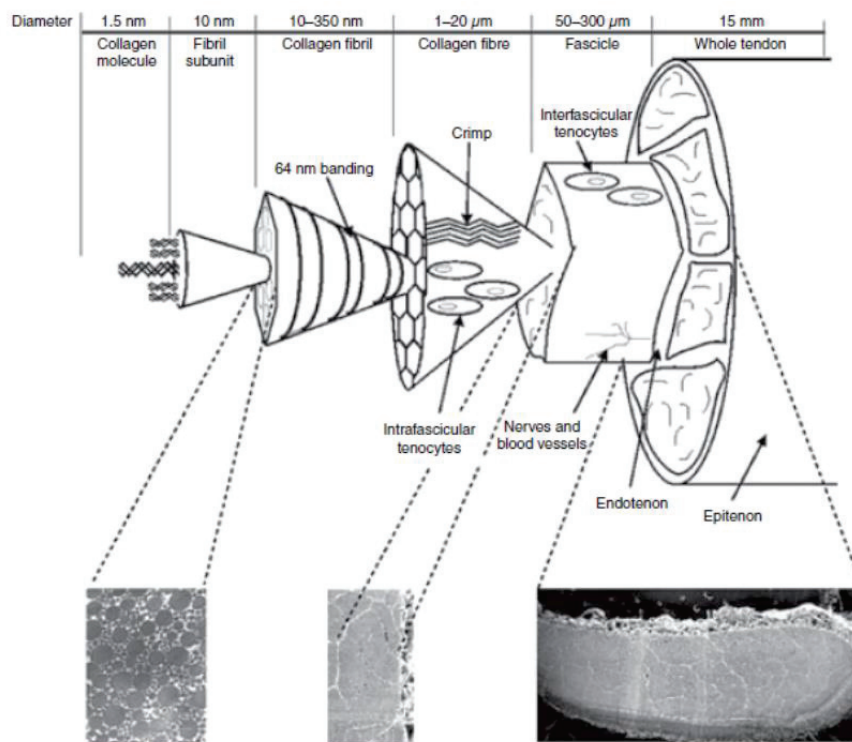


Figure 18: Organisation des tendons. Représentation schématique de la structure hiérarchisée des tendons. A chaque niveau, les faisceaux de collagène sont séparés par de petites quantités de matrice non-collagénique. D'après Thorpe et al., 2013.

Le collagène I est le plus abondant des collagènes produits par les ténocytes : il représente 95 % des collagènes du tendon (Screen et al., 2016). Mais les tendons sont aussi constitués d'autres collagènes fibrillaires, quantitativement minoritaires tels que les collagènes III et V qui régulent notamment la fibrillogénèse.

Outre les collagènes fibrillaires, on retrouve également dans les tendons des FACITs (collagènes XII et XIV) mais aussi des protéines non-collagéniques comme les protéoglycanes et glycoprotéines (Screen et al, 2016). Les protéoglycanes (PGs) (moins de 0,2% de la masse sèche du tendon) sont généralement divisés en : 1) de larges PGs pouvant s'agréger comme le versicane et l'aggrécane, particulièrement présents dans les régions péricellulaires et les zones de compressions du tendon, et qui ont pour rôle d'augmenter la teneur en eau de ces régions, grâce à de longues chaînes GAG chargées négativement, afin d'augmenter la résistance aux compressions et 2) de petits PGs riches en leucine (SLRP, famille composée de dix-sept membres) comme le biglycan, la décorine, la fibromoduline et le lumican qui régulent la formation des fibres et la maturation des tendons (Edom-Vovar et Duprez, 2004). Ainsi les souris déficientes indépendamment pour chacun des SLRP cités ci-dessus présentent une structure anormale des fibres de collagènes dans de nombreux tissus dont les tendons (Edom-Vovar et Duprez, 2004). Les glycoprotéines du tendon sont la ténascine-C, COMP (Collagen Oligomeric Matrix Component) et la ténomoduline, la lubricine. Des fibres élastiques composées d'élastine, de fibrillines 1 et 2, et d'autres molécules associées aux fibres élastiques sont aussi présentes (Screen et al., 2016). Également, des structures microfibrillaires contenant de la fibrilline, indépendantes des zones contenant de l'élastine, sont retrouvées dans la MEC du tendon. Peu de données sont disponibles concernant la fonction de ces composants, cependant, la lubricine et l'élastine localisées dans la « matrice inter-faisceaux » pourraient faciliter le glissement des fibres collagéniques les unes contre les autres (Thorpe et al., 2013). De même, la lubricine est également localisée dans la gaine autour des tendons, où elle jouerait à nouveau un rôle dans le phénomène dit de « sliding ». Les fibrillines ont à la fois un rôle structural et instructif. Leur rôle structural varie en fonction du temps et du niveau d'assemblage des fibres élastiques et des microfibrilles. Leur rôle instructif dépend de la faculté de la fibrilline à séquestrer les facteurs « transforming growth factor beta » (TGFbeta) et « bone morphogenetic protein » (BMP) dans la MEC (Screen et al., 2016). Les FACITs diminuent les interactions entre les fibres de collagène I, leur permettant ainsi de glisser les unes contre les autres lorsqu'une force d'étirement est appliquée. La distribution des protéoglycanes est fonction du type de stress appliqué. Ainsi les zones du tendon soumises à des forces de compression sont plus riches en glycosaminoglycanes que les zones soumises à étirements (Canty and Kadler, 2002).

- La fibrillogenèse

L'assemblage des fibres de collagène dans le tendon est hiérarchisé et implique tout d'abord la formation de fibrilles relativement courtes qui vont ensuite fusionner pour former les très longues fibres retrouvées dans le tendon mature (Canty and Kadler, 2002). Chez l'Homme, le collagène I est le collagène fibrillaire majeur des os, de la peau, de la cornée et du tendon alors que chez le poulet, le collagène I est l'unique collagène fibrillaire présent (Canty and Kadler, 2002). Ceci fait donc du poulet un très bon modèle embryonnaire pour faciliter l'étude des stades précoces de la biosynthèse des collagènes et de l'assemblage des fibres. Comme vu précédemment (chapitre 1-4), le collagène est d'abord synthétisé sous forme de procollagène, puis les N et C-propeptides vont être clivés par des métalloprotéinases. Les molécules de collagène ainsi clivées vont alors être capables de s'assembler spontanément en structure fibrillaire caractéristique. La stabilisation des fibrilles de collagène nécessite des réticulations (cross-linking) contribuant à la résistance du tendon. L'enzyme lysyl oxidase convertit ainsi les résidus lysine en allysine et les hydroxylysine en hydroxyallysine. Ces nouveaux résidus vont à leur tour déclencher une variété de réticulations inter et intramoléculaires (Canty and Kadler, 2002). En particulier, les N et C-téloptides vont être réticulés au niveau de la région en triple hélice de la molécule de collagène voisine. Ainsi, la fibrillogenèse débute par l'association des molécules de collagènes, avec un décalage régulier des fibres les unes par rapport aux autres. Le collagène I s'associe en microfibrilles et l'ajout bout à bout de collagène I permet aux microfibrilles de croître de façon linéaire pour former des fibrilles. Les fibrilles s'assemblent latéralement pour former des fibres qui vont à leur tour s'associer en faisceaux (Zhang et al., 2005). Comme indiqué précédemment, les SLRPs mais aussi les FACITs présents dans le tendon vont jouer un rôle prépondérant dans l'assemblage des fibres et le phénomène de « sliding ». L'incorporation de collagène III et/ou V dans les fibres de collagène I conduit à la formation de fibres dites hétérotypiques. Les fibres hétérotypiques de type I/III sont présentes très tôt au cours du développement du tendon. L'interaction entre deux collagènes fibrillaires différents est ainsi importante dans la régulation de l'assemblage initial des fibrilles (Zhang et al., 2005). Les différences de maturation des parties N-propeptides des collagènes III et V peuvent influencer l'assemblage des fibres de collagène et réguler les interactions avec les PGs ou les FACITs, La présence de collagène III et V varie selon le type de tendon et le stade de développement. L'assemblage des fibrilles de collagène a principalement lieu au cours du développement foetal, alors que leur croissance et maturation se font après la naissance. Les propriétés mécaniques du tendon s'en trouvent totalement modifiées. Ainsi, l'élasticité du tendon adulte de poulet est près de 40 000 fois supérieure à celle du tendon foetal (Gaut and Duprez, 2016).

- Les marqueurs du tendon

Au cours du développement embryonnaire, les cellules mésenchymateuses indifférenciées dérivent du mésoderme et du mesectoderme (cellules des crêtes neurales) et donnent lieu à différentes formes de TCs : os, cartilage, tendons, ligaments et TC irrégulier (Nassari et al., 2017). La spécialisation et la différenciation de chaque type de TC sont contrôlées par des facteurs de transcription spécifiques clés ou des molécules signales. Les tendons ont différentes origines selon leur position dans le corps. Les tendons du tronc proviennent des somites et plus précisément d'une sous-région du sclérotome appelée syndétome (Brent et al., 2003), tandis que les tendons de la région craniofaciale dérivent des cellules des crêtes neurales. Au contraire du cartilage et de l'os, le(s) principal(aux) gène(s) impliqué(s) dans la spécialisation du tendon au cours du développement est (sont) toujours inconnu(s) (Nassari et al., 2017). Pour l'instant, le marqueur le plus précoce des précurseurs des ligaments et tendons chez l'embryon de vertébré est *Scleraxis* (*Scx*), un facteur de transcription de type « basic helix-loop-helix ». *Scx* est fortement exprimé des stades progéniteurs aux stades différenciés des ténocytes, les fibroblastes du tendon. *Scleraxis* peut se fixer au promoteur proximal de la chaîne $\alpha 1$ du collagène I *in vitro* et l'activer (Léjard et al., 2007), ainsi qu'augmenter l'expression de protéoglycanes (décorine, fibromoduline, lumican et α -SMA) dans la matrice tendineuse (Alberton et al., 2012; Chen and Galloway, 2017). De plus, *Scx* régule positivement l'expression de la ténomoduline, marqueur des ténocytes différenciés, *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, les souris mutantes *Scx*^{-/-} présentent des défauts sévères des tendons avec une forte limitation de la transmission de force des tendons des membres et de la queue alors que les tendons que les auteurs distinguent dans la catégorie des tendons d'ancrage (comme la monocouche cellulaire tendineuse qui entoure les côtes et les connectent aux muscles intercostaux) et les ligaments sont moins affectés (Murchison et al., 2007; Nassari et al., 2017). Cependant les cellules progénitrices du tendon sont présentes chez les souris *Scx*^{-/-}, ce qui indique que *Scx* ne serait pas le gène principal conduisant la ténogenèse au cours du développement. En effet, deux autres facteurs de transcription ont été identifiés: le facteur de transcription homeobox *Mkx* (Mohawk) et le facteur de transcription à doigt de zinc *Egr1* (Early Growth Response 1) (Lejard et al., 2011; Nassari et al., 2017). Les souris mutantes *Mkx*^{-/-} et *Egr1*^{-/-} présentent toutes deux des défauts des tendons avec une diminution de l'expression de *Col1a1* et du nombre de fibres de collagène I dans les tendons (Lejard et al., 2011; Nassari et al., 2017). Cependant, *Mkx* et *Egr1* sont exprimés après *Scx* au cours du développement et ne sont pas spécifiques du tendon. Les voies TGF β (Transforming growth factor) et FGF (Fibroblast growth factor) régulent la spécialisation et la différenciation du tendon à différents endroits du corps (Gaut and Duprez, 2016). Comme je l'ai indiqué, les progéniteurs des tendons axiaux proviennent du

syndétome, localisé à l'interface sclérotome-myotome. Chez le poulet, en l'absence de muscles axiaux (ablation du dermomyotome), les tendons axiaux ne se développent pas (Brent et al., 2003) ce qui montre l'implication de facteurs externes au syndétome pour la formation de ces tendons. En effet, l'expression de SCX est induite par les signaux FGF provenant du myotome, en même temps que l'expression de PAX1 est diminuée (Brent et al., 2003). Au contraire l'initiation des tendons de la tête et des membres est indépendante du muscle (Nassari et al., 2017). Les signaux TGF β sont nécessaires et suffisants pour l'expression de SCX/Scx au cours du développement du poulet et de la souris alors que les signaux FGF sont nécessaires et suffisants pour l'expression de SCX uniquement dans les cellules indifférenciées de membre de poulet mais pas de souris (Nassari et al., 2017). Bien que les muscles ne soient pas nécessaires à l'initiation des tendons de la tête et des membres, ils sont requis pour le maintien de l'expression de SCX/Scx/Scxa et pour la différenciation complète du tendon. Ainsi, en l'absence de muscles, les tendons dégèrent chez les embryons de poulet, souris et poisson zèbre (Nassari et al., 2017). Il est également important de noter que l'immobilisation des embryons de poulet diminue l'expression de SCX dans les tendons des membres et que l'ajout de FGF4 ou de TGF β permet d'éviter la sous expression de SCX consécutive à l'immobilisation. TGF β et FGF sont donc induits par des forces mécaniques qui régulent la différenciation des tendons (Nassari et al., 2017).

- La formation du syndétome (Figure 19)

Si l'on revient plus en détail sur le développement du syndétome, selon le modèle établi chez le poulet (Brent et al., 2003), en réponse aux signaux des tissus environnants, le nouveau somite formé est donc divisé en un épithélium dorsal, le dermomyotome et un mésenchyme ventral, le sclérotome. Un peu plus tard, le dermomyotome se subdivise en un myotome et un dermatome qui le recouvre, et reste dorsal. Finalement, le sclérotome se subdivise à son tour en un sclérotome ventral, et un syndétome dorsal. L'ensemble de ces transformations sont obtenues en réponse à des signaux d'abord externes puis internes au somite. En effet, au cours du développement précoce des somites, Shh, sécrété depuis la notochorde et le plancher neural, induit l'expression à la fois de Pax1 dans le sclérotome et de FGF/FREK dans le myotome. Au cours du développement du somite, les signaux FGFs du myotome activent l'expression de FREK, ce qui active alors à son tour Scx (via le facteur X) dans le sclérotome, donnant naissance au syndétome. Pax1 sclérotomal réprime indirectement Scx (via le facteur Z), mais son effet est contrecarré par les signaux FGF8/FREK (via le facteur Y). Les progéniteurs du muscle (myotome) et du cartilage (sclérotome) coopèrent pour placer les progéniteurs du tendon (syndétome) à la jonction muscle-cartilage. Une interaction

induite entre les progéniteurs du muscle et du cartilage conduit à la mise en place des progéniteurs du tendon entre eux; ainsi, le primordium du tendon se met en place dans le même espace relatif, requis plus tard pour jouer le rôle de connecteur du muscle et du cartilage, comme montré sur la Figure 19, avec l'attachement du muscle épaxial aux vertèbres.

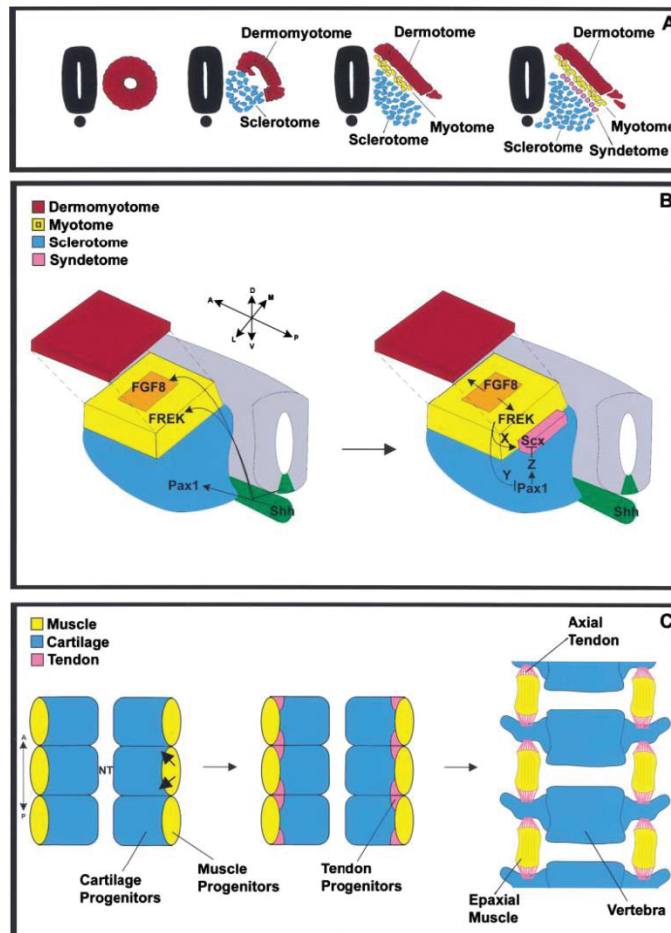


Figure 19: Modèle de formation du syndétome établi chez le poulet. (A) Schéma de sections transverses représentant le développement des somites depuis l'épithélium (à gauche) jusqu'au somite (à droite). Le nouveau somite formé (en rouge à gauche) est divisé en un dermomyotome en rouge et un sclérotome en bleu. Puis, le dermomyotome se subdivise en un myotome (en jaune) et un dermatome (en rouge). Finalement, en réponse aux signaux provenant du myotome, le sclérotome se subdivise à son tour en un sclérotome ventral (en bleu, à droite de la figure A), et un syndétome dorsal (en violet). Tube neural et notochorde sont indiqués en noir. (B) Signaux impliqués dans l'induction de l'expression de Scx dans le syndétome. Notochorde et plancher neural sont représentés en vert. Les flèches indiquent les axes antéropostérieur (A, P), dorso-ventral (D, V), et médial-latéral (M, L). Le tube neural est indiqué en gris. (C) Schéma illustrant les interactions entre les progéniteurs du muscle et du cartilage. Six somites, trois de chaque côté du tube neural (NT), et leurs dérivés, sont représentés en vue frontale. Extrait de Brent et al., 2003.

- Les tendons chez le poisson zèbre

Les tendons du poisson zèbre partagent les mêmes caractéristiques morphologiques, moléculaires, et structurales que ceux des amniotes, que ce soit aux stades embryonnaires

ou à l'âge adulte (Chen and Galloway, 2017). Ainsi, l'organisation du réseau collagénique composant le myosepte est équivalent à la structure des tendons de mammifères. De même, tout comme chez les mammifères, les cellules progénitrices des tendons apparaissent tout d'abord à l'interface entre le muscle en développement et le cartilage et expriment *scxa*, un des orthologues du gène humain SCX. En effet, il existe deux paralogues pour *scleraxis* chez le poisson zèbre : *scxa* et *scxb*. Cependant, l'expression de *scxb* est uniquement détectée par RT-PCR au-delà de 54 hpf. De ce fait, les chercheurs utilisent préférentiellement *scxa* pour étudier les tendons du poisson zèbre.

Dans les stades un peu plus tardifs, l'expression d'autres molécules de la MEC telles que la ténomoduline, la thrombospondin-4b et la chaîne $\alpha 2$ du collagène I est observée (Chen and Galloway, 2017), comme chez les mammifères.

Finalement, l'originalité du poisson zèbre réside dans le fait que les tendons sont distribués tout au long du tronc avec la même périodicité. En effet, chez le poisson zèbre, ce sont les myoseptes délimitant les somites, qui jouent le rôle de tendons. Et du fait de cette succession périodique muscle-tendon-muscle-tendon, les cellules musculaires sont reliées par leurs extrémités à deux myoseptes successifs.

2.3 Les interactions entre muscle et tendon

- L'interaction physique entre muscle et tendon: la jonction myotendineuse et les systèmes d'ancrage

La JMT est localisée à l'interface entre les cellules musculaires et le tendon. C'est une structure hautement spécialisée au niveau de laquelle, les forces générées par le muscle sont transmises via les systèmes d'ancrage aux fibres collagéniques du tendon. Chez les animaux comme chez l'Homme, la JMT présente des interdigitations (Figure 20) formées d'invaginations et d'évaginations du sarcolemme (Knudsen et al., 2015; Tidball and Lin, 1989). Ceci a pour effet d'augmenter la surface de contact entre le muscle et le tendon (10 à 50 fois) et ainsi augmenter la surface sur laquelle s'exercent les forces, mais aussi de créer une accroche physique à la manière de deux pièces de puzzle, pour résister aux forces extrêmement élevées qui s'appliquent dans cette zone (Tidball and Daniel, 1986). Le sarcolemme est ici particulièrement riche en complexe DAPC (complexe protéique associé à la dystrophine) et en intégrines, notamment $\alpha 7\beta 1$.

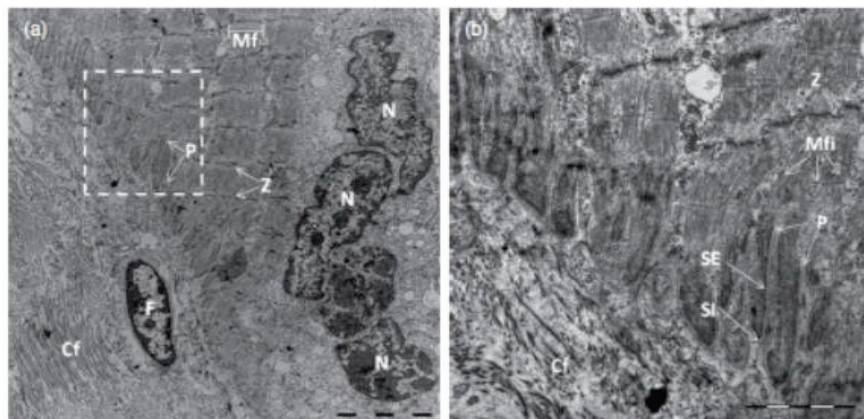


Figure 20: La jonction myotendineuse humaine (JMT) en microscopie électronique à transmission, sections longitudinales. (a) La JMT humaine est observée ici en diagonale du haut gauche au bas droit de l'image. A la JMT, les évaginations du sarcolemme forment des interdigitations (P). Les myofibres (Mf) et les stries Z sont nettement reconnaissables. Si l'on suit les sarcomères jusqu'à la JMT, ils semblent changer d'orientation pour devenir parallèles à l'axe majeur des P. Au niveau du tendon, les fibres de collagène (Cf) s'orientent longitudinalement et transversalement. A droite, un noyau (N) de myofibre peut être observé. Un fibroblaste (F) est visible dans le tendon. Barre d'échelle : 5 μm . (b) Fort grandissement de la zone encadrée de pointillés en (a). Les myofilaments (Mfi) s'étendent de la dernière strie Z jusqu'au tendon. En approchant du tendon, les filaments sont alors uniquement constitués de fin filaments (probablement d'actine). Les interdigitations (P) sont aussi clairement visibles sur ce cliché, constitués d'évaginations (SE) et d'invaginations (SI) du sarcolemme. Barre d'échelle: 2 μm . D'après Knudsen et al., 2015.

La structure et la composition de la JMT étant peu documentées et les bases moléculaires du développement de la JMT encore floues, l'émergence de différents modèles animaux comme le poisson zèbre a facilité l'étude de cette jonction, qui restait jusqu'alors peu accessible. En effet, le risque de réaliser chez les patients des biopsies dans cette région explique le faible nombre d'articles étudiant l'organisation de la JMT humaine. En 2011, Depalma et ses collègues parviennent pour la première fois à décrire des modifications de cette structure spécialisée grâce à des prélèvements issus de patients souffrant de diverses pathologies nécessitant une amputation d'une partie inférieure de la jambe (pathologies nécessitant toutes un alitement prolongé = groupe de patients souffrant d'atrophies musculaires) ou à la suite d'accident de la route (patients jeunes = groupe contrôle) (Palma et al., 2011). Ils présentent la JMT comme l'élément le plus faible du système muscle-tendon, le plus sensible aux micro-traumatismes et supportant des stress élevés. En effet, en cas de traumatisme, les zones de rupture décrites se situent au niveau de la JMT ou au niveau du muscle mais à proximité immédiate de la JMT, et jamais dans le tendon. Ils proposent trois grades de description de la JMT qui pourraient servir au pronostic d'une pathologie musculaire. Au grade 0, la JMT paraît normale, au grade 1, la JMT est dans un état intermédiaire pouvant conduire à une atrophie irréversible ou réversible ; enfin au grade 2, l'altération musculaire serait irréversible. Afin de classer les JMT observées au sein de ces 3 grades, ils proposent d'établir le ratio B/P (base sur périmètre) des interdigitations après observations en microscopie électronique à transmission. De façon intéressante, ils concluent à une différence très significative de ce ratio entre le groupe témoin et le groupe des patients souffrant d'atrophie musculaire. La JMT serait donc affectée qualitativement et quantitativement dans le muscle atrophique. Cependant, cette étude peut être très controversée du fait de la grande hétérogénéité des pathologies des patients du groupe atrophique mais également de la différence d'âge entre les patients témoins (trentenaires) et atrophiques (octogénaires). De plus, pour être certain que la mesure soit correcte, il faudrait s'assurer que les coupes réalisées soient parfaitement transversales à la JMT. Cependant, les articles de Knudsen et Jakobsen confirment en partie leurs observations (Jakobsen et al., 2017; Knudsen et al., 2015).

Knudsen *et al.* confirment que, comme chez les animaux modèles, chez l'homme, la JMT présente une structure 2D en interdigitations permettant d'augmenter de 10 à 20 fois la surface, comparée à une surface plate, ce qui permettrait à la fois de réduire le stress en cette zone (le stress étant par définition une force divisée par une aire) et de, en quelques sortes, « cisailer » les forces appliquées en augmentant l'adhésion (les repliements du sarcolemme diminuant l'angle d'application des forces). Toutefois, ils soulignent à leur tour que l'application d'une tension supérieure d'à peine 20% par rapport à une tension moyenne

normale générée lors d'une activité physique (chez les animaux) conduit à une rupture de la JMT ou du muscle à proximité. Mais, loin de s'arrêter à l'observation de la JMT humaine en 2D, ils ont mis à profit une technique récente de microscopie électronique à balayage par faisceau d'ions focalisés (FIB-SEM), pour décrire pour la première fois la structure 3D de la JMT humaine (Figure 21). Cette observation a mis en évidence que les protrusions tendineuses présentes à la JMT et qui avaient été interprétées comme des interdigitations à partir de l'observation de clichés de microscopie électronique en 2D sont en réalité des structures beaucoup plus larges. Ces protrusions n'auraient en effet pas une forme de cylindres ou de pylones mais plutôt la forme d'arêtes montagneuses qui s'étendent parallèlement aux sarcomères.

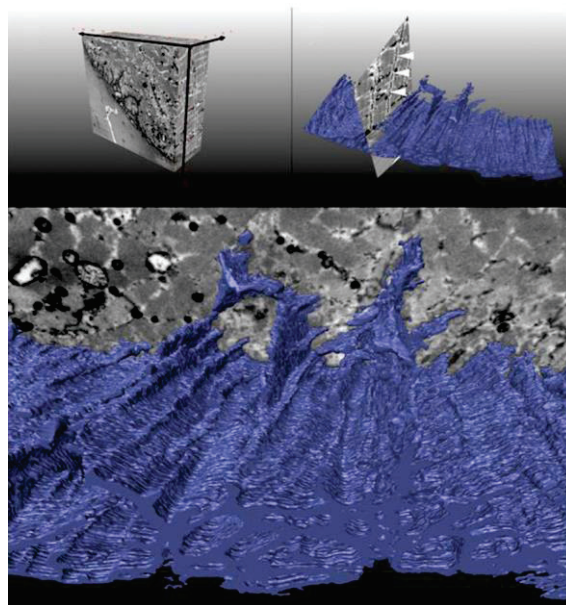


Figure 21: Reconstruction 3D de la jonction myotendineuse humaine. En haut à gauche, la reconstruction 3D réalisée à partir de clichés successifs (telles des coupes sériées) par FIB-SEM montre la JMT avec le muscle en haut à droite et le tendon en bas à gauche. L'image en haut à droite montre une des sections longitudinales du muscle positionnée sur la reconstruction 3D du tendon représentée en bleu. Le tendon forme des ex-croissances qui se rencontrent et fusionnent. En fusionnant, il y a formation de structures protrusives en arêtes. Les stries Z (têtes de flèches blanches) sont clairement visibles. Suivant la direction des sarcomères, elles s'alignent parallèlement aux structures protrusives du tendon. Ainsi, les myofibrilles s'alignent au niveau des protrusions et sont connectées au tendon. Enfin, l'image du bas montre le même type de structures tendineuses mais cette fois-ci au contact du tissu musculaire en section transverse. La reconstruction 3D de la JMT permet d'apprécier son architecture sous forme d'arêtes montagneuses. Extrait de Knudsen et al., 2015.

Il est facilement observable en microscopie électronique à transmission « classique » que les myofilaments des sarcomères terminaux (les plus proches de la JMT) s'insèrent au niveau du sarcolemme. L'observation en trois dimensions, elle, permet de mieux apprécier l'architecture tendineuse en arêtes montagneuses et donc la largeur des interdigitations.

En 2017, Jakobsen et ses collègues s'appuient sur cette description de la JMT et s'intéressent à la plasticité de cette structure face à des exercices d'entraînement. Tout d'abord, ils précisent que la zone de rupture suite à une tension trop importante est plus souvent localisée au niveau de la bande A du sarcomère la plus proche de la JMT qu'au niveau de la JMT elle-même. Ils s'intéressent ensuite à la composition de la JMT et de l'endomysium (qui emballe chaque fibre musculaire) et à l'évolution de cette composition lorsque les sujets sont soumis à un entraînement. Dans un premier temps, ils montrent par divers immunomarquages réalisés sur des sujets contrôles (Figure 22) que le collagène XXII est le seul parmi les collagènes testés (I, III, VI, XII, XIV) à être exprimé uniquement et fortement à la JMT (à l'exception de très rares fins marquages entre myofibres ou insertions tendineuses). Mais, de façon intéressante, ils relèvent qu'en certaines zones de la JMT, il y a absence d'interdigitation corrélée à l'absence d'expression du collagène XXII. Ils montrent également que le collagène VI est présent en périphérie du collagène XXII à la JMT. Les collagènes III, VI, XII et XIV sont quant à eux d'avantage exprimés au niveau de l'endomysium et de façon intéressante l'expression du collagène XIV semble augmenter à proximité de la JMT (Jakobsen et al., 2017).

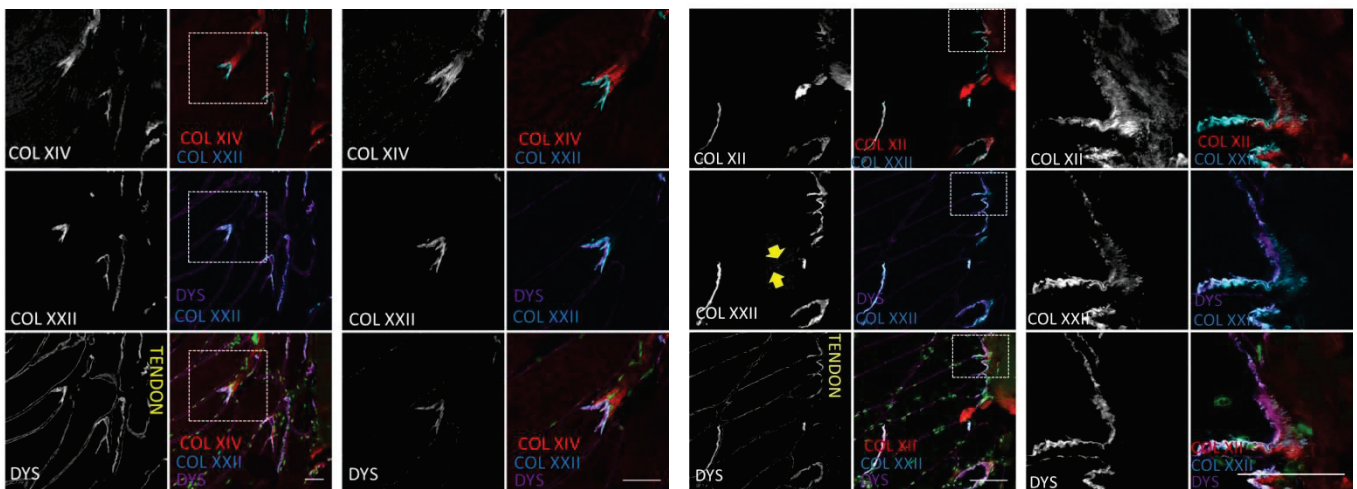


Figure 22: Collagène XXII et dystrophine à la JMT humaine (tendon gracilis) après marquages des collagènes XII, XIV et XXII et de la dystrophine. Le tendon se trouve sur la partie droite des images. Noyaux en vert. Les cadres en pointillés montrent les zones qui ont fait l'objet d'un agrandissement. Les fibres musculaires sont délimitées par le marquage de la dystrophine et l'extrémité de la plupart des fibres à la JMT est visible grâce à un intense marquage de COL XXII. Les flèches jaunes montrent un fin marquage de COL XXII à la bordure entre deux myofibres. COLXXII est localisé entre la dystrophine et le collagène XIV, et est plus particulièrement en lien étroit avec la dystrophine. Noyaux en vert. Barre d'échelle : 50 µm. Modifié d'après Jakobsen et al., 2017.

Dans un second temps, après avoir soumis certains sujets à un entraînement physique de 4 semaines, ils constatent que l'entraînement permet d'augmenter l'expression du collagène

XIV dans l'endomysium mais également d'augmenter la proportion de macrophages (à l'interface muscle-tendon) et de ténascine C (dans le muscle). Il y aurait donc un remodelage matriciel dans la zone tissulaire de la JMT en cas d'entraînement, ce qui pourrait la protéger d'avantage des micro-traumatismes. Enfin, ils ne notent pas de modification de l'expression du collagène XXII visualisée par microscopie optique après immunomarquage faisant suite à 4 semaines d'entraînement. Cependant, il est à noter que d'autres études rapportent qu'un entraînement intensif de 4 semaines serait insuffisant pour protéger le couple muscle-tendon des micro-traumatismes et que 10 semaines d'entraînement seraient préférables.

L'implication de la JMT dans le développement et le maintien de l'appareil musculo-squelettique est indéniable. C'est également un site primordial dans l'innervation et la vascularisation des muscles et des tendons (Kvist et al., 1995). Une meilleure compréhension des interactions entre MEC, sarcolemme et cellules du tendon serait d'un intérêt majeur notamment pour envisager des pistes thérapeutiques lors de pathologies telles que les dystrophies musculaires. C'est dans ce contexte que nous avons tenu à décrire les changements morphologiques de la JMT au cours du développement du poisson zèbre et à schématiser les principales étapes de ce processus (Annexe 3). Nous avons également étudié le rôle du collagène XXII au sein de cette JMT (partie Résultats).

La JMT comporte deux complexes d'ancrage distincts (Figures 23 et 24) permettant tous deux un lien structural entre l'actine cytoplasmique et la MEC du tendon *via* la laminine 211 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$). Les filaments d'actine sont stabilisés entre eux au niveau de la strie Z (jonction entre deux sarcomères) par l'intermédiaire de l' α -actinine. Celle-ci peut s'associer à la desmine et à l'actine qui font le lien entre les deux systèmes d'ancrage : le complexe intégrine $\alpha 7\beta 1$ -dépendant d'une part et le complexe DAPC d'autre part.

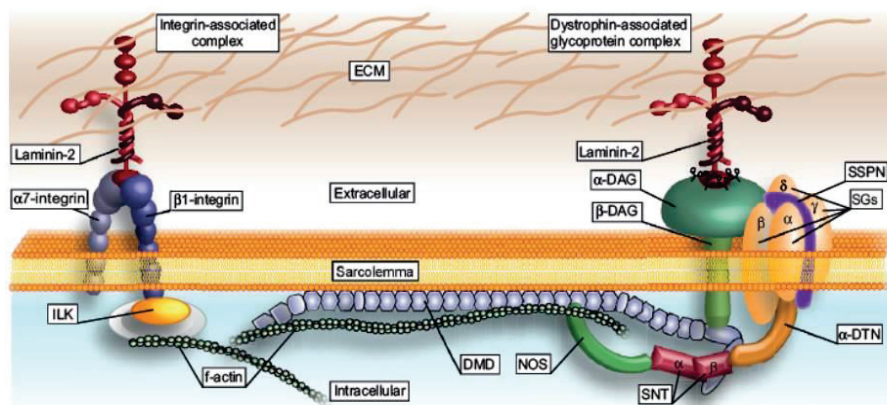


Figure 23: Deux complexes protéiques constituent le lien mécanique principal entre le cytosquelette d'actine et la MEC chez le poisson zèbre. Du fait de leur rôle central dans l'intégrité musculaire, une modification de la composition du complexe associé à l'intégrine à gauche ou du complexe associé à la dystrophine à droite peut conduire à une dystrophie musculaire. DAG: dystroglycan; DMD: dystrophine; DTN: dystrobrevine; ILK: kinase liée à l'intégrine; NOS: oxyde nitrique synthétase; SG: sarcoglycan; SNT:syntrophine; SSPN: sarcospan. D'après Berger and Currie, 2012.

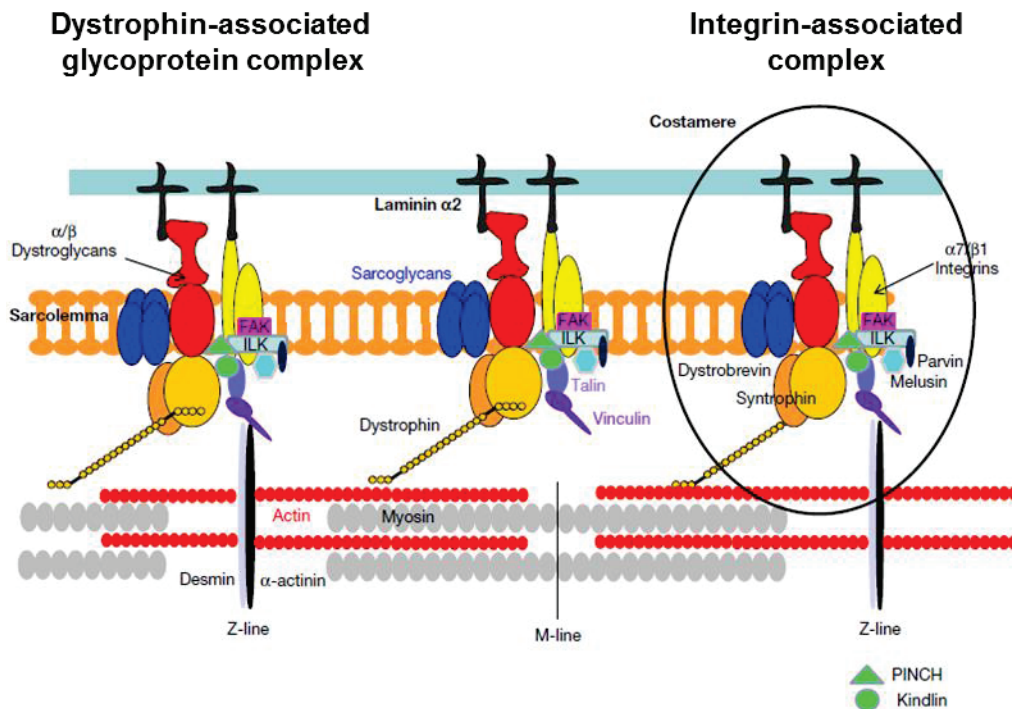


Figure 24: Représentation schématique des protéines formant les costamères dans les muscles squelettiques. FAK, focal adhesion kinase ; ILK, integrin-linked kinase ; PINCH, particularly interesting cysteine- and histidine-rich protein. Modifié d'après Jaka et al., 2015.

La laminine 211 est la protéine commune aux deux systèmes liant le cytosquelette des fibres musculaires aux protéines de la MEC du tendon. Les laminines sont des glycoprotéines trimériques composées d'un bras long (chaîne α) et de deux bras courts (les chaînes β et γ). Elles constituent, avec le collagène IV, les composants majeurs des lames basales. La laminine-2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$, nommée laminine 211 dans la nouvelle nomenclature) est appelée mérosine et est exprimée spécifiquement par les cellules musculaires d'une part et par les cellules de Schwann lors de la formation des jonctions neuromusculaires (JNM) d'autre part. La laminine 211, fortement exprimée à la JMT, représente l'unique isoforme de laminine présente à la JMT adulte, les laminines 221 et 411 étant uniquement exprimées chez l'embryon (Grounds et al., 2005). La chaîne $\alpha 2$ s'unit aux chaînes β et γ pour former la laminine 211 qui va s'associer ensuite avec le complexe dystroglycan et les protéoglycanes à héparane sulfates via son domaine globulaire C-terminal (Huang, 2003). Une mutation sur le gène *LAMA2* codant pour la chaîne $\alpha 2$ induit chez l'homme une dystrophie musculaire congénitale dite à mérosine négative (MDC1A). Des mutations dans les orthologues murins et de poisson zèbre sont également à l'origine de phénotypes dystrophiques.

▪ Le complexe DAPC

La dystrophine s'associe à de nombreuses protéines pour former le complexe DAPC (dystrophin-associated protein complex, Figure 25). L'isoforme musculaire de la dystrophine est une protéine de 427 kDa possédant un domaine N-terminal liant l'actine, un large domaine central composé de 24 unités dites « spectrin-like triple helical coiled coils » et un domaine C-terminal riche en cystéine. La dystrophine s'étend latéralement le long des filaments d'actine F, se liant principalement via trois sites de la région N-terminale (Norwood et al., 2000) et par liaisons électrostatiques via les répétitions d'acides aminés basiques du domaine central. Un déficit en dystrophine conduit à une déstabilisation du complexe DAPC et à des dystrophies musculaires sévères: la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et la dystrophie musculaire de Becker (DMB). Ceci souligne le rôle central de cette protéine dans l'assemblage et le maintien du lien entre cytosquelette d'actine et la MEC. Les autres composants du complexe sont les dystroglycans α et β établissant le lien transmembranaire entre laminine 2 et dystrophine, les 5 sarcoglycans α , β , γ , δ et ϵ , le sarcospan, l' α -dystrobrevine, la syntrophine, la syncoiline, l'oxyde nitrique synthétase NOS, la laminine 2 (comme vu précédemment) et la cavéoline 3.

Des mutations dans n'importe lequel des gènes codant pour les sarcoglycans entraînent la perte des autres formes et conduisent à des dystrophies musculaires des ceintures (LGMD) 2D, 2E, 2C et 2F respectivement causées par l'absence des sarcoglycans α , β , γ et δ (Ehmsen et al., 2002).

Le sarcospan est une protéine membranaire de 25 kDa avec quatre domaines transmembranaires et deux domaines intracellulaires N et C-terminaux, ce qui est unique pour une protéine du complexe DAPC. Aucune pathologie humaine n'est actuellement connue comme liée à un déficit en sarcospan. Les souris KO pour le sarcospan maintiennent un taux d'expression normal de tous les sarcoglycans au niveau du sarcolemme et aucune dystrophie musculaire n'est constatée (Lebakken et al., 2000).

Cinq isoformes d' α -dystrobrevine différentes par leur partie C-terminale existent. Trois sont retrouvées au niveau du muscle, mais seule l' α -dystrobrevin-2 est abondamment exprimée au niveau du sarcolemme. Cette isoforme contient deux sites de liaison à la syntrophine mais peut être alternativement épissée, modulant ainsi le nombre de sites de liaison à la syntrophine, ce qui module l'association de la syntrophine au complexe DAPC (Newey et al., 2000). La dystrobrevine contient plusieurs sites consensus tyrosine kinase. Les interactions protéine-protéine pourraient aussi être régulées par des phosphorylations de tyrosine. La dystrobrevine s'associe avec la dystrophine via des interactions coiled-coil, mais un lien indépendant avec le complexe sarcoglycan/sarcospan pourrait aussi exister puisque

dystrobrevine et syntrophine peuvent lier le DAPC en l'absence de la région C-terminale de la dystrophine (Ehmsen et al., 2002). De façon étrange, les souris invalidées pour la dystrobrevine présentent un phénotype similaire à la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) alors que le complexe DAPC et l'intégrité du sarcolemme sont maintenus: la perte de lien entre syncoiline et filaments intermédiaires de desmine pourrait être en cause (Grady et al., 1999). Une réduction des NOS du sarcolemme est également observée chez ces souris et pourrait participer au phénotype.

Les trois isoformes de syntrophine (58 kDa) sont retrouvées à la JNM des muscles squelettiques, mais seules les isoformes $\alpha 1$ et $\beta 1$ sont présentes au niveau du sarcolemme extra-jonctionnel. Les deux possèdent des domaines PH (pleckstrin homology), qui sont des domaines d'environ 100 acides aminés retrouvés dans de nombreuses protéines de la signalisation. Dans chaque isoforme, le premier domaine PH est un domaine PDZ (PSD-95/Dlg1/ZO-1) facilitant la dimérisation avec d'autres protéines contenant des domaines PDZ. La partie C-terminale de l' α -syntrophine se lie à la dystrophine et aux protéines associées, libérant le domaine PDZ, capable de recruter d'autres protéines au complexe (Adams et al., 2001). Ainsi, les syntrophines pourraient servir au recrutement des protéines de signalisation du sarcolemme et du complexe DAPC. A ce jour, aucune pathologie humaine n'est associée à des mutations sur le gène de la syntrophine. Les souris invalidées pour la syntrophine $\alpha 1$ (la plus abondante dans le muscle) n'ont aucun phénotype évident, mais NOS est absent du sarcolemme et la membrane postsynaptique est anormale (Ehmsen et al., 2002).

La syncoiline a été identifiée via son interaction avec l' α -dystrobrevine du muscle (Newey et al., 2001). On trouve la syncoiline au niveau de tous les types musculaires, au niveau du sarcolemme, des stries Z et de la JNM. Elle interagit avec la desmine, et constituerait ainsi le lien entre le sarcolemme et le réseau de filaments intermédiaires. La surexpression de syncoiline constatée dans plusieurs dystrophies musculaires pourrait être un mécanisme de compensation permettant de limiter les dommages musculaires (Newey et al., 2001).

La production d'oxyde nitrique (NO) neuronale (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) est importante pour l'augmentation locale du flux sanguin, ce, pour s'adapter aux besoins métaboliques des muscles qui se contractent. La présence de nNOS au niveau du sarcolemme est modulée via des domaines PDZ interagissant avec la syntrophine $\alpha 1$ (fortement exprimée au niveau du sarcolemme et des JNM) (Kameya et al., 1999). Cette interaction est perdue dans plusieurs pathologies comme la DMD. Les patients atteints de DMD présentent des constrictions anormales des vaisseaux sanguins dues à l'absence de dystrophine qui empêche le recrutement de nNOS au niveau du sarcolemme, ce qui affecte

la production d'oxide nitrique. Chez les souris *mdx*, (modèle de souris KO pour la dystrophine), l'utrophine est fortement surexprimée en absence de dystrophine, restaurant la localisation des membres du complexe DAPC, cependant, l'utrophine ne permet pas de restaurer le recrutement de nNOS au niveau du sarcolemme, critère clé pour une synthèse normale de NO dans les muscles squelettiques (Ramachandran et al., 2013). Cependant, la perte d'expression de nNOS seule, chez les souris ne semble pas provoquer de dystrophie (Gonzalez et al., 2015).

Les cavéoles sont des invaginations vésiculaires de la membrane plasmique de nombreuses cellules. La cavéoline-3 est spécifiquement retrouvée au niveau des cavéoles du muscle jouant un rôle important dans les phénomènes d'endocytoses et de transduction des signaux. Il a été montré que la cavéoline-3, d'abord considérée comme distincte du DAPC, a un lien étroit avec ce complexe. La cavéoline 3 interagit directement avec la partie C-terminale du β -dystroglycan, et co-immunoprécipite avec la dystrophine et l' α -sarcoglycan (Ehmsen et al., 2002). Son interaction directe avec nNOS a également été démontrée

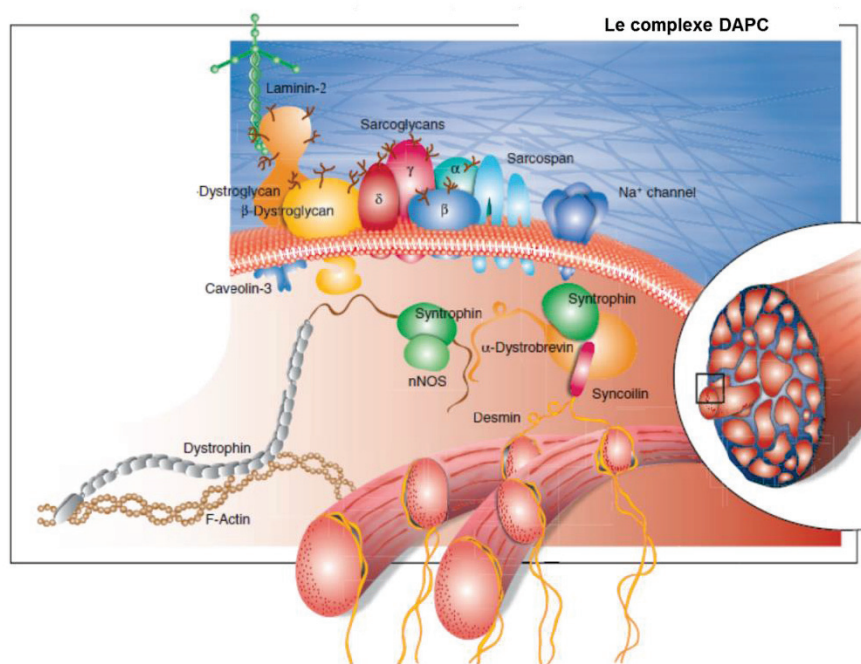


Figure 25: Le complexe des protéines associées à la dystrophine.

Modifié d'après Ehmsen et al., 2002.

(Herrmann et al., 2000). Il n'est donc pas surprenant que l'absence de cavéoline 3 puisse déstabiliser le complexe DAPC et ainsi entraîner des pathologies musculaires (Herrmann et al., 2000). Ainsi, la mutation Ala46Thr a été retrouvée à l'état hétérozygote dans le gène de la cavéoline-3 chez un patient atteint de dystrophie musculaire des ceintures LGMD 1C (Herrmann et al., 2000). Enfin, des canaux sodiques voltage-dépendant se lient aux domaines PDZ de la syntrophine, une interaction qui pourrait influencer les propriétés de

conduction des ions ou l'association à d'autres canaux. Cependant, même en absence de syntrophine, une distribution normale des canaux sodiques est observée le long du sarcolemme, cette interaction ne semble donc pas essentielle à la localisation des canaux (Adams et al., 2001; Ehmsen et al., 2002). De plus il n'existe à ce jour pas d'étude dans lesquels ces canaux auraient été spécifiquement éliminés de la JMT. Il n'est donc pour l'heure pas possible de conclure quant à leur importance dans le maintien du complexe DAPC.

- Le système d'ancrage dépendant de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$

Les intégrines sont des récepteurs membranaires ayant pour ligands majoritaires les protéines de la MEC. Les hétérodimères associent de façon non-covalente les sous unités α et β des intégrines. L'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ est exprimée au niveau de la JMT, son domaine intracellulaire repose sur un socle protéique qui la relie au cytosquelette de la fibre musculaire. La desmine est connectée à ce complexe et plus précisément à la plectine par l'intermédiaire d'un adaptateur : l' α -crystalline. L'actine-G peut soit interagir avec la vinculine via l' α -actinine soit se lier directement à la N-RAP (« nebulin-related actin-binding protein »). Celle-ci interagit avec l'actine en C-terminal et avec la taline en N-terminal via un domaine LIM (Figure 26).

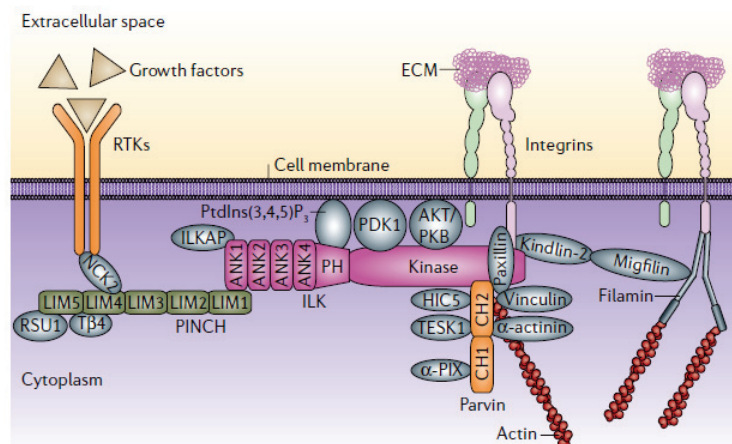


Figure 26: Régulateurs importants du signaling médié par les intégrines à la JMT. ILK (Integrin-linked kinase) est constituée de 3 domaines, des répétitions N-terminales ankyrine (ANK), un domaine d'homologie à la plekstrine (PH) et un domaine C-terminal kinase. ANK1 se lie aussi bien au domaine LIM1 de PINCH isoforms qu'à la phosphatase associée à ILK (ILKAP). Le domaine PH se lie probablement au phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃). Le domaine kinase d'ILK lie les parvines, paxilline, MIG2/kindline-2, les queues cytoplasmiques des intégrines β , le substrat kinase substrate AKT/PKB (protein kinase B) la kinase phosphatidylinositol-3-kinase-dependent kinase-1 (PDK1). Les isoformes PINCH, contiennent 5 domaines LIM et se lient aux récepteurs à tyrosine kinase (RTKs) via l'adaptateur NCK2. PINCH1 se lie au suppresseur-1Ras (RSU1) et à la thymosine- $\beta 4$ (T $\beta 4$). α - et β -parvines peuvent lier directement l'actine ou indirectement via la paxilline ou HIC5 (α -parvine seulement) ou l' α -actinine (β -parvine seulement). L' α -Parvine se lie aussi à TESK1 (Ser/Thr kinase testicular protein kinase-1), alors que la β -parvine se lie à α -PIX (guanine nucleotide-exchange factor), qui influence le remodelage de l'actine via les GTPases Rac et Cdc42. Des interactions avec les intégrines et le cytosquelette peuvent aussi avoir lieu via le complexe MIG2/kindline-2–migfiline–filamine. D'après Legate et al., 2006.

La vinculine interagit avec la N-RAP et est également capable de se lier à la taline. Liées indirectement, plectine et taline forment le socle protéique sur lequel l'intégrine $\alpha7\beta1$ se fixe. La partie extracellulaire de cette intégrine interagit avec le domaine C-terminal du bras long de la laminine. La fixation de la laminine 2 sur l'intégrine $\alpha7\beta1$ déclenche une cascade de phosphorylations impliquant les voies Akt/PKB. Il en résulte l'activation de ILK/PINCH (integrin linked kinase/particularly interesting Cys-His-rich protein), renforçant encore le lien structural par recrutement de protéines de la JMT en réponse à l'activation de la voie de signalisation initiée par ILK (Wang et al., 2008).

Après avoir vu comment s'organise la JMT, nous allons maintenant nous intéresser aux processus qui mènent à sa mise en place.

- Les interactions chimiques entre muscle et tendon: importance au cours du développement
 - La mise en place des progéniteurs musculaires et tendineux

Chez le poisson zèbre, tendons et ligaments se développent dans des sites anatomiques variés : le système craniofacial, les nageoires et le squelette axial. Leur induction et leur maintien sont similaires à ceux des autres espèces de vertébrés. Au cours du développement on note quelques différences entre les différents sites anatomiques, du fait d'origines embryonnaires distinctes. Néanmoins, tendons et ligaments de tout site anatomique ont pour origine commune des cellules progénitrices qui en se différenciant permettent également la formation du cartilage et des os, à l'exception du système musculo-squelettique axial.

Nous avons vu au cours de la partie 2.2 que les muscles squelettiques axiaux dérivent des somites (Figure 19), qui se différencient en dermomyotome (qui donnera le derme et les muscles) et sclérotome (qui donnera les vertèbres et les côtes). Comme vu précédemment dans la partie 2.2, chez les amniotes, le somite est principalement constitué de la partie médiane du sclérotome, et les vertèbres se développent de façon synchronisée avec la musculature associée. Les tendons axiaux proviennent du syndétome, un compartiment des somites qui se met en place sous l'induction de signaux FGF provenant du myotome vers le sclérotome adjacent pour induire la formation du tendon (Brent et al., 2003). La différenciation du sclérotome en syndétome (puis tendon) dépend du cartilage (Brent, 2005). Chez les téléostéens, il n'en est pas de même. Les somites dérivent de façon prédominante du myotome et d'une petite partie du sclérotome ventral. Les formations du cartilage axial et du myotome ne sont pas synchronisées – des myofibres différenciées sont présentes chez les embryons, alors que le cartilage se forme plus tardivement, au cours des stades larvaires

(Chen and Galloway, 2017). Les myomères (segments musculaires dérivés des somites) sont séparés le long de l'axe dorso-ventral par le myosepte horizontal et le long de l'axe antéro-postérieur par les myoseptes verticaux. Myoseptes horizontal et verticaux participent à la transmission de force au cours des mouvements d'ondulations. Ils sont considérés comme étant les homologues des tendons axiaux des vertébrés supérieurs du fait de leur architecture similaire et des profils d'expression géniques enrichis en protéines de la MEC. Cependant, des différences d'origine peuvent être notées. Des expressions précoces de molécules de la MEC retrouvées au niveau du myosepte horizontal à 24 hpf pourraient provenir des cellules pionnières du muscle, originaires du myotome (Chen and Galloway, 2017).

Les cascades signalétiques impliquées dans la mise en place des myoseptes chez les téléostéens restent peu documentées. Ainsi, il est postulé que les cellules exprimant *scxa* dans les myoseptes verticaux proviennent du sclérotome. L'induction de l'expression de *scxa* par les cellules progénitrices du tendon est dépendante du muscle chez le poisson zèbre. En effet, chez les embryons déficients en *myod1-myf5*, l'expression de *scxa* est normale entre 53 et 58 hpf dans les régions craniofaciales et au niveau des nageoires alors qu'elle est absente dans les myoseptes (Chen and Galloway, 2014). Ceci est cohérent avec le développement du squelette axial des amniotes puisque les signaux provenant du muscle sont nécessaires à la formation du syndétome mais ne sont pas requis pour les régions des membres et du crâne. Les myoseptes constituent ainsi un véritable modèle pour étudier la formation de la JMT comme premier site de transmission de forces des muscles squelettiques.

▪ La mise en place de la JMT

Comme expliqué précédemment, les signaux moléculaires régulant la myogenèse sont très étudiés, cependant, le développement, l'homéostasie ou encore la régénération musculaire nécessitent des interactions avec les tissus environnants et les aspects cellulaires et moléculaires de ce dialogue ne sont pas complètement élucidés. L'identification de facteurs de transcription caractérisant les différents types de tissus conjonctifs entourant les muscles permet d'étudier le rôle du tissu conjonctif dans la morphogenèse tissulaire depuis les premiers stades de différenciation des myoblastes jusqu'au stade tardif de maturation des muscles. Mais les interactions muscles-tissus conjonctifs sont également critiques lors de la régénération du muscle après une blessure ou au cours d'une maladie neuromusculaire.

Nassari et ses collaborateurs concluent dans leur revue à une communication bidirectionnelle entre le muscle et le tissu conjonctif (Nassari et al., 2017).

Il est aujourd'hui établi que le tendon requiert le muscle pour se développer correctement, et ce chez le poulet, la souris et le poisson zèbre (Gaut and Duprez, 2016). Cependant, l'influence du tendon sur le développement musculaire est moins évidente chez les vertébrés. Des expériences menées chez le poulet où l'on ôte un tendon embryonnaire, montrent que du tissu musculaire ectopique se développe, suggérant un rôle du tendon dans la délimitation de la zone de croissance du muscle et sa différenciation (Nassari et al., 2017).

Le modèle drosophile a permis d'étudier plus en détails cette interaction. Ainsi, si les cellules précurseurs de tendon de drosophile appelées apodeme et caractérisées par l'expression du facteur *Stripe* (Early growth response-like transcription factor), sont altérées au cours des premières étapes du développement de la patte, la localisation des myoblastes s'en trouve perturbée. L'établissement de la JMT nécessite elle aussi une migration correcte des cellules myogéniques en direction des cellules du tendon. Cette étape de migration se fait via des signaux de guidage délivrés par les cellules du tendon. *Stripe* régule ainsi positivement l'expression du gène *Slit*, codant pour une protéine sécrétrice qui a également été montrée comme étant impliquée dans le guidage au cours de la migration axonale. *Slit* est exprimée par les cellules du tendon alors que son récepteur *Robo* (Roundabout) est exprimé par le muscle. De façon intéressante, les mutants drosophiles *Slit* présentent des défauts musculaires (défaut de migration caudo/rostrale des myoblastes pionniers et défaut de formation des fibres musculaires), soulignant la nécessité des signaux provenant du tendon pour le développement correct du muscle (Nassari et al., 2017; Ordan and Volk, 2015). Les interactions tendons et muscles via *Slit/Robo* sont nécessaires pour l'arrêt de la migration des progéniteurs musculaires chez la drosophile.

La formation de la JMT chez la drosophile nécessite également la protéine transmembranaire KONTIKI, enrichie à l'extrémité des myotubes et nécessaire pour diriger leur migration et la reconnaissance entre les cellules du tendon et les cellules musculaires (Nassari et al., 2017). Chez la drosophile, les cellules du tendon sont donc requises pour la morphogénèse du muscle au travers de signaux spécifiques émanant du tendon et agissant sur les cellules myogéniques. Si ce type de signaux interviennent également au cours du développement du système musculosquelettique des vertébrés, ils restent encore à les identifier. Ainsi, bien qu'il ait été montré que l'orthologue vertébré de *Stripe*, *Egr1/2*, est impliqué dans la différenciation du tendon (Lejard et al., 2011; Nassari et al., 2017), il n'y a pas de défaut évident de formation du muscle en l'absence d'*Egr1*. Chez le poisson zèbre, *Tsp4b* (*thrombospondin-4*) semble nécessaire pour orchestrer l'assemblage de la MEC du

tendon nécessaire à l'attachement musculaire à la JMT (Subramanian and Schilling, 2014). L'inactivation de *Tsp4* chez la souris montre que TSP4 contrôle le dépôt de MEC à la fois dans le tendon et le muscle et est nécessaire à la bonne organisation des fibres de collagène du tendon (Nassari et al., 2017). Cependant, l'absence de *Tsp4* affecte aussi la structure des muscles squelettiques, en contrôlant l'expression des protéoglycanes à héparane-sulfate dans le muscle (Frolova et al., 2014). Finalement, les tendons semblent indispensables à la morphogenèse musculaire tardive des vertébrés. En effet, la translocation des myofibres différenciées pour former le muscle flexeur digitorum superficialis dans les membres antérieurs de souris (phénomène unique puisque les myofibres différenciées ne sont en principe plus capables de se déplacer) est très affectée chez les mutants *Scx*, ce qui indique que le tendon est impliqué dans le patterning et la position finale des muscles (Huang et al., 2013).

- L'implication du TC dans l'homéostasie musculaire chez l'adulte

Les capacités régénératrices des muscles squelettiques reposent sur la présence de cellules souches musculaires appelées cellules satellites (CS) qui prolifèrent en réponse à l'exercice pour faciliter la croissance musculaire et le remodelage, ou à la suite de traumatismes musculaires pour réparer le muscle endommagé. Les CS sont des cellules progénitrices PAX3/7 positives localisées sous la lame basale qui se forme autour des fibres musculaires, chez les mammifères après la naissance. Les CS restent quiescentes jusqu'à ce que le muscle soit endommagé, lorsque se produit une rupture de la lame basale et que des CS activées entrent en prolifération avant de former de nouvelles fibres musculaires (Nassari et al., 2017). *Myf 5* est détecté dans la majorité des CS quiescentes et l'activation des CS s'accompagne de l'expression de *Myod1*. De fort taux de *Myf5* conduisent à une down-régulation de *Pax7*, une activation de la myogénine et la formation de nouvelles fibres musculaires. En l'absence de cellules positives pour *Pax7* (souris *Pax7^{-/-}*), la régénération du muscle échoue et à la place, une infiltration fibreuse et adipeuse est observée.

Cependant, après un dommage musculaire, des cellules non-myogéniques peuvent aussi participer à la régénération, soit en dérivant en cellules souches myogéniques soit en activant les CS du muscle. Ainsi, des cellules musculaires interstitielles au potentiel myogénique ont été identifiées. Elles sont caractérisées par l'expression du gène *PW1/Peg3* et sont appelées PICs pour PW1-positive interstitial cells. Le groupe de Rossi a également identifié une population cellulaire au potentiel fibroblastique ou adipogénique mais non myogénique appelées Fibro/Adipogenic progenitors (FAPs) (Nassari et al., 2017). Il est ainsi proposé qu'une balance entre myogenèse dépendante des CS et adipogenèse/fibrogenèse

dépendant des FAPs régule l'homéostasie et la régénération musculaires. Après un dommage musculaire, les progéniteurs mésenchymateux FAPs prolifèrent avant les CS et envahissent l'espace entre les fibres musculaires en train de régénérer, où elles génèrent des facteurs promouvant la myogenèse. Lorsque la régénération est efficace, les progéniteurs FAPs sont écartés du tissu via des signaux apoptotiques provenant des CS. Si la régénération musculaire échoue, les FAPs persistent conduisant à une dégénérescence fibreuse (fibroblastes) ou graisseuse (adipocytes) selon l'environnement.

Les composants de la MEC contribuent aussi directement au potentiel régénératif du muscle. En effet, il a été montré que la fibrose, riche en fibronectine, est une étape initiale essentielle à la régénération pour activer la prolifération des CS (Bentzinger et al., 2013). Les progéniteurs des TC, FAPs et PICs pourraient être autant de sources potentielles de fibronectine et ainsi contribuer à la fibrose au cours de la régénération musculaire. Il est également important de noter que les CS activées, peuvent elles-mêmes libérer de la fibronectine dans leur microenvironnement et ainsi s'auto-réguler (Bentzinger et al., 2013).

Les TCs sont également importants lors de pathologies musculaires. Ainsi des mutations des gènes *COL6A1*, *COL6A2* et *COL6A3* ont été identifiées chez des patients atteints de la dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich et de la myopathie de Bethlem. Les souris mutantes pour *Col6a1* présentent des altérations du réticulum sarcoplasmique musculaire et des mitochondries (Pan et al., 2014) et les souris mutantes pour *Col6a3* présentent un phénotype du TC associé à un phénotype myopathique similaire à celui observé chez les souris KO pour *Col6a1* (Pan et al., 2013).

Les mutations du collagène VI entraînent donc à la fois des défauts musculaires et du TC. De plus, les souris *Col6a1* présentent aussi un délai de régénérescence musculaire et une réduction de l'auto-renouvellement des CS. La transplantation de fibroblastes sauvages dans les muscles de souris mutantes *Col6a1* sauve les CS. Le collagène VI est donc capable de réguler le comportement des CS dans le muscle (Urciuolo et al., 2013).

Enfin, au cours de l'hypertrophie musculaire, les CS peuvent réguler l'expression des collagènes par les cellules fibrogéniques via la sécrétion d'exosomes, ce qui démontre que des cellules progénitrices du muscle peuvent interagir avec leur microenvironnement pour moduler la plasticité tissulaire (Fry et al., 2017). De même, Abou-Khalil et ses collaborateurs ont montré en 2015 que les CS Pax7 positives sont impliquées dans la réparation osseuse (Abou-Khalil et al., 2015).

Une communication bidirectionnelle entre le muscle et le TC est donc cruciale pour un assemblage correct du système musculo-squelettique au cours de son développement aussi bien que pour son maintien chez l'adulte. Des changements de l'environnement local des TCs pourraient donc contribuer aux pathologies musculaires ou encore à la perte de compétence des cellules souches musculaires liée à l'âge en impliquant des cascades signalétiques et des gènes similaires à ceux décrits pour médier la morphogenèse musculaire dépendante des TCs au cours du développement.

2.4 Pathologies du système musculo-tendineux

Les maladies neuromusculaires affectent le fonctionnement du muscle et donc la motricité, soit directement en raison d'une atteinte des fibres musculaires elles-mêmes, soit indirectement par l'intermédiaire des autres constituants de l'unité motrice: la jonction neuromusculaire, les fibres nerveuses du système nerveux périphérique ou les motoneurons de la moelle épinière. Extrêmement nombreuses, ces maladies sont classées en différentes catégories. Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux pathologies musculaires héréditaires sans atteinte du système nerveux central, en distinguant les myopathies des dystrophies musculaires. Les myopathies sont des maladies se traduisant par une dégénérescence et une nécrose du tissu musculaire, pouvant être congénitales, héréditaires ou acquises alors que les dystrophies musculaires sont des formes particulières de myopathies où l'on observe la présence de cellules jeunes, témoin de régénération. Ce processus de dégénérescence/régénération tend à contrebalancer (au moins au début) la perte cellulaire caractéristique des différentes myopathies musculaires. Parmi ces myopathies et dystrophies, nous nous intéresserons particulièrement aux pathologies impliquant un acteur de la JMT et ayant une répercussion majeure sur le système musculo-squelettique.

- Les dystrophies musculaires congénitales (DMCs)

Caractérisées par une atteinte musculaire entraînant une faiblesse musculaire dès la naissance ou apparaissant dans les premiers mois de la vie, les DMCs sont classées en trois grandes catégories. Les DMCs sont toutes d'origine génétique et aujourd'hui 29 gènes responsables sont identifiés.

(1) Les DMCs liées à des anomalies de la matrice extracellulaire telles que la DMC avec déficit primaire en mérosine ou DMC 1A et la DMC d'Ullrich (UCMD), qui sont les plus fréquentes. La DMC 1A encore appelée dystrophie de ceinture est caractérisée par un déficit en chaîne $\alpha 2$ des laminines, composant de la lame basale des fibres musculaires, et provoque une faiblesse des muscles de ceinture (abdomen) et une importante hypotonie

axiale (Quijano-Roy et al., 2008). La DMC d'Ullrich est une collagénopathie avec déficit en collagène VI. Différentes mutations affectant les gènes codant les trois chaînes majoritaires $\alpha 1$, $\alpha 2$ ou $\alpha 3$ du collagène VI chez l'Homme entraînent un déficit partiel ou total en collagène VI provoquant une pathologie plus ou moins sévère. D'ailleurs, la distinction entre Myopathie de Bethlem (évoquée ci-après) et DMC d'Ullrich ne semble aujourd'hui pas si évidente et l'on parle ainsi plutôt de myopathies liées au collagène VI, ce qui englobe un spectre de pathologies allant de formes sévères de dystrophie musculaires d'Ullrich à des myopathies de Bethlem qui sont modérées (Bönnemann, 2011). Même si certains symptômes prénataux (réduction de mouvements du fœtus) peuvent laisser suspecter une DMC d'Ullrich, les symptômes sont surtout évidents à la naissance avec une hypotonie et des rétractions et des déformations articulaires souvent marquées qui contrastent avec l'hyper extensibilité des membres distaux. Pour les cas les plus sévères, des difficultés pour se nourrir peuvent apparaître dans la petite enfance nécessitant la pose d'une sonde gastrique temporaire et les malades ne parviennent jamais à marcher. Dans la majorité des formes typiques de DMC d'Ullrich, il y a acquisition de la marche, bien que tardive (2 ans et plus). Cependant ces enfants peuvent perdre cette faculté au fil du temps. La maladie progresse lentement et des difficultés respiratoires apparaissent pouvant causer la mort des patients en fin d'adolescence. Une meilleure prise en charge des patients et des progrès dans les interventions respiratoires permettent aujourd'hui aux malades atteints d'une DMC d'Ullrich d'atteindre l'âge adulte.

(2) Les DMCs liés à des anomalies de l' α -dystroglycan ou alphasdystroglycanopathies sont classées à part. Le syndrome de Walker-Warburg (SWW), qui est le plus sévère. SWW est une forme rare de dystrophie musculaire congénitale associée à des anomalies cérébrales et oculaires. Le SWW se manifeste à la naissance par une hypotonie sévère généralisée, une faiblesse musculaire, un développement psychomoteur absent ou très pauvre, une atteinte oculaire et des convulsions. Le syndrome est dû à une O-glycosylation anormale de l' α -dystroglycane. Plusieurs gènes ont été impliqués dans l'étiologie du SWW et d'autres restent à découvrir. La plupart des mutations ont été identifiées dans les gènes codant les protéines O-Mannosyltransférases 1 et 2 (POMT1 et POMT2). Des mutations dans d'autres gènes de la glycosylation de l' α -dystroglycan ont été trouvées dans des cas de SWW (*FKTN*, *LARGE*, *FKRP* et *POMGNT1*) (Vajsar and Schachter, 2006). Une mutation du gène COL4A1 sans rapport direct avec les modifications post-traductionnelles de l' α -dystroglycan a aussi été identifiée chez des patients atteints de SWW.

(3) Les autres formes de DMC constituent un groupe hétérogène dont la DMC avec déficit en sélénoprotéine N ou syndrome de la colonne raide est la plus fréquente. La DMC avec déficit en sélénoprotéine N est une maladie génétique qui se transmet selon un mode autosomique

récessif. Elle est due à une anomalie du gène *SEPN1*. Le muscle est le siège d'une dégénérescence qui se manifeste par une hypotonie associée à une atrophie musculaire. L'atteinte musculaire prédomine nettement au niveau des muscles du tronc par rapport aux muscles des membres. De ce fait, la capacité de marcher de façon autonome est conservée très longtemps à la différence d'autres formes de DMC. Aucune atteinte cardiaque ou cérébrale n'a été observée chez les patients. Il est encore difficile de connaître avec certitude l'évolution de cette pathologie mais une prise en charge précoce et rigoureuse notamment au niveau respiratoire et orthopédique permet de maintenir une espérance de vie des patients proche de la normale. On trouve également dans ce groupe la myopathie de Duchenne ou dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) qui est une maladie myo-dégénérative récessive affectant tous les types de cellules musculaires (lisses, cardiaques et squelettiques). Elle n'affecte que les garçons (incidence : 1/3300) car elle résulte d'une mutation sur le gène de la dystrophine localisé sur le chromosome X. Les femmes porteuses de la mutation ne présentent aucune gêne, sauf exception, mais peuvent bien entendu transmettre l'anomalie à leur descendance. La DMD se manifeste rarement avant l'âge de trois ans même s'il existe parfois un retard dans l'acquisition de la marche. Les chutes deviennent ensuite de plus en plus fréquentes avec des difficultés pour se relever. La maladie se caractérise ensuite par une faiblesse musculaire progressive des membres et du tronc avec développement de scoliose, puis, plus tardivement des difficultés respiratoires, urinaires, digestives et des atteintes du muscle cardiaque nécessitant un suivi médical précoce et régulier. L'espérance de vie des patients atteints de DMD est malheureusement le plus souvent d'une vingtaine d'années. A l'échelle tissulaire la DMD se caractérise par une dégénérescence des fibres musculaires et une nécrose du tissu musculaire. Lors des premières années de vie, la nécrose est compensée par un processus de régénération. Mais après 2-3 ans, cette capacité de régénération diminue et devient insuffisante pour réparer efficacement le muscle. L'espace laissé « libre » par le tissu musculaire lésé est alors envahi par du tissu conjonctif (fibrose) ou du tissu adipeux, le muscle perd alors en volume et devient moins puissant (atrophie musculaire) ce qui conduit à une perte de la capacité contractile et un raccourcissement du muscle. A l'échelle moléculaire, la DMD est causée par des mutations dans le gène codant la dystrophine. La dystrophine est une protéine subsarcoplasmique de très haut poids moléculaire (427 kDa) qui relie le cytosquelette d'actine à la MEC. Une déficience en dystrophine déstabilise le complexe DAPC, augmentant ainsi la fragilité du sarcolemme. Les mutations de la dystrophine qui causent la DMD sont pour 65% des délétions, pour 30% d'autres types de mutations et pour 5 % des duplications (Guyon et al., 2009). Certaines mutations qui conservent le cadre de lecture peuvent donner lieu à une protéine modifiée conduisant à un phénotype moins sévère qui correspond à la dystrophie musculaire de Becker (DMB). Chez les mammifères, les mécanismes intracellulaires

conduisant à la dégénérescence du muscle sont peu documentés. Il est cependant communément accepté qu'en absence de dystrophine, le sarcolemme fragilisé laisse pénétrer les ions Ca^{2+} , qui sont retrouvés en excès dans la cellule. Cette augmentation de la concentration en calcium intracellulaire altère le fonctionnement des mitochondries qui libèrent alors des facteurs apoptotiques conduisant à la mort cellulaire (Giacomotto et al., 2013).

La DMC avec déficience en intégrine $\alpha 7$ (Lisi and Cohn, 2007), bien que parfois évoquée comme une myopathie modérée est une forme de DMC caractérisée par une hypotonie néonatale, une faiblesse et une atrophie des muscles proximaux, un retard de développement moteur, des atteintes cognitives, une scoliose et une dyspnée due à une faiblesse musculaire respiratoire. Cette pathologie très rare présente une progression fatale (Angelini, 2014).

- La myopathie de Bethlem (MB)

Comme nous l'avons vu précédemment, le diagnostic des patients atteints de myopathies liées au collagène VI présentant des formes intermédiaires de sévérité peut être difficile. Les phénotypes des malades de la MB sont extrêmement variables. Les malades présentent des contractures typiques des tendons d'Achille et des coudes au cours de la première décennie de leur vie et pendant l'adolescence. Ces contractures progressent pour impliquer les muscles fléchisseurs des doigts et des épaules. Même chez des patients dont la faiblesse musculaire progresse seulement très lentement, la progression des contractures peut être la cause d'invalidité sérieuse. Finalement, la combinaison de faiblesse et de contractures peut rendre la marche difficile et ils sont souvent appareillés. Les patients rapportent un déclin considérable dans la force de leurs muscles dans leur 4ème et 5ème décennies de vie.

- Les arthrogryposes

Le terme arthrogrypose vient du grec et signifie « articulations en crochet ». Cette pathologie regroupe différentes maladies ayant en commun des raideurs articulaires isolées ou associées à d'autres symptômes viscéraux, nerveux ou intellectuels (Taussig, 2002). Les arthrogryposes entrent dans le vaste cadre de ce qu'il est convenu d'appeler les syndromes d'immobilité fœtale qui regroupent une multitude d'anomalies neurologiques et musculaires. Les raideurs articulaires présentes chez le fœtus persistent après la naissance induisant une plus ou moins grande limitation des mouvements de rotation et/ou de flexion. L'origine peut être génétique ou acquise (virus, médicaments...). Toutes les articulations peuvent être

touchées ou seulement certaines : déformation du pied en varus équin (pied bot), pouce replié dans la paume et doigts fléchis au niveau de l'articulation inter-phalangienne proximale...La prévalence est comprise entre 1/3000 et 1/5000 (Hall, 2014). On distingue l'arthrogrypose multiple congénitale (AMC) ou classique d'une part et tous les syndromes arthrogryposiques d'autres parts comme les arthrogryposes distales (AD). L'AMC est la forme la plus fréquemment rencontrée et touche les quatre membres, uniquement les membres inférieurs, ou seulement les membres supérieurs. Ces raideurs articulaires sont responsables de déformation des articulations et s'accompagnent de paralysies, d'intensité variable, des muscles entourant ces articulations. La masse musculaire des membres est diminuée voire absente et remplacée par du tissu adipeux. L'AD est une atteinte des mains et des pieds uniquement. Le pronostic fonctionnel est bien meilleur que celui de la forme classique.

Aujourd'hui, des mutations retrouvées sur plus de 15 gènes ont été répertoriés pour expliquer des cas d'arthrogryposes. Ces gènes codent pour des protéines retrouvées dans différents compartiments : protéines de l'appareil contractile (MYH3, MYH8, MYBPC1, TPM2, TNNT3, TNNI2), protéines transmembranaires (de type canal ionique: PIEZO2, TARP, ou de type récepteur: FGFR3), protéines de la MEC (Fibrilline 2) (Hall, 2014). Par exemple, une mutation dominante retrouvée dans une isoforme de la troponine T (TNNT3) ou I (TNNI2) a été identifiée chez des patients atteints d'arthrogrypose distale de type 2B. La troponine fait partie d'un complexe régulant la contraction des muscles striés par régulation des interactions actine et myosine du sarcomère, sous la dépendance de Ca^{2+} (Ferrante et al., 2011).

Les causes moléculaires des arthrogryposes pourraient également impliquer des gènes codant des protéines de la JMT. Notre équipe de recherche a d'ailleurs été sollicitée pour étudier un lien possible entre une mutation du collagène XXII et des cas non expliqués d'arthrogryposes.

La sévérité de ces pathologies témoigne à elle seule du rôle prépondérant de la JMT dans le maintien de l'intégrité musculaire.

3. Le poisson zèbre: un bon modèle pour étudier les pathologies du muscle

Le cycle de vie du poisson zèbre est présenté en Annexe 6

3.1 Origine

Le poisson *Danio rerio* de la famille des cyprinidés, appelé communément poisson zèbre, peut également se voir attribuer d'autres noms vernaculaires tels que poisson pyjama ou bagnard. C'est un poisson téléostéen et à ce titre c'est un poisson osseux à nageoires rayonnées par la présence de fins éléments osseux segmentés appelées « bony rays ». Dans la famille Cyprinidés, on distingue 371 genres et 3027 espèces. Au sein du genre *Danio* on dénombre 20 espèces différentes. Les poissons zèbres sont des animaux à croissance continue (avec un plateau de croissance) tout au long de leur vie. Ce sont des organismes aérobies et poïkilothermes (leur température corporelle varie avec celle de leur milieu). Le poisson zèbre est originaire du Pakistan, de l'Inde, du Bangladesh, du Népal et de la Birmanie (Figure 27).

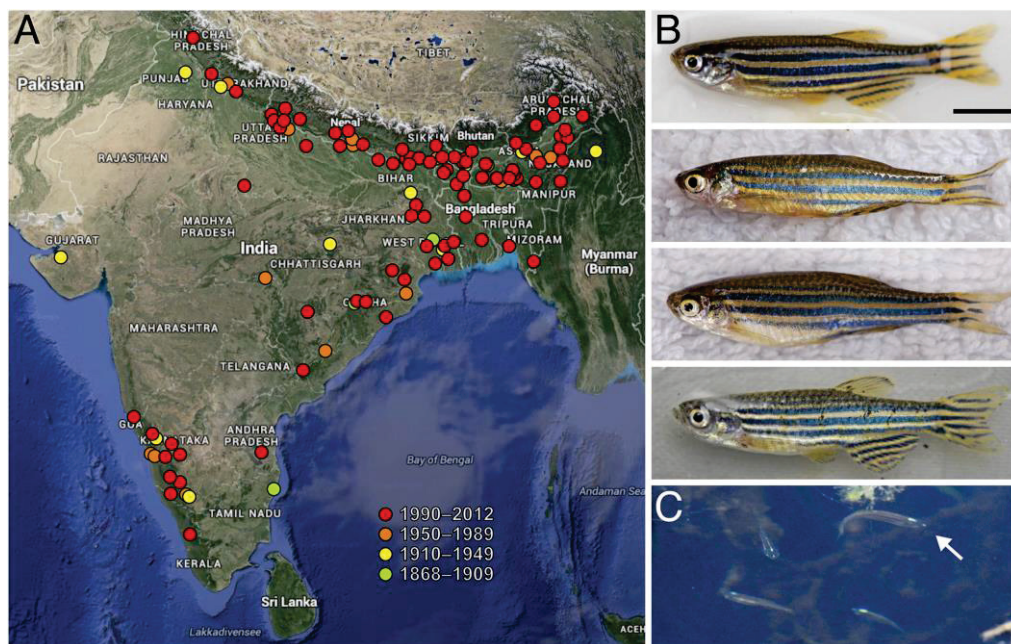


Figure 27: Le poisson zèbre sauvage à travers le monde. (A) Sites historiques et plus récents où l'on peut trouver *Danio rerio*: Inde, Népal, Bangladesh et probablement le Myanmar. (B) Poisson zèbres de plusieurs populations en Inde du Nord-Est. Les 2 poissons du haut sont des mâles et les 2 poissons du bas des femelles; les mâles ont tendance à avoir un cou et un ventre jaune-orangé. (C) Un groupe de poisson zèbre (un seul poisson est désigné par une flèche) a été identifié dans un état du Nord-Est de l'Inde à haute altitude (Meghalaya, 1320 mètres), au nord du Bangladesh. Barre d'échelle: 5 mm. Extrait de Parichy et al., 2015.

Le poisson zèbre, qui a une bouche terminale orientée vers le haut (Figure 27 B), est donc un poisson d'eau douce que l'on peut retrouver naturellement en pleine eau et proches surfaces, dans des eaux de températures oscillant entre 18 et 38°C. On observe toutefois que la fourchette de température optimale pour l'espèce est de 24 à 29°C. De par son origine, le poisson zèbre est très peu soumis à des variations de lumière entre 2 saisons, ce qui a été traduit en laboratoire par l'application d'une photopériode de 10-14 H (10 heures de nuit et 14 heures de jour). En milieu naturel, il se reproduit préférentiellement à la saison des moussons caractérisée par une température élevée, pas de circulation d'eau et une petite hauteur d'eau plutôt chaude et riche en phytoplancton.

Elevé depuis plus d'un siècle, le poisson zèbre utilisé en laboratoire de recherche ne vient plus du milieu naturel (Table 1).

Table 1. Recognised wild-type zebrafish lines listed by the Zebrafish International Resource Center

Name	Description
AB	Derived from two lines purchased by George Streisinger from a pet shop in Albany, Oregon, USA in the late 1970s. The currently used line *AB was derived from the original AB line in 1991–1992 by parthenogenesis
AB/Tübingen	An 'official' line maintained as a cross but the term is also applied to crosses where the two parental lines are maintained separately
C32	Derived from laboratory strains at Oregon. The current C32bc9 stock is a derivative of Steve Johnson's inbred C32
Cologne	Isolated at the Reugels/Campos-Ortega Laboratory, University of Cologne, Germany
Darjeeling	Collected in Darjeeling in 1987 and sent to Monte Westerfield at Oregon. A much faster swimmer than other wild-type strains. Used extensively for mapping as it contains many polymorphic markers
Ekkwill (EKW)	From Ekkwill breeders in Florida and maintained in Grunwald laboratory, University of Utah, USA
Hong Kong	Stock obtained from a Hong Kong fish dealer
HK/AB	Hybrid of Hong Kong and AB wild-type lines
HK/Sing	Hybrid of Hong Kong and Singapore wild-type lines
India	Stock obtained from expedition to Darjeeling, India (wild isolate)
Indonesia	Stock obtained from Indonesian fish dealer
Nadia	Wild-caught about 40 miles east of Calcutta, India. The fish were collected from stagnant ponds and flood plains. Imported in 1999 by a wholesaler in Oregon. Established in the Oregon laboratory from an initial breeding of about ten individuals
Singapore	Stock obtained from Singapore fish dealer
SJA	sjA is an inbred line of *AB isolated at the Stephen L. Johnson Laboratory, Washington University Medical School, USA. Unlike *AB, which is bred to retain polymorphisms, this subline is bred to reduce polymorphism and is at least 85% monomorphic.
SJD	Isolated at the Stephen L. Johnson Laboratory
Tübingen (TU)	Wild-type short fins. Strain used by Sanger for the zebrafish sequencing project. It was cleaned up to remove embryonic lethal mutations from the background before being used for mutagenesis and sequencing
Tübingen long fin (TL)	Homozygous for <i>leo</i> ^l , a recessive mutation causing spotting in adult fish, and <i>lof</i> ^{dl2} a dominant homozygous viable mutation causing long fins. This is not the line used in the Sanger zebrafish sequencing project. It is genetically different from TU because it was bred differently and not "cleaned up," and therefore retains a lot of polymorphisms
WIK	Derived from wild catch in India and used for genome mapping

Table 1: Liste de lignées de poissons zèbres sauvages reconnues par le ZIRC (« Zebrafish International Resource Center »). Extrait de Spence et al., 2008.

Le modèle poisson zèbre est introduit en laboratoire à la fin des années 1960 par George Streisinger (Université de l'Oregon, Eugene, Etats-Unis) comme modèle d'embryologie et de génétique. Les premières lignées sont issues d'un magasin aquariophile proche de l'université. Il développe en particulier des méthodes de mutagenèse et commence la caractérisation génétique de l'espèce. Il publie ses recherches dans les années 1970 et 80

(Streisinger et al., 1981 ; Walker et Streisinger, 1983). Cependant, il est intéressant de noter qu'aujourd'hui plusieurs lignées sont utilisées dans les différents laboratoires de recherche (principalement AB/Tübingen et TL), paramètre à prendre en considération dans l'analyse des données.

3.2 Intérêts du modèle

Le poisson zèbre, très prisé des aquariophiles débutants pour sa facilité d'élevage, présente de nombreux avantages pour son utilisation en tant que modèle vertébré de laboratoire. Sa taille relativement petite (4 cm environ à l'âge adulte) permet le maintien et la reproduction de milliers de poissons dans une animalerie de taille relativement restreinte. Elevé en laboratoire dans une eau de 28°C aux paramètres physico-chimiques contrôlés, l'embryon de poisson zèbre se développe très rapidement (48h). Le poisson zèbre présente un cycle de vie relativement court puisqu'il atteint la maturité sexuelle en 3-4 mois. Les œufs (0.7 mm) sont pondus librement dans le milieu et la fécondation est externe, ce qui rend aisée l'obtention d'embryons. De plus, le taux de fertilité des femelles est très élevé (300 œufs en moyenne mais de 50 à 1000 œufs pondus par femelle par semaine) durant toute l'année, ce qui représente un avantage statistique considérable pour des études biologiques. Ces nombreux avantages naturels couplés au développement d'outils de génétique et d'imagerie (transparence des embryons) ont fait du poisson zèbre, en quelques décennies, un excellent modèle de développement, de génétique et d'imagerie, de plus en plus utilisé (Figure 28), tout particulièrement dans l'étude des pathologies humaines.

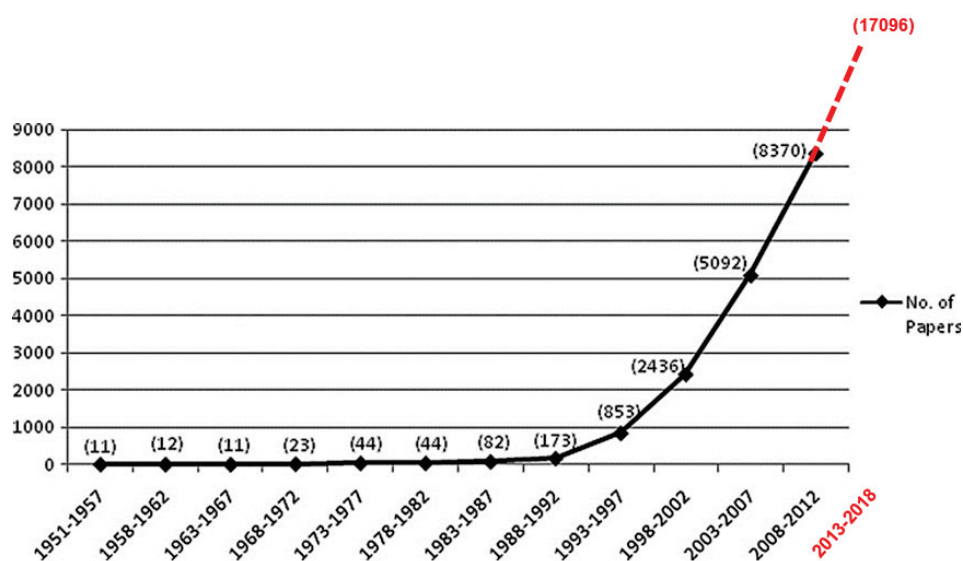


Figure 28: Evolution du nombre de publication utilisant le modèle poisson zèbre de 1951 à nos jours. Modifié d'après Kinth et al., 2013.

3.3 Les grandes étapes du développement

Trente minutes seulement après la fécondation, commence la période de clivage au cours de laquelle on passe d'un embryon d'une cellule, télolécithe (caractérisé par un volume considérable de vitellus localisé à l'un des pôles) à un embryon de mille cellules au stade sphère. S'en suivent les stades d'épibolie et de gastrulation au cours desquels sont mis en place les différents feuilletts embryonnaires. Entre 10 et 11 heures post fécondation (hpf), commence la somitogenèse, en parallèle de laquelle s'effectue l'organogenèse à partir de

14 hpf. A 24 hpf, le plan général de l'embryon est établi et les organes majeurs sont visibles. C'est alors que commence la pigmentation. Vers 3 jours, l'embryon éclot. La jeune larve commence alors à nager librement et croît progressivement jusqu'à atteindre l'âge adulte (Annexe 1). Le développement des gonades de poisson diffère selon l'espèce. Ainsi, les poissons protogynes tels que le poisson zèbre se développent d'abord comme femelles et peuvent ensuite devenir des mâles (Takahashi et al., 1977). Les gonades du poisson zèbre se développent et arrivent à maturité dans les 3-4 premiers mois de vie du poisson. Des études histologiques réalisées chez le poisson zèbre révèlent que cinq semaines après la fécondation, tous les poissons présentent des gonades de type « ovaires ». Sept semaines après la fécondation, pour la première fois, une partie des poissons présentent des gonades de type testiculaire. La période de temps séparant les stades protogyne et bisexuel différencié peut varier selon la souche et les conditions d'élevage des poissons (Uchida et al., 2002; Takahashi et al., 1977). Des facteurs tels que la densité de poisson, leur nourriture ou encore la température de l'eau peuvent également influencer le ratio male/femelle.

3.4 Des premières contractions à la nage

Trois types de comportement locomoteurs se succèdent au cours du développement. On distingue ainsi des contractions spontanées, puis des contractions en réponse à une stimulation tactile et enfin des mouvements de nage (Figure 29) (McKeown et al., 2009). De 17 à 21 hpf, les embryons présentent des contractions spontanées dont la fréquence atteint un pic à 19 hpf. A partir de 21hpf, la stimulation tactile des embryons entraîne des mouvements d'enroulement de la queue, appelés « tail coiling », dont la fréquence atteint un pic à 26 hpf. A partir de 27 hpf, les embryons adoptent un comportement de nage, en réponse à un stimulus, qui deviendra spontané par la suite.

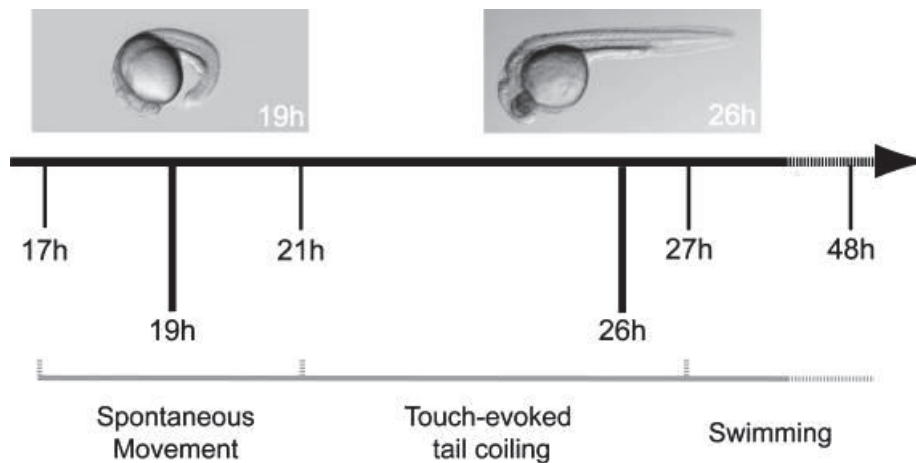


Figure 29: Comportements locomoteurs au cours du développement du poisson zèbre. Extrait de McKeown et al., 2009.

- Contractions spontanées

Les premiers mouvements de l'embryon qui commencent précisément à 17 hpf correspondent à des contractions spontanées du tronc que l'on appelle des mouvements de « coiling ». Ce sont des contractions relativement lentes des somites antérieurs qui amènent l'extrémité de la queue à toucher la tête de l'embryon et qui ont lieu en alternance droite-gauche à la façon d'un métronome. La fréquence de ces mouvements atteint un pic à 19 hpf puis diminue progressivement pour atteindre une fréquence quasiment nulle vers 27 hpf. La régularité de ces mouvements change également au cours du développement: un embryon de 18 à 23 hpf contracte continuellement alors que les embryons plus âgés (24 hpf) présentent des périodes de 3 à 5 contractions suivies de périodes d'inactivité qui peuvent durer jusqu'à 20 secondes. Ces contractions spontanées qui se propagent de manière rostro-caudale ne sont pas des contractions autonomes du muscle mais dépendent de l'activité des motoneurones primaires et d'un certain nombre d'interneurones présents dans la moelle épinière. Les travaux de Melançon et collaborateurs en 1997 indiquent qu'au moment du pic de 19 hpf, ces contractions spontanées sont dues à des contractions des fibres pionnières qui sont les premières fibres à être contactées par l'axone du motoneurone primaire caudal (CaP), le premier à sortir de la moelle épinière pour naviguer jusqu'à sa cible musculaire (Melançon et al., 1997).

- Contractions en réponse à un stimulus tactile

Dès 21 hpf, l'embryon commence à répondre à des stimulations tactiles réalisées au niveau de la tête ou de la queue par des contractions contre-latérales (*i.e.* vers la gauche si l'embryon est touché par la droite et inversement). Ce type de mouvement survient quand

les motoneurones primaires sont activés à la fois par des neurones du cerveau postérieur et par des neurones de la moelle épinière tels que les neurones sensoriels Rohon-Beard (RB) (Brustein et al., 2003). Par ailleurs, il a été montré que ce sont des contractions des fibres musculaires lentes qui sont à l'origine de ces mouvements rapides de torsion (« coiling »).

- Nage

A partir de 27 hpf, la stimulation tactile d'un embryon au niveau de la queue entraîne des mouvements de torsion partiels qui sont suivis d'un bref mouvement de nage en avant de l'embryon sur une distance équivalent environ à une fois la longueur du corps (Brustein et al., 2003). Ce mouvement de nage initialement lent correspond à une séquence de contractions alternées de faible amplitude du tronc et de la queue dont la fréquence augmente de manière linéaire au cours du développement. Ce comportement requiert alors une intégration de neurones du cerveau postérieur, d'inter-neurones spinaux et des motoneurones secondaires (Brustein et al., 2003). A 48 hpf, un stimulus tactile engendre un mouvement de nage en avant, brusque et rapide, d'une fréquence plus élevée qui dure plusieurs secondes et que l'on appelle le « burst swimming ». Bien que les embryons soient plutôt inactifs à ce stade, des épisodes de « burst swimming » peuvent également survenir spontanément de manière occasionnelle. Il a été montré que ce sont des contractions des fibres musculaires rapides qui sont responsables de ce type de nage. A l'heure actuelle, l'analyse du « burst swimming » en réponse à une stimulation tactile est de plus en plus utilisée pour évaluer les conséquences physiologiques de défauts musculaires ou d'innervation motrice sur des embryons de 2 à 3 jpf. Ces analyses se basent généralement sur des tests simples qui mesurent par exemple le temps moyen que met un embryon à parcourir une distance fixée par l'expérimentateur (Goody et al., 2012) ou la trajectoire, la distance parcourue et la vitesse des embryons par suivi manuel ou automatique (méthode de « tracking »). La nage se complexifie par la suite et la larve adopte un large répertoire de comportements locomoteurs qu'elle alterne afin d'évoluer dans son environnement, comportements que j'ai choisi d'aborder dans le chapitre 3.10.

3.5 Le poisson adulte

Les analyses expérimentales d'embryons et de larves de poisson zèbre sont nombreuses et leurs morphologies et développements sont aujourd'hui très bien documentées. A l'inverse, la description de l'anatomie des poissons zèbres adultes et l'étude du développement des

structures et organes ainsi que les techniques permettant de réaliser des expériences chez l'adulte sont bien moins documentés. Ceci devient indispensable pour l'analyse de nombreuses lignées de poisson zèbre modèles pour étudier des pathologies humaines telles que les cancers (mutant p53 par exemple, Mione and Trede, 2010), les maladies cardiaques, la maladie d'Alzheimer (mutant préséniline1 permettant l'étude du système histaminergique du cerveau, essentiel aux fonctions cognitives affectées chez les patients, Sundvik et al., 2013 and Newman et al., 2014) ou encore les dystrophies musculaires. Le poisson zèbre adulte est également de plus en plus utilisé pour des tests de toxicité (ces tests sont également fréquents sur des embryons et larves de poisson zèbre). Or, pour pouvoir explorer tout le potentiel de ce modèle, il paraît essentiel de comprendre la physiologie, l'anatomie et l'histologie du poisson zèbre « normal » adulte (Menke et al., 2011). Les organes de larve subissent des modifications significatives tant au niveau de leur structure globale, de leur morphologie et de leur localisation anatomique au cours de la transition larve-adulte. Extérieurement, la larve jusqu'alors transparente présente des rayures pigmentées et des nageoires pelviennes, alors qu'intérieurement, les organes suivent une croissance massive et se remodelent (Figure 30).

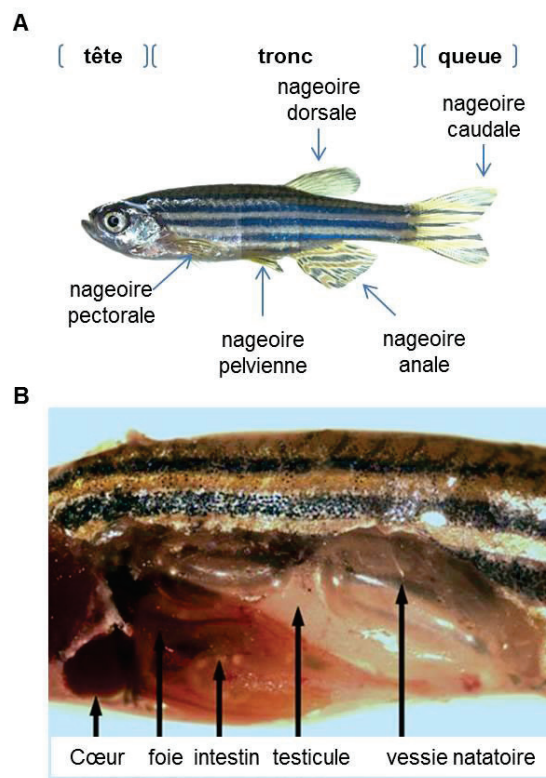


Figure 30: Anatomie d'un poisson zèbre à l'âge de 6 mois. (A) les différents types de nageoire présentes chez le poisson. (B) Anatomie interne de la partie ventrale d'un poisson permettant la visualisation de plusieurs organes. Image B issue d'un tutoriel de dissection en ligne (<https://www.jove.com/video/1717/dissection-of-organs-from-the-adult-zebrafish>).

Les gonades se développent en testicules ou ovaires fonctionnels. La dissection d'organes adultes chez le poisson zèbre est relativement aisée et permet ainsi de réaliser des hybridations *in situ*, de l'immunohistochimie, des études histologiques, des extractions d'ARN, des analyses protéiques ou encore d'autres techniques moléculaires.

Plus généralement, l'anatomie interne du poisson zèbre est commune à l'ensemble des poissons téléostéens. Ainsi, les organes de la cavité abdominale sont distribués ventralement, tandis que l'essentiel de la partie dorsale est occupé par le système musculo-squelettique.

- Le système musculo-squelettique

La colonne vertébrale principale se développe à partir de la notochorde et est constituée d'une série de vertèbres connectées (Figure 31). Ces vertèbres ont des prolongements transverses, les côtes. Répartis tout le long de la colonne vertébrale, les arcs branchiaux rejoignent la moelle épinière.



Figure 31: La colonne vertébrale. Coupe sagittale de poisson adulte: à gauche, vue générale; à droite, grossissement au niveau de la colonne vertébrale. Extrait de Menke et al. 2011.

Les muscles squelettiques sont liés aux côtes et à la peau (Figure 32), transformant ainsi l'énergie de la contraction musculaire en une force propulsive.

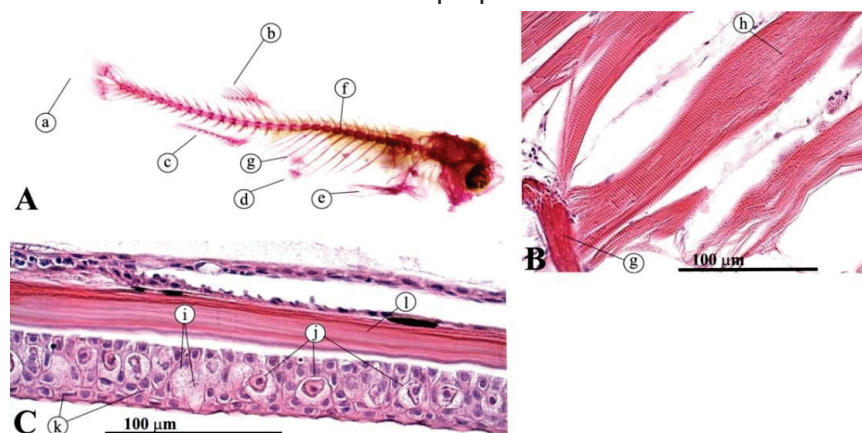


Figure 32: Le système musculo-squelettique. (A) Coloration au Rouge Alizarin qui met en évidence les os. (B) Vue dorsale des muscles squelettiques attachés aux côtes. (C) Vue latérale de la peau montrant le positionnement des écailles (couche de kératine dure) plus ou moins enchâssées sous l'épiderme. Les écailles reposent sur une assise de cellules tétraédriques à desmosomes. (a) nageoire caudale, (b) nageoire dorsale, (c) nageoire anale, (d) nageoire pelvienne, (e) nageoire pectorale, (f) colonne vertébrale ; (g) côtes ; (h) muscle squelettique ; (i) cellules caliciformes (goblet cells) ; (j) cellules d'alarme (alarm cells) ; (k) keratinocytes ; (l) écaille. Extrait de Menke et al., 2011.

Un point important qu'il reste à souligner est la troisième et plus importante phase de la myogenèse, ayant lieu à l'âge adulte. En effet, de nouvelles fibres musculaires s'ajoutent tout le long du myotome. Le muscle a une apparence structurale typique en mosaïque, visible en section transversale (Fig 33-C).

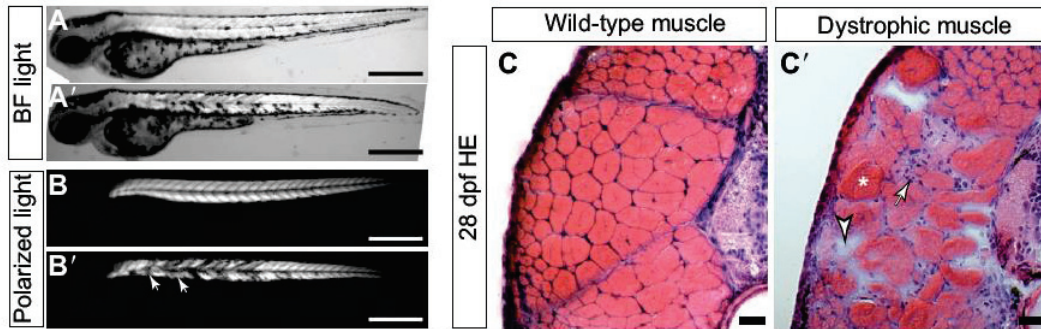


Figure 33: Caractéristiques des muscles dystrophiques de poisson zèbre.

A 3 jpf, il est difficile de distinguer un embryon sauvage (A) d'un embryon dystrophique (A') en lumière transmise. Au contraire les propriétés de birefringence observées en lumière polarisée permettent de mettre en évidence les myofibres détachées qui apparaissent plus sombres (B' flèches) que les myofibres de l'embryon sauvage (B). Sections transversales d'un poisson sauvage (C) et déficient en dystrophine (C') de 28 jpf colorés à l'hématoxyline éosine. Comme chez l'Homme, les muscles du mutant *dmd* sont caractérisés par une atrophie (têtes de flèche), une infiltration de cellules mononuclées (flèche), des myofibres eosinophiles (astérisque) et une variabilité du diamètre des myofibres en section transversale. Barre d'échelle: 0,5 mm. D'après Berger and Currie, 2012

Les poissons combinent ainsi de façon unique, hyperplasie et hypertrophie des fibres musculaires, ce qui permet la croissance du muscle au cours de leur vie (Figueiredo et al., 2012) alors que chez les mammifères la croissance post-natale est seulement dépendante de l'hypertrophie des fibres musculaires formées au cours du développement embryonnaire. Les cellules recrutées pour former de nouvelles fibres ou contribuer à l'hypertrophie des fibres existantes dérivent de cellules précurseurs myogéniques situées sous la lame basale et liant les fibres musculaires matures. Ces cellules présentent donc de grandes similarités de localisation et de fonctionnement avec les cellules satellites des mammifères.

3.6 De l'invalidation transitoire à la création de lignées stables

Dans les années 1980, le poisson zèbre apparaît comme un organisme modèle pertinent pour la génétique grâce à un criblage automatique de mutagenèse par rayons gamma qui a donné lieu à une grande collection de mutants (Chakrabarti et al., 1983; Walker and Streisinger, 1983). La caractérisation de ces mutants constitue une avancée majeure en

recherche fondamentale et médicale, permettant (1) la découverte de caractéristiques phénotypiques partagées avec des maladies humaines et (2) la classification des mutants dans des catégories phénotypiques (mutations qui affectent la somitogenèse, ou encore le cœur par exemple). Depuis, de nombreux outils ont été développés pour éditer le génome du poisson zèbre (Annexe 1). De nombreuses lignées ont été établies comme des modèles pour des maladies humaines et sont utilisées pour élucider les mécanismes physiopathologiques sous-jacents (Dooley and Zon, 2000). Entre 1993 et 1996, un crible de mutations à grande échelle est réalisé à Tübingen, en Allemagne. Ce crible utilise l'ENU (N-nitroso-N-éthylurée) comme agent mutagène (Haffter et al., 1996; Mullins et al., 1994; Solnica-Krezel et al., 1994). Cette méthode est toujours utilisée dans le cadre du projet de mutation du poisson zèbre (www.sanger.ac.uk) pour créer un allèle inactivé dit « knock-out » pour chaque gène codant une protéine et constituer une banque de mutants pour la recherche (www.zebrafish.org ou www.ezrc.kit.edu). La mutagenèse basée sur l'utilisation de rayons γ ou de l'ENU ne permet pas de cibler spécifiquement le gène d'intérêt. Pour pallier cela, une stratégie anti-sens basée sur l'utilisation de Morpholino® (MO) a été développée en 2000 (Nasevicius et Ekker, 2000) (Figure 34). Cette technique permet de diminuer le niveau d'expression d'une protéine ciblée pendant les premiers jours de développement du poisson zèbre. Les morpholinos sont de courts oligonucléotides de synthèse d'environ 25 pb, dont la structure est modifiée (remplacement du ribose par une morpholine, hexose non physiologique) ce qui les rend insensibles aux nucléases cellulaires et plus soluble (modification des groupements phosphate). Ils sont micro-injectés dans les embryons au stade une cellule. Deux types différents de MO existent: (1) les morpholinos bloquant la traduction, qui ciblent la région 5' UTR d'un ARN messenger et empêchent l'assemblage du complexe d'initiation de traduction au site d'initiation de la traduction; (2) les morpholinos d'épissage ou de régions régulatrices, qui interfèrent avec les étapes de maturation du pré-ARNm. En ciblant certains sites d'épissage, ce deuxième type de MO conduit communément à l'exclusion d'exons tandis que l'activation de sites d'épissage cachés peut conduire à des inclusions ou exclusions partielles. Plus récemment, en 2008, un troisième type de MO a été développé: les vivo-morpholinos (vivo-MO). Ils sont couplés à un dendrimère octoguanidine qui facilite la pénétration du MO dans les cellules. Il n'est donc pas nécessaire de les injecter en intracellulaire ce qui les rend utilisables au-delà du stade une cellule (Morcos et al., 2008). Les vivo-MOs peuvent ainsi être micro injectés localement, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale chez les larves et les adultes à des endroits spécifiques, comme par exemple, au niveau de la nageoire caudale dans le cadre de l'étude du processus de régénération (Figueiredo et al., 2012; Nauroy et al., 2018b). Des morpholinos contrôles spécifiques appelés mismatch (MS) et possédant 5 bases modifiées

par rapport aux morpholinos référents doivent être utilisés en parallèle pour confirmer la spécificité du phénotype observé.

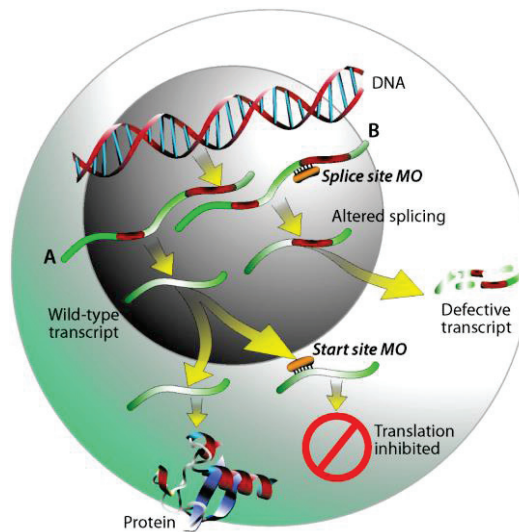


Figure 34: Les morpholinos®. (A) Expression normale d'un gène chez les eucaryotes (A, partie gauche) et inhibition de l'expression par Morpholino bloquant la traduction (A, partie droite) ou Morpholino d'épissage (B). Extrait de Timme-Laragy et al., 2012.

Une nouvelle avancée majeure pour l'utilisation du poisson zèbre comme modèle intervient en 2001 avec le début du séquençage du génome entier du *Danio rerio* par l'institut Sanger (The Wellcome Trust Sanger Institute). Ce séquençage a été achevé en 2013 (Howe et al., 2013). Ce projet a donné lieu à plusieurs versions d'assemblage. La version Zv9 de la souche Tübingen a été publiée en 2013 et son organisation et sa structure ont été décrites en détails, en particulier par comparaison avec le génome humain (Howe et al., 2013). Le consortium de référence du génome, dorénavant en charge des mises à jours du génome du poisson zèbre a publié en 2015 la version GRCz10 qui intègre des modifications majeures puis en mai 2017 la version GRCz11.

Le génome du poisson zèbre est ainsi composé d'environ 1.6 milliards de paires de bases, distribués sur 25 paires de chromosomes et contient plus de 26 000 gènes codant des protéines (source : www.ensembl.org; Mai 2018). L'analyse du génome de *Danio rerio* a montré que le poisson zèbre est proche de l'humain puisque 70% des gènes humains ont un homologue chez le poisson zèbre, et cette valeur atteint 86% si l'on ne considère que les gènes liés à des maladies humaines (Howe et al., 2013).

La connaissance du génome du poisson zèbre et l'intérêt du modèle pour étudier notamment des pathologies humaines ont déclenché le développement de nouvelles techniques d'édition du génome (Figures 35 et 36) chez le poisson zèbre pour pouvoir mener des approches de génétique inverse. Ainsi, sont successivement apparus les nucléases à doigts

est détourné pour provoquer des cassures au sein d'une séquence ADN cible *in vitro* (Jinek et al., 2012). Dans le système d'édition du génome CRISPR/Cas9, un ARN guide (ARNsg) et la nucléase Cas9 (CRISPR associated protein 9) sont introduits dans une cellule eucaryote et déclenchent une cassure double brin de l'ADN en un point précis de la séquence cible (Figure 36 a). L'ARNsg est composé de deux parties: (1) La partie 5' (18 à 23 pb) qui est complémentaire de l'ADN génomique (ADNg) cible. La séquence d'ADNg ciblée doit être immédiatement suivie par un motif PAM (protospacer adjacent motif) requis pour le clivage de l'ADNg par la nucléase Cas9. Chaque Cas9 a besoin de sa propre séquence PAM mais la plus commune est la séquence 5' – NGG – 3' qui correspond à la Cas9 de la bactérie *Streptococcus pyogenes* (Ran et al., 2013). (2) Le reste de l'ARNsg (80-100 pb) forme une longue queue adoptant une structure en épingle à cheveux qui permet le recrutement de la protéine Cas9 (Figure 36). Dans la cellule, la partie spécifique de l'ARNsg s'hybride spécifiquement avec sa séquence complémentaire et la Cas9 induit une cassure double brin franche 3 pb en amont de la séquence PAM (Ran et al., 2013).

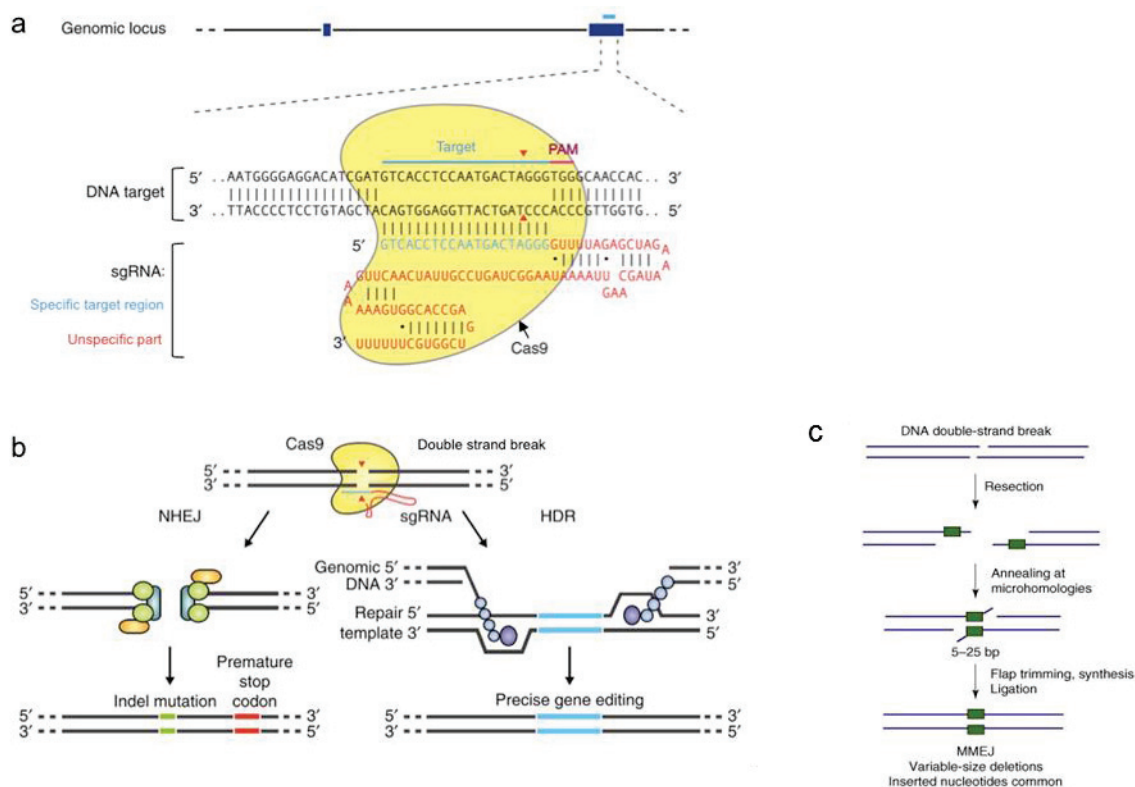


Figure 36. La technologie CRISPR-Cas9. (a) Schéma d'un ARNsg typique pour la nucléase Cas9. La séquence cible est représentée par la ligne bleue au niveau du génome et la séquence correspondante est écrite en bleu dans l'ARNsg. Les lettres rouges correspondent à la longue queue non spécifique de l'ARNsg qui sert au recrutement de Cas9. La barre horizontale rose localise la séquence PAM. Les deux têtes de flèche rouges pointent le site de clivage de la Cas9. (b) Réparation de la double cassure de l'ADN générée par le système CRISPR/Cas9. En l'absence de matrice modèle, la cassure de l'ADN est réparée via le système NHEJ et peut générer des délétions ou insertions pouvant créer potentiellement l'apparition d'un codon stop prématuré. Si une matrice modèle est fournie, le système HDR permet une édition du génome dont les conséquences sont préalablement

choisies. (c) MMEJ. De courtes séquences homologues conduisent à une petite délétion choisie au préalable. Modifié d'après Ran et al., 2013 et McVey and Lee, 2008.

En l'absence de séquence « modèle », la cassure est réparée par NHEJ (Non-Homologous End Joining), ce qui génère souvent des insertions et/ou des délétions (Indel) (Figure 36 b, gauche). Ces Indel peuvent causer un décalage du cadre de lecture susceptible de provoquer l'apparition d'un codon stop prématuré et par conséquent, générer une invalidation de l'allèle d'un gène (knock-out). Une autre voie appelée MMEJ (Microhomology-mediated end joining) est décrite (Kawahara et al., 2016; McVey and Lee, 2008) (Figure 36 c). Alors que la réparation NHEJ conduit à des insertions ou délétions imprévisibles, la réparation MMEJ utilise de petites séquences homologues (5 à 25 pb) présentes de part et d'autre de la cassure double brin et entraîne ainsi le plus souvent une petite délétion prévisible et choisie (Figure 36). Enfin, si une séquence « modèle » est présente dans la cellule, la cassure est réparée par HDR (Homology Directed Repair) (Figure 36 b, droite). Si l'on fournit à la cellule une séquence modèle contenant une mutation particulière d'intérêt, cette mutation spécifique sera intégrée dans le gène et peut ainsi mener à la création d'un knock-out ou d'un knock-in de l'allèle (Ran et al., 2013).

Le système CRISPR/Cas9 est donc extrêmement puissant pour modifier un gène spécifiquement et est applicable à la plupart des organismes. Cet outil est apparu particulièrement révolutionnaire pour le modèle poisson zèbre, pour qui, contrairement aux souris, il n'existe pas de cellules souches embryonnaires établies. En effet chez le poisson zèbre ou le xénope, des asymétries moléculaires sont déjà observées dans l'œuf fécondé (Chazaud, 2008). Elles vont se transmettre différemment aux cellules filles au cours des divisions et déterminer ainsi leur future identité. Au contraire, chez les mammifères et notamment chez la souris, aucun déterminant cellulaire n'a été localisé de manière asymétrique dans le zygote. Les cellules souches embryonnaires de souris peuvent donc être utilisées pour créer des souris transgéniques.

- CRISPR/Cas9 chez le poisson zèbre

En 2014, les paramètres importants (résumés ci-après) pour générer l'invalidation d'un allèle chez le poisson zèbre par la technologie CRISPR/Cas9 ont été publiés (Talbot and Amacher, 2014). ARNsg et Cas9 (ARNm ou protéine) sont co-injectés dans l'embryon au stade une cellule (Figure 37). Le taux de mutagenèse est évalué sur une partie de la génération F0 par la technique High Resolution Melt Analysis (HRMA) et l'autre partie des embryons est élevée jusqu'à l'âge adulte. Les potentiels fondateurs F0 sont croisés avec des poissons de souche sauvage et à nouveau, une partie de la génération F1 est sacrifiée pour évaluer par HRMA la transmission des mutations par le fondateur et pour identifier et sélectionner les mutations

d'intérêt (par séquençage). Le reste des poissons F1 issus des fondateurs identifiés comme intéressants est élevé jusqu'à l'âge adulte. Une partie de la nageoire caudale des adultes F1 est prélevée sous anesthésie (fin-clip) pour être génotypée ce qui permet d'identifier les animaux hétérozygotes. Les poissons F1 hétérozygotes sont croisés entre eux dans le but de sélectionner des poissons F2 homozygotes portant la mutation d'intérêt. Le phénotype des poissons F2 est analysé pour accéder à la fonction du gène cible.

Pour obtenir un bon taux de mutagenèse chez les F0, l'efficacité des ARNsg doit être optimisée. Le pourcentage de GC dans la séquence d'ADNg ciblée et son contexte génomique, ou encore la stabilité des structures secondaires des ARNsg sont autant de facteurs qui vont impacter l'efficacité des ARNsg (Liu *et al.*, 2016). Plusieurs outils bio-informatiques ont ainsi été développés pour aider les utilisateurs à concevoir des ARNsg efficaces (Li *et al.*, 2016).

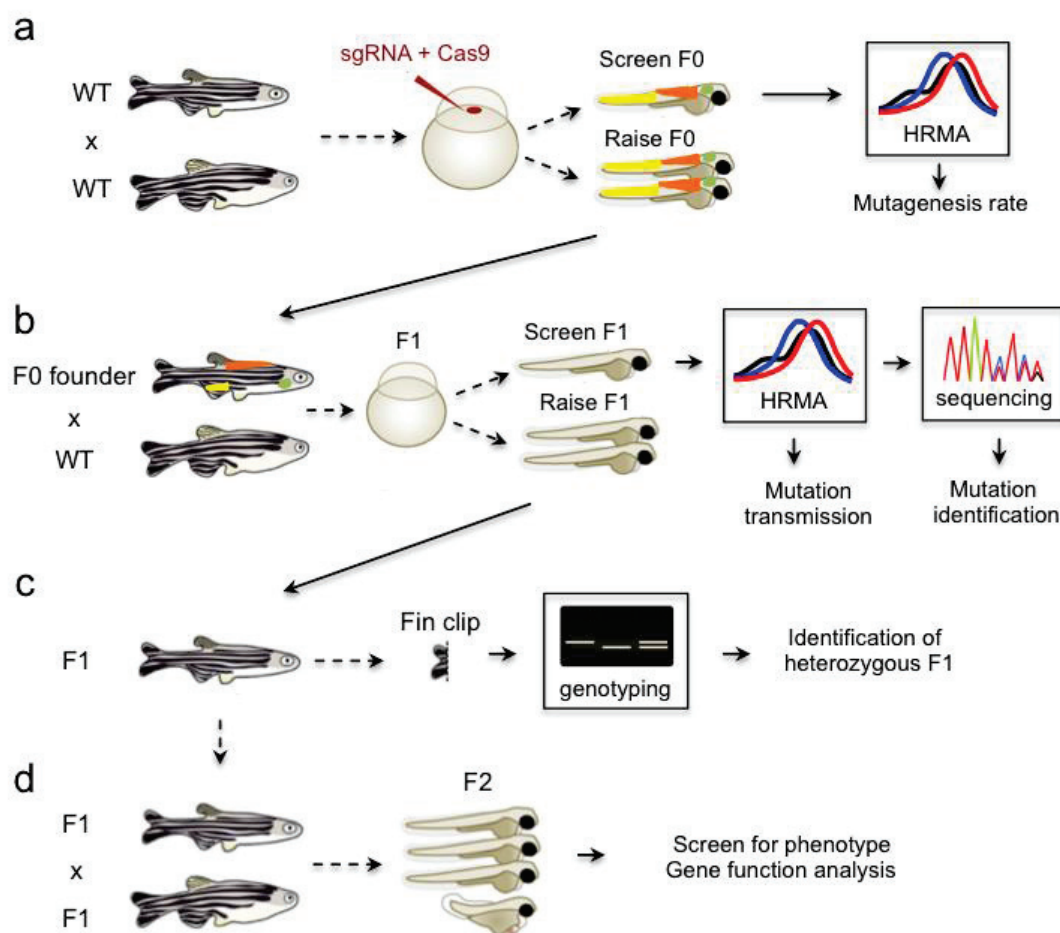


Figure 37. Représentation schématique des différentes étapes nécessaires à l'obtention de mutants par la technologie CRISPR/Cas9 chez le poisson zèbre. Modifié d'après Huang *et al.*, 2012, et Li *et al.*, 2016. Extrait de la thèse de P. Nauroy,

De notre expérience au laboratoire, le site web CRISPOR (www.crispor.tefor.net) semble être l'un des plus performants (Haeussler et al., 2016). Cependant, l'efficacité *in vivo* des ARNsg n'est parfois ni corrélée avec la prédiction ni avec l'efficacité *in vitro* (Albadri et al., 2017). De plus, les potentiels « off-targets » prédits ne sont pas toujours le reflet de ceux constatés *in vivo*. Enfin, la fréquence élevée de polymorphisme chez le poisson zèbre peut également affecter l'efficacité des ARNsg mais aussi complexifier le génotypage. Cela constitue un paramètre important qui doit être pris en compte. En résumé, la génération de lignées de poisson zèbre invalidées pour un gène cible est maintenant très accessible à l'échelle d'un laboratoire (simple, fiable et efficace) mais elle nécessite pour autant une certaine expertise et un certain temps (un an minimum pour pouvoir créer une lignée et analyser le phénotype).

Enfin, le knock-in (Figure 38) semble plus compliqué à mettre en œuvre chez le poisson zèbre, notamment du fait de son développement très rapide (Albadri et al., 2017; Kawahara et al., 2016).

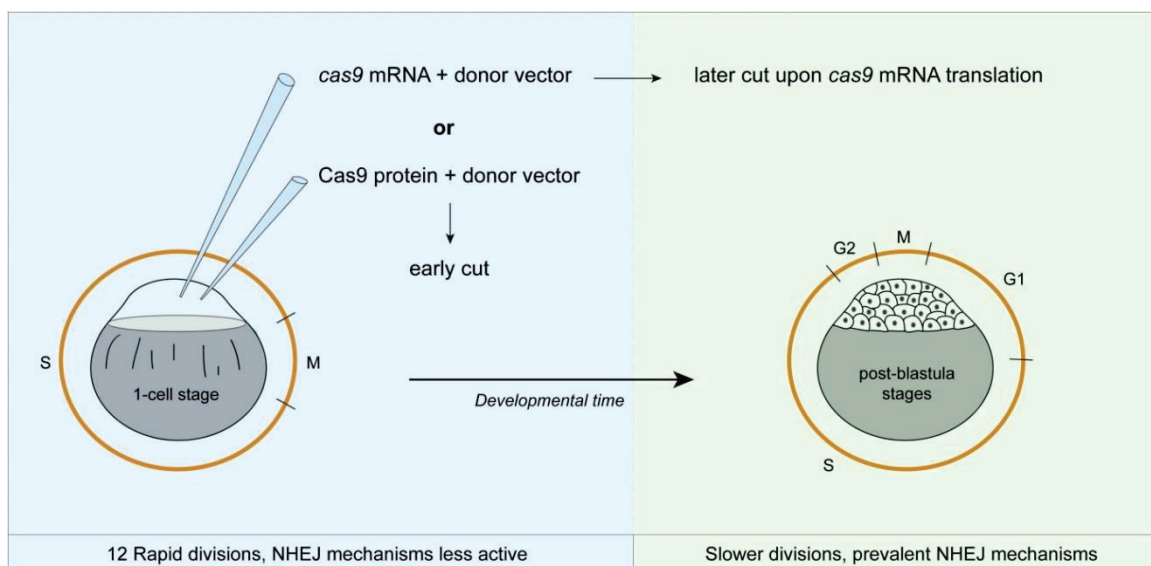


Figure 38. Stratégies knock-in au cours du développement embryonnaire précoce du poisson zèbre. Représentation schématique de deux différentes stratégies de KI employant soit l'ARNm Cas9 soit la protéine Cas9 pour générer la cassure double brin. Les premières divisions cellulaires se produisent très rapidement (toutes les 15 min) chez le poisson zèbre, avec peu voire pas d'interphase (partie bleue du schéma). En conséquence, au cours de ses divisions, la réparation par NHEJ est peu active. Plus tard, comme les divisions cellulaires prennent plus de temps et que les interphases sont plus longues, le système NHEJ est utilisé préférentiellement (partie verte du schéma). En conséquence, l'injection de la protéine Cas9 ou de l'ARNm cas9 et le timing de génération de la cassure de l'ADN peut influencer le type de réparation utilisé pour intégrer la séquence du donneur (matrice modèle). Extrait d'Albadri et al., 2017.

3.7 Le poisson zèbre, un modèle de choix pour l'étude des pathologies du muscle

Le poisson zèbre est un modèle de choix pour étudier les pathologies humaines du muscle (Jagla et al., 2017). En effet, après un jour de développement, *Danio rerio* présente des comportements moteurs qui peuvent être mesurés facilement et de façon reproductible. Comme nous l'avons vu précédemment, ses muscles squelettiques sont quasi identiques à l'homme d'un point de vue histologique et ultrastructural (Figure 39).

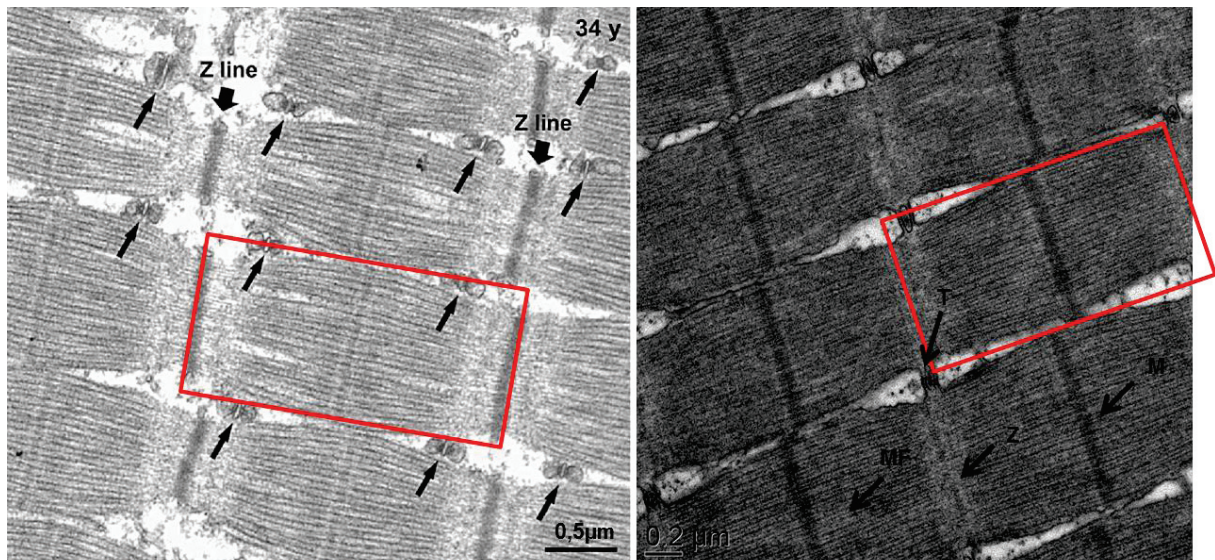


Figure 39. Myofibrilles du muscle squelettique humain (34 ans) et de poisson zèbre adulte de 6 mois en microscopie électronique à transmission. (T) triades, (MF) myofilaments, (Z) Strie Z ou Z line. Les clichés de gauche (jeune Homme de 34 ans) et de droite (poisson zèbre de 6 mois) illustrent la similarité de structure des muscles squelettiques entre ces deux espèces. Les cadres rouges encadrent chacun un sarcomère. Une différence peut être notée ici : les triades encadrent les bandes I et A chez l'Homme alors que chez le poisson zèbre, les triades font face aux stries Z. Modifié d'après Boncompagni et al., 2006 et image de droite, M.Malbouyres..

Cette grande similarité entre le muscle squelettique humain et le muscle squelettique du poisson zèbre inclut la préservation des composants du complexe DAPC, du système de couplage excitation-contraction et de l'appareil contractile, 3 structures fondamentales pour étudier et comprendre la pathogenèse des maladies musculaires humaines. Les symptômes cliniques présentés par les patients se rapprochent davantage des phénotypes de plusieurs lignées modèles de poisson zèbre que des phénotypes de modèles générés dans d'autres espèces comme la souris par exemple (Berger and Currie, 2012; Berger et al., 2010; Telfer et al., 2010).

Comme résumé dans la Table 2, le modèle poisson permet l'étude de nombreuses maladies affectant le muscle. De récentes revues résument très bien ces études, en particulier dans la

revue du groupe de P. Curie (Berger and Currie, 2012) mais aussi plus récemment les revues de (Gibbs et al., 2013; Goody et al., 2017).

Zebrafish gene	Genetic tools	Human condition	Reference
<i>dmd</i>	Mutant ENU (<i>sapje</i>) Mutant ENU (<i>sapje-like</i>) Mutant ENU(<i>dmdpc2</i>)	Dystrophie musculaire de Duchenne	Granato <i>et al</i> , 1995; Basset <i>et al</i> , 2003 Berger <i>et al</i> , 2011 Guyon <i>et al</i> , 2009 Giacomotto <i>et al</i> , 2013
<i>lama2</i>	Mutant ENU (<i>caf</i>) Mutant ENU (<i>cl501</i>)	Dystrophie musculaire congénitale (MDC1A)	Hall <i>et al</i> , 2007 Gupta <i>et al</i> , 2012
<i>col6a1</i>	Mutant TALEN	Dystrophie musculaire congénitale d'Ulrich; myopathie de Bethlem	Telfer <i>et al</i> , 2010; Zulian <i>et al</i> , 2014; Radev <i>et al</i> , 2015
<i>col15a1b</i>	Mutant ENU-TILLING	Pas de pathologie humaine connue	Guillon <i>et al</i> , 2016
<i>dag1</i>	Mutant ENU (<i>patchytail</i>)	Dystrophie musculaire des ceintures (MDDGC9) et dystroglycanopathies	Gupta <i>et al</i> , 2011
<i>popdc1</i>	Mutant TALEN	Dystrophie musculaire des ceintures et arythmie cardiaque	Schindler <i>et al</i> , 2016
<i>ryr1b</i>	Mutant (spontaneous mutation, <i>ryr</i>)	Formes multiples de myopathies congénitales	Hirata <i>et al</i> , 2007
<i>flnc</i>	Mutant ENU (<i>sot</i>)	Myopathie myofibrillaire	Ruparelia <i>et al</i> , 2012 et 2016
<i>desma</i>	Mutant ENU	Myopathie myofibrillaire	Trinh <i>et al</i> , 2011; Ramspacher <i>et al</i> , 2015
<i>tmod4</i>	Mutant ENU (<i>trg</i>)	Pas de pathologie humaine connue	Berger <i>et al</i> , 2014
<i>stac3</i>	Mutant ENU (<i>mi34</i>)	Myopathie américaine native	Horstick <i>et al</i> , 2013
<i>myo18b</i>	Mutant ENU Mutant CRISPR/Cas9	Myopathie sévère de Némaline	Berger <i>et al</i> , 2017
<i>cavin4b/murcb</i>	Mutant TALEN	Pas de pathologie humaine connue	Housley <i>et al</i> , 2016
<i>tnni2a.4</i>	Mutant ENU	Arthrogrypose distale de type 2B	Ferrante <i>et al</i> , 2011
<i>lamb2</i>	Mutant ENU (<i>sofly</i>)	Syndrôme de Pierson	Jacoby <i>et al</i> , 2009
<i>ilk</i>	Mutant ENU (<i>loc</i>)	Cardiomyopathie dilatée	Bendig <i>et al</i> , 2006; Postel <i>et al</i> , 2008

Table 2. Lignées de poissons zèbres modèles pour des pathologies musculaires.

Les mutants modèles de cardiomyopathies ne sont pas décrits ici à l'exception du mutant *loc* du fait de son phénotype dystrophique. *dmd* = dystrophine, *lama2* = laminine $\alpha 2$, *caf* mutant = candyfloss mutant, *dag1* = dystroglycan 1, *popdc1* = popeye domain-containing 1, *ryr1b*= ryanodine receptor 1b, *ryr* mutant = relatively relaxed mutants, *sot* mutant = stretched out mutant, *flnc* = filamine C, *desma* = desmine, *Tmod4* = tropomodulin-4, *trg mutant* = *träge* mutant = mutant inerte, rigide, *stac3* = composant du système excitation-contraction, *myo18b* = myosin XVIIIb, *sig* mutant = *schlãfrig* mutant = mutant fatigué, *cavin* = cavéoline, *tnni2a.4* = Troponin I, skeletal, fast 2a, tandem duplicate 4, *lamb2* = laminin beta 2, *ilk* = integrin-linked-kinase, mutant *loc* (lost-contact).

3.8 Mutants poisson zèbre de pathologies musculaires

Depuis le début des années 2000, les dystrophies musculaires ont été largement étudiées chez le poisson zèbre (Guyon et al., 2007) et l'utilisation des morpholinos a permis de mettre en évidence que dystroglycan, dystrophine, δ -sarcoglycan, titine ou encore cavéoline-3 sont toutes des protéines requises pour un développement musculaire normal chez le poisson zèbre au cours des sept premiers jours de développement. D'autre part, le screening de Tuebingen de 1996 a mis en évidence un groupe de mutants présentant des défauts

musculaires et plusieurs de ces mutants ont depuis été caractérisés. Nous allons donc nous intéresser à ces mutants. Nous évoquerons les autres modèles animaux uniquement lorsque cela s'avèrera nécessaire pour la compréhension des pathologies.

- Mutants des composants des complexes de la JMT

- Dystrophine

Des mutations sur le gène codant la dystrophine ont été identifiées dès 1986 comme la cause de la DMD chez l'Homme (voir partie 2.4). Et pourtant les premières thérapies prometteuses n'ont été que récemment décrites et doivent être évaluées. C'est pourquoi le développement de modèles animaux, offrant la possibilité de cribler des médicaments à haut débit a été estimé de grande utilité.

Ainsi, Gieseler et ses collaborateurs (Giacomotto et al., 2013; Gieseler et al., 2000) ont développé un modèle *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) pour lequel les gènes *dys-1* codant la dystrophine et *hlh-1* codant MyoD sont mutés. Les « simples » mutants *dys-1* présentent une légère dégénérescence musculaire alors que les doubles mutants sont progressivement paralysés du fait d'une dégénérescence musculaire massive quantifiée par marquage des filaments d'actine. Giacomotto et ses collaborateurs montrent en 2013 que la dynamique mitochondriale est sévèrement affectée dès les premiers stades de dégénérescence musculaire, non seulement chez les nématodes dystrophiques mais également pour un modèle poisson zèbre de DMD. Ainsi, le knock-down du gène codant *drp-1* (qui promeut la fission des mitochondries) réduit la fragmentation mitochondriale et la dégénérescence musculaire des nématodes dystrophiques (Giacomotto et al, 2013).

Les souris *mdx* déficientes pour la dystrophine présentent une pathologie musculaire plus modérée que les patients DMD, du fait d'une meilleure régénération des fibres musculaires mais également d'une activation du gène codant pour l'utrophine (*Utrn*), orthologue autosomal du gène *dys*, pouvant compenser, au moins partiellement, l'absence de la dystrophine (Law and Tidball., 1993; Bassett, 2003). Les souris *mdx* présentent une réduction du nombre d'interdigitations de la JMT. Les doubles mutants *mdx/Utrn* présentent, comme les souris mutantes pour la laminine $\alpha 2$, une quasi absence d'interdigitations de la JMT. Le complexe DAPC est donc primordial pour une formation correcte de la JMT et l'utrophine compense l'absence de la dystrophine chez la souris. Chez l'Homme, l'utrophine ne compenserait pas aussi bien que chez la souris l'absence de la dystrophine.

Malgré les anomalies de structure de la JMT décrites chez les souris modèles pour la DMD ou pour les myopathies congénitales, aucun cas de rupture de la JMT, pourtant observé chez l'homme, n'a été décrit. D'ailleurs, les tests mécaniques réalisés sur des fibres musculaires isolées à partir de souris *mdx* ne montrent pas non plus de réduction de la force musculaire (Law et al., 1995; Bassett, 2003). La souris ne serait donc pas toujours le modèle de choix pour étudier les pathologies du muscle. Les modèles invertébrés, eux, présentent le désavantage de ne pas posséder de véritable analogue du système DAPC. Ainsi, chez *C.elegans*, un complexe intégrine analogue au complexe d'adhésion focale est décrit mais l'homologue *dys-1* de la dystrophine et de l'utrophine et d'autres composants de DAPC sont plutôt requis à la JNM plutôt que pour l'attachement des muscles au tendon.

C'est dans ce contexte qu'a été étudié le mutant *sapje* du poisson zèbre, issu de la mutagenèse ENU, qui porte une mutation non-sens dans le gène *dmd*. Cette mutation est létale à l'état homozygote. Chez les individus hétérozygote, une rupture massive des fibres musculaires somitiques à leur point d'attachement au niveau des myoseptes est observé (Figure 40). Chez les mutants *sapje*, l'utrophine ne compense pas l'absence de dystrophine et comme l'embryon utilise très précocement ses fonctions locomotrices (mouvements spontanés dès 24hpf), le phénotype des mutants *sapje* est très sévère dès le stade larvaire. En 2011, Berger et ses collaborateurs décrivent un autre mutant poisson zèbre pour la dystrophine, *dmd^{pc2}*, qui porte une mutation dans l'exon 32, conduisant à une délétion sans modification du cadre de lecture. Ce mutant leur a permis de mesurer comment la modulation de l'épissage de la dystrophine peut influencer le phénotype musculaire. Les auteurs utilisent des morpholinos pour bloquer les sites donneurs ou accepteurs ou cibler les sites enhancers (ESE pour exonic splice enhancer) du mutant *dmd^{pc2}*. Ainsi, si 10 à 20 % de la dystrophine « normale » est présente, la fonction musculaire n'est que partiellement restaurée alors que 30 à 40 % améliore significativement le phénotype dystrophique des poissons (Berger et al., 2011). Le mutant *dmd^{pc2}* pourrait donc être utilisé pour évaluer des stratégies thérapeutiques de traitement des DMD. En effet, le contrôle de l'épissage d'exons est une piste thérapeutique pour restaurer la fonction de la dystrophine chez les patients.

Enfin, l'article de Vieira et collaborateurs est un bel exemple de l'utilité de la complémentarité des divers modèles biologiques (Vieira et al., 2017). Ainsi, c'est la découverte de deux chiens de race golden retriever parmi un groupe de chien modèle de dystrophie musculaire (GRMD) présentant un phénotype dystrophique plus modéré comparé aux autres chiens du groupe modèle qui a permis de mettre en évidence que les muscles de ces deux chiens présentaient un taux de PITPNA (phosphatidylinositol transfer protéine- α) plus élevé. Les auteurs ont eu l'idée d'étudier la régulation de l'expression de PITPNA chez les mutants *sapje* mais également *in vitro* à partir de cellules dérivées de muscle provenant de patients

atteints de DMD. La diminution du taux de PTPNA est associée à une diminution de PTEN (phosphatase and Tensin homolog) et une augmentation de la quantité d'Akt phosphorylée (pAkt).

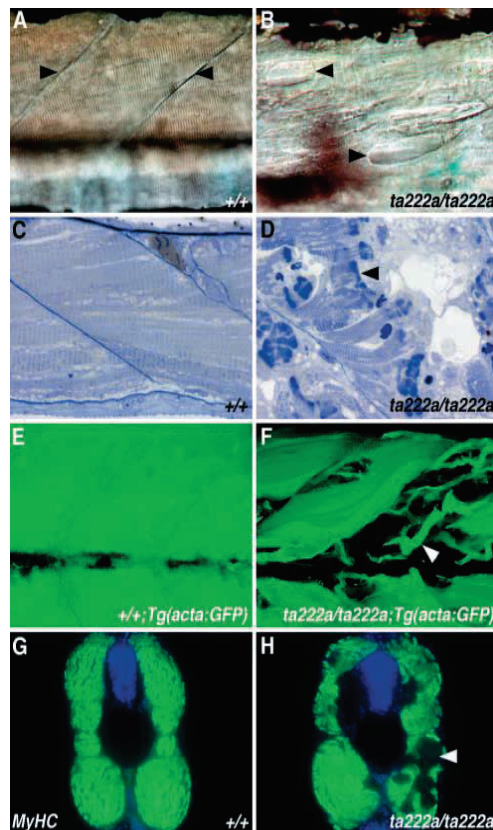


Figure 40. Les mutants *sapje* développent des lésions des muscles squelettiques. (A,B) Chez les poissons contrôles, les fibres musculaires s'étendent sur toute la largeur du somite entre deux myoseptes (têtes de flèche en A; vue latérale à 48 hpf), alors que les poissons *sapje* présentent de nombreux espaces vides de fibres au sein du somite (têtes de flèche en B) correspondant à des fibres détachées et rétractées. (C,D) La coloration au bleu de toluidine en histologie montre la présence de fibres musculaires détachées et rétractées chez les mutants *sapje* (tête de flèche en D; section para-sagittale, 72 hpf) non retrouvées chez les poissons contrôles (C). (E,F) La reconstruction 3D des somites après microscopie confocale sur des poissons transgéniques Tg(acta:GFP) confirme la perte importante de fibres musculaires (F) des mutants *sapje* par rapport aux poissons contrôles (E). (G,H) Le marquage anti-MyHC (en vert) montre que la différenciation est normale chez les poissons témoins (G) et *sapje* (H), et confirme d'importantes lésions (tête de flèche en H) des somites des mutants. Modifié d'après Basset, 2003.

Leurs résultats suggèrent que PTPNA pourrait être une cible intéressante pour le traitement des DMD.

Les défauts de la JMT sont rarement décrits parmi les défauts musculaires des patients atteints de pathologies musculaires telles que DMD et ce, en partie, car les biopsies musculaires des patients sont délibérément réalisées à distance du tendon afin de simplifier

l'étude histologique et de minimiser les effets délétères de la biopsie pour le patient. Il n'est donc pas clairement démontré que les patients atteints de DMD présentent davantage de rupture de la JMT ou d'autres défauts de la JMT. Cependant, des études non invasives (imagerie par résonance magnétique) suggèrent que les défauts musculaires sont plus prononcés à proximités des JMT chez les patients DMD (Bassett, 2003).

Le mutant *sapje-like* (phénotype très similaire au mutant *sapje*), présentant une mutation sur le site donneur de l'exon 62 de la dystrophine, a été identifié et constitue un modèle de choix pour étudier les pathologies du muscle associées à des modifications de l'épissage de la dystrophine (Guyon et al., 2009). De façon intéressante, il a été montré par western-blot que chez les mutants *sapje-like*, la quantité de protéines β - δ et γ -sarcoglycan est modérément mais spécifiquement réduite, suggérant que le sous-complexe sarcoglycan est légèrement déstabilisé, ce qui reproduit ce qui est observé chez certains patients atteints de DMD (la déstabilisation du sous-complexe sarcoglycan peut être de sévérité variable). Contrairement aux patients DMD, une subtile réduction de la protéine β -DAG est également décrite chez les mutants *sapje-like*. Cela suggère que l'intégrité du complexe DAPC semble altérée chez les mutants *sapje-like* (Guyon et al., 2009).

- Laminine α 2

Chez l'Homme, plus de 800 mutations du gène codant pour la laminine α 2 (LAMA2) ont été identifiées et conduisent à des DMC plus ou moins sévères. La majorité des mutations aboutissent à la forme la plus commune de dystrophie musculaire congénitale (MDC1A).

Comme déjà discuté, la laminine α 2 est spécifiquement retrouvée au niveau des lames basales des muscles striés et des nerfs périphériques et interagit avec les laminines β 1, γ 1 ou β 2 pour former les laminines 211 et 221 de la lame basale. Ces complexes interagissent avec l' α -DAG d'une part et l'intégrine α 7 β 1 d'autre part à la surface des myofibres pour stabiliser le sarcolemme. Mais les laminines jouent également un rôle dans la régénération musculaire puisque dans les muscles déficients en laminine α 2, la prolifération des cellules satellites est réduite et les muscles perdent ainsi leur capacité à régénérer (Kuang et al., 1999; Girgenrath et al., 2005; Gupta et al., 2012). Chez la souris, l'invalidation complète de la laminine α 2 conduit à une dystrophie musculaire sévère et des retards de croissance alors que des mutations faux-sens ou d'épissage causent des phénotypes moins sévères (Xu et al., 1994; Miyagoe et al., 1997; Patton et al., 2008; Gupta et al., 2012). Un modèle de chat existe également, pour lequel une dystrophie musculaire est observée (Figure 41) de même que des défauts cérébraux (O'Brien et al., 2001). Les animaux modèles présentent un tableau clinique similaire à celui rencontré chez les patients en l'absence de laminine α 2,

suggérant une conservation des fonctions de cette protéine au cours de l'évolution des muscles de vertébrés.

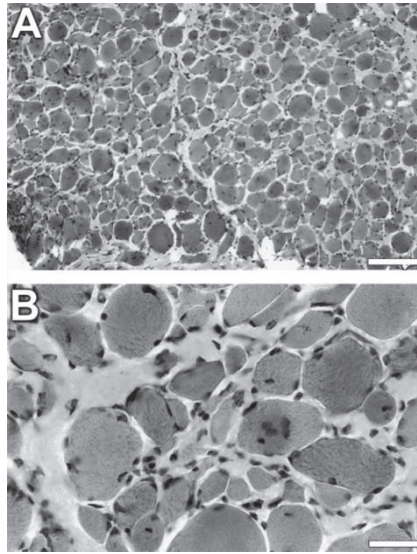


Figure 41. Analyse MET de muscle provenant d'une lignée de chats dont le gène codant la laminine $\alpha 2$ est invalidé. Barres d'échelle 100 μ m (A) et 25 μ m (B). Notez la fibrose marquée de l'endomysium, la nécrose des myofibres et leur variabilité en taille ainsi que l'accumulation de lipides au niveau du périmysium. D'après O'Brien et al., 2001.

Bien que l'utilisation du modèle murin pour le développement de piste thérapeutique paraisse prometteur, d'autres modèles animaux comme le poisson zèbre paraissent plus appropriés pour tester des molécules à plus grande échelle comme dit en introduction de ce chapitre. Trois modèles moléculaires ont été proposés pour expliquer cette pathologie: (1) le modèle le plus commun est que l'absence de LAMA2 au niveau des deux complexes retrouvés à la JMT provoque une faiblesse du sarcolemme et sa rupture, conduisant à une nécrose cellulaire, comme c'est le cas pour la DMD ; (2) l'absence de signalisation médiée par LAMA2 pendant le développement et le maintien du tissu musculaire aboutit à des défauts de prolifération et de fusion des myoblastes; (3) la perte de LAMA2 au niveau de la lame basale des cellules de Schwann entourant les nerfs périphériques conduit à une atrophie des nerfs. Or, l'utilisation du modèle poisson remet en question ces trois hypothèses. Chez le poisson zèbre, il existe deux lignées mutantes pour *lama2* issues de la mutagenèse ENU : les mutants *candyfloss (caf)* et *cl501*. L'absence de *lama2* chez ces deux mutants induit un phénotype musculaire dégénératif. En effet, les premières étapes de myogenèse et de fusion des myoblastes sont correctes. L'innervation des neurones moteurs primaires est également normale. Mais des détachements des fibres musculaires sont effectivement observés. Ces détachements sont induits par les contractions musculaires puisque l'anesthésie d'embryons *caf* de 72 hpf, empêchant toute contraction musculaire, restaure le phénotype musculaire. Cependant, le détachement des fibres n'est pas associé à

une rupture du sarcolemme (Figure 42). En effet, les fibres se détachent et se rétractent sans que leur sarcolemme ne semble altéré, si bien que le détachement déclenche la mort cellulaire mais moins rapidement que dans le cas des mutants *sapje* où une nécrose rapide après rupture du sarcolemme est observée. En MET, une fibrose est visible et on retrouve des composants du myosepte « accrochés » à l'extrémité de la fibre musculaire rétractée. Des expériences d'immunomarquages permettent de préciser que le détachement des fibres musculaires a lieu du côté extracellulaire de la JMT plutôt qu'au niveau du sarcolemme. Ainsi, à 36 hpf, chez les mutants *sapje*, le dystroglycan est uniquement détecté à la JMT lors du détachement de la fibre musculaire traduisant une rupture du sarcolemme alors que chez les mutants *caf*, à 72 hpf, l'expression de la dystrophine, du dystroglycan et de la laminine 1 est retrouvée à l'extrémité des myofibres rétractées.

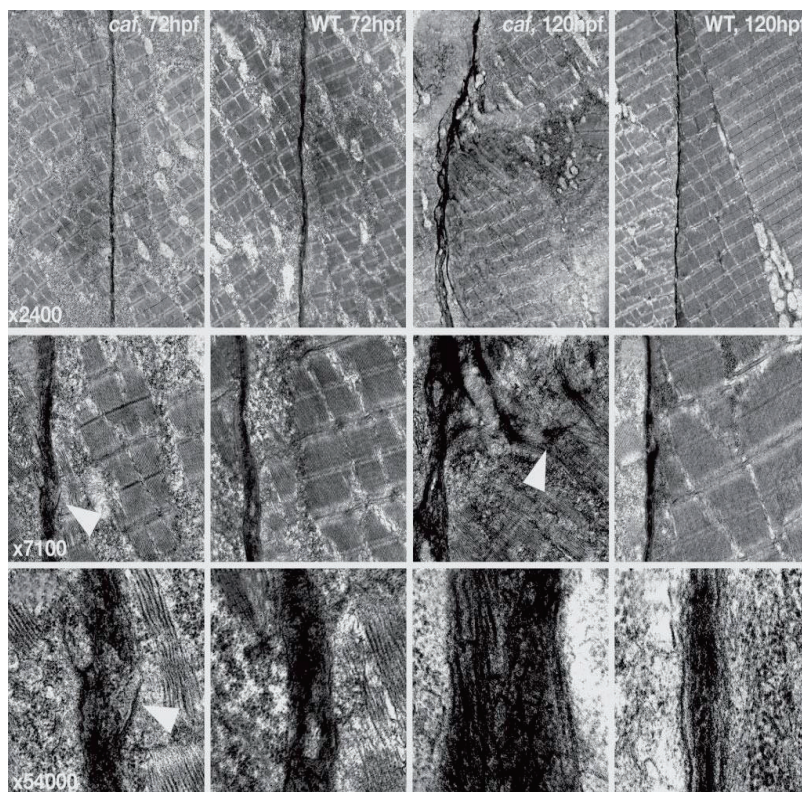


Figure 42. Analyse en MET des myoseptes verticaux des mutants *caf* comparés aux embryons sauvages de 72 et 120 hpf. A faible grandissement, le myosepte des mutants paraît déformé et fibrotique. A grandissement intermédiaire, des déchirements sont visibles (têtes de flèche). A fort grandissement, le myosepte est nettement plus large en diamètre et présente des fibres de collagène condensées, indication d'une réponse fibrotique. D'après Hall et al., 2007.

Ainsi, Hall et ses collaborateurs proposent que les défauts musculaires en l'absence de LAMA2 sont déclenchés par les contractions musculaires sans atteinte du sarcolemme et que le détachement déclenche ensuite la mort cellulaire (Hall et al., 2007). En 2012, Gupta *et al*, identifient également un mutant poisson zèbre portant une mutation sur un site d'épissage de *lama2* résultant en une perte de fonction de la laminine $\alpha 2$ (perte de la région

interagissant avec les β et γ -laminines) (Gupta et al., 2012). Ces mutants observés par biréfringence à 3 jpf montrent les muscles du tronc sous forme de « patch » avec de larges zones sombres traduisant une dégénérescence des muscles squelettiques alternant avec des zones réfringentes correspondant aux muscles non affectés. Ce phénotype est plus sévère que celui observé pour les mutants KO pour la dystrophine où la dégénérescence musculaire est observée plus tardivement (4-5 jpf). La dégénérescence concerne la presque totalité des somites des mutants *lama2* à 5 jpf.

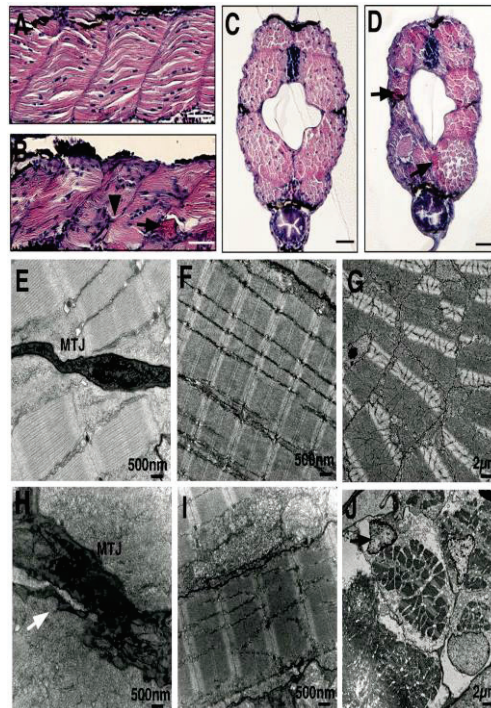


Figure 43. Myoseptes anormaux et détachement des myofibres chez les poissons déficients pour la laminine- $\alpha 2$ (*lama2cl501/cl501* fish). (A et B) Coloration hématoxyline-éosine de sections longitudinales de poissons sauvages (A) et mutants (B) de 5 jpf. Les muscles des mutants sont hautement désorganisés dans les somites affectés avec des myoseptes aux contours irréguliers (tête de flèche) et des myofibres détachées éosine-positives (flèche). (C–D) Sections transversales montrant des myotomes globalement plus petits chez les mutants (D) et des fibres musculaires dégénérées à 5 jpf (flèche), Barres d'échelle = 10 mm. (E et H) MET montrant le détachement de la fibre musculaire de la JMT chez les mutants (H, flèche). (F et I) Les myofibres du sauvage (F) sont fermement solidaires les unes des autres alors que chez les mutants (I), de larges espaces matriciels sont visibles entre les fibres. Les stries Z et lignes M sont désorganisées. (G et J) Les défauts de MEC entraînent des dommages au niveau des myofibres du myotome. Des noyaux apoptotiques sont visibles chez les mutants (J, flèche). D'après Gupta *et al*, 2012.

Les embryons présentent de grandes difficultés à se mouvoir et tourbillonnent dans l'eau. Les mutants homozygotes meurent entre 8 et 15 jpf alors que les poissons hétérozygotes semblent normaux ; ils présentent en MET une JMT très endommagée avec une dilatation des myoseptes ainsi qu'une accumulation de fibres de collagène (Figure 43). Les myofibres qui restent attachées au myosepte présentent des stries Z et M désorganisées sans défaut du sarcolemme. Des sections transversales de muscle confirment les détachements de

myofibrilles et l'accumulation de membranes vésiculaires suggérant la présence de fibres nécrosées (Gupta et al., 2012). L'expression du β -dystroglycan et de la dystrophine est également réduite chez ces mutants.

En cas d'absence d'un des composants de la JMT, la modification des cascades signalétiques expliquerait d'avantage l'apparition de pathologies dystrophiques que la perte de l'intégrité du lien entre la MEC du myosepte et le sarcolemme (JMT) (Hall et al., 2007). Dans le cas de la laminine $\alpha 2$, des dysfonctions tant mécaniques que signalétiques semblent impliquées dans la pathologie MDC1A.

▪ Laminine $\beta 2$

Il existe un mutant de la laminine $\beta 2$, issu de la mutagenèse ENU, nommé *softy* (*sof*), qui porte une mutation faux-sens sur le gène *lamb2* (Jacoby et al., 2009). De façon unique, les auteurs ont pu étudier les mutants *softy* homozygotes puisque la majorité d'entre eux survit. Comme pour les mutants *sapje* et *caf*, les défauts observés chez les mutants *softy* (*sof*) proviennent d'une perte d'adhésion des fibres musculaires à la JMT qui provoque un détachement des fibres musculaires. Cependant, une large proportion des mutants (64%) atteignent l'âge adulte et sont fertiles. La rupture des fibres est externe au sarcolemme puisqu'elles se détachent des myoseptes verticaux au niveau de la lame basale. Selon les auteurs, la formation de terminaison de fibres musculaires ectopiques (EFTs) permettrait de nouveaux attachements des fibres qui préserveraient leur viabilité. Leurs observations en MET concernant la rupture membranaire décrite, bien qu'intéressantes, doivent être revues à la lumière des connaissances actuelles. L'image présentée en Figure 44 A pour illustrer un myosepte de poissons zèbre sauvage à 72 hpf n'est pas très représentative de ce que l'on connaît aujourd'hui de la structure du myosepte et de la JMT à ce stade (Charvet et al., 2011) puisqu'aucune inter-digitation de la membrane n'est visible ici (Figure 44). Pour autant, si l'on exclut la présence d'interdigitations, décrite comme anormale par les auteurs et que l'on peut considérer comme tout à fait normal au contraire.

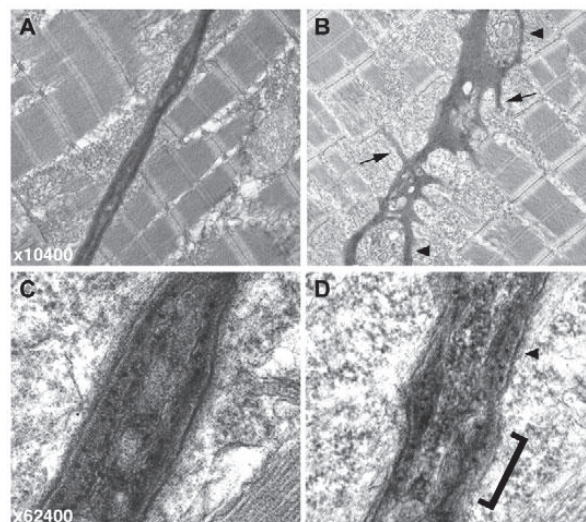


Figure 44. Analyse en MET des myoseptes verticaux à 3 jpf. Poissons sauvages (A et C) et mutants *sof* (B et D). D'après Jacoby et al., 2009.

La présence de cloques (Figure 44B, tête de flèche) au niveau du myosepte est, elle, effectivement anormale. De même, il me semble (Figure 44 D) que la MEC du myosepte est moins dense et que le sarcolemme présente des irrégularités. Je ne pense pas que les clichés présentés dans cet article permettent de conclure de façon évidente à une rupture des myofibres au niveau de la lame basale.

▪ Dystroglycan

Le dystroglycan est un des acteurs principaux du complexe DAPC. Le gène codant le dystroglycan (*DAG1*) est hautement conservé au cours de l'évolution et est retrouvé en une seule copie dans le poisson zèbre (*dag1*) alors qu'il est dupliqué chez d'autres poissons téléostéens (Gupta et al., 2011). La protéine précurseur est clivée en deux sous-unités matures α et β . L' α -DAG est une protéine de la MEC alors que le β -DAG est une glycoprotéine enchâssée dans le sarcolemme et qui lie la dystrophine intracellulaire à l' α -DAG extracellulaire. Mais les DAG sont aussi des molécules de signalisation. Des glycosylations post-traductionnelles sont nécessaires pour qu'ils puissent interagir avec leurs ligands. Aucune mutation du DAG n'a été identifiée chez l'Homme mais des mutations récessives concernant au moins six gènes conduisent à des défauts de glycosylation du DAG qui sont associés à diverses pathologies regroupées sous le nom de dystroglycanopathies (comme évoqué précédemment), dont certaines formes de DMC . Plusieurs modèles animaux de dystroglycanopathies ont été développés. La souris KO pour *Dag* meurt très tôt au cours du développement embryonnaire du fait de gros défauts d'assemblage des lames basales et particulièrement de la membrane de Reichert, une membrane basale extra embryonnaire composée entre autre de laminine et de collagène IV et qui est une structure spécifique aux rongeurs. Les souris KO conditionnel CMK-Cre *Dag* Flox pour lesquelles *Dag* est invalidé spécifiquement au niveau des muscles squelettiques grâce à l'utilisation de la recombinaison Cre sous la dépendance du promoteur CMK (Creatine Muscle Kinase), présentent un phénotype dystrophique. Les cellules satellites, quant à elles, sont toujours capables d'exprimer *Dag* et de régénérer les fibres musculaires endommagées (Cohn et al., 2002). Une réduction de l'expression de *Dag* a également été montrée dans des modèles de chats *Sphynx* et *Devon* (Martin et al., 2008).

La drosophile possède également un orthologue du gène dystroglycan (*Dg*) mais les enzymes impliquées dans la glycosylation de DAG chez les vertébrés sont absentes chez la mouche. Chez le poisson zèbre, l'utilisation de morpholinos pour réduire l'expression de DAG conduit à la présence de fibres musculaires désorganisées, apoptotiques et nécrotiques chez les morphants dès 24 hpf (Parsons et al., 2002).

Un mutant nommé *patchytail*, issu de la mutagenèse par l'ENU, a également été caractérisé. Ce mutant présente une substitution d'un nucléotide résultant en un changement d'une

valine en acide aspartique au niveau du domaine C-terminal de l' α -DAG, nécessaire à son interaction avec le domaine C-terminal du β -DAG. Une forte réduction du transcrit est mise en évidence par RT-PCR et en western blot les protéines α et β -DAG sont indétectables. Le mutant *patchytail* présente des muscles dystrophiques (ses propriétés de biréfringence sont réduites, on parle aussi de birefringence « patchy ») et des défauts de locomotion, mais également des défauts de développement des yeux et du système nerveux central (SNC), similaires à ceux observés chez certains patients atteints de dystroglycanopathies (Gupta et al., 2011).

Dans les premières étapes de développement, la formation des fibres musculaires des mutants *patchytail* est similaire aux poissons témoins. Les premiers signes de dégénérescence musculaire (Figure 45) apparaissent entre 3 et 4 jpf et ne concernent que quelques somites postérieurs. Mais entre 4 et 7 jpf, la dégénérescence musculaire progresse rapidement dans tout le tronc et les homozygotes meurent entre 8 et 10 jpf. A l'état hétérozygote, les poissons sont parfaitement viables et fertiles et semblent non affectés.

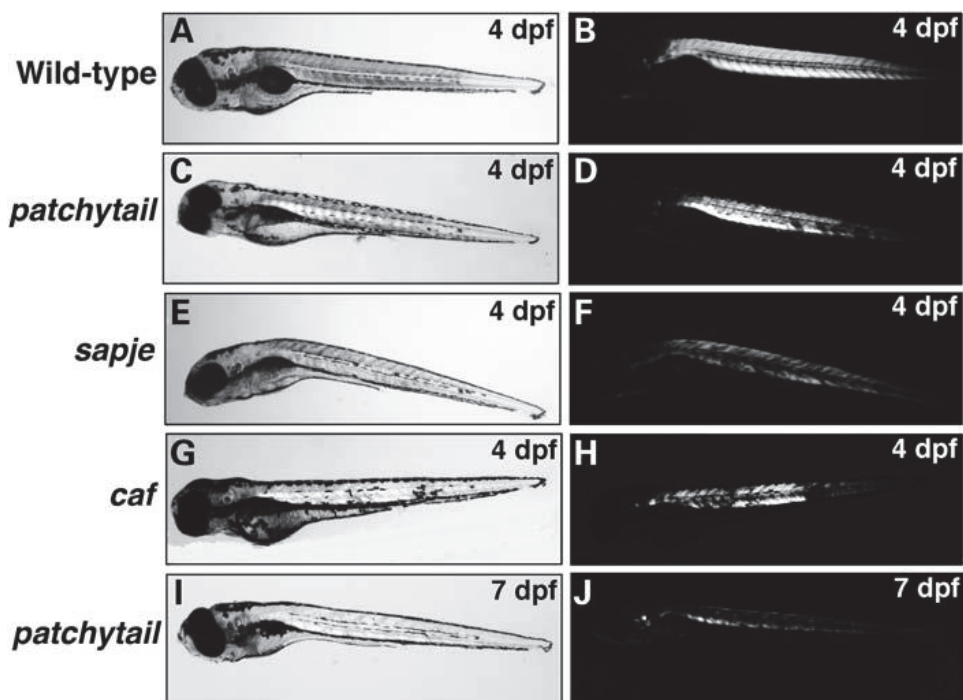


Figure 45. Le mutant *patchytail* présente une diminution de ses propriétés de biréfringence et donc une dégénérescence musculaire similaire aux phénotypes dystrophiques. (A et B) Poisson sauvage à 4 jpf présentant une forte capacité de biréfringence caractéristique de muscles bien organisés. (C et D) Le mutant *patchytail* paraît normal mais présente une perte de ses propriétés de birefringence et une dégénérescence musculaire dans les somites postérieurs en lumière polarisée à 4 jpf. La sévérité de la dégénérescence musculaire des mutants *patchytail* est moindre comparée aux *sapje* (E et F) et *caf* (G et H). (I et J) A 7 jpf, la dégénérescence musculaire des mutants *patchytail* s'étend à l'entièreté des somites. D'après Gupta et al., 2011.

L'absence de DAG est démontrée chez les mutants *patchytail* par immunofluorescence, et s'accompagne d'une réduction de signal de la laminine α -2 au niveau des myoseptes. L'aire d'expression de la laminine α -2 est élargie comparée au WT. La présence de la dystrophine est également fortement réduite. L'absence de DAG conduit donc à une modification d'expression de ses partenaires au sein du complexe DAPC. A 3 jpf, l'ultrastructure des muscles squelettiques, observée par MET, semble normale et seuls de petites déchirures au sein de la MEC du myosepte sont visibles (Figure 46). A 7 jpf, les myoseptes sont très dilatés et présentent plus de déchirures au niveau de la MEC sans que des ruptures de sarcolemme ne soient décrites par les auteurs. En sections transversales, les contours des fibres musculaires adjacentes chez les mutants semblent irréguliers comparés aux sauvages.

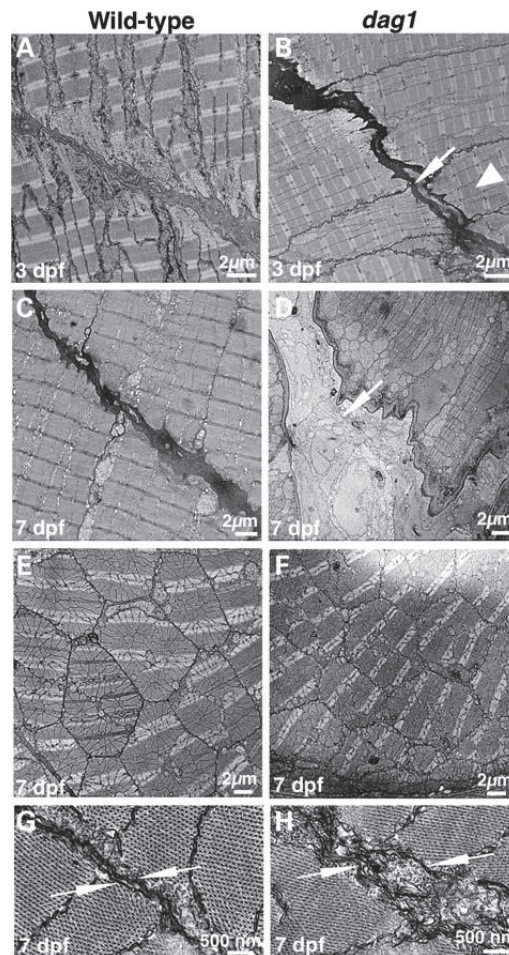


Figure 46. Analyse en MET de muscles squelettiques de poissons sauvage et mutant *dag1* à 3 et 7 jpf. Les myoseptes des embryons contrôles (A) sont compacts et présentent des structures denses aux électrons alors que les myoseptes des mutants *dag1* présentent de légères déchirures (flèche) du côté MEC à 3jpf (B). Les myofibrilles (tête de flèche) semblent normales. Par comparaison avec le poisson sauvage (C), le myosepte des poissons mutants (D) présentent de nombreuses déchirures et une augmentation de son diamètre (flèche) à 7 jpf. Les sections transversales de muscles montrent la régularité de l'organisation des myofibrilles et de leur sarcolemme chez les poissons sauvages (E) au contraire des poissons mutants (F). Les frontières sarcolemmiques sont plus facilement analysables à fort grandissement (flèches G et H) D'après Gupta et al., 2011

L'ultrastructure des tubules-t (dans lesquels le DAG est exprimé en condition normale) est également altérée et ce dès 3 jpf, au sein des triades (Figure 47). Ce défaut semble donc précéder l'irrégularité de contours des fibres musculaires décrites à 7 jours de développement.

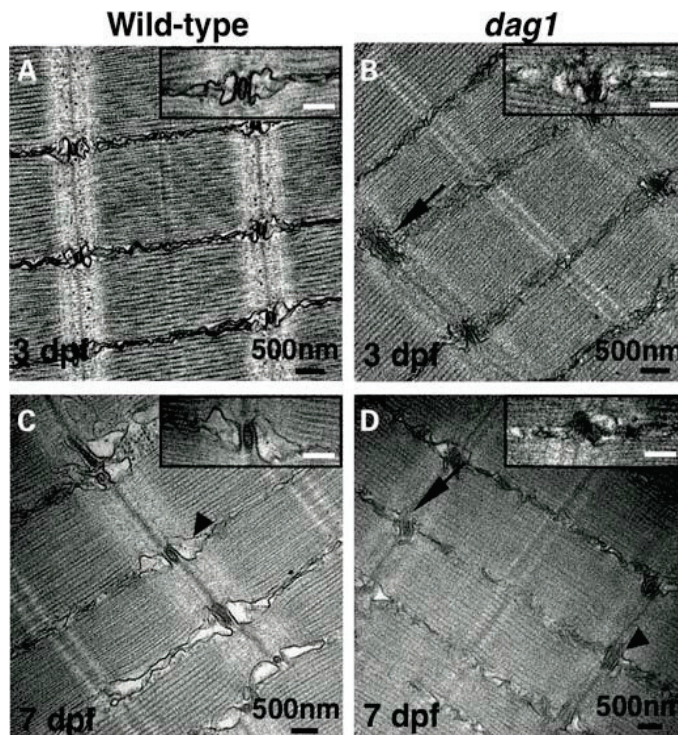


Figure 47. Ultrastructure des tubules-t chez les poissons sauvages et mutants *dag1* à 3 et 7 jpf. (A et B) Les tubules-t sont correctement formés chez les poissons contrôles mais pas chez les mutants à 3 jpf (B, flèche). (C et D) Tubules-t (D flèche) et vésicules terminales du réticulum sarcoplasmique (tête de flèche) sont malformés chez les mutants comparés aux sauvages (Barre d'échelle dans les encarts 100 nm). Modifié d'après Gupta et al., 2011

A nouveau, le poisson zèbre semble donc être un modèle de choix, cette fois-ci pour étudier la pathogénèse des dystroglycanopathies, sans létalité embryonnaire précoce comme c'est le cas pour d'autres modèles vertébrés évoqués précédemment.

- La kinase liée aux intégrines (ilk)

Comme expliqué précédemment, le dystroglycan et l'intégrine $\alpha7\beta1$, tous deux présents à la JMT, sont les récepteurs des laminines. Les souris déficientes en *Itga7* présentent une dystrophie musculaire progressive consécutive à un défaut de la JMT. Les deux complexes de la JMT initialement décrits comme ayant des fonctions indépendantes, semblent pourtant interagir puisque chez les souris déficientes à la fois pour l'*itga7* et la dystrophine, une interaction génétique est observée, indiquant une complémentarité entre les deux systèmes

d'ancrage (Rooney et al., 2006 ; Postel et al., 2008). Malgré le rôle démontré de l'intégrine $\alpha\beta 1$ dans l'intégrité du tissu musculaire, la littérature concernant la compréhension des interactions entre cette intégrine et ses partenaires est peu abondante. Il est connu que la protéine ILK est capable de se lier au domaine intracellulaire de la sous-unité $\beta 1$. ILK interagit également avec la paxilline, PINCH et la β -parvine pour les connecter au cytosquelette d'actine. Le costamère est le point d'ancrage des myofibrilles au sarcolemme par le biais de la desmine (Figure 24). Il participe donc à l'organisation de la cellule musculaire en servant de point d'attache, alignant alors les myofibrilles au niveau de leurs disques Z. La kinase ILK est présente au niveau des costamères des cellules cardiaques et du sarcolemme des cellules musculaires squelettiques. Ainsi, les souris mais aussi les poissons déficients en ILK présentent des contractions cardiaques réduites provoquant une cardiomyopathie (Bendig et al., 2006) similaire aux patients portant des mutations sur le gène d'ILK ou du domaine de liaison à l'intégrine de la laminine 4. Les mutants poissons zèbres *msq* (main squeeze) portent la mutation L308P qui touche le domaine sérine/thréonine kinase d'ILK entraînant une réduction de son activité kinase. Ils présentent un œdème péricardiaque sans défaut évident de flux sanguin jusqu'à 72hpf. Alors, les contractions ventriculaires des mutants *msq* vont progressivement diminuer jusqu'à devenir inexistantes à 96 hpf. Les cardiomyocytes ventriculaires sont pourtant tout à fait « normaux » et plus globalement, la morphogenèse du cœur se fait normalement. Les auteurs montrent que la réduction de l'activité kinase d'ILK des mutants *msq* empêche la fixation d'ILK sur la β -parvine (protéines des disques Z). Le réseau intégrine-ILK- β -parvine est donc important dans la régulation des contractions cardiaques du poisson zèbre puisqu'il déclenche notamment une augmentation de l'expression du facteur natriurétique atrial (anf) et du VEGF, ce qui a pour conséquence une augmentation transitoire du flux calcique cardiaque, et donc une augmentation des contractions cardiaques (Bendig et al., 2006). En 2007, Gheyara et ses collaborateurs décrivent aussi un phénotype dystrophique chez les souris de 9 mois en l'absence d'ILK mais les mécanismes restent non identifiés (Gheyara et al., 2007). De même, chez le nématode et la drosophile, ILK semble avoir, respectivement, un rôle essentiel au niveau du sarcolemme et pour l'intégrité et la fonction des muscles nécessaires au vol (Postel et al., 2008).

Le mode d'action d'ILK est assez controversé puisqu'*in vitro*, l'activité kinase a été montrée comme étant importante pour induire les voies de signalisation en aval des récepteurs intégrines (Dedhar, 2000; Delcommenne et al., 1998; Persad et al., 2001), alors que les modèles *in vivo* (utilisation de mutants « kinase-dead d'ILK) semblent démontrer que son activité kinase n'est pas requise pour sa fonction dans le muscle (Zervas et al., 2001;

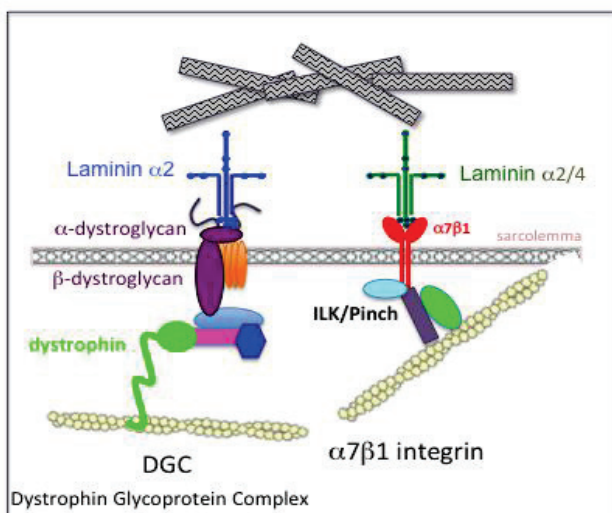
Mackinnon et al., 2002). Ceci suggère que pour maintenir l'intégrité du muscle, ILK agirait principalement comme une protéine d'échafaudage.

Un autre mutant d'*ilk* existe chez le poisson zèbre. Le mutant lost-contact (*loc*) obtenu par mutagenèse ENU présente un codon stop prématuré dans le gène *ilk* entraînant une perte complète de son expression. Les poissons *loc* présentent ainsi des détachements de fibres musculaires squelettiques. Ces défauts sont nettement visibles à 4 jpf, donc, eux aussi, plus tardivement que les mutants *caf*. Le recrutement d'ILK à la JMT nécessite la présence de la laminine 4 et de l'intégrine $\alpha 7$. Les travaux de Postel et ses collaborateurs démontrent qu'ILK n'est pas indispensable à l'assemblage de la JMT mais est requise pour renforcer l'adhésion des fibres musculaires à la lame basale lorsque les forces mécaniques augmentent lors des contractions musculaires. Ces travaux sont en accord avec le mode d'action d'ILK démontré *in vitro* puisque les auteurs montrent que l'activité d'ILK renforçant l'adhésion des myofibres nécessite la présence d'un domaine kinase fonctionnel (Postel et al., 2008). Ils identifient également une nouvelle interaction entre ILK et MLP (sarcomeric muscle LIM protein) et confirment qu'ILK se lie à la β -parvine, protéine essentielle à l'adhésion des muscles squelettiques au tendon. Initialement, ILK se trouve dans tout le sarcoplasme des myoblastes pour être ensuite recrutée aux frontières des somites au moment où les myoblastes s'allongent et que la JMT se forme, ce qui fait écho au patron d'expression du collagène XXII (Charvet et al., 2013).

Les premiers modèles d'animaux invalidés pour certains composants de la JMT ont fortement contribué à notre connaissance de cette structure. Ainsi, la figure 48 ci-dessous récapitule les différents mutants de la JMT qui ont déjà été identifiés chez le poisson zèbre. Cependant, une étude plus exhaustive de la JMT est nécessaire pour mieux comprendre les pathologies du muscle. Il est donc crucial de générer des modèles animaux pour identifier de nouveaux gènes causatifs, caractériser les protéines qui en sont issues et explorer la physiopathologie de ces maladies ou encore tester et/ou proposer des pistes thérapeutiques.

Protéines des deux systèmes de linkage de la JMT

Phénotype de détachement



Mutants

- *Candyfloss/lama2*
- *Patchytail/dag1/dystroglycan*
- *Sapje/dystrophin*
- *Lost-contact / ilk*

Morphants

- *Lama4* morphants
- *Integrin $\alpha 7$* morphants

Basset et al., 2003; Hall et al., 2007; Postel et al., 2008; Ingham, 2009; Gupta et al., 2011

Figure 48. Mutants et morphants dystrophiques chez le poisson zèbre.

Modifié d'après un schéma de F. Ruggiero.

Si les protéines des complexes de la JMT sont indispensables à une activité normale du muscle squelettique, d'autres complexes sont bien évidemment nécessaires, parmi lesquels le complexe protéique du couplage excitation contraction ou les protéines constitutives des sarcomères. Ainsi, l'absence de protéines de ces complexes conduit à des défauts de fonctionnement du muscle.

- Autres mutants poissons zèbres présentant des pathologies musculaires

D'autres mutants ciblant des acteurs importants du muscle squelettique (hors complexe de la JMT) ont été identifiés. Je n'en citerai ici que quelques-uns me semblant apporter des informations pertinentes en regard des études menées lors de ma thèse, les autres étant listés dans le Tableau 3.

Le gène *POPDC1* contenant un domaine Popeye code pour une protéine de liaison à l'AMP cyclique, cAMP, abondamment exprimée dans les muscles squelettiques. Les protéines POPDC sont initialement localisées à la membrane plasmique puis dans les tubules-t, mais elles ont aussi été identifiées au niveau de l'enveloppe nucléaire des cellules musculaires striées. Une interaction physique entre POPDC, CAV3 et le canal potassique TREK-1 a été reportée. En 2016, Schindler et ses collaborateurs identifient une mutation de *POPDC1* (mutation homozygote faux-sens affectant le domaine Popeye) chez deux patients atteints d'arythmie cardiaque et de dystrophie musculaire des ceintures (Schindler, 2016), et démontrent chez ces patients une réduction de 50% de l'affinité de POPDC mutée pour cAMP. Leur analyse par MET révèle une membrane plasmique discontinue et la présence anormale de vacuoles sub-membranaires (Figure 49)

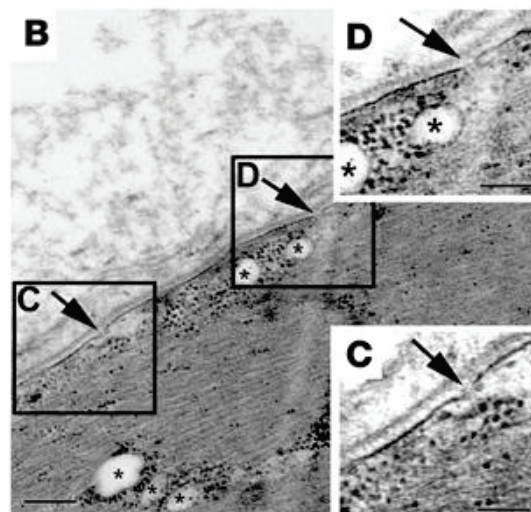


Figure 49: Analyse en MET du muscle squelettique d'un patient présentant une mutation du gène *POPDC1*. La photo B révèle la présence de discontinuités de la membrane plasmique (flèches) et de vacuoles subsarcolemmales et inter-myofibrillaires (asterisks). C et D montrent des agrandissements des zones identifiées en B. Barre d'échelle: 2 µm (B); 1 µm (C et D). Modifié d'après Schindler, 2016.

Utilisant une lignée de cellules musculaires cardiaques murine, les auteurs démontrent que cette même mutation de POPDC1 induit une hyperpolarisation qui va diminuer la vitesse de propagation des potentiels d'action. De façon intéressante, la création d'un mutant de poisson zèbre reproduisant la mutation humaine par la technologie TALEN provoque un phénotype musculaire et cardiaque similaire à celui rencontré chez les patients (Figure 50)

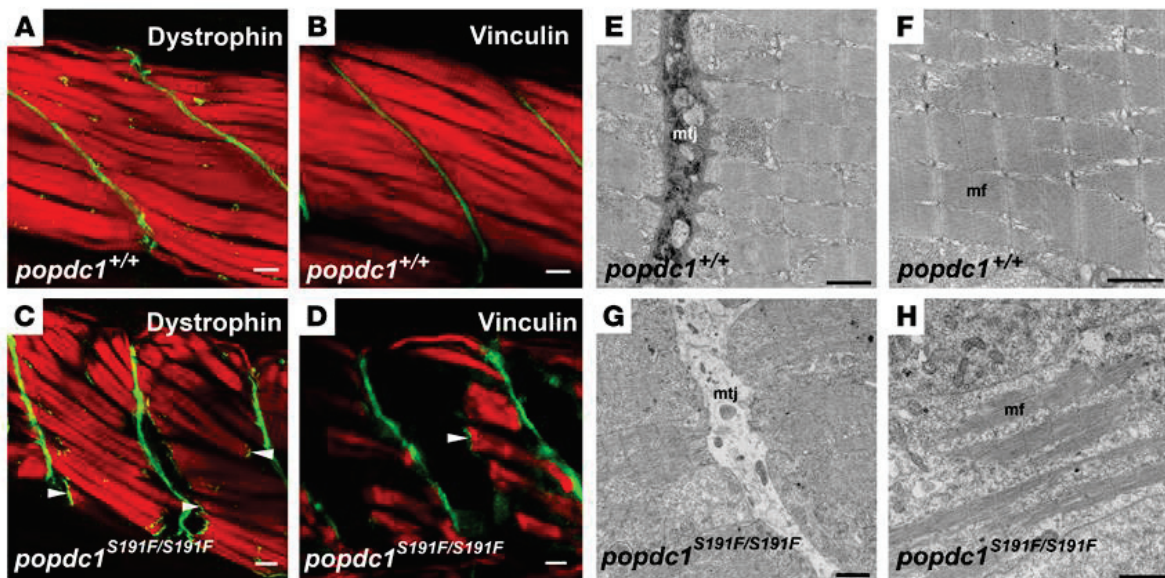


Figure 50. Le poisson zèbre mutant *popdc1S191F* présente une dystrophie musculaire. (A–D) Analyse par microscopie confocale du marquage de l'actine (phalloïdine couplée à un fluorochrome rouge) et de la dystrophine (en vert, clichés A et C) ou de la vinculine (en vert, clichés B et D) dans les muscles squelettiques du tronc des poissons sauvages (*popdc1*^{+/+}, A et B) ou mutants homozygotes (*popdc1*^{S191F/S191F}, C et D). Les clichés représentent des vues latérales de la musculature du tronc de larves de 5 jpf. Les têtes de flèche indiquent la présence de dystrophine ou vinculine à l'extrémité des fibres détachées. (E–H) Analyse en MET des muscles du tronc des poissons sauvages (*popdc1*^{+/+}, E et F) ou mutants homozygotes (*popdc1*^{S191F/S191F}, G et H) Barres d'échelle: 10 µm (A–D); 1 µm (E et F); 2 µm (G et H). mf, myofibrilles. Modifié d'après Schindler, 2016

La pénétrance du phénotype à 5 jpf, est réduite au tiers des embryons. Les fibres musculaires des mutants se détachent de la JMT et se rétractent. La présence de dystrophine ou vinculine à l'extrémité des fibres détachées suggère que les fibres détachées de la JMT sont probablement intactes. Le myosepte des mutants incorrectement identifié par les auteurs comme étant la JMT présente moins de matériel dense aux électrons. De par nos connaissances, nous pouvons compléter leurs observations en décrivant une forte diminution de la quantité de collagène au sein du myosepte.

D'autres composants primordiaux pour le fonctionnement du muscle sont les protéines des sarcomères. Les composants principaux des sarcomères sont les filaments

épais riches en myosine que l'on retrouve entre les filaments fins composés principalement d'actine. Les filaments fins sont ancrés aux disques Z et par glissement entre les filaments épais, une force de contraction est générée. Contrairement à l'organisation sarcomérique qui est bien documentée, le processus initial d'assemblage du sarcomère reste sujet à controverse. De façon intéressante, un modèle récent souligne l'impact des tensions mécaniques muscle-tendon dans la myofibrillogenèse (Weitkunat et al., 2014). Ainsi, chez la drosophile, il y a d'abord attachement des fibres musculaires au tendon puis assemblage des myofibrilles. Cet attachement coïncide avec une augmentation des tensions mécaniques. Si l'on compromet l'attachement initial et le recrutement de l'intégrine, de sévères défauts de myofibrillogenèse sont constatés.

Chez l'homme, des mutations dans les gènes codants certains des composants des sarcomères peuvent conduire à des pathologies musculaires. Ainsi, une mutation non-sens dans le dernier exon codant du gène *MYO18B*, codant la myosine XVIIIIB, a été découverte chez deux patients atteints de myopathie à némaline qui se caractérise par une faiblesse et une hypotonie des muscles du visage, fléchisseurs du cou et proximaux des membres. A l'échelle cellulaire, les myopathies à némaline se définissent par la présence d'agrégats protéiques sous forme de bâtonnets (les némalines) dans les fibres musculaires. La myosine XVIIIIB est une chaîne lourde de myosine. Une molécule de myosine est en effet un complexe hexamérique composé de deux chaînes lourdes et quatre chaînes légères. Dans les muscles squelettiques, les multiples complexes de myosine s'assemblent pour former les filaments épais qui s'intègrent au sein des sarcomères. Les souris invalidées pour *Myo18b* présentent des défauts du myocarde avec un mauvais alignement des filaments fins et épais des sarcomères. Bien que chez la souris sauvage, *Myo18b* soit aussi exprimé au niveau des muscles squelettiques, aucun défaut des muscles squelettiques n'a été décrit pour les souris *Myo18b*^{-/-}. Chez le poisson zèbre, le mutant *sig* pour schläfrig qui signifie « fatigué » en allemand, a été identifié après mutagenèse ENU. Il présente un défaut d'épissage de *myo18b* (myosine 18b): l'intron se situant entre les exons 21 et 22 n'est que partiellement épissé. Ceci génère une insertion « in-frame » qui induit la présence de codons stop prématurés. Cependant, la protéine fonctionnelle est également présente chez les mutants, la perte de fonction n'est donc que partielle. Les muscles du tronc des mutants *sig* ont des sarcomères qui s'assemblent mais avec un alignement incorrect des filaments fins d'actine et épais de myosine. Les mutants *sig* homozygotes meurent à 2 spf. Un mutant a également été créé grâce à la technologie CRISPR/Cas9 pour invalider totalement cette même protéine. Ceci conduit à une perte totale de la structure sarcomérique des muscles squelettiques rapides (Berger et al., 2017). Ces deux mutants présentent des défauts des muscles squelettiques, ce qui en fait de meilleurs modèles de la pathologie humaine que le

mutant murin qui ne présente que des défauts cardiaques. Cependant, les muscles affectés de ces poissons ne présentent pas d'agrégats en bâtonnets comme ceux retrouvés chez l'homme. Ceci peut s'expliquer par le fait que la pathologie humaine est due à une mutation faux-sens, si bien qu'une protéine délétère est présente dans la cellule où elle a tendance à former des agrégats, alors que les mutants de poisson zèbre ne présentent qu'une diminution partielle ou totale de la protéine sauvage, mais ils ne produisent pas de protéine mutée.

Chez le poisson zèbre, les mutants *trg* (*träge* signifie « inerte » en allemand), ne produisent plus la tropomoduline-4, un régulateur de la longueur et de la stabilité des filaments fins, ce qui provoque une dispersion des filaments fins dans les muscles squelettiques. La tropomoduline 4 n'a pas été directement associée à des myopathies humaines mais le phénotype des poissons permet de proposer *tmod4* comme un gène cible pour expliquer certaines myopathies à némaline (Berger et al., 2014).

Il est également intéressant de noter que chez les mutants *stretched out* (*sot*) dépourvus de filamine C qui est une protéine liant l'actine (FNLC), une accumulation de matériel filamentueux au niveau des myoseptes est observée en MET, ainsi qu'une infiltration des mitochondries dans les zones dépourvues en myofibrilles dans les muscles lents uniquement (Ruparelia et al., 2012, 2016).

Enfin, les poissons mutants sur les gènes de collagène (*col6a1* ou *col15a1b*) montrent des défauts de développement du système neuromusculaire, notamment décrits par notre équipe de recherche (Guillon et al., 2016) qui sont décrits dans la revue présentée en Annexe 1. Par exemple, un mutant poisson zèbre généré par la technologie TALEN reproduit une des plus fréquentes mutations retrouvée chez les patients atteints de MB (absence de l'exon 14 de *col6a1*). Ces poissons présentent un réticulum sarcoplasmique dilaté et des défauts de mitochondries récapitulant le phénotype progressif de la maladie. Une telle lignée paraît ainsi d'un intérêt majeur afin de disséquer les mécanismes de la maladie et de préciser le rôle du collagène VI dans la physiologie du muscle et au cours de sa régénération (Radev et al., 2015).

Dans leur ensemble, ces études démontrent que le poisson zèbre est un très bon modèle pour aborder les pathologies du système musculaire squelettique. L'utilisation des « mutants musculaires » contribue à la compréhension de la pathogenèse mais peut également s'avérer pertinent pour mettre en œuvre des schémas thérapeutiques de dépistage.

3.9 Analyse de l'activité musculaire du poisson zèbre

Nous disposons au laboratoire de diverses techniques permettant d'analyser le développement des poissons et leurs phénotypes: analyses histologiques, analyses en microscopie à fluorescence et microscopie électronique, analyses génétiques et moléculaires...Et pour réaliser ces études, nous avons l'expertise et les outils nécessaires pour travailler avec des stades précoces de développement (0 à 5 jpf). Cependant, comme vous le lirez dans le second article, qui est au cœur de mon projet de thèse, la génération des poissons *co/22a1^{-/-}* m'a conduite à travailler avec des stades plus tardifs et adultes. J'ai donc dû adapter certaines méthodes d'analyse et j'ai très vite été amenée à rechercher par quelle méthode originale et fonctionnelle je pourrai accéder à des paramètres de mesures de l'activité musculaire. C'est ainsi que j'ai choisi de m'orienter vers deux méthodes permettant d'apprécier les conséquences fonctionnelles de l'inactivation d'un gène « important » (*co/22a1*) dans le développement et le maintien du muscle squelettique. J'ai ainsi choisi d'analyser l'activité musculaire des poissons zèbres au travers de deux approches expérimentales: des mesures de l'amplitude de contraction musculaire par électrophysiologie, pour lesquelles j'ai dû perfectionner la technique préalablement utilisée au laboratoire, en collaboration avec B. Allard (INMG, Lyon), et des mesures de capacités de nage des poissons par test de nage par pallier en collaboration avec C. Lefrançois.

- Mesures de forces de contractions

Dans le premier article que vous trouverez en partie résultats (Charvet et al., 2013), nous avons collaboré avec B. Allard afin de mesurer l'amplitude des contractions musculaires des larves de poissons zèbre. Cependant, nous n'étions pas entièrement satisfaits par les mesures réalisées du fait d'un placement assez peu précis des minuties placées de part et d'autre du poisson et susceptible de créer un biais dans nos mesures. Or, dans l'étude de Dou et collaborateurs en 2008, les auteurs proposent une autre méthode pour analyser les fonctions mécaniques des muscles de larves de poisson zèbre, en positionnant des clips aluminium de part et d'autre des larves afin de mesurer plus précisément les contractions et de mieux contrôler l'étirement musculaire (Dou et al., 2008). Je me suis donc inspirée de cette étude pour fabriquer des clips en aluminium et nous avons mis au point un système permettant d'optimiser les mesures tout en contrôlant précisément tous les paramètres de calibration du système, de stimulation des contractions, d'étirement des poissons et d'enregistrement des amplitudes des contractions générées (Figure 51).

L'ajout de minuscules gouttelettes de colle chirurgicale déposées à l'aide de micro-capillaires en verre sur les clips en aluminium permet encore d'optimiser la mesure.

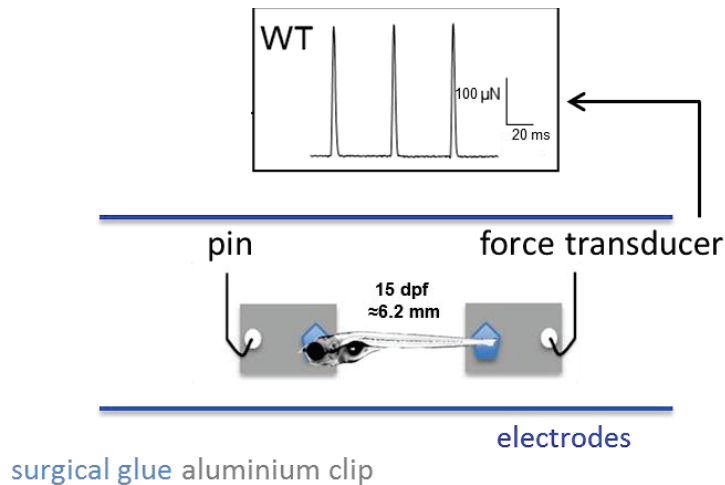


Figure 51. Schéma de la mesure des contractions musculaires chez la larve de poisson zèbre de 2 semaines. Sous anesthésie (tricaine), la tête des larves est pincée afin d'empêcher toute contraction musculaire non déclenchées par les stimuli électriques que nous contrôlons. Les larves sont méticuleusement fixées à l'aide de colle chirurgicale sur des clips en aluminium fabriqués au laboratoire et placés au niveau de la tête et de l'extrémité caudale des poissons. L'amplitude des contractions déclenchées à la suite d'impulsions électriques générées entre les électrodes est mesurée via un transducteur mécano-électrique. Une fois correctement positionné, pour chaque poisson testé, l'intensité des impulsions électriques est progressivement augmentée jusqu'à l'obtention d'une réponse contractile maximale. Cette intensité de stimulation est sélectionnée pour réaliser les mesures (Fiche protocole n°11). Une fois l'intensité de stimulation sélectionnée, le corps du poisson est graduellement étiré et relâché (grâce à un micromanipulateur) jusqu'à obtention d'une réponse contractile maximale. Le transducteur mécano-électrique étant sensible aux vibrations, aux bruits et à la lumière, les manipulations sont donc réalisées à l'abri de la lumière, sur une table antivibratoire et une cage de faraday est utilisée pour limiter le bruit de fond généré par les autres appareils électriques.

- Evaluation des performances de nage
 - Les différents types de nage

Les poissons présentent différents types de nage (Figure 52) qui peuvent être classés en trois catégories principales en fonction du type d'effort, des muscles sollicités et des substrats énergétiques utilisés. La nage aérobie soutenue dite nage stable correspond à un effort endurant du poisson sur une longue période (de l'ordre de plusieurs heures) sans interruption et sans fatigue musculaire. Elle peut être observée lors d'exploration de l'habitat ou durant les migrations. Le second type de nage présente, elle, un caractère anaérobie et est qualifiée d'instable; elle correspond à un effort intense de courte durée (de l'ordre de quelques secondes) de type sprint. Elle est typiquement rencontrée pendant les périodes d'accélération, comme par exemple un départ rapide lors de la réponse de fuite ou d'attaque au cours des interactions proie-prédateur. Entre ces 2 extrêmes, la nage est dite prolongée et implique le recrutement de tous les types de fibres musculaires et donc l'utilisation du

métabolisme aérobie et anaérobie. Ainsi, lors des migrations, les saumons remontent les rivières: milieux turbulents aux vitesses de courant variables.

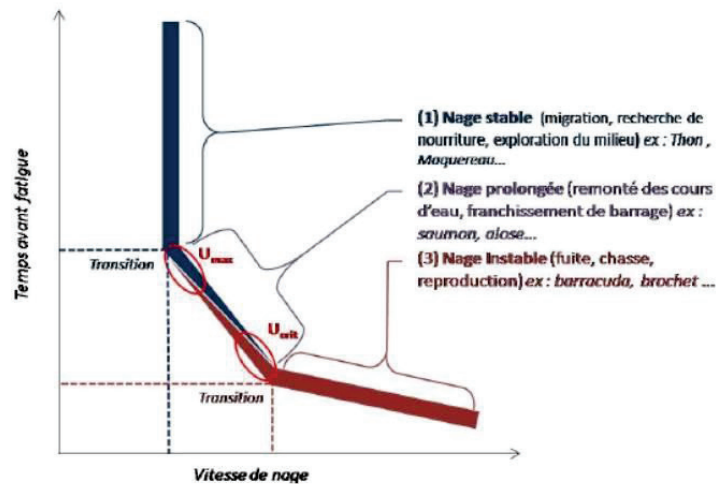


Figure 52: Les différents types de nage chez les téléostéens en fonction de la vitesse de nage et du temps avant la fatigue. Les espèces citées en exemple sont particulièrement bien adaptées aux types de nages auxquelles elles sont associées. U_{max} représente la vitesse de nage maximale où une partie de l'effort de nage commence à être assurée par du métabolisme anaérobie. U_{crit} est la vitesse de nage critique à partir de laquelle l'individu n'est plus capable de fournir un effort face à un courant imposé de manière expérimentale sous forme de paliers successifs. Modifié d'après Videler, 1993.

▪ Les tests de nage

La grande majorité des tests de performance de nage consiste à étudier cette nage prolongée. Les poissons sont pour cela contraints à nager individuellement dans un tunnel de nage où la vitesse de courant est contrôlée (Gerger et al., 2014; Lucas et al., 2016). La vitesse de nage critique ou U_{crit} (*i.e.* la vitesse maximale atteinte par un poisson au cours d'un test de performance de nage; Hammer, 1995) est alors fréquemment employée comme indicateur des capacités de nage d'un poisson. La vitesse est augmentée progressivement par paliers (ou step protocol, Figure 53), et U_{crit} est estimée (Fiche protocole n°12). Même si peu communs, il existe également des tests à l'effort où la vitesse est maintenue constante. Les tunnels de nage sont dans certains cas également conçus pour servir de respiromètre hermétique, qui permettent d'estimer le coût énergétique associé à l'effort de nage (Hammer, 1995).

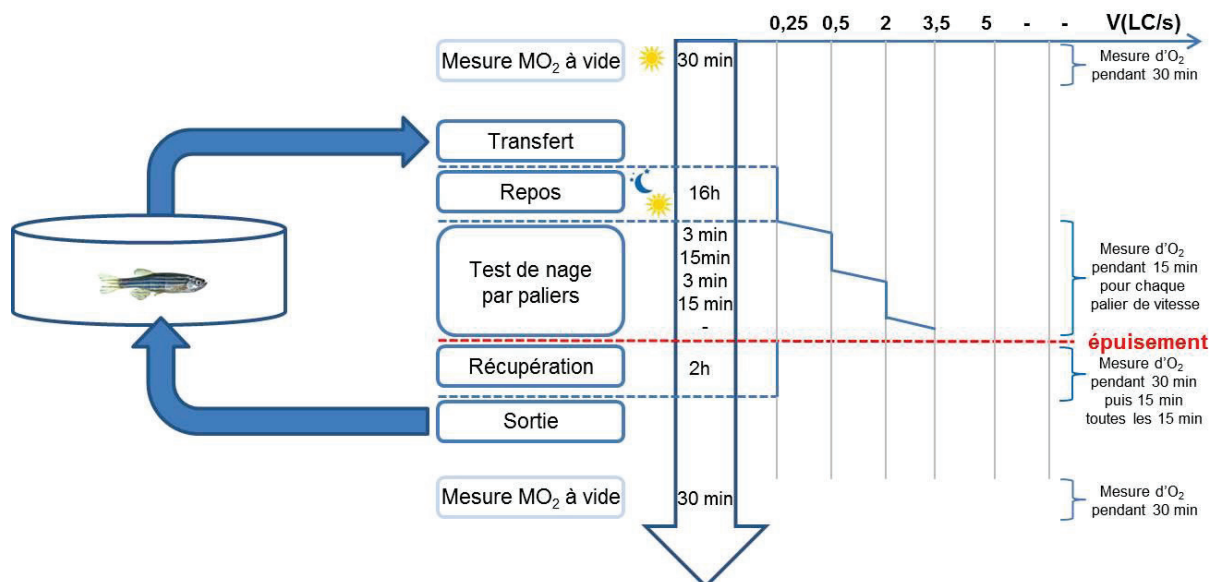


Figure 53: Le test de nage par palier. Les différentes phases du test sont affichées dans les encadrés à gauche de la figure. Au centre de la figure, la flèche indique l'ordre chronologique de chaque étape et sa durée. L'axe horizontal du haut indique les différentes vitesses de nage V (en LC/s) auxquelles sont soumis les poissons zèbres dans notre expérience.

Au cours du test de nage, le comportement de l'individu est précautionneusement observé. Pendant les premiers paliers de vitesse, on s'attend à ce que l'individu présente des mouvements amples et réguliers de la nageoire caudale et adopte une position relativement stable dans la chambre. Ces caractéristiques sont propres à une nage stable, basée sur le recrutement des fibres musculaires aérobie et donc associée à une demande en oxygène croissante lorsque l'effort s'intensifie. Au-delà d'une certaine vitesse, des mouvements plus spasmodiques du corps et de la nageoire caudale vont apparaître, caractéristiques de la nage prolongée. Une part de l'effort de nage commence alors à être puisée dans le métabolisme anaérobie. Les irrégularités de la nage vont s'accroître avec le temps, la vitesse du courant augmentant. L'individu va finir par se laisser glisser et repartir d'un mouvement brusque (« Burst and Glide »), fournissant un effort court et intense. La part anaérobie va donc augmenter progressivement jusqu'à la vitesse de nage critique de l'animal c'est-à-dire jusqu'à son épuisement.

- Critères mesurés au cours des tests de performance de nage par paliers

Étant donné que la U_{crit} dépend grandement de la capacité du poisson à fournir l'énergie nécessaire à l'activité de nage prolongée, ces tests de performance de nage sont souvent associés à des mesures de performance métabolique. Il est alors admis que la U_{crit} d'un individu est limitée par l'approvisionnement en oxygène des tissus, lié notamment à sa diffusion au niveau des branchies et son transport dans le sang ; ainsi une diminution de U_{crit} montre une diminution des capacités métaboliques générales d'un individu (Hammer, 1995).

U_{crit} est alors calculée ainsi que la consommation d'oxygène (MO_2) (Fiche protocole n°12-Matériels et Méthodes et Annexe 5)

L'étude de la bioénergétique permet d'évaluer la répartition des allocations énergétiques au sein de l'organisme en fonction de ses besoins et de ses contraintes environnementales.

- Concept de Fry

L'élément central du concept de Fry est la notion de capacité métabolique énergétique (Fry, 1971). La puissance énergétique d'un organisme représente la quantité d'énergie produite par unité de temps (Figure 54). La quantité d'énergie, principalement sous forme d'ATP, étant majoritairement issue de processus aérobies (par exemple l'utilisation du glucose par la voie aérobie produit environ 15 fois plus d'ATP que son utilisation par la voie anaérobie), la puissance énergétique d'un organisme est souvent estimée à travers son taux métabolique aérobie ou consommation d'oxygène (Fry, 1971; Lucas et al., 2014).

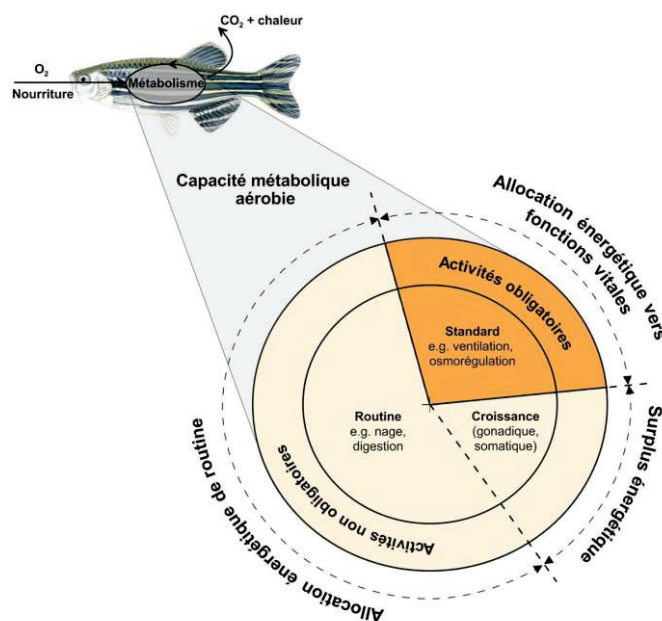


Figure 54: La capacité métabolique aérobie en trois compartiments : l'allocation énergétique vers les fonctions vitales obligatoires (taux métabolique standard), l'allocation énergétique de routine et le surplus énergétique pour les activités non-obligatoires ou discrétionnaires. Extrait de la thèse de Julie Lucas, 2015.

- Taux métabolique standard, taux métabolique actif et registre métabolique aérobie.

Le taux métabolique actif (AMR, active metabolic rate) est le métabolisme aérobie maximal d'un organisme mesuré lorsqu'il est en situation d'activité intense, alors que le taux métabolique standard (SMR, standard metabolic rate) est le métabolisme minimal nécessaire au maintien des activités indispensables à la survie (e.g. travail de la pompe

cardiaque) mesuré chez des individus au repos et à jeun (Brett, 1964). Le registre aérobie (AMS, aerobic metabolic scope) est la différence entre AMR et SMR et représente la capacité d'un organisme à fournir l'oxygène nécessaire aux activités. La dette en oxygène (DO_2), en $mg\ O_2\ g^{-1}$, correspond à l'oxygène nécessaire pour restaurer les stocks d'oxygène des tissus et cellules, et rétablir les déséquilibres biochimiques (Figure 55), osmotiques, en lactate et glycogène (notamment utilisés en anaérobie) de l'individu. Elle est calculée à partir des valeurs de consommation d'oxygène (MO_2) obtenues pendant la phase de récupération.

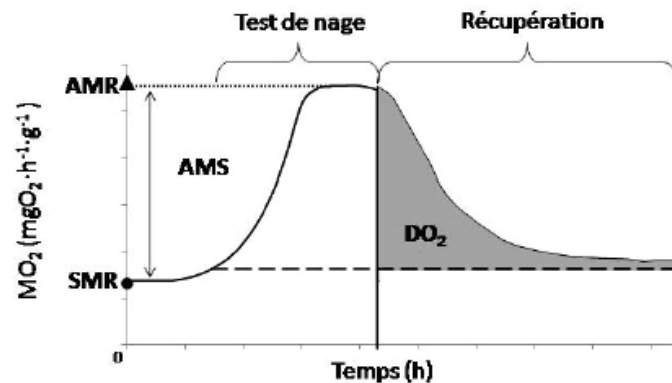


Figure 55: La consommation d'oxygène pendant le test de nage et en phase de récupération. La ligne en tirets représente la MO_2 obtenue pour le premier palier du test de nage qui sert de référence pour le calcul de la DO_2 . Modifié d'après Brett, 1964.

- Sources potentielles d'artéfacts pour les tests de performance de nage

Diverses sources potentielles d'erreur (Plaut, 2000) sont à considérer lors des tests de performance utilisant les systèmes les plus courants de tunnel de nage.

Ainsi, on peut citer quatre sources principales d'artéfacts:

1. Les caractéristiques du flux : les utilisateurs mettent en place différents systèmes au sein du tunnel de nage (série de structures plastiques en nid d'abeille, tuyaux de petits diamètres...) dans le but de mettre en place un flux laminaire d'eau. Malheureusement, le flux d'eau est rarement parfaitement laminaire et dans la plupart des cas, le flux est souvent uniformément micro-turbulent. Or, dans leur habitat naturel, les poissons nagent plus généralement en eau calme ou turbulente, et expérimentent donc peu ce genre de flux.
2. L'effet paroi : dans un tunnel de nage, des zones « limites » apparaissent près des parois du tunnel, au cours de l'expérience et varie selon la vitesse du flux. Le poisson peut aussi ressentir une résonance de pression du fait de son propre mouvement et se retrouver comme « repoussé » de la paroi. Ainsi, le poisson peut donc être contraint de nager à une autre vitesse que celle supposée (i.e. celle du flux d'eau

généralisé par l'expérimentateur). Pour pallier à cela, un ratio est respecté de façon à ce que la section de poisson soit faible par rapport à celle de la chambre de nage....Il est important de noter toutefois que l'utilisation de chambres trop grandes pourrait rendre difficile la mesure de consommation d'oxygène. En effet, un petit animal dans un gros volume ne va pas consommer suffisamment d'oxygène pour permettre une bonne détection des variations d'O₂.

3. Le poisson lui-même en masquant une partie de l'aire du tunnel peut générer une vitesse supérieure à celle envisagée et créer des pressions autour de sa propre masse corporelle. De même que pour l'effet paroi, cet effet est communément corrigé en faisant en sorte que la section transversale du poisson ne représente pas plus de 10% de la section transversale du tunnel de nage.
4. Sous-estimation de la U_{crit} : la performance de nage critique est en générale mesurée individuellement. Or, de nombreux poissons se déplacent naturellement en bancs (Wiwchar et al., 2018). Il est donc possible que l'on sous-estime la performance des poissons. Logan *et al.* ont ainsi comparé les performances de nage de poissons zèbres *Danio rerio* individuels et en groupe de 3, 5 ou 10. Ils ont constaté que les poissons nagent plus vite en bancs et que la cohésion des poissons augmente parallèlement à la vitesse d'écoulement. Cette plus grande U_{crit} s'explique par un plus grand nombre de poissons nageant plus longtemps à des vitesses moins grandes. L'augmentation de la U_{crit} pourrait être reliée à des économies d'énergie ainsi qu'à des différences sur le plan de la physiologie individuelle.

En résumé, estimer la U_{crit} est probablement la meilleure façon d'estimer expérimentalement les capacités de nage d'un poisson et même si l'environnement dans lequel se trouve un poisson dans un tunnel de nage est rarement, voire jamais, le reflet de son habitat naturel, elle permet de prédire des conséquences écologiques. Il ne paraît cependant pas pertinent de procéder à de tels tests pour prédire les chances de survies d'une espèce. Dans tous les cas, le comportement du poisson doit être rigoureusement observé et répertorié au cours de l'expérience par l'expérimentateur et doit être prise en compte pour l'analyse des tests de performance de nage.

Matériels et méthodes

Protocoles

- Protocole n°1: Conditions d'élevage des poissons zèbre au laboratoire
- Protocole n°2: Stratégie Knockdown par injection de morpholinos
- Protocole n°3: Synthèse et injection des ARNsg
- Protocole n°4: Test d'efficacité de mutagenèse
- Protocole n°5: Génotypage des lignées *col22a1*^{-/-}
- Protocole n°6: Rétro-transcription et PCR quantitative
- Protocole n°7: Biréfringence
- Protocole n°8: Immunofluorescence *in toto*
- Protocole n°9: Vidéo-microscopie
- Protocole n°10 : Microscopie électronique à transmission
- Protocole n°11 : Mesure de l'amplitude des contractions musculaires après électrostimulation
- Protocole n°12 : Test de performance de nage/ Histologie

Protocole n° 1

Conditions d'élevage des poissons zèbre au laboratoire

Les poissons zèbres adultes sont relativement faciles à élever au laboratoire, à 28°C dans de petits récipients remplis d'eau du système. Cependant, la vitesse de développement, le déterminisme sexuel ainsi que la taille des poissons dépendent de plusieurs paramètres tels que la température, la nature et la quantité de nourriture *versus* le nombre de poisson par tank. C'est pourquoi, les conditions d'élevage sont contrôlées attentivement au sein de l'animalerie.

- **Embryons de 0 à 5 jours post fécondation**

100 embryons sont élevés de 0 à 5 jours post fécondation en incubateur à 28°C, en boîte de pétri de diamètre 100 mm contenant ~30 mL de milieu E3. Les embryons sont observés quotidiennement et les éventuels morts sont retirés.

Composition du milieu E3 10X telle que définie dans le Zebrafish book (Westerfield, 2000):

	Concentration (g/L)
NaCl	2.87
KCl	0.13
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.48
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.82

Du bleu de méthylène (Biochemika Fluka) à la concentration finale de 0.006% est ajouté au milieu E3 pour limiter le développement de bactéries et de champignons.

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

- **Larves et poissons adultes**

Des stades 5 jours post fécondation à adultes, les larves sont maintenues à 28°C dans l'animalerie PRECI. Les poissons zèbre de souche AB/Tü sont utilisés comme témoins pour nos expériences.

De 5 à 15 jours post fécondation, les larves sont nourries avec de la poudre Gemma Micro 75 4 fois par jour.

De 15 à 40 jours post fécondation, les larves sont nourries avec de la poudre Gemma Micro 75 3 fois par jour et avec de petits crustacés vivants (artémia) une fois par jour.

De 40 jours post fécondation à 3 mois, les poissons juvéniles sont nourris avec de la poudre Gemma 300, 3 fois par jour et avec des artémia une fois par jour.

Les poissons zèbre adultes sont nourris 2 fois par jour: une fois avec de la poudre Gemma 300 et une fois avec des artémia.

Les poissons sont observés au quotidien et les éventuels morts sont retirés des tanks et enregistrés dans le registre obligatoire d'entrée et sortie des animaux.

- **Autorisation légale**

L'animalerie PRECI (Plateau de Recherche Expérimentale en Criblage *In Vivo*) fait partie de la SFR Biosciences (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS of Lyon, UCBL). Son numéro d'agrément officiel est le B693870602.

La procédure de création et de maintien des lignées *col22a1^{-/-}* par la technologie CRISPR-Cas 9 et l'étude du collagène XXII dans la formation et le maintien de la JMT a été validée par le CECCAPP_IGFL_2014_002. La procédure de "Test de performance de nage" a été validée par le CECCAPP_PRECI_2017_003 et soumise au ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche, et au ministère de l'agriculture et de la pêche (#13345).

Protocole n° 2

Stratégie Knockdown par injection de morpholinos

Afin d'inhiber l'expression de *col22a1*, nous avons utilisé une stratégie antisens basée sur l'injection de morpholinos, stratégie couramment employée dans le modèle du poisson zèbre. Un morpholino est une petite séquence généralement composée de 20 à 25 nucléotides dessinés pour être complémentaires d'une séquence d'intérêt et modifiés par la présence d'un groupement morpholine qui leur confère une plus grande stabilité. A la différence des ARN interférents, ils n'agissent non pas par un mécanisme de dégradation de l'ARN messenger mais par encombrement stérique empêchant l'accès de la séquence ciblée aux différents complexes protéiques qui la reconnaissent. Afin de s'assurer de la spécificité des phénotypes induits par l'inhibition de l'expression de *col22a1*, les expériences ont été réalisées en parallèle avec deux morpholinos différents décalés sur le site d'initiation de la traduction du collagène XXII et non chevauchant: un morpholino nommé MO22a et un morpholino nommé MO22b. Un morpholino contrôle dit mismatch, nommé ci-après MO22ms, possédant cinq mutations par rapport à la séquence du MO22a a également été utilisé comme contrôle négatif. Les caractéristiques techniques de ces morpholinos, leurs modes d'action détaillés ainsi que les doses auxquelles ils ont été injectés sont décrits dans cette fiche technique.

- **Morpholinos bloquant la traduction de l'ARNm de *col22a1* (MO22a et MO22b)**

Caractéristiques techniques

Séquence 5' 3'	Nom
CTTGAGCCCAAATCGAAACTCCATC	MO22a
CATGAAGTTGCTGCTCCTGTGGAGA	MO22b

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

Mode d'action

Les morpholinos MO22a et MO22b sont complémentaires de la séquence de l'ARNm de *col22a1* en amont du codon initiateur de la traduction bloquant ainsi l'assemblage des sous unités ribosomiques sur le site d'initiation de la traduction de l'ARNm de *col22a1*.

Micro-injection

8.5 ng (dans 0.5nL) de MO22a ou b sont injectés aux stades une à quatre cellules avec du rouge de phénol dilué au 1/20^{ème} pour faciliter la visualisation lors de l'injection.

- **Morpholino contrôle (MO22ms)**

Caractéristiques techniques

Séquence 5' 3'	Nom
CTTCAGGCCAAATGGAAAATCAATC	MO22ms

Le morpholino est resuspendu dans de l'eau milliQ autoclavée de façon à obtenir une solution stock de 4 mM, stockée à -20°C sous forme d'aliqots de 10 µl. Les dilutions utilisées pour l'injection sont également stockées à -20°C.

Mode d'action

Le morpholino contrôle de type mismatch est un bon contrôle négatif d'injection de morpholinos et son utilisation chez le poisson zèbre est recommandée par Gerety et Wilkinson, 2011.

Micro-injection

8.5 ng (dans 0.5 nL) de MO22ms sont injectés aux stades une à quatre cellule(s) avec du rouge de phénol dilué au 1/20^{ème} pour faciliter la visualisation lors de l'injection.

Préparation des capillaires et microinjection des embryons

Les capillaires d'injection utilisés sont fabriqués à l'aide d'une étireuse P2000 équipée d'un filament laser dans les conditions suivantes (programme 31, unités arbitraires) : Heat :470, Pull :120, Vel :80, Del :80. La veille de l'injection, 5 à 8 couples de poissons sont placés dans des bacs de pontes séparés. L'allumage automatique des lumières le matin déclenche des pontes synchronisées. Les œufs fertilisés, non déchorionnés, sont récupérés et placés en boîtes de Pétri 100mm recouvertes d'agar 2.5% à la surface duquel sont moulées des rigoles (à l'aide de capillaires non étirés d'environ 1mm de diamètre). Les œufs sont placés dans les rigoles dans du milieu E3 1X contenant 0.006% de bleu de méthylène. Les embryons sont alors injectés avec 8.5 ng (quantité la plus faible donnant un morphotype, différentes concentrations ayant été testées au préalable) de MO22a, MO22b ou MO22ms.

Protocole n°3

Synthèse et injection des ARNsg

La technologie CRISPR/Cas9 est une méthode d'édition du génome qui permet de générer le knock-out ou le knock-in de gènes spécifiques au sein d'organismes variés. Cette technique a été utilisée pour générer deux lignées knock-out pour *col22a1* chez le poisson zèbre. Cette technique repose sur la co-injection d'un ARN simple guide (ARNsg) qui va s'hybrider au gène cible et d'une nucléase recrutée par l'ARNsg pour induire localement une cassure double-brin de l'ADN. La réparation de cette cassure peut induire des insertions ou délétions pouvant être responsables de l'apparition d'un codon stop prématuré, ayant pour conséquence l'invalidation du gène cible. Nous décrivons ici le design, la production et l'injection de l'ARNsg.

- Design *in silico* des ARNsg

Différentes bases de données disponibles gratuitement via internet ont été utilisées pour le design des ARNsg. Le turnover des logiciels, leur amélioration et leur efficacité ont nettement évolué en peu de temps entre le début de notre étude et aujourd'hui. Il est donc recommandé de s'informer régulièrement sur l'évolution de ces sites et leur fiabilité. Dans notre cas, nous recommandons l'utilisation de la base de données CRISPOR pour le design des ARNsg pour le modèle poisson zèbre, comme étant une base pratique et fiable

<http://crispor-beta.tefor.net/>. Deux oligonucléotides correspondant à l'ARNsg sont dessinés. Une fois hybridés, les oligonucléotides forment un fragment double-brin contenant une partie centrale correspondant à la séquence spécifique du gène cible avec des extrémités 5' et 3' cohésives pour leur clonage directionnel dans le vecteur DR274 entre les sites *BsaI*. Ainsi, un des ARNsg cible le domaine vWA du collagène XXII (5' –GGATAAGACACGTGTGGCAG – 3') et un second ARNsg cible le domaine TSPN du collagène XXII (5' – GGATGGCGA-GAACAGGGCGG – 3') dans le but de générer deux lignées distinctes, toutes deux knock-out pour *col22a1*.

- Préparation des vecteurs

Le vecteur DR274 est commandé chez Addgene (#42250) et 1 µg du vecteur est digéré par 10U d'enzyme *BsaI* (NEB - R0535), dans 50 µL pendant 2 heures à 37°C.

La digestion est vérifiée par migration de 3 µL du mix de digestion sur gel d'agarose 0.6% en utilisant 60 ng du vecteur non-digéré comme contrôle.

Si la digestion est complète, le mélange de digestion est séparé sur gel d'agarose 0.6% et la bande spécifique est coupée puis purifiée à l'aide du kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel -740609 ».

- Préparation de l'insert

Les oligonucléotides Forward et Reverse sont dilués séparément à 50 μM dans du Tris 5mM, pH5.5, à partir de solutions stock à 100 μM .

12 μL de chaque solution sont mélangés afin d'obtenir 24 μL de mélange d'hybridation dont 2 μL sont conservés séparément sur glace.

Les 22 μL restant sont incubés 5 minutes à 95°C puis lentement refroidis à température ambiante jusqu'à atteindre 25°C.

Les échantillons suivants sont alors déposés sur gel d'agarose 2%: 1 μL de chaque oligonucléotide à 50 μM , 2 μL du mélange d'hybridation conservé à 4°C et 2 μL du mix d'hybridation chauffé à 95°C afin de contrôler la bonne hybridation des deux oligonucléotides.

Deux dilutions successives du mélange d'hybridation au 1/5 dans de l'eau DNase, RNase free permettent d'obtenir un mélange à 1 μM .

- Ligation et transformation

100 ng du vecteur DR274 digéré et 1 μL du mélange d'hybridation à 1 μM sont ligués à l'aide du kit Quick Ligation (NEB - M2200).

Les bactéries *E. coli* XL1-blue sont alors transformées avec le mélange de ligation, étalées sur gélose LB contenant l'antibiotique kanamycine et incubées O/N à 37°C.

- PCR sur colonies

3 à 6 colonies sont utilisées pour contrôler la présence de l'insert dans le vecteur chez les bactéries. Puis, une PCR est réalisée utilisant le primer M13F du vecteur et l'oligonucléotide CRISPR F en présence de MasterMix GoTaq (GoTaq Green Master Mix - Promega Corporation - M7122) selon les instructions du fabricant.

Les colonies positives sont amplifiées dans 5 mL du milieu de culture et le plasmide est purifié à l'aide du protocole « high-copy plasmid » (high-copy plasmid DNA from *E. coli*, Nu-

cleospin Plasmid, Macherey-Nagel – 740588) selon les instructions du fabricant. Les plasmides sont ensuite séquencés pour contrôler la séquence de l'insert.

- Transcription *in vitro* et purification

8 µg de vecteur sont digérés par 40U de *DraI* enzyme (NEB - R0129) dans 160 µL pendant 2 heures à 37°C et le mix de digestion est séparé sur gel d'agarose à 2%. La bande la plus courte, contenant la séquence codant pour l'ARNsg est purifiée à l'aide du kit (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel -740609) selon les instructions du fabricant.

L'ARNsg est synthétisé à l'aide du kit MEGAscript T7 Transcription (AM1334 - Ambion - Life Technologies) selon les instructions du fabricant. Un mélange de 5 µL contenant le vecteur digéré est alors incubé pendant 6 heures à 37°C.

20 µL d'eau DNase, RNase free et 1 µL de Turbo DNase sont ajoutés en fin de réaction. 1µL du mélange est conservé et le reste est incubé 15 minutes à 37°C pour digérer l'ADN matrice. 1 µL de cette transcription *in vitro* digérée est déposé sur gel d'agarose 3% afin de vérifier la présence de transcrits et la digestion de l'ADN matrice. Le mélange restant est divisé dans 1 tube de 1 µL et 2 tubes de 10 µL, puis stocké à -80°C.

10 µL de la transcription *in vitro* sont précipités par utilisation d'acétate d'ammonium (protocole habituel) et resuspendus dans 12 µL d'eau DNase, RNase free. 1 µL est déposé sur gel d'agarose 3% en parallèle de 1 µL de transcription *in vitro* digérée afin de vérifier l'efficacité de la précipitation.

Les ARNsg sont stockés à -80°C dans 2 à 4 tubes d'ARNsg à 400 ng/µL pour les injections ultérieures.

- Injection des embryons de poissons zèbre

ARNsg et protéine Cas9 recombinante (NEB, M0386T) sont décongelés doucement sur la glace. 1.5 µL d'ARNsg à 400 ng/nL et 3 µL de protéine Cas9 à 20µM sont mélangés et incubés pendant 10 minutes à RT avant d'être replacés sur glace jusqu'à injection.

1nL du mélange (soit 2.12ng de protéine Cas9 et 133pg d'ARNsg) est injecté à l'aide de capillaires couplés à un micro-injecteur dans la cellule de poisson zèbre au stade 1 cellule.

Protocole n°4

Test d'efficacité de mutagenèse

Pour évaluer le taux de mutagenèse après injection des ARNsg et de la protéine Cas9 ou pour évaluer la transmission de la mutation par un fondateur F0 à sa descendance, une des méthodes classiquement utilisée est l'analyse haute résolution des courbes de fusion (High-Resolution Melting Analysis). Nous avons donc mis au point et utilisé cette technique pour établir les deux lignées *col22a1^{-/-}*.

- Extraction de l'ADNg

Les embryons de 3 à 5 jours sont placés individuellement dans des tubes contenant 20 μ L de NaOH à 50mM (en eau DNase, RNase free) et incubés pendant 10 minutes à 95°C.

Les tubes sont délicatement tapotés du bout des doigts et placés sur glace.

2 μ L de Tris-HCl 1M pH8 sont ajoutés dans chaque tube et à nouveau homogénéisés par tapotements. L'ADNg peut être conservé à 4°C pour une courte période ou à -20°C pour une conservation à plus long terme.

- PCR en temps réel

Les primers ont été choisis à l'aide du logiciel Primer 3 Plus (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi, paramètres: Tm: 60°C; Amplicon: 200 bp; %GC: 50 %) et commandés chez Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com). Elles sont resuspendues à 100 μ M comme solutions stocks et conservées à -20°C.

Le kit fastStart Universal SYBR GreenMaster (Roche, 04913850001) est utilisé pour la PCR réalisée sur l'appareil CFX96 Biorad.

24 μ L du mélange suivant sont déposés dans chaque puit et 1 μ L d'ADNg est ajouté.

Mélange PCRq

	1 tube (volume in μ L)
fastStart Universal SYBR GreenMaster mix	12.5
Mélange de primers reverse et forward (30 μ M chacun)	0.5
H ₂ O DNase / RNase free	11

Le programme suivant est utilisé:

10 minutes à 95°C

(10 secondes à 95°C; 30 secondes à 60°C) x 40 cycles

Courbes de fusion:

65°C pendant 30 secondes

65°C → 95°C (0.1°C/5s). Une mesure à chaque étape.

95°C pendant 15 secondes

4°C ∞

- Analyses HRM

Les analyses HRM ont été conduites selon Talbot et Amasher, Zebrafish 2014: "A Streamline CRISPR Pipeline to Reliably Generate Zebrafish Frameshifting Alleles". Supplementary material, part V. "Mutagenize F0 embryos, and tests mutagenesis efficiency", page 16 (Talbot and Amacher, 2014).

Les injections donnant lieu à des courbes de fusion qui, après traitement des données, présentent des déflexions d'au moins -0.1 (différence-RFU pour relative fluorescence units) sont considérées comme ayant provoqué un fort taux de mutagenèse, comme expliqué par les auteurs.

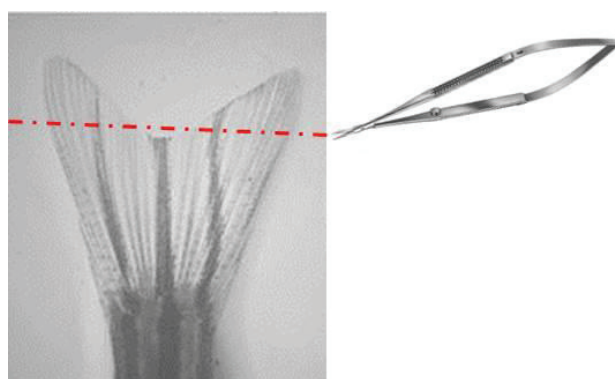
Protocole n° 5

Génotypage des lignées *col22a1^{-/-}*

Une fois les mutations d'intérêt sélectionnées (délétion de 8 nucléotides dans le domaine VWA et de 4 nucléotides dans le domaine TSPN) et séquencées, les deux lignées *col22a1^{-/-}* ont d'abord été maintenues à l'état hétérozygote pour la mutation, nécessitant donc un génotypage des poissons après chaque croisement. Un simple protocole de double PCR a été établi pour les deux lignées pour un génotypage rapide et à moindre coût mais il a parfois été nécessaire (en cas de doutes suite aux résultats de PCR) de procéder à un séquençage.

- Prélèvement de l'extrémité de la nageoire caudale dit « Fin Clip »

Les poissons sont placés dans un bécher contenant 0.168 mg/mL de Tricaïne (3-amino benzoic acidethylester, Sigma-Aldrich, A5040, solution stock à 4 mg/mL en eau distillée et conservée à -20°C) mélangée extemporanément à l'eau du système d'élevage. Les poissons arrêtent progressivement de bouger et l'on considère qu'ils sont anesthésiés lorsqu'ils ne réagissent plus aux stimulations externes (tapoter sur les parois du bécher par exemple). Pour plus de facilité, les poissons anesthésiés sont positionnés dans une cuillère en plastique où seule la nageoire caudale dépasse. L'extrémité de cette nageoire est alors coupée à l'aide de micro-ciseaux selon l'image ci-dessous:



Après prélèvement de l'extrémité de la nageoire caudale, les poissons sont replacés dans un bac rempli d'eau du système d'élevage et en quelques secondes, ils se réveillent et nagent à nouveau. Une à cinq minutes peuvent s'avérer nécessaires avant un retour à un comportement normal du poisson.

- Extraction de l'ADNg

Les morceaux de queue sont placés individuellement dans des tubes contenant 200 µL de NaOH à 50mM (en eau DNase, RNase free) et incubés pendant 10 minutes à 95°C. Les tubes sont délicatement tapotés du bout des doigts et placés sur glace. 20 µL de Tris-HCl

1M pH8 sont ajoutés dans chaque tube et à nouveau homogénéisés par tapotements. L'ADNg peut être conservé à 4°C pour une courte période ou à -20°C pour une conservation à plus long terme.

- Protocole de double PCR pour génotyper les poissons WT vs Hétérozygote portant une délétion de 8 nucléotides dans le domaine vWA vs Homozygote pour cette même délétion : Afin de réaliser un génotypage par PCR, deux couples d'oligonucléotides ont été dessinés afin d'amplifier spécifiquement soit la séquence WT (oligonucléotides 108 F et R) soit la séquence mutée (délétion de 8 nucléotides, oligonucléotides 109F et R). Ainsi, après dépôt sur gel d'agarose 2% des deux produits PCR côte à côte, la signature d'un poisson WT sera la présence d'une seule bande de forte intensité correspondant à l'amplicon à partir du couple d'oligonucléotides spécifiques de la séquence WT, celle d'un poisson hétérozygote sera la présence de deux bandes de moyenne et même intensité correspondant aux deux amplicons à partir respectivement du couple d'oligonucléotides spécifique de la séquence WT et spécifique d'autre part de la séquence mutée. Enfin, la signature d'un poisson homozygote sera la présence d'une unique bande de forte intensité correspondant à l'amplicon à partir du couple d'oligonucléotides spécifiques de la séquence mutante.

Oligonucléotides pour la PCR « spécifique du brin WT », amplicon de 129 nucléotides.

108F 5'- GGATAAGACACGTGTGGCAG -3' (NB : se termine par 7 nt sur les 8 délétés chez le mutant)

108 R 5'- GTGTTTCCACCCAGGTAG -3'

Oligonucléotides pour la PCR « spécifique du brin muté », amplicon de 123 nucléotides.

109F 5'- GTGGATAAGACACGTGGT -3' (NB : les deux derniers nucléotides sont spécifiques au mutant)

109R 5'- GTGTTTCCACCCAGGTAG -3'

- Protocole de double PCR pour génotyper les poissons WT vs Hétérozygote portant une délétion de 4 nucléotides dans le domaine TSPN vs Homozygote pour cette même délétion : Afin de réaliser un génotypage par PCR, deux couples d'oligonucléotides ont été dessinés afin d'amplifier spécifiquement soit la séquence WT (oligonucléotides 103 F et R) soit la séquence mutée (délétion de 4 nucléotides, oligonucléotides 104F et R). Ainsi, après dépôt sur gel d'agarose 2% des deux produits PCR côte à côte la lecture du génotypage se fera selon le même principe évoqué précédemment pour la première lignée.

Oligonucléotides pour la PCR « spécifique du brin WT », amplicon de 69 nucléotides.

103F 5'-GGATGGCGAGAACAGGGCGG-3' (NB : se termine par les 4 nt délétés chez le mutant)

103 R 5'-AAAACCGCCCGCACCGCAT-3'

Oligonucléotides pour la PCR « spécifique du brin muté », amplicon de 86 nucléotides.

104F 5'-TCTGGATGGCGAGAACAGGT-3'

104R 5'-TCCACCTCTGGGTTCTAAAA-3'

Un kit GoTaq Master Mix est utilisé pour les PCR (GoTaq Green Master Mix - Promega Corporation - M7122) suivant le protocole ci-après:

	1 tube (µL)
Master Mix 2X	6.25
primer F (10mM)	0.75
primer R (10mM)	0.75
DMSO	0.38
H ₂ O	3.37

1µl d'ADNg est ajouté à ce mélange de 11.5 µL puis le programme suivant est appliqué:

95°C pendant 5 minutes

(95°C 30 secondes, T_m des primers 30 sec, 72°C 30 sec) x 34 cycles

72°C 10 min, 15°C∞

En cas de doutes concernant les résultats du génotypage par double PCR, une PCR simple suivie d'une purification du produit de PCR en vue d'un séquençage est réalisée.

- PCR ThermoPOL Promega col22a1 pour la lignée ciblant le domaine vWA

	1 tube (µL)	20 tubes
ThermoPOL Buffer 10X	5	100
dNTP (10mM)	1	20
Primer Forward	2.5	50
Primer Reverse	2.5	50
DMSO	1.5	30
ThermoPol	0.25	5
H ₂ O	34.25	685

Répartir 47 µL par tube et ajouter 3µL d'ADNg

- Programme PCR

95°C pendant 5 minutes

(95°C 20 secondes-60°C 30 secondes-68°C 30 secondes) X 35 cycles
68°C 10 min
15°C ∞

Le produit PCR peut être conservé à 4°C pour une courte période ou à -20°C pour une conservation à plus long terme.

Primers encadrant la zone ciblée par l'ARNsg et appelés 40F et 40R:

40F 5'-CCAGGTTGTAAGAACGTCCAC-3'

40R 5'-GAACAACCTGATCCCAGCAG-3'

Taille attendue de l'amplicon : 434 nucléotides. 5µl du produit de PCR sont déposés sur gel d'agarose 2% avant de procéder à la purification à l'aide d'Acétate de sodium (NaOAc) ci-après.

- PCR ThermoPOL Promega col22a1 pour la lignée ciblant le domaine TSPN
Même mélange et même programme PCR que précédemment, avec dans ce cas, les primers suivants encadrant la zone ciblée par l'ARNsg et appelés 77F et 77R:

77F 5'-CATCCCGTAAGGAAGACTGG-3'

77R 5'-GATGGGTAGCGTCTCGATGT-3'

Taille attendue de l'amplicon : 577 nucléotides. 5µl du produit de PCR sont déposés sur gel d'agarose 2% avant de procéder à la purification à l'aide d'Acétate de sodium (NaOAc) ci-après.

- Purification de produit PCR avec Acétate de Sodium (NaOAc)

La PCR est complétée avec de l'H₂O DNase/RNase free qsp 100 µL.

10 µL de NaOAc 3 M sont ajoutés et l'on mélange délicatement par tapotements

Puis 2.5 volumes (250µL) d'EtOH 100% froid (-20°C) sont ajoutés et le mélange est homogénéisé par pipetage (up and down).

Le mélange est incubé 30 minutes à -80°C (bien respecter ce temps pour éviter aux amorces de précipiter ce qui peut générer des soucis de séquençage) puis centrifugé 30 minutes à 4°C, à 15000 rpm.

Le surnageant est enlevé et le culot lavé avec 300µL d' EtOH 70% froid (-20°C).

Puis le mélange est à nouveau centrifugé 5 minutes à 4°C, à 15000 rpm.

Le surnageant est ôté et les tubes laissés ouverts 15 minutes à RT.

25 µL d'H₂O DNase/RNase free sont ajoutés puis après quelques minutes, le culot est re-suspendu.

L'ADN est envoyé selon les recommandations GATC Biotech® afin d'être séquençé par la méthode Sanger.

Protocole n° 6

Rétro-transcription et PCR quantitative

Pour analyser le profil d'expression génique de gènes spécifiques chez les poissons zèbres WT ou *col22a1*^{-/-} âgés de deux semaines, leur ARN a été extrait puis rétro-transcrit afin de réaliser des PCR quantitatives. Tous les primers utilisés ont été spécifiquement dessinés pour cette expérience et validés avant utilisation.

- Extraction des ARNs au Trizol

20 embryons de chaque génotype (WT vs Homozygote *col22a1*^{-/-}) sont regroupés en un seul et même tube RNase free en limitant au maximum le volume de E3. Puis le milieu E3 est éliminé et les embryons rincés avec 500µL d'eau millipore autoclavée. Cette eau est éliminée et remplacée par 250 µL de Trizol (INVITROGEN, conservation à 4°C), sous hotte chimique. Une homogénéisation mécanique est réalisée à l'aide d'une seringue sérologique de 1mL et d'une aiguille 21G (20 pipetages répétés) puis 23G (10 pipetages répétés).

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

Les homogénats sont ensuite incubés 5 minutes à température ambiante puis 50 µl de CHCl₃ (chloroforme) sont ajoutés et une homogénéisation par agitation manuelle pendant 15 secondes est réalisée. Le mélange est ensuite incubé pendant 3 minutes à température ambiante, puis centrifugé à 12000 g, pendant 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse supérieure est récupérée (environ 100 µl) et transférée dans un nouveau tube RNase free.

Les ARNs sont précipités par ajout de 125 µl d'isopropanol à la phase aqueuse: le mélange est homogénéisé doucement par retournement manuel puis incubé 10 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé à 12000 g, pendant 15 minutes à 4°C.

Un maximum de surnageant est retiré et le culot est lavé à l'aide de 500 µl d'éthanol 70% dilué en H₂O RNase free, puis le tout est centrifugé à 7500 g, pendant 5 minutes à 4°C. A nouveau, le surnageant est retiré et on ajoute 500 µl d'éthanol 70% avant de centrifugé à 7500 g, pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et une dernière centrifugation à 7500 g, pendant 2 minutes à 4°C est réalisée. Les dernières gouttes d'éthanol peuvent être éliminées délicatement à l'aide d'une micropipette et le culot est séché à RT pendant 10 minutes environ sous la surveillance du manipulateur.

Les ARNs totaux sont re-suspendus dans 15 µl d'H₂O RNase free (tube placé sur glace) pendant 10 minutes avant d'être homogénéisés par pipetages répétés.

La concentration des ARNs est évaluée par dosage au Nanodrop et les ARNs conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

- Reverse Transcription : préparation des ADN complémentaires (ADNc) à partir d'ARNm précédemment extraits

1µg d'ARN est mélangé à 0.5 µL de random primers (Promega, 500 µg/mL) dans un volume final de 15 µL (H₂O DNase / RNase free) en tube PCR. Les tubes sont placés 5 minutes à 70°C en machine PCR pour éliminer les structures secondaires des ARNs et transférés immédiatement sur glace.

10 µL du mélange de RT suivant est ensuite ajouté dans chaque tube:

	1 tube (volume in µL)
Tampon de transcription 5X	5
M-MLV reverse transcriptase (Promega, 200 U/µL)	1
dNTP mix (Promega, 10mM each)	1.25
Rnasin (Promega, 25U/ µL)	0.625
H ₂ O DNase / RNase free	2.125

Les tubes PCR sont incubés 1 heure à 37°C en machine PCR puis conservés à -20°C. Les ADNc sont dilués au 1/10^e avant utilisation.

- PCR quantitative

Les primers ont été dessinés à l'aide du logiciel Primer 3 Plus (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi), avec les paramètres: Tm: 60°C; Amplicon: 100 à 200 pb; %GC: 50 %) et commandés chez Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com).

Les primers sont re-suspendus à 100µM (solutions stock) et conservés à -20°C.

L'efficacité des primers est testée par dilutions successives des produits de la RT. Les couples de primers ayant une efficacité comprise entre 1.80 et 2.10 peuvent être utilisés pour la PCR quantitative.

Le gène *Pol II* est utilisé comme gène de référence après avoir vérifié que son expression n'est pas modifiée entre les différentes conditions testées.

Nom des primers	Primer Forward (5' to 3')	Primer Reverse (5' to 3')
<i>col1a1</i>	CTGCAAGAACAGCATTGCAT	TAGGCAGACGGGATGTTTTTC
<i>col21a1</i>	CTGGACCTGAGGGACGAC	CCGATCGGAGGATGTCTCT
<i>col22a1</i>	CAAGTGTGGGCAAGGAGAAT	CGTTTGACCTCCTCCAATGT
<i>itga7</i>	CAGCTGGTACCCAAACACG	CACAGAGTACCCGAATGAGGA
<i>lama2</i>	CCACTGGGGTCACGACAT	CGGTGTTTCAGGTTACACTGC
<i>fn1a</i>	ATTCAACGCACGTTCTACC	TAATTTTGCCCTTGCCTGAC
<i>dag1</i>	TGTTGGAGCCTCTGTTACCC	TGGGTTTCTTTGGAGGTCTCT
<i>pol II</i>	CCAGATTCAGCCGCTTCAAG	CAAACCTGGGAATGAGGGCTT

Le kit suivant a été utilisé pour la PCRq: fastStart Universal SYBR GreenMaster (Roche, 04913850001) et l'appareil utilisé est la CFX96 Biorad.

8 µL du mélange suivant sont déposés dans chaque puit et 2 µL d'ADNc sont ajoutés.

	1 tube (volumes in µL)
fastStart Universal SYBR GreenMaster mix (2X)	5
Mélange des primers reverse et forward (30 µM chacun)	0.2
H ₂ O DNase / RNase free	2.8

Le programme suivant est utilisé:

10 minutes à 95°C

(10 secondes à 95°C; 30 secondes à 60°C) x 40 cycles

Courbes de fusion:

65°C 30 secondes

65°C → 95°C (0.5°C / 2.5 sec). 1 lecture tous les 0.5°C.

95°C 15 secondes

4°C ∞

Les résultats sont analysés selon la méthode publiée par Pfaffl, 2001.

Protocole n°7

Biréfringence

La biréfringence est la propriété physique d'un matériau dans lequel la lumière se propage de façon anisotrope. L'anisotropie est la propriété d'être dépendant de la direction. Quelque chose d'anisotrope pourra présenter différentes caractéristiques selon son orientation.

La biréfringence est largement utilisée en microscopie notamment lors de contraste interférentiel de Nomarski ou à l'aide de microscopes polarisants permettant de visualiser des objets de faible contraste. Dès 1858, E. Brücke découvre que le muscle a la propriété d'être biréfringent. L'arrangement des fibres musculaires tel un pseudo-cristal réfracte ainsi la lumière différemment des tissus environnants. Ici, l'utilisation de deux polariseurs, placés de part et d'autre des embryons de poisson zèbre, permet donc d'apprécier l'organisation caractéristique des fibres musculaires.

Les larves WT ou *col22a1^{-/-}* de 5 jpf sont anesthésiées à l'aide de tricaine puis placées sur une lame de verre entre deux polariseurs (3Dlens, Taiwan) et observées sur un microscope Zeiss Axiozoom V16 équipé d'une caméra AxioCam MRm 1.4 megapixels.

La moyenne des niveaux de gris des pixels situés dans la région du tronc des poissons est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ.

Protocole n°8

Immunofluorescence *in toto*

Les embryons de poisson zèbre sont très petits, en particulier en début de développement, ce qui permet de pouvoir réaliser des immunomarquages *in toto* au lieu d'avoir à réaliser des immunomarquages sur coupes. Dans notre cas, les immunomarquages *in toto* ont par exemple été utilisés pour vérifier l'invalidation de la protéine ColXXII pour les lignées générées à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9.

- Préparation des échantillons

Les embryons de différents stades de développement sont fixés dans 500µL de paraformaldéhyde 4% en PBS 1X, la nuit à 4°C.

Les échantillons sont rincés 5 min dans 500µL de PBS 1X à température ambiante, sous agitation modérée. Les échantillons sont progressivement déshydratés par des bains successifs en: méthanol 25%/ PBS 1x 75%; méthanol 50%/ PBS 1x 50%; méthanol 75%/ PBS 1x 25%; 5 minutes chacun à température ambiante.

Les échantillons peuvent alors être stockés en méthanol 100 % à - 20°C au moins 1 heure. Déshydratation et réhydratation peuvent également être réalisées en éthanol en suivant les mêmes étapes.

Les échantillons sont progressivement réhydratés dans des bains successifs de méthanol 75%/PBS 1x 25%; méthanol 50%/PBS 1x 50% et méthanol 25%/PBS 1x 75%; 5 minutes chacun à température ambiante. Les échantillons sont ensuite rincés 3 fois 5 minutes dans la solution de rinçage, à température ambiante sous agitation modérée.

Les échantillons sont ensuite perméabilisés à l'aide de 500µL d'acétone 100% à -20°C pour une durée qui varie selon leur stade de développement:

- pour les embryons de moins de 24 hpf: 5 minutes
- pour les embryons de 24 à 48 hpf: 15 minutes
- pour les embryons de plus de 48 hpf: 30 minutes

Les échantillons sont rincés 3 fois 5 minutes en solution de rinçage, à température ambiante sous agitation modérée. Pour les embryons de plus de 72 hpf seulement, une étape supplémentaire de perméabilisation de 20 minutes en protéinase K (12 µg/mL) diluée dans la solution de rinçage 1X est réalisée.

Les échantillons sont rincés 3 fois 5 minutes en solution de rinçage, à température ambiante sous agitation modérée.

- Saturation et anticorps primaires

Les échantillons sont incubés dans 400µL de la solution de saturation pendant 3 à 4 heures minimum à RT sous agitation modérée, puis incubés dans 250 µL de la solution de saturation contenant les anticorps primaires O/N à 4°C sous agitation modérée.

- Lavages et anticorps secondaires

Les échantillons sont rincés 5 minutes puis 4 fois 30 minutes dans 500µL de solution de rinçage à RT sous agitation modérée.

Pour les embryons seulement, un second cycle dans 400µL de solution de saturation est réalisé pendant 3 à 4 heures à RT sous agitation modérée.

Puis les échantillons sont incubés dans 250µL de la solution de saturation contenant les anticorps secondaires O/N à 4°C sous agitation modérée.

- Lavages et marquage éventuel des noyaux (facultatifs)

Les échantillons sont rapidement rincés pendant 5 minutes en solution de rinçage 1X à RT sous agitation modérée.

Facultatif : Les échantillons sont incubés en PBS 1X contenant 0.5 µg/mL de Hoechst pendant 5 à 10 minutes à RT sous agitation modérée.

Enfin, les échantillons sont rincés quatre fois 30 minutes en solution de rinçage, à RT sous agitation modérée.

Les échantillons sont conservés en PBS 1X à 4°C jusqu'à observation.

Dans le cas de tissus adultes ou de stades tardifs (au-delà de 5 jours), l'épaisseur des échantillons pouvant gêner l'observation, les échantillons peuvent être inclus en OCT et des coupes à froid réalisées pour faciliter l'observation.

Solutions:

Solution de rinçage (PBDTT): 1% (v/v) DMSO; 0.1% (v/v) Tween 20; 0.5% (v/v) Triton X-100 en PBS X

Solution de saturation (PBDTT-SS-BSA): 2% (v/v) sheep serum; 2 mg/mL BSA en PBDTT

Solution de rinçage pour tissus adultes (PBST): 0,8% (v/v) Triton X-100 in 1x PBS

Solution de saturation pour tissus adultes (PBST-SSD): 0,8% (v/v) Triton X-100; 10% (v/v) Sheep Serum; 1% (v/v) DMSO en PBST.

Anticorps primaires

Anticorps primaires	Référence/informations	Concentration
anti-ColXXII	polyclonal, lapin	1 / 1000 ^e
anti-ColXII	polyclonal, cobaye	1 / 250 ^e
F310, myosin light chain 1 and 3f	DSHB, F310 monoclonal, souris	1/20 ^e
anti-lamy1	DSHB, AB_2134060 monoclonal, souris, 2E8	1/500 ^e
anti-lamβ1	abcam ab88279 monoclonal, souris, DG10	1/500 ^e

Anticorps secondaires

Anticorps secondaires	Référence	Concentration
anti-rabbit Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11034	1 / 500 ^e
anti-mouse Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11029	1 / 500 ^e
anti-guinea pig Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11073	1 / 500 ^e
anti-rabbit Alexa Fluor 546	Invitrogen, A11035	1 / 500 ^e
anti-mouse Alexa Fluor 546	Invitrogen, A11030	1 / 500 ^e
anti- guinea pig Alexa Fluor 546	Invitrogen, A11074	1 / 500 ^e

- Cas particulier de la phalloïdine

La phalloïdine fait partie des toxines extraites des champignons tels que l'amanite phalloïde, connues sous le nom de phallotoxines. Elle se lie à l'actine filamenteuse, empêchant sa dépolymérisation et « empoisonnant » la cellule. Cette propriété de liaison avec les filaments d'actine lui permet d'être utilisée en imagerie cellulaire comme marqueur de ces derniers.

Pour utiliser la phalloïdine en immunofluorescence, les échantillons ne doivent pas être traités au méthanol. Ainsi, après fixation, les échantillons sont uniquement rincés 4 fois une heure dans une solution de triton 5% en PBS 1X puis les échantillons sont incubés O/N à 4°C sous agitation modérée dans la solution de Phalloïdine diluée au 1/100^e.

Le lendemain, les échantillons sont rincés une heure en PBS 1X, Tween 0.1%.

Ils peuvent être conservés en PBS 1X à 4°C jusqu'à observation. Un marquage de noyaux à l'aide de Hoechst peut également être réalisé comme expliqué précédemment.

Protocole n°9

Vidéo microscopie

Afin d'illustrer les difficultés de nage des poissons *col22a1^{-/-}* les plus sévèrement atteints, des vidéos ont été réalisées au stade 2 spf.

Les larves sont placées en boîte de pétri de diamètre 100 contenant de l'eau du système d'élevage. La motilité des larves est observée et enregistrée sur un microscope stéréoscopique Zeiss Axiozoom V16 équipé d'une caméra à haute résolution AxioCam HRm Rev.3 Firewire. Les images ont été enregistrées à la fréquence de 1 image/5 ms, pendant 25 secondes, en l'absence de toute stimulation des larves.

Protocole n°10

Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) est la méthode de choix pour étudier l'ultrastructure du muscle et plus particulièrement la jonction myotendineuse. Elle permet de visualiser notamment les myofilaments, leur organisation (striations Z...), le sarcolemme ou encore les fibres de collagène. Ainsi, nous avons beaucoup utilisé cette technique aussi bien lors de l'étude du développement des myoseptes et de la jonction myotendineuse (Annexe 2), que dans les deux articles, pour différents stades de développement embryonnaires, larvaires et adultes.

- Fixation des échantillons

Les échantillons sont fixés en tampon cacodylate 0.1M final contenant 1.5 % (v/v) de glutaraldéhyde et 1.5% (v/v) de paraformaldéhyde, pH7.4 plusieurs jours à 4°C.

Les échantillons sont rincés 3 fois 10 minutes en tampon cacodylate 0.1 M contenant 8% de sucrose, à température ambiante. Ils peuvent être conservés ainsi plusieurs jours à 4°C.

Les échantillons sont post-fixés dans du tétroxyde d'osmium 1% dilué dans le tampon précédent, pendant 45 minutes à température ambiante, puis ils sont rincés très rapidement en eau distillée avant la déshydratation.

- Déshydratation et substitution

Les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs d'éthanol dilués en eau distillée: 30%; 50%; 70%; 80%; 95%; 100% éthanol, 5 minutes chacun à température ambiante.

Pour parfaire la déshydratation, ils sont immergés dans de l'oxyde de propylène pendant 10 minutes à température ambiante.

Puis les échantillons sont immergés dans la résine epoxy : 50% Epon (50% Epon A; 50% Epon B), 50% oxyde de propylène pour au minimum 1 heure à température ambiante puis toute la nuit dans la résine 100% Epon (50% Epon A; 50% Epon B) contenant 1.7% du volume final de résine en BDMA (diméthylbenzylamine, accélérateur du durcissement de la résine), à température ambiante.

- Inclusions

Les échantillons sont immergés dans un nouveau bain (préparé extemporanément) de résine 100% Epon (50% Epon A; 50% Epon B) contenant 1.7% du volume final de résine en BDMA, puis placés méticuleusement dans un moule en silicone approprié contenant les références de chaque échantillon, selon l'orientation désirée lors des coupes. Ils sont ainsi incubés 3 jours à 56°C pour que la résine polymérise. Les échantillons peuvent ainsi être conservés, à vie, à température ambiante, à l'abri de la poussière.

- Sections semi et ultra-fines puis contraste

Des coupes semi (0.3 μm d'épaisseur) et ultra-fines (65 à 70 nm d'épaisseur) sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome Leica UC7 ou Reichert Ultracut S. Les coupes semi-fines sont déposées sur lame de verre, séchées sur une platine chauffante à 37°C et sont ensuite colorées au Bleu de méthylène/Azur II selon Richardson. Les coupes ultrafines sont déposées sur grille de cuivre 300 mesh.

Après une nuit minimum de séchage à température ambiante, les grilles contenant les coupes ultrafines sont contrastées manuellement à l'aide d'acétate d'uranyle dilués à 7% dans du méthanol, préalablement filtré, déposés dans des salières avec couvercle maintenues à l'abri de la lumière pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. Les grilles sont ensuite rincées dans les bains suivants: 100% méthanol (2 bains successifs); 50% méthanol / 50% eau distillée filtrée; 100% eau distillée filtrée. Les grilles sont alors incubées 1 heure à 37°C sur un papier filtre, à l'abri de la poussière afin qu'elles sèchent. Enfin, les grilles sont contrastées pendant 5 à 10 minutes à température ambiante à l'aide de gouttelettes de citrate de plomb déposées sur des boîtes de pétri de diamètre 100mm contenant de la cire dentaire, en présence de pastilles de sodas pour éviter les précipités sur les coupes, puis rincées dans une solution de soude puis 3 bains d'eau distillée filtrée.

NB : pour tous les rinçages de grilles, les bains sont disposés dans des piluliers en verre et les grilles maintenues à l'aide d'une pince ultra-fine inversée afin de traverser la surface de liquide de rinçage au moins une vingtaine de fois pour chaque bain.

- Observation

Les coupes ultra fines sont observées au Centre Technologique des Microstructures, CT μ , sur un microscope électronique à transmission Philips CM120, à l'Université de Lyon, France (<http://www.microscopies.univ-lyon1.fr>).

NB : tous les produits chimiques utilisés sont de qualité « EM grade ».

Cas particulier des tissus musculaires adultes :

Pour les morceaux de queues de poissons adultes de 6 mois, des tranches sont réalisées à l'aide d'un scalpel, dans le mélange fixateur, sous loupe binoculaires, et la peau est délicatement ôtée à l'aide d'une pince. Les temps des bains sont adaptés (ces morceaux étant plus épais que les embryons et larve). Ainsi, après fixation les échantillons sont rincés 3 fois 15 minutes, de même les temps des bains d'éthanol croissants sont rallongés à 15 minutes chacun, puis 3 bains de 15 minutes en éthanol 100% sont réalisés et un bain 50% éthanol 100/ 50% oxyde de propylène de 15 minutes est ajouté. Deux bains de 15 minutes en oxyde de propylène sont ensuite nécessaires. De même la substitution se fait en davantage d'étapes (OxProp / Epon 3/1: 2 heures ; OxProp / Epon 1/1: 2 heures ; OxProp / Epon 1/3: 1 nuit, sous hotte, pour évaporation lente de l'oxyde de propylène ; Epon : deux 1/2 journées et une nuit puis inclusion le lendemain matin avec un mélange de résine frais). NB: L'Epon est supplémenté avec du BDMA 1.7% dès la substitution.

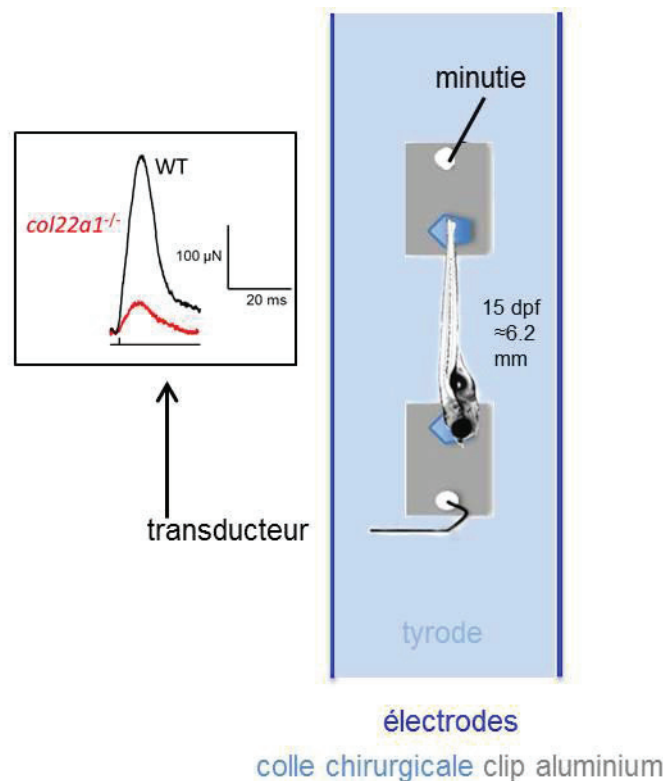
Protocole n°11

Mesure de l'amplitude des contractions musculaires après électrostimulation

Nous avons choisi d'analyser l'activité musculaire des larves WT et *col22a1^{-/-}* présentant des phénotypes modérés ou sévères au stade 2 spf, par mesure de l'amplitude de contraction musculaire.

- Réalisation des mesures

Les larves sont placées brièvement dans un bécher contenant 0.168 mg/mL de tricaïne (3-amino benzoic acidethylester, Sigma-Aldrich, A5040), puis leur tête est écrasée à l'aide de pinces ultrafines (Tweezers n°5, Dumont) afin d'empêcher toute contraction musculaire non déclenchée par les stimuli électriques. Les larves sont rapidement transférées dans une solution physiologique de Tyrode (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, PH 7.2) afin que la tricaïne n'interfère pas avec la réponse musculaire induite par l'électrostimulation. Une petite goutte de colle chirurgicale est déposée sur chacun des deux clips en aluminium réalisés au préalable (voir figure ci-dessous).



Puis, sous loupe binoculaires, la larve est positionnée entre les deux clips en aluminium. Au contact de la larve légèrement humide, la colle polymérise et le poisson est alors solidaire des deux clips. Le poisson est alors placé de façon perpendiculaire au transducteur mécano-

électrique AE801, parallèlement et à équidistance entre deux électrodes immergées en partie dans un polymère (montage expérimental réalisé par Bruno Allard), la tête du poisson étant côté transducteur. Une minutie est introduite par l'expérimentateur dans le trou situé dans le clip aluminium en partie caudale du poisson. Puis, à l'aide d'un micromanipulateur, la minutie reliée au transducteur via une tige de graminée (montage expérimental réalisé par Bruno Allard) et crochétée à son extrémité, est introduite dans le trou du clip aluminium situé au niveau de la tête de la larve. L'étirement du corps du poisson est ajusté avec le micromanipulateur sous contrôle binoculaires. Le signal correspondant à la force musculaire du poisson est échantillonné à la fréquence de 200 Hz et numérisé à l'aide d'un convertisseur analogique-numérique (National Instrument) et enregistré sur ordinateur via le logiciel WinWCP (Université de Strathclyde, UK). L'ensemble de la musculature du poisson est stimulée par application d'impulsions électriques supraliminaires de 0.5 ms.

Pour chaque poisson testé, l'intensité des impulsions électriques est progressivement augmentée jusqu'à obtention d'une réponse contractile maximale. Cette intensité de stimulation, augmentée de 20% est sélectionnée pour réaliser les mesures. Une fois l'intensité de stimulation sélectionnée, le corps du poisson est graduellement étiré jusqu'à obtention d'une réponse contractile maximale.

NB : Le transducteur mécano-électrique étant sensible aux vibrations, bruits et lumières, les manipulations sont réalisées sur une table antivibratoire et une cage de Faraday est utilisée pour limiter le bruit de fond généré par les autres appareils. La lumière de la loupe binoculaire est coupée pendant les mesures.

Protocole n°12

Test de performance de nage/ Histologie

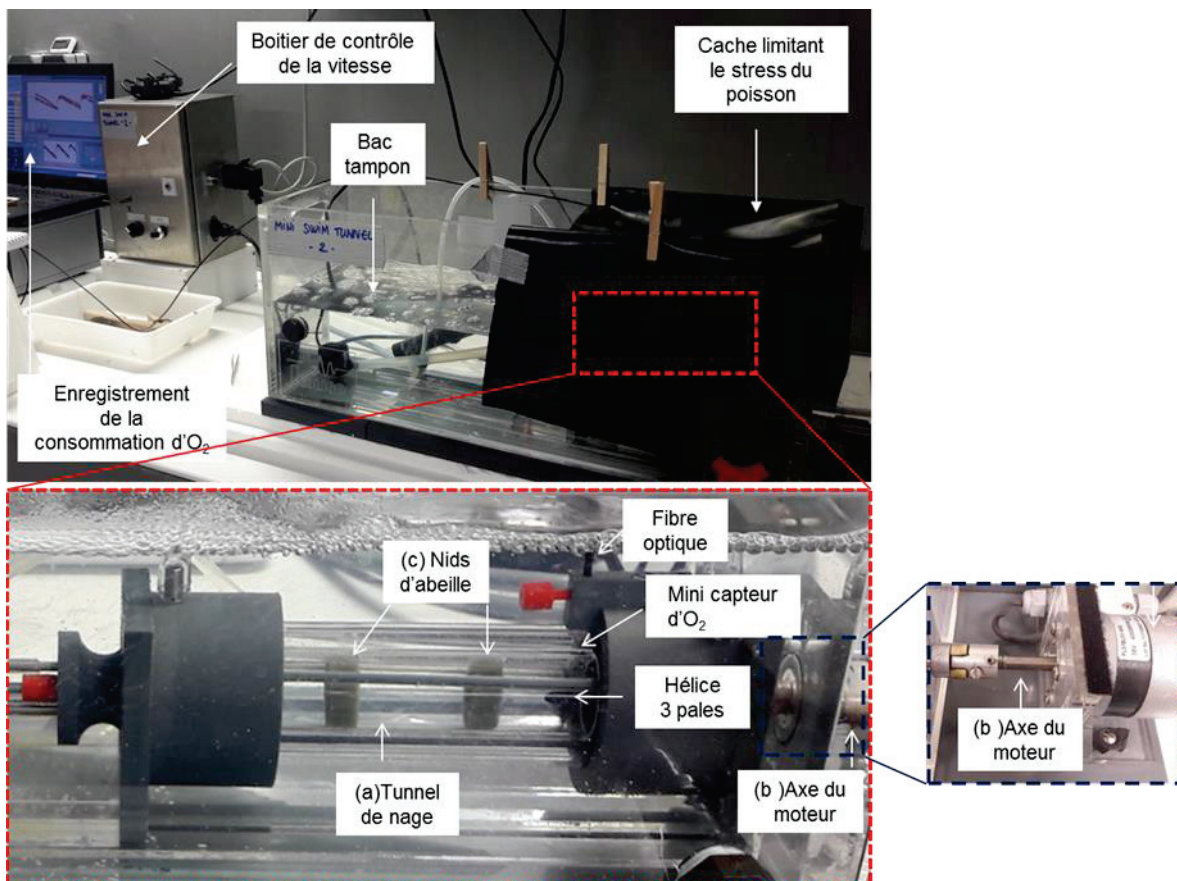
Comme décrit par Lucas *et al*, 2016, tester la performance de nage d'un poisson est considéré comme l'étude d'une fonction biologique d'intérêt majeur puisque contribuant à sa survie (Swanson *et al*, 1998; Plaut, 2001). En effet, la nage intervient dans les interactions prédateur–proie, dans la recherche de nourriture ou encore dans les processus de migration (Hammer, 1995; Plaut, 2001). Dans notre cas, nous nous proposons d'estimer et de comparer les capacités de nage de deux différents lots d'individus : des individus témoins et des individus chez lesquels le gène *col22a1* impliqué dans le développement du tissu musculaire a été invalidé. Ici, évaluer la performance de nage permet donc d'étudier les conséquences fonctionnelles de l'absence du collagène XXII. Notre étude consiste donc à évaluer les performances de nage et le coût métabolique associé chez des poissons *col22a1*^{-/-} âgés de 6 mois (comparativement à un lot de poissons WT du même stade). Pour cela nous mesurons pour chaque individu U_{crit} et AMS comme indicateurs de leur état physiologique. (Pour plus de détails, voir paragraphe 3.9 Evaluation des performances de nage). Le stade 6 mpf a été choisi afin de se placer à une période de croissance maximale au niveau de la musculature.

- Montage expérimental

Deux respiromètres de nage identiques de 170 mL (Loligo Systems, Danemark) sont utilisés pour évaluer les performances de nage et le métabolisme des poissons. Chaque respiromètre est composé (a) d'une chambre de nage dans lequel le poisson est placé, (b) d'un moteur couplé à une hélice à trois pales pour contrôler le flux d'eau (c) de 2 nids d'abeille placés de chaque côté du tunnel de nage de façon à laminariser le flux d'eau contre lequel le poisson va devoir nager. Chaque respiromètre est immergé dans un bassin tampon ouvert de 20 L rempli d'eau, identique à la zone d'élevage des poissons et maintenue à une température contrôlée (*i.e.* 28°C comme dans l'animalerie) et oxygénée. L'alimentation en eau dans chaque tunnel de nage se fait grâce à des pompes de flux qui contrôlent le flux d'eau depuis le bassin tampon vers le respiromètre.

La consommation d'oxygène associée à l'activité du poisson est mesurée dans les respiromètres (Steffensen, 1989) lorsqu'ils sont isolés, c'est à dire lorsqu'il n'y a aucun flux d'eau provenant du bac tampon. Au cours d'un test de nage, on respecte donc une alternance de phases pendant lesquelles l'eau, et donc l'oxygène, sont renouvelés dans le tunnel et de phases pendant lesquelles la consommation d'oxygène peut être mesurée. Le cycle de ces phases est respectivement de 3 et 15 minutes. La mesure d'oxygène se fait grâce à un mini capteur d'oxygène collé sur la paroi interne de la chambre de nage, en regard d'une fibre

optique (PreSens, Allemagne). Ce capteur possède un composant coloré sensible à la lumière et à l'oxygène. Ainsi, lorsqu'il est excité par le flash lumineux émis par la fibre optique, il émet de la fluorescence dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'oxygène présente dans le milieu. La fibre optique est connectée à un système de mesure de l'oxygène multicanaux (OXY 4 mini, PreSens, Allemagne) pour enregistrer le niveau d'oxygène dissous dans l'eau. Cet enregistrement se fait toutes les 5 s. Les mesures de concentration en oxygène sont acquises avec le logiciel Oxy4 puis analysées avec le logiciel GraphicalAnalysis (version 3.4). Ce logiciel permet de calculer les valeurs de pentes de diminution de la concentration en oxygène dans la chambre de nage, lors des périodes de mesures de 15 minutes, qui sont proportionnelles à la consommation d'O₂ des poissons (MO₂). Les valeurs de pente sont calculées pour chaque individu pour chaque vitesse de nage. Les fibres optiques sont calibrées une fois au début du test de performance de nage en mesurant un 0% et un 100% de saturation en air à la température de 28 °C.



- Protocole expérimental

Chaque test de nage se déroule en 3 grandes phases décrites ci-après: (a) une phase de repos et d'acclimatation qui suit le transfert du poisson dans le tunnel de nage, (b) une phase

de test de nage par paliers et (c) enfin une phase de récupération précédant le remplacement en animalerie.

J0: Le poisson est mis à jeun le matin et transféré individuellement en fin d'après-midi dans le tunnel de nage. Le poisson est donc à jeun 24h avant le début du challenge de nage. Comme nous disposons de 2 tunnels de nage, chaque test consiste à tester 2 poissons en parallèle (un de chaque condition biologique, et entre 2 tests consécutifs, on intervertit les conditions biologiques afin d'éliminer un éventuel effet tunnel). Chaque poisson est placé dans le tunnel avec un très faible flux d'eau (0.25 LC s^{-1}) pour toute la nuit afin de lui permettre de s'acclimater dans son nouvel environnement et de récupérer du stress généré par le transfert.

J1: Après la nuit d'acclimatation, le test de nage commence et consiste en une augmentation du flux d'eau par palier de 1.5 LC. s^{-1} depuis 0.5 LC. s^{-1} et jusqu'à épuisement de l'animal. Chaque palier dure 15 min, au cours duquel la consommation d'oxygène MO_2 du poisson est mesurée. Pour rappel, entre 2 paliers, l'eau, et donc l'oxygène, sont renouvelés pendant 3 minutes et la vitesse du flux d'eau est progressivement augmentée pour atteindre le palier suivant. Si la saturation en O_2 du poisson descend en dessous de 75% (risques de souffrance du poisson et risque de perturbation de la performance de nage du fait de l'hypoxie), la mesure de consommation d'oxygène est interrompue et l'oxygène est alors renouvelé dans la chambre de nage ; pendant cette opération, la vitesse de nage reste inchangée et le challenge natatoire se poursuit.

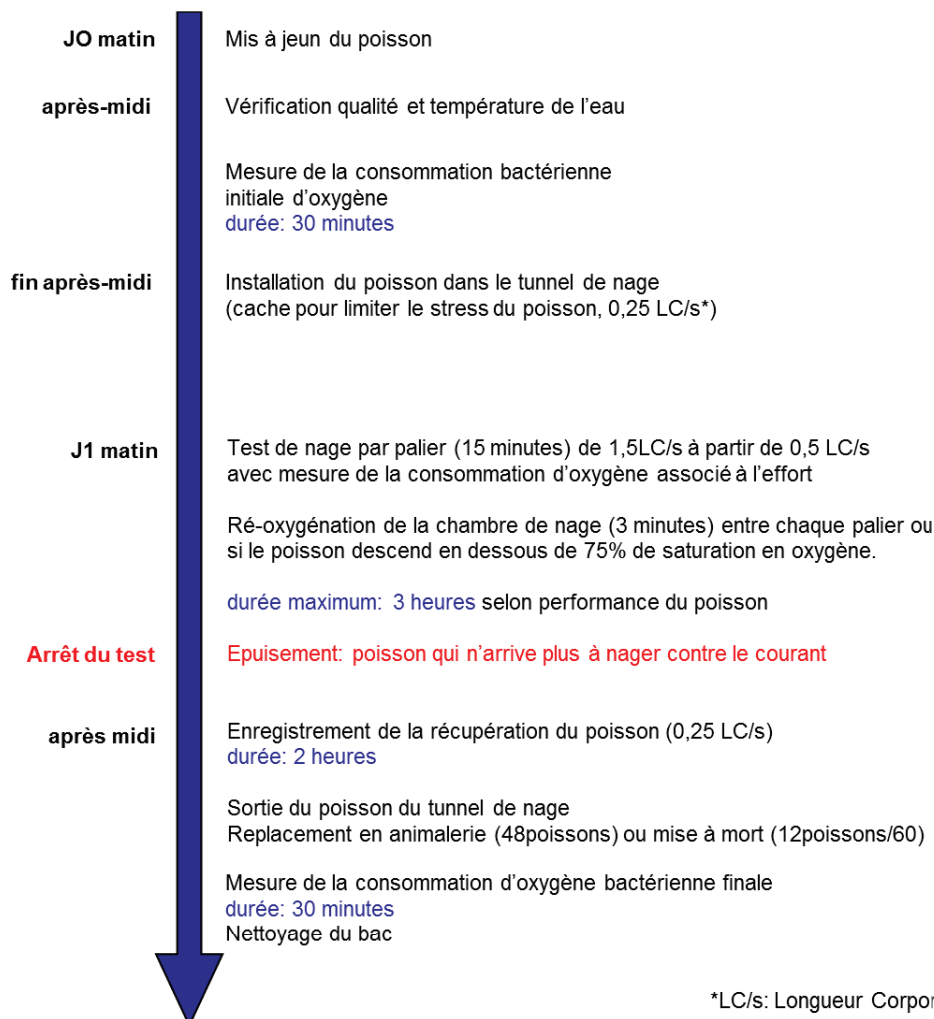
L'expérience s'arrête lorsque le poisson est épuisé, c'est à dire lorsqu'il ne parvient plus à nager contre le courant (dans ce cas, le poisson reste en général lové contre le nid d'abeille). La vitesse est alors diminuée rapidement à 0.25 LC s^{-1} pour une période de récupération. Pendant cette phase de récupération, la consommation d'oxygène de l'individu est alors mesurée, au repos, pendant 30 minutes avec renouvellement de l' O_2 pendant 30 secondes toutes les 15 minutes puis à raison d'une mesure de 15 minutes toutes les 15 minutes (ré-oxygénation), pendant 2 heures. Enfin, les poissons sont extraits des tunnels et anesthésiés à l'aide de tricaine.

Les poissons zèbres sont alors placés dans un petit bécher contenant 0.168 mg/mL de tricaine (3-amino benzoic acidethylester, Sigma-Aldrich, A5040, solution stock à 4 mg/mL dissous dans l'eau distillée et stockée à -20°C) dissous extemporanément dans de l'eau du système d'élevage. Les poissons s'arrêtent alors progressivement de bouger et l'on considère qu'ils sont anesthésiés lorsqu'ils arrêtent de réagir à toute stimulation externe (tapoter les parois du bécher par exemple). On valide également l'efficacité de l'anesthésie par le

constat d'un ralentissement de la ventilation. L'anesthésie permet alors de procéder aux mesures de taille standard et totale, de poids et de noter toute information utile (caractéristiques des nageoires, sexes...). Avant et après chaque test de nage, une mesure de « blanc » est réalisée en absence de poisson dans le respiromètre de nage. Cela permet de quantifier la consommation d'oxygène non pas due au poisson mais au développement éventuel de bactéries dans le tunnel de nage. Ces valeurs sont soustraites à la mesure de consommation d'oxygène.

Chaque poisson n'est testé qu'une seule fois.

Il est primordial qu'au cours du challenge de nage le poisson soit maintenu dans une eau présentant les mêmes caractéristiques qu'en zone d'élevage (température, pH, osmolarité...). Il est à noter qu'après chaque test individuel, le matériel est entièrement et précautionneusement désinfecté (povidone iodée Mylan® 10% à raison de 15mL dans 10L d'eau du robinet), nettoyé (brosser chaque petits recoins et tuyaux pour éliminer tout microorganisme qui pourrait s'y trouver fixé) et rincé abondamment, avant d'être remis en conditions expérimentales.



*LC/s: Longueur Corporelle par seconde

- Calcul de la vitesse de nage critique

U_{crit} est calculée selon la formule de Brett (1964): $U_{crit} = U_t + t_1 \cdot t^{-1} \cdot U_1$

où U_t (en LC s⁻¹) est la vitesse maximale atteinte et maintenue pendant un palier entier, t_1 (en min) est le temps de nage du poisson au dernier palier atteint, t (en min) est le temps de nage pour chaque palier (i.e. 15 min dans notre cas) et U_1 le facteur d'augmentation de la vitesse entre chaque palier (1.5 LC s⁻¹).

- Calcul de consommation d'oxygène (MO_2) :

La consommation d'oxygène MO_2 est exprimée en mg O_2 g⁻¹ h⁻¹ et est calculée selon la formule: $MO_{2meas} = \Delta [O_2] \cdot \Delta t^{-1} \cdot V \cdot M_{meas}^{-1}$

où $\Delta [O_2]$ (en mg O_2 L⁻¹) est la variation de la concentration en oxygène au cours de la période de mesure Δt (en h), V (en L) est le volume occupé par le respiromètre moins le volume occupé par le poisson et M_{meas} (en g) est la masse du poisson testé.

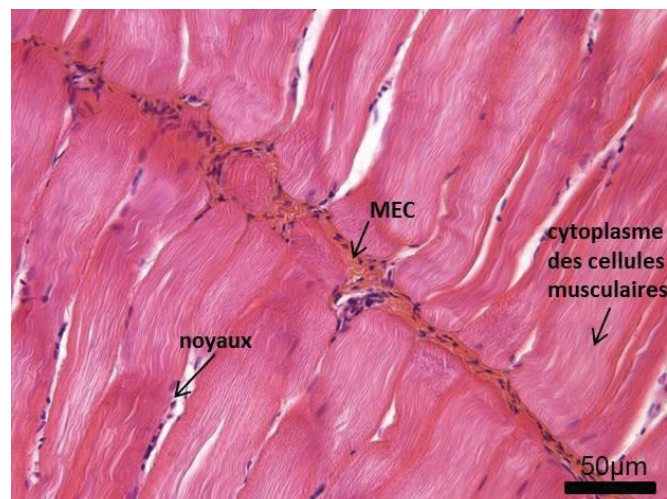
- Analyses histologiques

Pour compléter notre étude, des analyses histologiques sont réalisées sur 3 adultes par condition biologiques (soit 6 adultes au total, choisis de façon aléatoire, à la seule condition qu'ils aient eu un comportement de nage analysable). Les poissons sont alors euthanasiés à l'issue du test de nage par immersion dans l'eau du système d'élevage contenant une surdose en tricaine (0.4 mg/mL). La mort des poissons est observée en moins d'une minute et constatée par l'arrêt de tout mouvement du poisson, ainsi qu'un arrêt de la respiration branchiale. Après avoir enlevé la tête puis la peau du poisson, les muscles du tronc sont sectionnés transversalement à l'aide d'une lame de rasoir stérile en 4 morceaux de taille identique et fixés immédiatement dans une solution de formol tamponnée (AFA) 24h à température ambiante.

Inclusion et coupes

Les échantillons fixés en AFA sont inclus en paraffine. Des coupes transversales de 5µm sont réalisées au microtome sur lame histologique.

Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES)



Cette coloration permet d'observer la structure et la morphologie du tissu comme ci-dessus, sur cette coupe de muscle de poisson zèbre adulte.

Après déparaffinage, les coupes sont colorées successivement par l'hématoxyline de Harris, l'éosine G et le safran. Les éléments matriciels sont jaune-orangé-rosé, le cytoplasme rose et les noyaux violets.

Observations

Les lames ainsi colorées sont observées en microscopie optique [Leica DM6000]. Les images sont acquises à l'aide d'une caméra couleurs [Leica DFC 450/ CCD 5Mpixels/ taille du pixel 3,4 μm /taille du capteur 8,7mm x 6,5 mm] et enregistrées à l'aide des logiciels d'analyse d'image [Leica MM AF software (metamorph) et Leica LASsoftware].

Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel « GraphPad Prism software ». Les tests « Student's t-tests » sont utilisés pour comparer les 2 conditions expérimentales: poissons WT et mutants *col22a1^{-/-}*. Pour tout test statistique, le résultat est considéré comme significatif (*), très significatif (**) ou hautement significatif (***) lorsque la valeur de p est respectivement <0.05 , <0.01 ou <0.001 .

Résultats

Synopsis 1

Ce premier article visait à déterminer le rôle du collagène XXII au cours du développement du poisson zèbre. Même si je n'étais pas l'actrice principale de ce travail qui a été confié à Benjamin Charvet, lors de sa thèse, puis à Alexandre Guiraud lors de son post-doctorat, j'ai dès le début de cette étude, tenu un rôle important dans l'obtention, l'analyse et l'interprétation des résultats. Bien entendu, mes compétences en imagerie optique et électroniques (Figures 1 à 7) ont été largement mises à contribution; mais, au-delà, c'est mon expertise au sens large (théorique et pratique) du modèle poisson, des collagènes et du tissu musculaire qui m'a permis de figurer comme second auteur de ce travail. J'ai plus particulièrement conduit de façon parfaitement autonome, la partie « étude des interactions entre *col22a1* et *itga7* » qui a permis (Figure 6) de mettre en évidence le lien entre le collagène XXII et l'intégrine $\alpha7\beta1$.

Comme expliqué précédemment, le collagène XXII a été découvert en 2004 par M. Koch et ses collaborateurs et a été décrit comme un marqueur des jonctions tissulaires, en particulier, au niveau de la JMT chez la souris. Sa fonction était inconnue. Nous avons montré qu'un orthologue du gène *COL22A1* codant pour le collagène XXII humain, est présent chez le poisson zèbre. Il n'existe pas de paralogue. Par hybridation *in situ* sur l'embryon entier, nous avons détecté les transcrits *col22a1* à partir de 22hpf dans tout le somite. De façon corrélée au développement de la JMT, le signal va progressivement se restreindre aux extrémités des fibres musculaires, au point d'ancrage sur la JMT. Une étude fonctionnelle par utilisation de la stratégie morpholino « knockdown » montre que l'absence de collagène XXII résulte en un phénotype musculaire de type dystrophique, incluant des défauts de nage, une courbure des embryons, une forte diminution de l'amplitude des contractions musculaires et des détachements de fibres musculaires induits par leurs contractions. Ceci entraîne une augmentation significative du facteur de survie Akt. Par imagerie optique et électronique, nous avons mis en évidence une forte diminution des interdigitations de la JMT et des défauts de structure du myosepte. La co-injection de doses sub-phénotypiques de morpholinos dirigés contre *col22a1* et d'autres composants des systèmes d'ancrage a permis de mettre en évidence une interaction synergique entre le collagène XXII et l'intégrine $\alpha7\beta1$, synergie non retrouvée notamment avec le dystroglycan. Nos résultats soulignent donc l'importance du collagène XXII pour la stabilisation de la JMT et pour renforcer l'attachement des cellules musculaires au cours de l'activité musculaire.

RESEARCH ARTICLE

Knockdown of *col22a1* gene in zebrafish induces a muscular dystrophy by disruption of the myotendinous junction

Benjamin Charvet^{1,*}, Alexandre Guiraud^{1,*}, Marilyne Malbouyres¹, Daniela Zwolanek², Emilie Guillon¹, Sandrine Breaud¹, Catherine Monnot³, Jörg Schulze², Hannah L. Bader¹, Bruno Allard⁴, Manuel Koch^{2,5} and Florence Ruggiero^{1,‡}

ABSTRACT

The myotendinous junction (MTJ) is the major site of force transfer in skeletal muscle, and defects in its structure correlate with a subset of muscular dystrophies. *Col22a1* encodes the MTJ component collagen XXII, the function of which remains unknown. Here, we have cloned and characterized the zebrafish *col22a1* gene and conducted morpholino-based loss-of-function studies in developing embryos. We showed that *col22a1* transcripts localize at muscle ends when the MTJ forms and that COLXXII protein integrates the junctional extracellular matrix. Knockdown of COLXXII expression resulted in muscular dystrophy-like phenotype, including swimming impairment, curvature of embryo trunk/tail, strong reduction of twitch-contraction amplitude and contraction-induced muscle fiber detachment, and provoked significant activation of the survival factor Akt. Electron microscopy and immunofluorescence studies revealed that absence of COLXXII caused a strong reduction of MTJ folds and defects in myoseptal structure. These defects resulted in reduced contractile force and susceptibility of junctional extracellular matrix to rupture when subjected to repeated mechanical stress. Co-injection of sub-phenotypic doses of morpholinos against *col22a1* and genes of the major muscle linkage systems showed a synergistic gene interaction between *col22a1* and *itga7* ($\alpha7\beta1$ integrin) that was not observed with *dag1* (dystroglycan). Finally, pertinent to a conserved role in humans, the dystrophic phenotype was rescued by microinjection of recombinant human COLXXII. Our findings indicate that COLXXII contributes to the stabilization of myotendinous junctions and strengthens skeletal muscle attachments during contractile activity.

KEY WORDS: Collagen, Extracellular matrix, Muscular dystrophy, Myotendinous junction, Skeletal muscle, Zebrafish

INTRODUCTION

The myotendinous junction (MTJ) represents the major site of muscle force transmission to tendons. This highly specialized structure displays finger-like folds that increase contact between muscle and tendon. Complex and dynamic interactions between muscle sarcolemma and extracellular matrix (ECM) components

occur at the MTJ, and form trans-sarcolemmal linkage systems that are required for the initiation and maintenance of muscle fiber attachment to tendon. These interactions provide a continuous structural link between intracellular cytoskeleton, sarcolemma and ECM proteins, such as the basement membrane (BM) component laminin. Two independent trans-sarcolemmal linkage systems are present at MTJs: the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) and the $\alpha7\beta1$ integrin complex. Whereas $\alpha7\beta1$ integrin binds only to laminin and was reported to localize primarily at the MTJ, α -dystroglycan interacts with several BM components and distributes along the sarcolemma (Han et al., 2009). DGC and $\alpha7\beta1$ integrin are both crucial for maintaining skeletal muscle integrity and attachments, but a functional overlap between the two linkage systems remains undemonstrated (Rooney et al., 2006; Han et al., 2009).

Mutations in most of the genes encoding components of the linkage complexes result in muscle disorders (Carmignac and Durbeej, 2012). In humans, mutations in the dystrophin gene cause Duchenne and Becker muscular dystrophies, whereas mutations in sarcoglycan genes are responsible for some forms of limb girdle muscular dystrophies (Cohn and Campbell, 2000). Mutations in the integrin $\alpha7$ gene (*ITGA7*) cause congenital myopathy (Hayashi et al., 1998) and the most common form of congenital muscular dystrophy MDC1A is associated with loss of functional laminin $\alpha2$ (Helbling-Leclerc et al., 1995). The impact of these mutations in MTJ formation and/or function is still poorly documented, particularly in the context of human diseases. However, mice that lack dystrophin (*mdx*; *Dmd* – Mouse Genome Informatics) (Law and Tidball, 1993; Law et al., 1995), laminin $\alpha2$ (*dy*; *Lama2* – Mouse Genome Informatics) (Desaki, 1992) or integrin $\alpha7$ (Miosge et al., 1999; Welser et al., 2009) exhibit a striking reduction in the number of membrane folds at MTJ that impairs its function and results in progressive muscular dystrophy.

Collagen XXII (COLXXII) is a distinctive BM component for it is strictly localized at tissue junctions, specifically at the MTJ (Koch et al., 2004). It belongs to the FACIT (fibril-associated collagens with interrupted triple helix) subset of the collagen superfamily, the members of which are known to associate with collagen fibers through their C-terminal collagenous domains and to mediate protein-protein interactions through their N-terminal non-collagenous domains (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). The function of COLXXII remains unknown, but its enrichment at the MTJ, as well as the high capacity of FACIT members to associate with other matrix components suggests that COLXXII may contribute to the mechanical stability of the MTJ.

Zebrafish is becoming instrumental for specifically addressing the extent to which the loss of MTJ components contributes to muscle physiology and pathology (Ingham, 2009). In zebrafish, somitic muscle fibers differentiate to span the entire myotome and

¹Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, ENS de Lyon, UMR CNRS 5242, Université Lyon 1, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France. ²Center for Biochemistry, Medical Faculty, University of Cologne, D-50931 Cologne, Germany. ³Centre Interdisciplinaire de Recherche en Biologie, CNRS UMR 7241/INSERM U1050, Collège de France, Paris, France. ⁴Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS UMR 5534, 69622 Villeurbanne Cedex, France. ⁵Institute for Dental Research and Oral Musculoskeletal Biology, Center for Molecular Medicine Cologne, Medical Faculty, University of Cologne, D-50931 Cologne, Germany.
*These authors contributed equally to this work

[‡]Author for correspondence (florence.ruggiero@ens-lyon.fr)

Received 17 March 2013; Accepted 27 August 2013

vertical myosepta, which are functionally equivalent to the mammalian tendon and serve as attachment sites at myotome borders where the MTJ forms (Henry et al., 2005; Charvet et al., 2011). Zebrafish dystrophic mutants and morphants with skeletal muscle abnormalities represent informative models of muscle disease pathogenesis (Ingham, 2009; Sztal et al., 2012) and therapy, as reported recently (Kawahara et al., 2011). The detachment of muscle fiber at the MTJ is a common phenotypic feature of several dystrophic mutants and/or morphants, e.g. *sapje*/dystrophin (*sap*) (Bassett et al., 2003; Guyon et al., 2009), *candyfloss*/laminin $\alpha 2$ (*caf*) (Hall et al., 2007) and *patchytail*/dystroglycan (Gupta et al., 2011), and the integrin $\alpha 7$ morphants (Postel et al., 2008). The integrin-linked kinase (ILK)-deficient *loss-contact* (*loc*) (Postel et al., 2008) and laminin- $\beta 2$ -deficient *softy* (*sof*) (Jacoby et al., 2009) mutants also exhibit destabilization of muscle attachments at intracellular (*loc*) and extracellular (*sof*) sides of the MTJ, suggesting that these genes are also important for maintenance of muscle attachments. In most of these mutants, skeletal muscles develop normally but the onset of muscle contractions provokes progressive muscle cell detachment from their insertion site and the subsequent degeneration of the axial myotome (Sztal et al., 2012).

In the present study, we have cloned and characterized the zebrafish ortholog of the human *COL22A1* gene, *col22a1*, and showed that the protein product COLXXII is specifically expressed by skeletal muscle and deposited at the junctional ECM as the MTJ develops. We show that *col22a1* knockdown in zebrafish embryos resulted in muscle dysfunction indicative of dystrophic phenotype. Synergistic interactions suggest that COLXXII contributes to the stabilization of the integrin $\alpha 7 \beta 1$ linkage system. Pertinent to a conserved role in humans, the dystrophic phenotype was rescued by microinjection of human COLXXII. Our findings provide functional evidence for a role of *col22a1* in the stabilization and maintenance of the MTJ.

RESULTS

Zebrafish *col22a1* presents the overall structure of its mammalian counterparts

A zebrafish ortholog of the human *COL22A1* gene is available in the CoreNucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The prediction of the zebrafish COLXXII $\alpha 1$ chain mRNA (XM_685915.3 version GI:189532156) was incomplete but corresponds well to the human and mouse COLXXII $\alpha 1$ chain. We thus decided to clone and sequence the complete zebrafish *col22a1* cDNA. To this aim, we subjected the predicted zebrafish COLXXII $\alpha 1$ chain mRNA sequence to a blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) against *Danio rerio* genomic sequences. This blast retrieved the *Danio rerio* strain Tuebingen unplaced genomic scaffold, Zv9_NA466 (NW_003336732.1). Using this sequence, we designed primers to obtain the complete sequence through PCR amplification of 24 hpf embryo cDNA. The sequence (accession number HE_981211; 4925 bp) included full coding sequence (4869 bp) and a part of the 5' and 3' UTR sequences. The protein deduced from the coding sequence contains 1622 amino acids (protein id CCK86746.1).

Alignments of the zebrafish COLXXII $\alpha 1$ chain with the human, mouse and chicken orthologs revealed an overall 60% identity and about 70% similarity (supplementary material Fig. S1; Table 1). The overall structure is similar to that of other vertebrates and contains the structural signatures of all FACITs (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005) (supplementary material Fig. S1). The only difference from the human COLXXII, but shared with mouse and chicken orthologs,

Table 1. Comparison between the collagen XXII $\alpha 1$ chain zebrafish (HE_981211) and human (NP_690848.1), mouse (NP_081450.1) and chicken (NP_001132911.1) orthologs

Species	Domains	Identity (%)	Similarity (%)
<i>Homo sapiens</i>	Full length	59	71
	VWA	70	85
	TSPN	67	85
<i>Mus musculus</i>	Full length	59	72
	VWA	69	87
	TSPN	68	87
<i>Gallus gallus</i>	Full length	60	74
	VWA	73	89
	TSPN	69	86

Numbers represent the percentage of identity and similarity obtained from alignments using ClustalW. TSPN, thrombosponin N-terminal-like domain, VWA, von Willebrand factor A-like domain.

was the absence of the NC4 linker sequence (supplementary material Fig. S1). As such, a transcript without NC4 was the unique transcript detected in developing zebrafish (supplementary material Fig. S2).

col22a1 is expressed in skeletal muscle and its protein product localizes at the MTJ

The expression pattern of zebrafish *col22a1* was analyzed at the transcriptional level by RT-PCR (Fig. 1A) and whole-mount *in situ* hybridization (Fig. 1B). By RT-PCR, we first detected *col22a1* expression at 22 hpf, during the third stage of segment boundary formation, as defined by Henry et al. (Henry et al., 2005). At 24 hpf, transcript level increased and expression was then maintained in developing embryos (Fig. 1A). *In situ* hybridization of 24 hpf embryos revealed a diffuse signal within the somites with no signal at myotome boundaries (Fig. 1B,a). As embryos developed, expression concentrated to muscle cell extremities close to vertical myosepta (Fig. 1B,b-e).

Protein expression in developing embryos was then assessed by western blot of whole-protein extracts using our specific polyclonal antibodies raised against a zebrafish COLXXII recombinant domain (supplementary material Fig. S3A,B). Two bands were detected from 24 hpf: one migrating at 200 kDa corresponding to the expected molecular weight of COLXXII $\alpha 1$ chain and an upper band that likely corresponds to partial non-reducible dimers (Fig. 1C), as reported for the mammalian COLXXII (Koch et al., 2004). Using confocal microscopy, COLXXII was detected in 26 hpf myotomes as a fuzzy signal, which became more intense along the myosepta (Fig. 1D,a). As embryo developed, COLXXII became restricted to myotomes boundaries (Fig. 1D,b,c). In addition, as revealed by whole-mount double immunostaining of 72 hpf embryos (Fig. 1D,c-e), COLXXII colocalized at the confocal resolution with the membrane-associated dystrophin that is enriched at junctional sarcolemma in zebrafish. Moreover, at later larval stage (5 dpf), when MTJ is fully differentiated and forms deep sarcolemmal folds (Charvet et al., 2011), COLXXII antibodies specifically decorated MTJ interdigitations (supplementary material Fig. S3E). Finally, COLXXII was detected in adult MTJs, suggesting a role for COLXXII throughout life (supplementary material Fig. S3C,D). *Col22a1* transcript was also detected in the head and the pectoral fins of 48 hpf (not shown) and 72 hpf (Fig. 1B,d) embryos, but signal was barely visible at the protein level (Fig. 1D,b). Collectively, our data identify *col22a1* as a specific marker of developing and mature zebrafish MTJs.

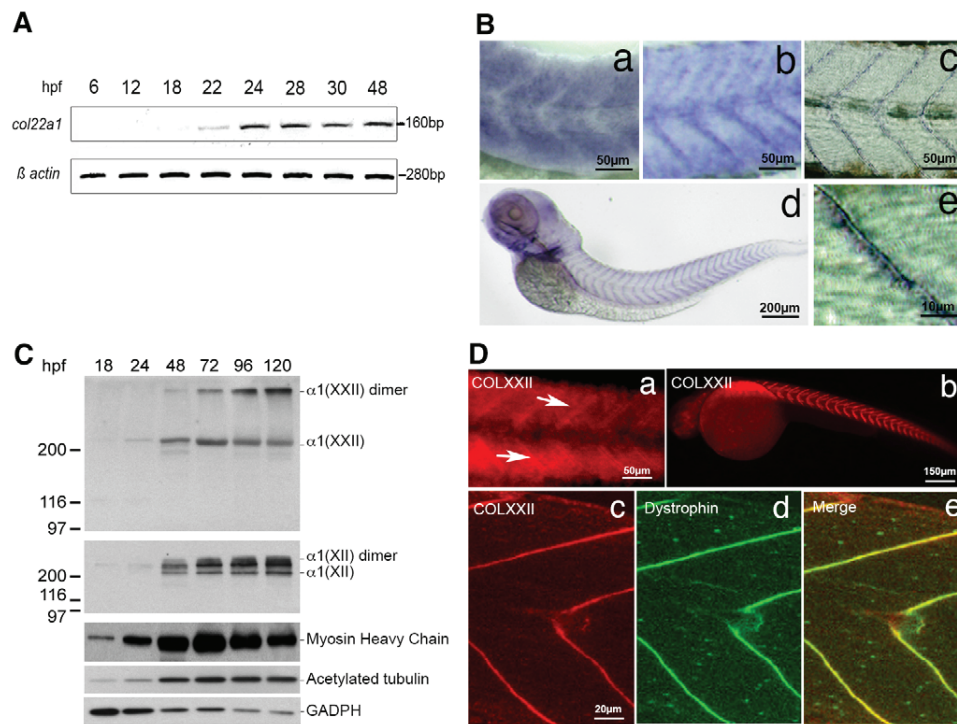


Fig. 1. Expression and distribution of zebrafish *col22a1* mRNA and protein. (A) RT-PCR analysis of zebrafish *col22a1* at different developmental stages. β -Actin was used as a loading control. (B) Whole-mount *in situ* hybridization with *col22a1* antisense probe in the trunk of 24 hpf (a), 48 hpf (b) and 72 hpf (c) embryos. Lateral view of a 72 hpf whole embryo (d) and zoomed image of a somite boundary (e). (a-e) Lateral views with anterior to the left; (a-c) somites in the posterior region of yolk extension are shown. Scale bars: 50 μ m in a-c; 200 μ m in d; 10 μ m in e. (C) Western blot with anti-COLXXII of protein extracts from animals at different stages. COLXXII and myosin heavy chain antibodies were used as collagen and late muscle differentiation marker controls, respectively. Antibodies to GAPDH and acetylated tubulin were used as loading controls. Number on the left indicate sizes (in kDa) of protein standard markers. hpf, hour post-fertilization. (D) Lateral views of whole-mount immunofluorescence staining with anti-COLXXII of 26 hpf (a) and 48 hpf (b) embryos. (a) Arrows indicate COLXXII staining that concentrated along myosepta. (c-e) Double immunostaining of a 72 hpf embryo with anti-COLXXII (c, red), dystrophin (d, green) and merge (e). Anterior is towards the left. Scale bars: 50 μ m in a; 150 μ m in b; 20 μ m in c-e.

***col22a1* knockdown leads to a muscular dystrophy-like phenotype**

To elucidate the function of COLXXII, morpholino-mediated knockdown was performed in zebrafish. The specificity and efficiency of the morpholinos targeting *col22a1* (MO22a and MO22b) was evidenced by western blotting (Fig. 2A) and immunofluorescence staining (Fig. 2B). We also examined the expression levels of collagen XII (COLXII), which is a FACIT collagen expressed in myosepta (Bader et al., 2009), in MO22-injected and uninjected embryos. We showed that COLXII protein levels (Fig. 2C) and *coll21a1a* gene expression (supplementary material Fig. S4A) did not change significantly, which is indicative of a specific effect of MO22 on the target gene. Injection of MO22a or MO22b in one- to two-cell embryos resulted in normal embryos during the first day of development. At 48 hpf, MO22a- and MO22b-injected embryos exhibited identical gross phenotype characterized by a slight (moderate phenotype) or pronounced (severe phenotype) curvature of the tail and trunk (Fig. 2C; supplementary material Table S2 for percentages of embryos in each class). The extent of inhibition of COLXXII protein expression correlated with the severity of the phenotype (supplementary material Fig. S5). The curvature phenotype became progressively more severe with time, which is indicative of the progressive nature of the phenotype (Fig. 2C, histogram). Higher magnification views of the trunk region of 96 hpf larvae revealed that, independently of phenotype severity, somites displayed abnormal U-shape morphology, which is indicative of muscle defects (Fig. 2D).

Muscle defects can correspond to defective muscle differentiation. COLXXII protein was detected from 24 hpf, a time when muscle differentiation is completed (Blagden et al., 1997). In support of this, the time-course expression of the late myogenic marker MHC was similar in MO22-injected and uninjected embryos, suggesting that muscles have differentiated normally (Fig. 2B). In addition to morphological defects, MO22-injected embryos generally failed to hatch and chorions have to be removed manually. Finally, unlike uninjected larvae (supplementary material Movie 1), MO22-injected larvae displayed swim failure and motility impairment after touch stimulation (supplementary material Movie 2). As the two sequence-independent morpholinos against *col22a1* (MO22a and MO22b) yielded identical results, we used them indifferently in all the following experiments and they will be referred as to MO22 hereafter.

The level of birefringence of the trunk muscle under polarized light is commonly used to quantify the level of muscle damage in zebrafish (Sztal et al., 2012). We thus quantified the level of birefringence in 4 dpf MO22-injected larvae with moderate phenotype and compared with larvae of the same age injected with morpholinos against *lama2* (MO-*lama2*) and *itga7* (MO-*itga7*), which have been reported to cause a dystrophic muscle phenotype (Hall et al., 2007; Postel et al., 2008). The percentage of birefringence was significantly reduced in larvae injected with MO22 ($n=10$; $P<0.001$) as for larvae injected either with MO-*lama2* ($n=10$; $P<0.05$) or MO-*itga7* ($n=10$; $P<0.001$) (Fig. 2E). Although reduction of birefringence in *col22a1* morphants was similar to that

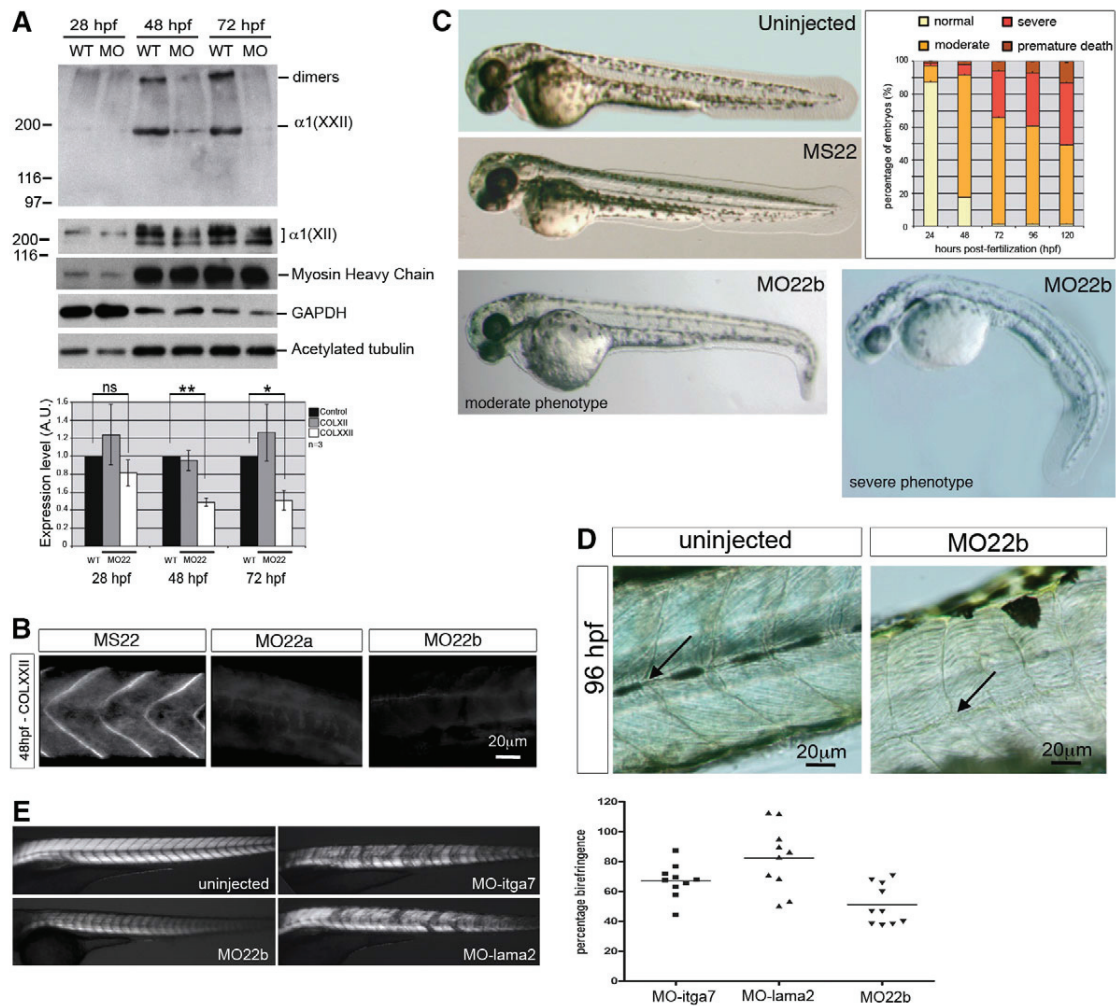


Fig. 2. Morpholino knockdown of *col22a1* in developing zebrafish. (A,B) Efficacy, specificity and functional duration of *col22a1* morpholino-knockdown in developing embryos. (A) Western blots of MO22b-injected (MO) and uninjected (WT) embryo protein extracts with antibodies to COLXXII, myoseptal marker COLXII or myosin heavy chain. Loading controls are GAPDH and acetylated tubulin. Data from one representative experiment are shown. Histogram shows densitometric quantification of relative COLXXII and COLXII expression levels normalized to acetylated tubulin. Data are mean \pm s.e.m. ($n=3$), $*P<0.05$, $**P<0.01$. (B) Immunofluorescence with antibodies to COLXXII of 48 hpf embryos injected with MO22a, MO22b and five-base mismatch morpholino (MS22). Scale bars: 20 μ m. (C,D) Light microscopy analysis of the phenotype. (C) Representative images of 48 hpf uninjected embryos, embryos injected with control MS22, and moderate and severe phenotypes of *col22a1* morphants (MO22b). Histogram shows percentage of MO22-injected larvae displaying no, moderate or severe phenotypes at different developmental stages ($n=250$; number of injections=3). (D) U-shaped somites of 96 hpf MO-injected larvae (MO22b) compared with the V-shaped somites of uninjected larvae (arrows). Scale bars: 20 μ m. (E) Birefringence of 4 dpf MO22-injected larvae. Representative images of larvae injected with morpholinos against *col22a1* (MO22, moderate phenotype), *lama2* (MO-lama2) and *itga7* (MO-itga7) compared with uninjected larvae. Quantification of birefringence measurements. Values represent mean birefringence normalized to uninjected larvae. Anterior is towards the left.

obtained with the *itga7* and *lama2* dystrophic morphants (Fig. 2E, histogram), *col22a1* morphants did not exhibit a stochastic muscle detachment phenotype, as observed in MO-*lama2* or MO-*itga7* larvae (Fig. 2E, left panel). The reduction of birefringence in MO22-injected larvae was rather caused by a general disorganization of muscles, including larger dark zones at myotome boundaries. When combined, our results showed that loss of COLXXII leads to defects that are indicative of a muscular dystrophic-like phenotype.

***col22a1* knockdown causes muscle weakness and contraction-induced fiber detachment**

The impaired swimming activity of *col22a1* zebrafish suggested defects in muscle force generation. We thus investigated the repercussions of *col22a1* knockdown on electrically evoked skeletal

muscle contractile performance at 5 dpf. Repeated twitch contractions elicited in uninjected larvae exhibited stable amplitudes (Fig. 3A). In MO22-injected larvae, the contractile force was considerably decreased and the mean amplitude of the twitch response was about eight times smaller. Given the localization of COLXXII, this muscle weakness likely resulted from reduced force transmission, although a decrease in the number of functional fibers involved in force development cannot be excluded. We indeed occasionally observed muscle detachment in morphants (Fig. 3B). Acridine Orange exclusively stained the retracted fibers, indicating that muscle fibers underwent cell death only after they detach (Fig. 3B). Histology analysis of 5 dpf MO22-injected larvae revealed cell-free spaces in myotomes (Fig. 3B), resulting from muscle fiber detachment and retraction. In addition, the myosepta

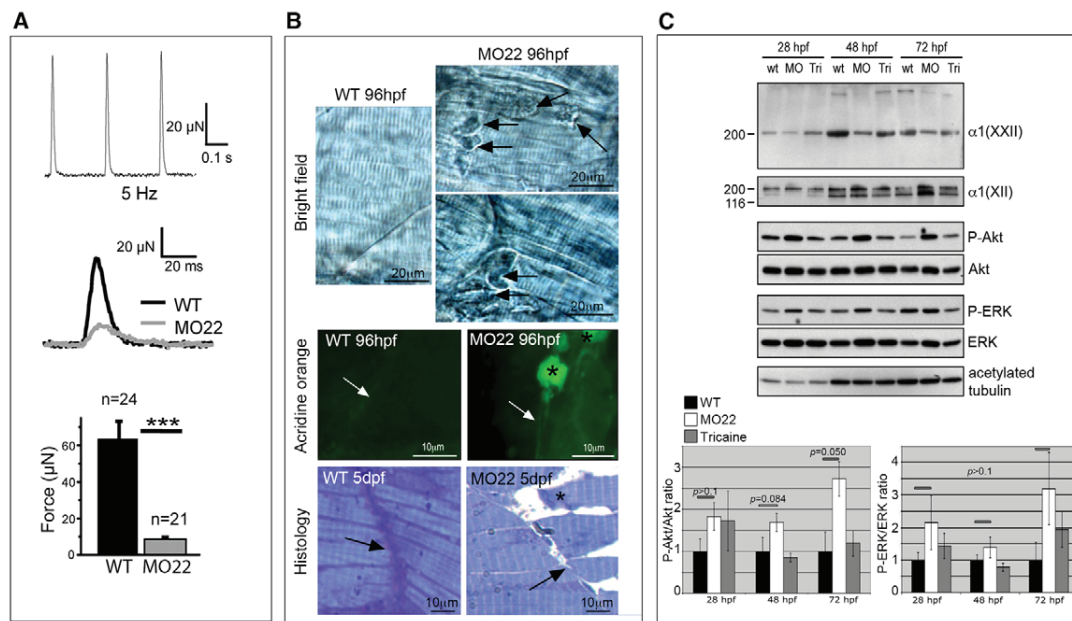


Fig. 3. *col22a1* knockdown leads to muscular dystrophic phenotype. (A) Recording of contraction in response to single supramaximal electric shocks applied to wild-type and MO-22-injected larvae. Twitch responses (middle panel) and mean contraction amplitudes (bottom panel) of 5 dpf wild-type (black) and MO22-injected (gray) larvae. Data are mean±s.e.m. *** $P<0.001$. (B) 96 hpf uninjected (WT) and MO22-injected (MO22) larvae. Light microscopy (top panel) revealed muscle detachment and retraction (MO22, arrows) from vertical myoseptum. Acridine Orange staining (middle panels): asterisks point to Acridine Orange-positive retracted muscle fibers in MO22 and arrows indicate myoseptum. Histology (bottom panels) of MO22 shows cell-free spaces, reduced MTJ interdigitations (arrows) and clear appearance of myosepta compared with WT. Asterisk indicates a detached and retracting muscle fiber. (C) Western blots with antibodies to phospho-Akt (P-Akt) and total Akt protein (Akt) or phospho-ERK1/2 (P-ERK1/2) and total ERK protein (ERK1/2) of extracts from uninjected (wt) and tricaine-treated (Tri) wild-type and MO22-injected (MO) embryos at different stages. Loading controls are antibodies to COLXXII and acetylated tubulin. Data from one representative experiment are shown. Only one band is detected with ERK1/2 antibodies, as reported for zebrafish (Ng et al., 2012). Histograms show densitometric quantification. Phospho-protein levels were normalized against total protein levels. Data are mean±s.e.m. ($n=3$).

and MTJ displayed perturbed morphology. The myosepta appeared larger and exhibited a clear appearance and the MTJs had lost their interdigitations (Fig. 3B), two structural defects that may also cause muscle weakness. Collectively, these data indicate that COLXXII is crucial for force development, and the integrity and maintenance of muscle attachments.

***col22a1* knockdown leads to increased phosphorylation of the survival factor Akt**

An increase in the phosphorylation of the survival factors Akt (Peter and Crosbie, 2006; Kim et al., 2011) and ERK (Boppart et al., 2011) was reported in dystrophic skeletal muscles and interpreted as a compensatory mechanism that counteracts muscle waste. We therefore investigated the activation of Akt and ERK in skeletal muscles of decapitated and de-yolked MO22-injected and wild-type embryos. Because mechanical forces have also been reported to induce Akt and ERK activation (Mohamed et al., 2010), in parallel with uninjected embryo controls, we raised wild-type embryos under anesthetizing (tricaine) conditions to inhibit muscle contractions. Contrary to controls, phosphorylation of Akt (P-Akt) significantly increased in MO22-injected embryos when substantial increase of embryo movement occurs within chorion (48 hpf) and at time of hatching (72 hpf) (Fig. 3C). We also detected similar elevation of the levels of ERK phosphorylation (P-ERK) though not significant (Fig. 3C). Unexpectedly, a decrease in COLXXII levels was observed in embryos treated with tricaine that was comparable with the reduction observed in 72 hpf MO22-injected embryos (Fig. 3C), suggesting that mechanical stress can regulate COLXXII. Hence,

our data show that the reduction of COLXXII expression does not activate Akt when embryos are raised under anesthetic that suppresses contractile activity and the incidence of muscle injury. Instead, in unanesthetized embryos, knockdown of COLXXII expression caused contraction-induced muscle damage that resulted in a compensatory mechanism promoting cell survival through Akt activation. Similar results were obtained for p-ERK (Fig. 3C). In conclusion, contraction-induced injury is responsible for the activation of Akt in morphant skeletal muscles, most likely to compensate for muscle waste induced by COLXXII deficiency.

COLXXII is required for strengthening MTJ stability at the junctional extracellular matrix

To determine the origin of muscle weakness and to detail the site of rupture leading to muscle fiber detachment, we next examined, using transmission electron microscopy (TEM), the ultrastructure of skeletal muscle of morphants. In agreement with the above western blot data that showed normal MHC expression (Fig. 2A), we did not detect any changes in the ultrastructure of the contractile system and triadic structures of morphants (Fig. 4B) when compared with uninjected larvae (Fig. 4A). Thus, lack of COLXXII did not prevent muscle fiber formation and differentiation. Sarcolemma was tightly associated to the junctional BM in MO22-injected larvae (Fig. 4D). As in controls (Fig. 4C), the BM formed a continuous layer, although, in some areas, its thickness appeared irregular (Fig. 4D). Remarkably, and in support of our histology data (Fig. 3B), MTJs lacked almost completely sarcolemmal folding in MO22-injected larvae (compare Fig. 4D with control in 4C). In addition, morphant

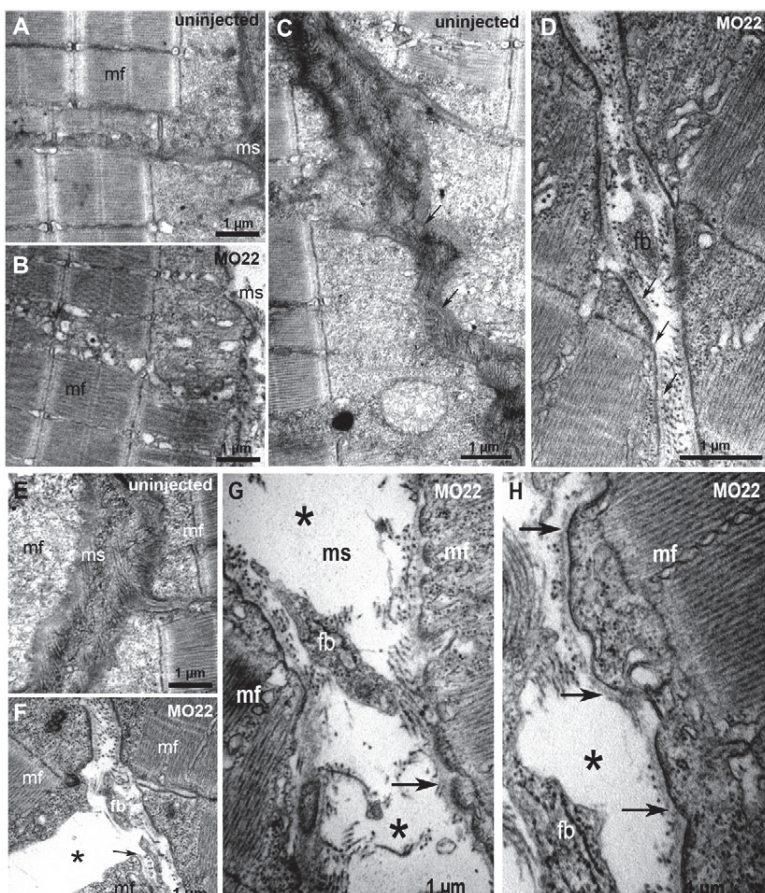


Fig. 4. TEM reveals defects in MTJ and myosepta ultrastructure, and identifies the rupture site at the outer surface of the basement membrane. Micrographs of 5 dpf uninjected (A,C,E) and MO22-injected (B,D,F-H) larvae. (A,B) Sarcomeric organization of skeletal muscle in morphants (B) and uninjected larvae (A). (C,D) Detail of the sarcolemma and basement membrane structure (arrows) in wild type (C) and morphants (D). (E-H) Detail of MTJ and myoseptum structure in wild type (E) and morphants (F-H). Asterisks show a gap corresponding to detached and retracted fiber (F) and tears between myoseptum and muscle fibers (G,H). At rupture sites, basement membrane remains attached to sarcolemma (G,H, arrows) and is torn away with fiber detachment and retraction (F, arrow). Contrary to control (E), fibroblasts (fb) are observed in damaged myosepta (F-H). ms, myosepta; mf, muscle fiber.

myosepta showed substantial ultrastructural defects. Wild-type myosepta consist of tightly packed collagen fiber bundles with an oblique arrangement (Fig. 4C,E). By striking contrast, myosepta of MO22-injected larvae appeared distended with sparse unorganized collagen fibrils, even in the absence of muscle cell detachment (Fig. 4D,F). In agreement with the reduced fibril density observed in morphant myosepta, qRT-PCR analysis of *coll1a* (encoding the fibril-forming collagen I) expression revealed progressive downregulation as embryos developed (supplementary material Fig. S4B). In addition, unlike controls (Fig. 4C,E), damaged myosepta contained numerous fibroblasts (Fig. 4D,F-H). Triple immunofluorescence staining with antibodies to the myoseptal marker COLXII confirmed that loss of COLXXII affects the structure of myosepta that appeared widened, distorted and irregular, and contained numerous Hoechst-positive elongated cells (compare Fig. 5B with control in 5A). Finally, F-actin staining revealed that instead of being regularly packed (Fig. 5A), muscle fibers of morphants appeared twisted and slack (Fig. 5B). Our data imply that damaged myosepta and MTJ may not be stiff enough to function optimally, resulting in a reduced tensile strength and defective muscle fiber packing.

Numerous tears (Fig. 4G,H) were observed in the vertical myosepta of MO22-injected larvae. The BM remained firmly attached to sarcolemma but interactions with the myoseptal collagen fibrils were disrupted (Fig. 4G,H). Accordingly, when muscle fiber has detached (Fig. 4F), an interruption of the BM was observed at the rupture site, indicating that the BM has retracted with the muscle fibers (Fig. 4F). We next performed confocal double

immunostaining with antibodies to the BM component laminin and to the sarcomeric α -actinin to examine whether laminin epitopes retract with detached fiber ends (Fig. 5C,D). Laminin antibodies primarily stained the MTJ of uninjected (Fig. 5C) and MO22-injected (Fig. 5D) larvae but the MTJ in MO22-injected larvae appeared distorted and irregular (Fig. 5D). In accordance with TEM observations, we observed that laminin epitopes retracted with detached fiber ends (Fig. 5D), indicating that BM component laminin remained associated with sarcolemma when muscle fibers detach and retract. In all, these results indicate that loss of COLXXII alters the interactions between muscle BM and myoseptal collagen fibrils at MTJ, predisposing to muscle cell detachment.

COLXXII functionally and structurally interacts with integrin α 7 β 1 linkage system

The attachment of muscle fibers to ECM is mainly mediated by the integrin α 7 and dystrophin-glycoprotein complex (DGC). In skeletal muscle, the BM component laminin α 2 interacts with DGC α -dystroglycan and integrin α 7 β 1, and thereby connects sarcolemma to ECM. Given similarities of their localization at the MTJ and phenotypes (impaired motility behavior, defective MTJ, reduced mechanical stability), we hypothesized that COLXXII may interact with transmembrane or extracellular components of the major linkage systems, such as the integrin α 7 (*itag7*), laminin α 2 (*lama2*) and/or α -dystroglycan (*dag1*). COLXXII belongs to the FACIT subset of the collagen family, the members of which are characterized by their capacity to mediate protein-protein interactions (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). To determine

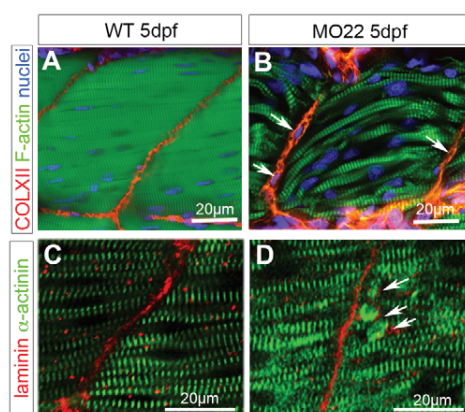


Fig. 5. Whole-mount confocal immunofluorescence. (A,C) Uninjected wild-type (WT) and (B,D) MO22-injected (MO22) larvae at 5 dpf stained with (A,B) anti-COLXXII (red), F-actin (green) and Hoescht solution (blue); and (C,D) laminin (red) and α -actinin (green) antibodies. (A,B) MO22-injected myosepta (B) contain numerous Hoechst-positive cells (blue, arrows). (C,D) Arrows in D indicate laminin epitope (red) retraction with detached muscle cells (green) in MO22-injected larvae.

whether COLXXII is a novel player of one or both of the linkage systems, we conducted gene interaction assays as described (Carney et al., 2010) (Fig. 6). For that, we first determined sub-phenotypic doses of morpholinos against each gene and injected MO22 and MO-*itga7*, MO-*lama2* or MO-*dag1* into one-cell embryos at the indicated doses, either alone or in combination, and assessed the occurrence of muscle fiber detachments in injected embryos at 72 hpf (Fig. 6). Only a few embryos (from 0 to 20%) displayed muscle detachment phenotype when morpholinos were injected individually at low doses (Fig. 6A-C). When combined, sub-phenotypic doses of MO22 and MO-*itga7* dramatically increased the percentage of embryos with muscle detachment (Fig. 6A), whereas co-injection of MO22 with MO-*dag1* failed to substantially compromise muscle attachment (Fig. 6C). In accordance with previous work demonstrating that laminin $\alpha 2$ interacts both with integrin $\alpha 7 \beta 1$ and dystroglycan, synergistic interactions were similarly observed upon injection of MO-*lama2* with either MO-*dag1* or MO-*itga7* (Fig. 6D). Besides, co-injection of MO22 and MO-*lama2* had lower effect (Fig. 6B) than combination of MO22 and MO-*itga7* (Fig. 6A), suggesting that additional laminin isoforms may be involved in muscle attachments. Overall, our data suggest that zebrafish COLXXII primary interacts with the integrin $\alpha 7$ linkage complex.

The dystrophic phenotype is rescued by micro-injection of human COLXXII protein

The next issue we addressed was whether zebrafish and human COLXXII are functionally equivalent. For that, we performed protein rescue of the MO22-injected embryo phenotype with the human recombinant protein COLXXII (hCOLXXII) produced and purified as described (supplementary material Fig. S6). One-cell stage embryos were co-injected with purified hCOLXXII and 0.5 pmol MO22 and compared with uninjected larvae and with larvae injected with hCOLXXII or MO22 alone. A significant rescue of the phenotype was achieved by co-injecting 0.16 ng of the human COLXXII with 0.5 pmol of MO22, as judged by their morphology (Fig. 7A-C, Table 2) and ability to respond to touch-evoked stimulations (supplementary material Movie 3). As controls, different combinations of co-injections were performed. Injections

($n=3$) of recombinant human collagen V (Bonod-Bidaud et al., 2007) with MO22 or hCOLXXII with 0.5 pmol morpholinos for the cartilaginous collagen XI (Baas et al., 2009) had no impact on the phenotype rescue (4% of unaffected embryos, $n=150$; 11% of unaffected embryos, $n=150$, respectively). Challenging the MO22-injected larvae with repeated electric shocks led to a considerable increase of the severity of the muscle phenotype (Fig. 7E), but had almost no effect on myotome integrity of larvae co-injected with MO22 and the human COLXXII protein (Fig. 7F) as for wild type (Fig. 7D). TEM examination of the skeletal muscle of MO22-injected larvae confirmed the above TEM observations: distended myosepta with sparse collagen fibrils, strong reduction of the sarcolemma folds and loose muscle attachments (Fig. 7H). By contrast, skeletal muscle fibers, MTJs and myosepta of MO22/hCOLXXII-co-injected larvae (Fig. 7I) appeared similar to uninjected larvae (Fig. 7G) though subtle differences in myoseptal collagen fibril density and MTJ folds persisted. In all, the rescue experiments provide evidence for a conserved function of COLXXII in humans.

DISCUSSION

In this study, we have cloned and characterized the zebrafish *col22a1* and shown that its protein product COLXXII, expressed primarily by skeletal muscle, is a component of developing and mature MTJ. The spatio-temporal expression profile of *col22a1* is compatible with a function in the stabilization of muscle attachments. First, COLXXII protein was detected in myotomes when fast muscle cells have already elongated and attached to vertical myosepta (Blagden et al., 1997; Henry et al., 2005; Snow and Henry, 2009; Charvet et al., 2011). Second, as embryos developed, *col22a1* transcript strictly localized at trunk and tail muscle fiber ends where they attach to myosepta and the protein was deposited at the MTJ. Expression of COLXXII in mouse embryos has not been reported yet. However, *col22a1* mRNA expression and protein distribution in perinatal and adult mice are consistent with our data (Koch et al., 2004). Third, levels of transcript and protein rose considerably when skeletal muscle contractions increased within chorions and then at hatching, suggesting that expression is regulated by mechanical stress as reported for the sarcomeric protein Tcap (Zhang et al., 2009). In support of this assumption, treatment of embryos with anesthetic reduced COLXXII levels significantly.

Knockdown of COLXXII resulted in a gross phenotype similar to that previously reported for the 'dystrophic' class of mutants *sapje* (*sap*, dystrophin), *candyfloss* (*caf*, laminin $\alpha 2$), *lost-contact* (*loc*) also called *ilk* (integrin-linked kinase), *patchytail* also called *dag1* (dystroglycan) (Bassett et al., 2003; Hall et al., 2007; Postel et al., 2008; Gupta et al., 2011), and *itga7* (integrin $\alpha 7$) morphants (Postel et al., 2008), all components of the muscle linkage systems present at the MTJ. Although *col22a1* morphants display a dystrophic phenotype, muscle lesions observed in *col22a1* morphants were considerably less severe than in the *caf/lama2* and *loc/ilk* mutants for which massive muscle detachment was observed in individual somites (Hall et al., 2007; Postel et al., 2008). Muscle fiber detachment occurred spontaneously in some *col22a1* morphants but was greatly enhanced when morphants were challenged with high-frequency electrically elicited contractures or with repeated touch-evoked stimuli. Nevertheless, COLXXII knockdown led to a highly significant reduction of muscle force. Because of the apparent integrity of the muscle fiber contractile apparatus, as judged by TEM, confocal microscopy and expression of the late muscle differentiation MHC marker, muscle weakness of *col22a1*

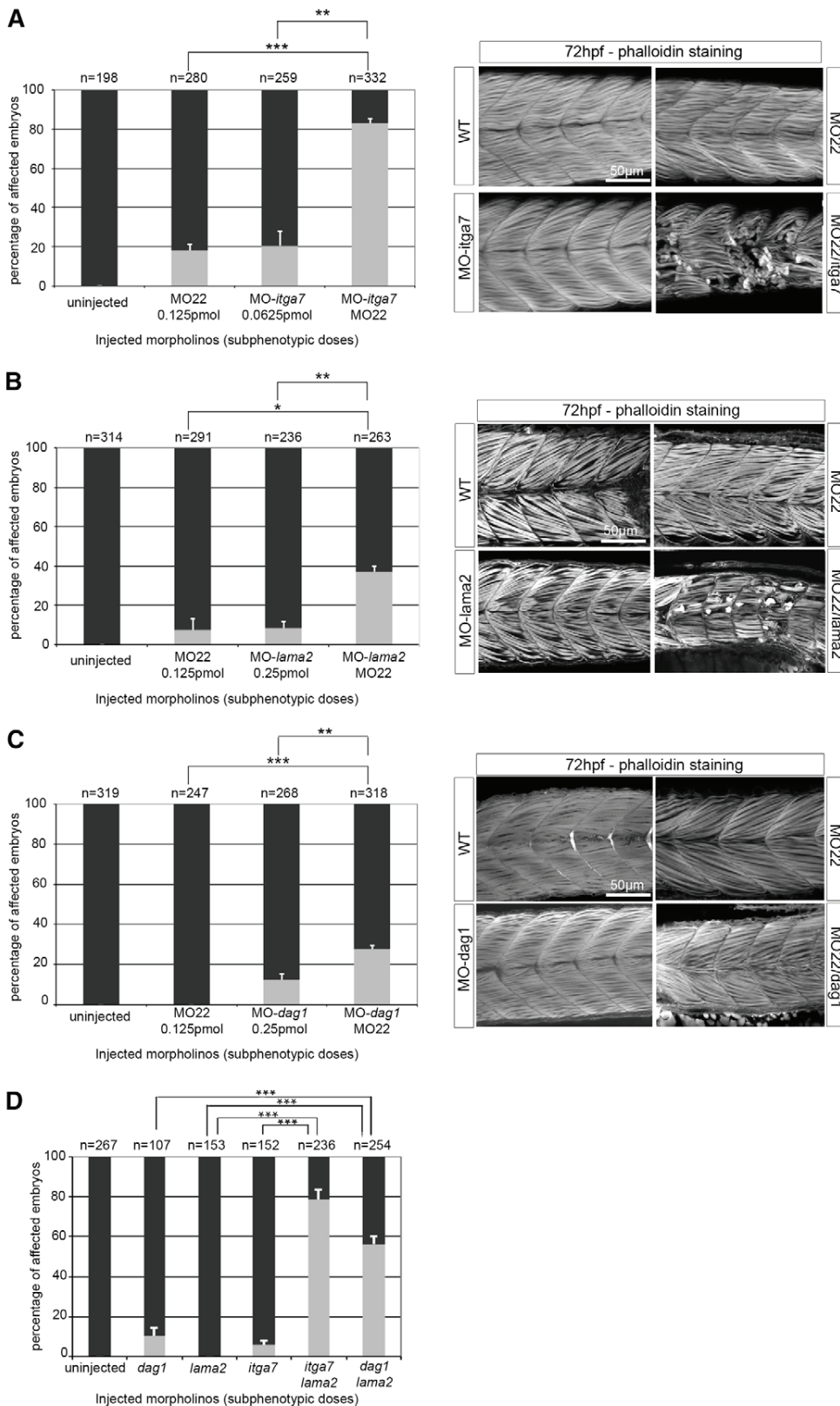


Fig. 6. Genetic interaction between *col22a1* and *itga7*. Synergistic genetic interactions between zebrafish *col22a1* (COLXXII) and *itga7* (integrin $\alpha7\beta1$) (A), *lama2* (laminin $\alpha2$) (B) or *dag1* (dystroglycan) (C), and between *lama2* and *itga7* or *dag1* (D), and mean frequencies of muscle detachment phenotype observed in morphants. Images show lateral views of 72 hpf embryo tail musculature stained with phalloidin-rhodamine after injection, alone or in combination, of sub-phenotypic doses of morpholinos against *col22a1*, *itga7* (A), *lama2* (B) and *dag1* (C). Scale bars: 50 μ m. Data are mean \pm s.e.m. (n=3). ***P<0.001; **P<0.01.

morphants was instead attributable to a reduction of force transmission capacity together with fiber detachment that contributed to reduced number of contracting fibers. In accordance with this line of reasoning, myosepta of *col22a1* morphants

exhibited loosely packed and low-density collagen fibrils compared with the densely packed collagen fibrils of wild-type myosepta, likely causing tissues to respond inefficiently to contractile force and vulnerability to mechanical stress. TEM examination of the

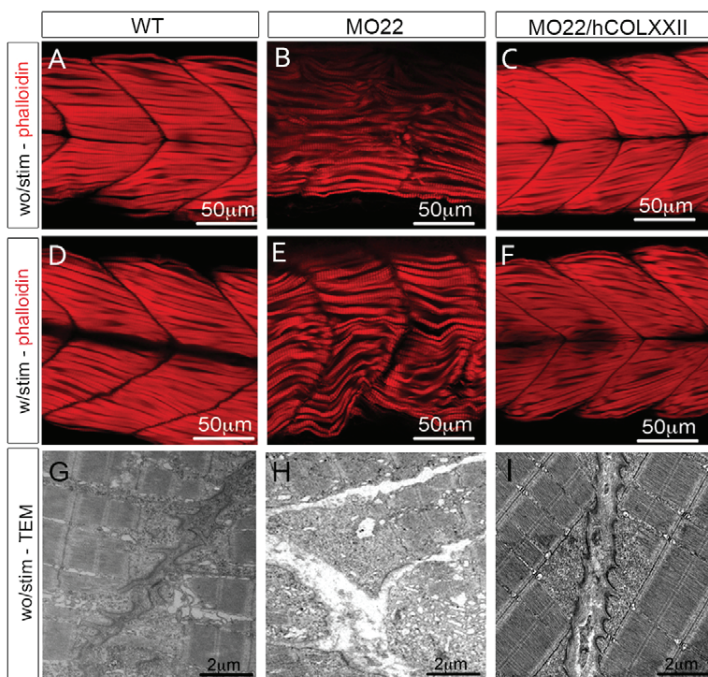


Fig. 7. Protein rescue of MO22-injected embryos. (A-F) 72 hpf and (G-I) 5 dpf uninjected (WT) and embryos injected with 0.16 ng hCOLXXII protein, with 0.5 pmol MO22 or in combination (MO22+hCOLXXII). (A-F) Whole-mount fluorescence staining with phalloidin-rhodamine of embryos stimulated (w/stim, D-F) or not (wo/stim, A-C) with high-frequency field. (G-I) TEM micrographs of skeletal muscle at 5 dpf. Scale bars: 50 μm in A-F; 2 μm in G-I.

dystrophic mutants *patchytail/dag1* (Gupta et al., 2011) and *soft/lamb2* mutants (Jacoby et al., 2009) also revealed noticeable defects in myoseptal structure. In addition to myoseptal defects, a strong reduction of sarcolemma folds at the MTJ was observed in *col22a1* morphants, as reported in mice models for muscular dystrophy, such as in *itga7*-null mice (Miosge et al., 1999), *mdx* mice (Law and Tidball, 1993; Law et al., 1995) and the double mutants *mdx/itga7^{-/-}* and *itga7/utr^{-/-}* (utrophin) (Rooney et al., 2006; Welser et al., 2009), but not reported in any of the zebrafish dystrophic class mutants. Reduction of MTJ folds and lack of myoseptal stiffness may also compromise force transmission and likely contributed to fragile muscle attachments. A unique feature of the *col22a1* morphants was the presence of numerous fibroblasts in damaged myosepta. Fibroblasts that are high producers of fibrillar collagens may have been recruited to repair the damaged myosepta, as reported in the tendon-healing process (Wang, 2006). Taken together, our results show that COLXXII contributes to the stabilization and maintenance of muscle attachments and efficient transmission of contractile forces.

Because the onset of COLXXII expression occurred at 24 hpf when the formation/maturation of BM is not completed (Charvet et al., 2011), one can expect that lack of COLXXII would affect junctional BM formation. However, *col22a1* morphants displayed a continuous BM, though irregular in thickness, suggesting that COLXXII is involved in BM maturation but not required for BM

initial assembly. Similarly, no ultrastructural defects were reported in junctional BM in absence of perlecan (Zoeller et al., 2008) or laminin $\alpha 2$ (Hall et al., 2007), though the two proteins are major BM components. With TEM, we demonstrated that muscle detachment occurs at junctional extracellular matrix, between the outer surface of BM and the adjacent myoseptal collagen fibers. This result is consistent with the immunogold localization of COLXXII at the outer surface of mouse skeletal muscle BM (Koch et al., 2004).

Interestingly, we showed that muscle detachment is accompanied by induction of Akt signaling pathway. Elevated Akt signaling was found in skeletal muscle in dystrophic mouse models and in individuals with muscular dystrophy (Peter and Crosbie, 2006). Akt treatment of *mdx* mice counteracted muscle wasting by promoting muscle regeneration (Kim et al., 2011). In addition, compensatory increased $\alpha 7\beta 1$ integrin levels in dystrophin-deficient mice were found to confer a protective effect in dystrophic muscle through the activation of ILK/Akt signaling pathway (Boppart et al., 2011). Elevated Akt activation in *col22a1* morphants can thus represent a compensatory response to counteract muscle injury in zebrafish.

In line with the aforementioned role of COLXXII in the stabilization of muscle attachments and given the phenotype similarities to dystrophic mutants, we assessed the *in vivo* contribution of COLXXII in DGC and/or integrin linkage systems by conducting *in vivo* synergistic interactions. The synergistic interactions data point to a role of COLXXII in stabilizing muscle

Table 2. Muscle phenotypes in treated embryos

Injection	Number of injections	Number of embryos	Phenotype (%)		
			Wild type	Muscle detachment	Other
None	3	250	99	0	1
MO22	3	350	4	90	6
hCOLXXII	3	250	86	0	14
MO22 + hCOLXXII	3	500	86	9	5

Percentage of uninjected embryos and embryos injected embryos with 0.5 pmol MO22 or 0.16 μg hCOLXXII alone or in combination (MO22+hCOLXXII) that display muscle phenotype (without stimulation) as scored visually under a stereoscope.

attachment through the integrin $\alpha 7\beta 1$ linkage system. This is not surprising because, as a FACIT collagen (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005; Veit et al., 2006; Agarwal et al., 2012), COLXXII is well suited to engage molecular interactions and to incorporate protein complexes. Recently, we showed that the FACIT collagen XIV participates to epidermal-dermal cohesion in developing zebrafish (Bader et al., 2013). However, whether COLXXII binding to integrin is direct or indirect is questionable. Although we cannot exclude a direct interaction with integrin, because recombinant human COLXXII was reported to interact with $\alpha 2\beta 1$ integrin-expressing cells (Koch et al., 2004), the fact that disruption occurred external to BM without compromising sarcolemmal integrity supports an indirect interaction. However, co-injection of sub-phenotypic doses of *col22a1* and *lama2* morpholinos elicited weaker phenotype than that generated with co-injection of *col22a1* and *itga7* morpholinos. In addition, although *lama2* was shown to participate in both DGC and integrin linkage systems, double injection of *dag1* and *col22a1* morpholinos at subphenotypic doses revealed that COLXXII does not primary participate to the DGC. These results suggest that, in addition to laminin $\alpha 2$, COLXXII may interact with $\alpha 7\beta 1$ through binding to another laminin isoform. Indeed, developing myotomes express several isoforms (Sztal et al., 2011) and epistasis experiments in zebrafish suggest that different laminin isoforms contribute to muscle attachments and integrity (Sztal et al., 2012). Knockdown of *lama4* or *itga7* resulted in a loss of ILK at the MTJs, which provides evidence that laminin $\alpha 4$ is also involved in muscle attachments (Postel et al., 2008). Collectively, our results suggest that COLXXII is a constitutive protein of the transmembrane $\alpha 7\beta 1$ linkage system that connects BM to the myoseptal extracellular matrix at the MTJ.

The specialized ECM that surrounds muscle cells as they differentiate is thought to play an important role in the formation, maintenance and integrity of muscle. Supporting this assumption, the number of causative extracellular matrix genes associated with muscular dystrophies is expanding (Lisi and Cohn, 2007). Zebrafish represent an excellent model for this group of disorders as *sap*, *caf* and *patchytail* mutants, and morphants in *itg7a*, display compromised muscle attachments that result in muscular dystrophies of various severities (Ingham, 2009) and also for understanding collagen function (Pagnon-Minot et al., 2008; Baas et al., 2009; Bader et al., 2013). The dystrophic phenotype of the *col22a1* morphants and its rescue with injection of the human recombinant protein together with the high sequence conservation between the zebrafish *col22a1* gene and their vertebrate homologs, strongly support a conserved role of COLXXII in humans and qualifies COL22A1 as a candidate gene for muscular dystrophies in humans. Further research should therefore concentrate on the investigation of mutations in COL22A1 gene in defined groups of individuals with unresolved cases of muscular dystrophies.

MATERIALS AND METHODS

Zebrafish strain, maintenance and specific treatments

AB/TU wild-type maintenance, embryo collection and staging were carried out at the zebrafish facilities using established protocols (Bader et al., 2009) (PRECI, SFR Lyon Biosciences Gerland). The developmental stages are given in hours post-fertilization (hpf) and days post-fertilization (dpf) at 28.5°C, according to morphological criteria. From 24 hpf, embryos were treated with phenylthiourea (Sigma P7629) to prevent pigmentation. To prevent muscle contraction, embryos were treated with tricaine as described previously (Renaud et al., 2011). Embryos were raised in Danieau solution containing 0.008% tricaine from 10 hpf onwards and replaced every 24 hours.

col22a1 cloning and RT-PCR

Zebrafish total RNA was isolated from 24 hpf embryos using TRIZOL reagent (Invitrogen) and reverse transcribed with SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies) and oligo(dT)₁₅. Full-length zebrafish *col22a1* was PCR amplified with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) using specific primers (supplementary material Table S1). The PCR product was gel purified and cloned into pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen). The sequence obtained was submitted to the EMBL Sequence Nucleotide Database and registered under the accession number HE_981211.

For standard RT-PCR, total RNA was reverse transcribed with M-MLV reverse transcriptase and random primers (Promega). PCR reactions were performed with taq polymerase (New England Biolabs) and *col22a1 VWA*, *col22a1 COL4*, *col22a1 NC3* and β -*actin* primers (supplementary material Table S1).

qRT-PCR

First-strand cDNA was prepared as described above and amplified by PCR using FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) mix (Roche) and specific primers (supplementary material Table S1) using a C1000 Thermal cycler with a CFX96 Real-Time system (Biorad). *beta-actin*, *polr2d*, *thp* were selected as housekeeping genes using BESTKEEPER (Pfaffl et al., 2004) and used for normalization. Relative transcript abundances were determined as described previously (Pfaffl, 2001). Student's *t*-tests were used to determine statistical significance ($n=4$).

Whole-mount *in situ* hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization was performed as described previously (Bader et al., 2009). Probes were amplified from 24 hpf zebrafish cDNA using *col22a1 VWA* and *col22a1 TSPN* primers (supplementary material Table S1). Stained embryos were observed with a stereomicroscope or a macroscope (all from Leica) equipped with a digital camera.

Morpholino knockdown

Two morpholinos targeting non-overlapping sequences upstream to the *col22a1* start codon (MO22a 5'-CATGAAGTTGCTGCTCCTGTGGAGA-3', MO22b 5'-CCTGAGCCCAAATCGAACTCCATC-3'), and a control mismatch morpholino (MS22 5'-CCTCAGGCCAAATGGAAA-ATCAATC-3') were purchased from Gene Tools (OR, USA) and 0.5 pmol were injected into one- to two-cell embryos as described previously (Pagnon-Minot et al., 2008). Unfertilized eggs were removed at 3 hpf and 50 to 200 embryos were then kept for gross phenotype analysis and remaining eggs were processed as described below.

For gene interaction assays, the integrin $\alpha 7$ -ATG morpholinos (MO-*itga7*) (Postel et al., 2008), laminin- $\alpha 2$ -MO (MO-*lama2*) (Pollard et al., 2006), dystroglycan-MO (MO-*dag1*) (Parsons et al., 2002) were used. Sub-phenotypic doses determined for each morpholino (0.0625 pmol for MO-*itga7*, 0.125 pmol for MO22a, 0.25 pmol for MO-*dag1* and MO-*lama2*) were used for co-injection into one-cell stage embryos. Morphological and phenotypic observations of morphants were performed with a stereomicroscope or a light microscope (all from Leica) equipped with a digital camera. Muscle detachment was scored when at least one somite was affected.

Immunostaining and antibodies

Whole-mount staining was performed as described (Bader et al., 2009). Stained embryos were observed with a Zeiss LSM510 or a Leica SP5 spectral confocal microscope. Images were processed using Adobe Photoshop and ImageJ softwares. For adult fish, frozen samples were embedded in OCT and immunostaining was performed on cryosections.

Rabbit polyclonal antibodies to zebrafish COLXXII were generated as follows. The N-terminal sequence of collagen XXII was amplified using zebrafish cDNA using degenerated primers (forward, 5'-GAYCTGGYCTTYMTCCTGGACAC-3'; reverse, 5'-ACRTGGAAGA-CRTGNGCNSWCTT-3'). The sequence was 100% identical to NW_003336732.1. For the generation of the recombinant VWA zebrafish domain, the coding sequence was amplified (forward, 5'-

CACGCTAGCCAAAGAGCAGGTTGTAAGAACGTCC-3'; reverse, 5'-GTGGGATCCTTACCTGATCTTGTGCGATGGCGTCAAAG-3' primers) and cloned into our PCEP (Invitrogen) modified expression vector. Underlined nucleotides are, respectively, the *NheI* and *BamHI* cloning sites. The production of polyclonal antibodies was performed as described previously (Bader et al., 2009). The following primary and secondary antibodies were also used: antibodies to zebrafish collagen XII $\alpha 1$ (COLXXII) (1:200) (Bader et al., 2009); anti-dystrophin (MANDRA-1) from Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, USA) (1:150), anti- α -actinin (A7811) and rabbit anti-laminin (L9393) from Sigma (1:800 and 1:400, respectively); anti-guinea pig IgG Ab coupled to Cy2 and to Cy3 (1:200); anti-rabbit and anti-mouse IgG coupled to Alexa488 (1:500); anti-rabbit IgG coupled to Alexa546 (all from Invitrogen) (1:500). Nuclei were stained with Hoechst solution and F-actin with fluorescent phalloidin conjugates (Sigma).

Birefringence assay

One-cell embryos were injected with 0.25 pmol MO-*itga7*, 0.5 pmol MO-*lama2* or 0.5 pmol MO22. Uninjected and morpholino-injected 4 dpf zebrafish larvae were anesthetized with tricaine, mounted in 1% low melting agarose on a glass slide, placed between two polarizers (3Dlens, Taiwan) and observed with a Leica microscope equipped with a coolSNAP CCD camera. The mean gray value of pixels in the trunk region was measured with ImageJ software. Values are expressed as the percentage of uninjected larvae \pm s.e.m. ($n=10$). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test (GraphPad Prism Software).

Histology and TEM

Zebrafish larvae were processed as previously described (Charvet et al., 2011). Thin sections stained with Methyl-Azur blue were observed with a light microscope (Leica) equipped with a digital camera (Nikon). Ultrathin sections were observed with a Phillips CM 120 electron microscope equipped with a Gatan digital CCD camera at the Centre Technique des Microstructures (UCBL, Villeurbanne, France).

Muscle contraction measurements

Procedure was adapted from Dou et al. (Dou et al., 2008). Zebrafish larvae were anesthetized with 0.017% tricaine and the head was crushed. Larvae were then bathed in a solution containing (in mM) 140 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES (pH 7.2). The tail was stuck to the bottom of the dish using a small pin while the head was hung on the extended arm of an AE801 force transducer mounted on a micromanipulator that allowed length adjustment. The whole fish musculature was stimulated by applying electric field pulses of 0.5 ms duration using two electrodes placed on either side of the fish. In each larva tested, the voltage was progressively augmented to give maximal twitch response and the voltage selected for investigating maximal force was then further increased by 20%. The larvae were gradually stretched from a resting length up to an optimal length, giving maximal force signal in response to stimulation. The contraction amplitude was measured at the peak of the force signal.

Protein extraction and western blot analyses

Embryos (30/stage/experiment) were sacrificed and yolks and head were discarded. Specimens were then frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Embryos were lysed in 50 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 1% SDS, 10 mM sodium fluoride and 1 mM sodium orthovanadate containing a protease inhibitor cocktail (Complete EDTA-free, Roche). Total extracts were sonicated and 10 μg of proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. Immunological detection was performed with HRP-conjugated secondary antibodies using Immuno-Star WesternC as a substrate (Bio-Rad). The primary antibodies were: rabbit monoclonal anti-phospho-Ser473 Akt (193H12) (1:1000), rabbit polyclonal anti-Akt (1:2000), rabbit monoclonal anti-phospho-Thr202/Tyr204 Erk1/2 (197G2) (1:1000), rabbit monoclonal anti-Erk1/2 (137F5) (1:2000) and rabbit monoclonal anti-GAPDH (14C10) (1:10,000) (Cell Signaling Technology); mouse monoclonal anti-myosin

heavy chain antibody (F59, DSHB) (1:100); and mouse monoclonal anti-acetylated tubulin antibody (6-11B-1, Sigma) (1:10,000). Band intensities were quantified using ImageJ software and Student's *t*-test was used to determine statistical significance.

Touch-evoked escape behavior assay

Live 5 dpf fishes were placed in Danieau buffer. The motility of larvae after stimulation by tail touch was recorded using a macroscope (Macro-Fluo, Leica) with a digital camera system.

Protein rescue

Protein rescue was performed as previously described (Zoeller et al., 2008). Purified recombinant human full-length COLXXII was prepared as previously described (Koch et al., 2004). Recombinant proteins, human COLXXII or human collagen V domain as control (Bonod-Bidaud et al., 2007), were injected in embryos either alone or in combination with morpholino (0.5 pmol) MO22 or *coll11a1* morpholinos as control (Baas et al., 2009) as described above. Fifty to 200 embryos were kept for gross phenotype analysis; 5 and 10 larvae were processed for TEM and phalloidin-rhodamine staining respectively.

Acknowledgements

We thank Laure Bernard (PRECI) for fish maintenance and Christophe Chamot (PLATIM) for expert image analysis (SFR Lyon-Biosciences-Gerland), the 'Centre Technique des Microstructures' (UCBL, Villeurbanne) for technical assistance with transmission electron microscopy and Pauline Nauroy for sharing qRT-PCR primers.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

B.C. performed and analyzed all experiments reported in Fig. 1A,B,D, Fig. 2B-D, Fig. 3A,B, Fig. 5 and Fig. 7; A.G. performed and analyzed all experiments reported in Table 1, Fig. 1C, Fig. 2A, Fig. 3C and all experiments reported in supplementary material Fig. S1, Fig. S2, Fig. S3B and Fig. S5. M.M. performed and analyzed experiments reported in Figs 4 and 6 and contributed to some experiments in Figs 5 and 7 and supplementary material. D.Z. and J.S. produced and characterized antibodies against zebrafish collagen XXII and the recombinant proteins and contributed to experiments reported in supplementary material Figs S3 and S6. E.G. contributed to some experiments reported in Fig. 6 and subsequent data analysis. S.B. designed, performed and analyzed the experiment reported in Fig 2E. H.L.B. and C.M. contributed to Fig. 1B and Fig. 3C, respectively. B.A. designed, supervised and analyzed all experiments reported in Fig. 3A. M.K. designed and supervised production of antibodies and recombinant proteins and subsequent data analysis. B.C., A.G., B.A. and M.K. helped with manuscript editing and critical review. F.R. supervised all experimental design, analyzed all data and wrote the manuscript.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche [10BLAN121901], by the Région Rhône-Alpes (Cible) and Association Française contre les Myopathies [MNM1-2010] to F.R.; by the Köln Fortune Programm to M.K. and D.Z.; and by the Fondation pour la Recherche Médicale to B.C.

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.096024/-/DC1>

References

- Agarwal, P., Zwolanek, D., Keene, D. R., Schulz, J. N., Blumbach, K., Heinegård, D., Zaucke, F., Paulsson, M., Krieg, T., Koch, M. et al. (2012). Collagen XII and XIV, new partners of cartilage oligomeric matrix protein in the skin extracellular matrix suprastructure. *J. Biol. Chem.* **287**, 22549-22559.
- Baas, D., Malbouyres, M., Haftek-Terreau, Z., Le Guellec, D. and Ruggiero, F. (2009). Craniofacial cartilage morphogenesis requires zebrafish *col11a1* activity. *Matrix Biol.* **28**, 490-502.
- Bader, H. L., Keene, D. R., Charvet, B., Veit, G., Driever, W., Koch, M. and Ruggiero, F. (2009). Zebrafish collagen XII is present in embryonic connective tissue sheaths (fascia) and basement membranes. *Matrix Biol.* **28**, 32-43.
- Bader, H. L., Lambert, E., Guiraud, A., Malbouyres, M., Driever, W., Koch, M. and Ruggiero, F. (2013). Zebrafish collagen XIV is transiently expressed in epithelia and is required for proper function of certain basement membranes. *J. Biol. Chem.* **288**, 6777-6787.

- Bassett, D. I., Bryson-Richardson, R. J., Daggett, D. F., Gautier, P., Keenan, D. G. and Currie, P. D. (2003). Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development* **130**, 5851-5860.
- Blagden, C. S., Currie, P. D., Ingham, P. W. and Hughes, S. M. (1997). Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. *Genes Dev.* **11**, 2163-2175.
- Bonod-Bidaud, C., Beraud, M., Vaganay, E., Delacoux, F., Font, B., Hulmes, D. J. and Ruggiero, F. (2007). Enzymatic cleavage specificity of the proalpha1(V) chain processing analysed by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **405**, 299-306.
- Boppert, M. D., Burkin, D. J. and Kaufman, S. J. (2011). Activation of AKT signaling promotes cell growth and survival in $\alpha7\beta1$ integrin-mediated alleviation of muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 439-446.
- Carmignac, V. and Durbecq, M. (2012). Cell-matrix interactions in muscle disease. *J. Pathol.* **226**, 200-218.
- Carney, T. J., Feitosa, N. M., Sonntag, C., Slanchev, K., Kluger, J., Kiyozumi, D., Gebauer, J. M., Coffin Talbot, J., Kimmel, C. B., Sekiguchi, K. et al. (2010). Genetic analysis of fin development in zebrafish identifies furin and hemicentin1 as potential novel fraser syndrome disease genes. *PLoS Genet.* **6**, e1000907.
- Charvet, B., Malbouyres, M., Pagnon-Minot, A., Ruggiero, F. and Le Guellec, D. (2011). Development of the zebrafish myoseptum with emphasis on the myotendinous junction. *Cell Tissue Res.* **346**, 439-449.
- Cohn, R. D. and Campbell, K. P. (2000). Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* **23**, 1456-1471.
- Desaki, J. (1992). Scanning electron microscopical study of skeletal muscle fiber ends in normal and dystrophic mice. *Arch. Histol. Cytol.* **55**, 449-452.
- Dou, Y., Andersson-Lendahl, M. and Arner, A. (2008). Structure and function of skeletal muscle in zebrafish early larvae. *J. Gen. Physiol.* **131**, 445-453.
- Gupta, V., Kawahara, G., Gundry, S. R., Chen, A. T., Lencer, W. I., Zhou, Y., Zon, L. I., Kunkel, L. M. and Beggs, A. H. (2011). The zebrafish dag1 mutant: a novel genetic model for dystroglycanopathies. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1712-1725.
- Guyon, J. R., Goswami, J., Jun, S. J., Thorne, M., Howell, M., Pusack, T., Kawahara, G., Steffen, L. S., Galdzicki, M. and Kunkel, L. M. (2009). Genetic isolation and characterization of a splicing mutant of zebrafish dystrophin. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 202-211.
- Hall, T. E., Bryson-Richardson, R. J., Berger, S., Jacoby, A. S., Cole, N. J., Hollway, G. E., Berger, J. and Currie, P. D. (2007). The zebrafish candyfloss mutant implicates extracellular matrix adhesion failure in laminin alpha2-deficient congenital muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7092-7097.
- Han, R., Kanagawa, M., Yoshida-Moriguchi, T., Rader, E. P., Ng, R. A., Michele, D. E., Muirhead, D. E., Kunz, S., Moore, S. A., Iannaccone, S. T. et al. (2009). Basal lamina strengthens cell membrane integrity via the laminin G domain-binding motif of alpha-dystroglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 12573-12579.
- Hayashi, Y. K., Chou, F. L., Engvall, E., Ogawa, M., Matsuda, C., Hirabayashi, S., Yokochi, K., Ziober, B. L., Kramer, R. H., Kaufman, S. J. et al. (1998). Mutations in the integrin alpha7 gene cause congenital myopathy. *Nat. Genet.* **19**, 94-97.
- Helbling-Leclerc, A., Zhang, X., Topaloglu, H., Cruaud, C., Tesson, F., Weissenbach, J., Tomé, F. M., Schwartz, K., Fardeau, M., Tryggvason, K. et al. (1995). Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **11**, 216-218.
- Henry, C. A., McNulty, I. M., Durst, W. A., Munchel, S. E. and Amacher, S. L. (2005). Interactions between muscle fibers and segment boundaries in zebrafish. *Dev. Biol.* **287**, 346-360.
- Ingham, P. W. (2009). The power of the zebrafish for disease analysis. *Hum. Mol. Genet.* **18** R1, R107-R112.
- Jacoby, A. S., Busch-Nentwich, E., Bryson-Richardson, R. J., Hall, T. E., Berger, J., Berger, S., Sonntag, C., Sachs, C., Geisler, R., Stemple, D. L. et al. (2009). The zebrafish dystrophic mutant softy maintains muscle fibre viability despite basement membrane rupture and muscle detachment. *Development* **136**, 3367-3376.
- Kawahara, G., Karpf, J. A., Myers, J. A., Alexander, M. S., Guyon, J. R. and Kunkel, L. M. (2011). Drug screening in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 5331-5336.
- Kim, M. H., Kay, D. I., Rudra, R. T., Chen, B. M., Hsu, N., Izumiya, Y., Martinez, L., Spencer, M. J., Walsh, K., Grinnell, A. D. et al. (2011). Myogenic Akt signaling attenuates muscular degeneration, promotes myofiber regeneration and improves muscle function in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1324-1338.
- Koch, M., Schulze, J., Hansen, U., Ashwodt, T., Keene, D. R., Brunken, W. J., Burgeson, R. E., Bruckner, P. and Bruckner-Tuderman, L. (2004). A novel marker of tissue junctions, collagen XXII. *J. Biol. Chem.* **279**, 22514-22521.
- Law, D. J. and Tidball, J. G. (1993). Dystrophin deficiency is associated with myotendinous junction defects in preneurotic and fully regenerated skeletal muscle. *Am. J. Pathol.* **142**, 1513-1523.
- Law, D. J., Caputo, A. and Tidball, J. G. (1995). Site and mechanics of failure in normal and dystrophin-deficient skeletal muscle. *Muscle Nerve* **18**, 216-223.
- Lisi, M. T. and Cohn, R. D. (2007). Congenital muscular dystrophies: new aspects of an expanding group of disorders. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 159-172.
- Miosge, N., Klenczar, C., Herken, R., Willem, M. and Mayer, U. (1999). Organization of the myotendinous junction is dependent on the presence of alpha7beta1 integrin. *Lab. Invest.* **79**, 1591-1599.
- Mohamed, J. S., Lopez, M. A., Cox, G. A. and Boriek, A. M. (2010). Anisotropic regulation of Ankr2 gene expression in skeletal muscle by mechanical stretch. *FASEB J.* **24**, 3330-3340.
- Ng, M. C., Hsu, C. P., Wu, Y. J., Wu, S. Y., Yang, Y. L. and Lu, K. T. (2012). Effect of MK-801-induced impairment of inhibitory avoidance learning in zebrafish via inactivation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in telencephalon. *Fish Physiol. Biochem.* **38**, 1099-1106.
- Pagnon-Minot, A., Malbouyres, M., Haffek-Terreau, Z., Kim, H. R., Sasaki, T., Thisse, C., Thisse, B., Ingham, P. W., Ruggiero, F. and Le Guellec, D. (2008). Collagen XV, a novel factor in zebrafish notochord differentiation and muscle development. *Dev. Biol.* **316**, 21-35.
- Parsons, M. J., Campos, I., Hirst, E. M. and Stemple, D. L. (2002). Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development* **129**, 3505-3512.
- Peter, A. K. and Crosbie, R. H. (2006). Hypertrophic response of Duchenne and limb-girdle muscular dystrophies is associated with activation of Akt pathway. *Exp. Cell Res.* **312**, 2580-2591.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. and Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* **26**, 509-515.
- Pollard, S. M., Parsons, M. J., Kamei, M., Kettleborough, R. N., Thomas, K. A., Pham, V. N., Bae, M. K., Scott, A., Weinstein, B. M. and Stemple, D. L. (2006). Essential and overlapping roles for laminin alpha chains in notochord and blood vessel formation. *Dev. Biol.* **289**, 64-76.
- Postel, R., Vakeel, P., Topczewski, J., Knöll, R. and Bakkens, J. (2008). Zebrafish integrin-linked kinase is required in skeletal muscles for strengthening the integrin-ECM adhesion complex. *Dev. Biol.* **318**, 92-101.
- Renaud, O., Herbomel, P. and Kissa, K. (2011). Studying cell behavior in whole zebrafish embryos by confocal live imaging: application to hematopoietic stem cells. *Nat. Protoc.* **6**, 1897-1904.
- Ricard-Blum, S. and Ruggiero, F. (2005). The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol. Biol. (Paris)* **53**, 430-442.
- Rooney, J. E., Welsler, J. V., Dechert, M. A., Flintoff-Dye, N. L., Kaufman, S. J. and Burkin, D. J. (2006). Severe muscular dystrophy in mice that lack dystrophin and alpha7 integrin. *J. Cell Sci.* **119**, 2185-2195.
- Snow, C. J. and Henry, C. A. (2009). Dynamic formation of microenvironments at the myotendinous junction correlates with muscle fiber morphogenesis in zebrafish. *Gene Expr. Patterns* **9**, 37-42.
- Sztaf, T., Berger, S., Currie, P. D. and Hall, T. E. (2011). Characterization of the laminin gene family and evolution in zebrafish. *Dev. Dyn.* **240**, 422-431.
- Sztaf, T. E., Sonntag, C., Hall, T. E. and Currie, P. D. (2012). Epistatic dissection of laminin-receptor interactions in dystrophic zebrafish muscle. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 4718-4731.
- Turner, D. L. and Weintraub, H. (1994). Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev.* **8**, 1434-1447.
- Veit, G., Hansen, U., Keene, D. R., Bruckner, P., Chiquet-Ehrismann, R., Chiquet, M. and Koch, M. (2006). Collagen XII interacts with avian tenascin-X through its NC3 domain. *J. Biol. Chem.* **281**, 27461-27470.
- Wang, J. H. (2006). Mechanobiology of tendon. *J. Biomech.* **39**, 1563-1582.
- Welsler, J. V., Rooney, J. E., Cohen, N. C., Gurple, P. B., Singer, C. A., Evans, R. A., Haines, B. A. and Burkin, D. J. (2009). Myotendinous junction defects and reduced force transmission in mice that lack alpha7 integrin and utrophin. *Am. J. Pathol.* **175**, 1545-1554.
- Zhang, R., Yang, J., Zhu, J. and Xu, X. (2009). Depletion of zebrafish Tcap leads to muscular dystrophy via disrupting sarcomere-membrane interaction, not sarcomere assembly. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4130-4140.
- Zoeller, J. J., McQuillan, A., Whitelock, J., Ho, S. Y. and Iozzo, R. V. (2008). A central function for perlecan in skeletal muscle and cardiovascular development. *J. Cell Biol.* **181**, 381-394.

Supplementary Figure 1



Figure S1: Alignment of zebrafish collagen XXII $\alpha 1$ chain (HE_981211) with the human (NP_690848.1 version GI:40805823), mouse (NP_081450.1 version GI:254692857) and chicken (NP_001132911.1 version GI:21272) proteins using ClustalW. The overall structure contains a SP signal peptide (SP), a succession of collagenous domains (COL, yellow) interrupted by non-collagenous sequence interruptions (NC, blue) and, at the N-terminal end, a von Willebrand factor A-like (VWA, purple) domain followed by a Thrombospondin N-terminal like (TSPN, green) domain. The zebrafish protein also contains the structural signatures of all FACITs: a double short interruption in the Gly-X-Y repeat pattern of COL1 (double underlined residues) and a conserved CXXXXC motif at the NC1-COL1 junction (in bold). Underlined residues are interruptions in COL domains. Note that the zebrafish, mouse and chicken collagen XXII $\alpha 1$ chain sequences are devoid of NC4 domain that is encoded by exon 40 in the human gene.

Supplementary Figure 2

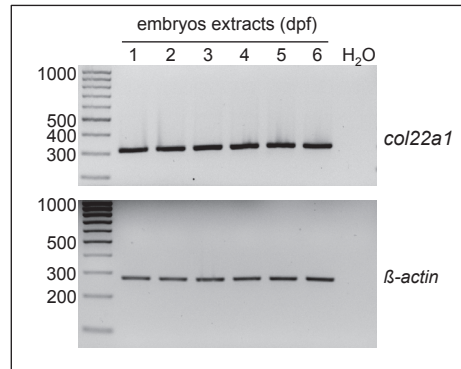


Figure S2: NC4 containing COLXXII isoform is undetectable throughout development. The presence of putative NC4 coding exon(s) in the zebrafish *col22a1* genomic sequence cannot be assessed because of the presence of a polyN stretch unresolved sequence between the last exon encoding COL4 domain and the first exon encoding COL3 domain (Zv9_NA466, NW_003336732.1). RT-PCR with primers flanking the potential NC4 coding exon(s) of the zebrafish *col22a1* cDNA at different developmental stages was thus performed followed by agarose gel electrophoresis analysis of the RT-PCR products that reveals the presence of one band migrating at the expected size for the *col22a1* transcript lacking the NC4 sequence (311bp). This result indicates that the transcript without NC4-coding sequence is by far the major, if not the unique, form expressed in embryos and larvae. *β-actin* was used as a loading control. Molecular weight markers on the right (in bp); dpf, days post fertilization.

Supplementary Figure 3

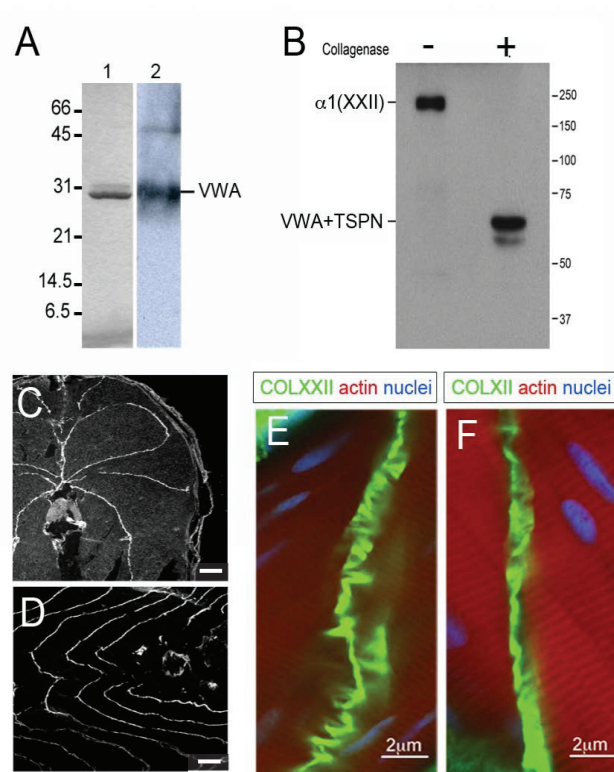


Figure S3: **A.** Generation of rabbit antibodies against the zebrafish VWA domain. Lane 1, 10% SDS-PAGE analysis of the purified recombinant VWA domain produced in 293-HEK cells - The band migrates at the expected position. Lane 2, Western-blot analysis of 293-HEK conditioned media using the polyclonal antibodies obtained after rabbit immunization with the recombinant VWA domain (anti-COLXXII). **B.** Western-blot analysis of recombinant full-length zebrafish collagen XXII incubated with (+) or without (-) collagenase as indicated. Zebrafish *col22a1* cDNA was subcloned into the *XhoI-XbaI* sites of the pCS2+ vector (Turner and Weintraub, 1994) and the construct was used to transiently transfect 293-HEK cells. In absence of collagenase, COLXXII antibodies recognize the zebrafish full-length recombinant COLXXII protein as a band migrating at the expected molecular mass of the protein (200 kDa, lane 1). The collagenase digestion product revealed a 70 kDa fragment that corresponds to the undigested non-collagenous N-terminal domains, VWA plus TSPN (lane 2). **A, B:** protein standard size markers on the left. **C-D.** Immunofluorescence analysis of collagen XXII expression in adult zebrafish. Frozen cross section (C) and lateral section (D) stained with anti-COLXXII. Bars = 20 μm. **E-F.** Whole mount confocal immunofluorescence staining of 5 dpf wild type larvae with anti-COLXXII (E) or anti-COLXII (F), actin is detected with phalloidin-rhodamine (red) and nuclei are stained with Hoechst-33344 (blue).

Supplementary Figure 4

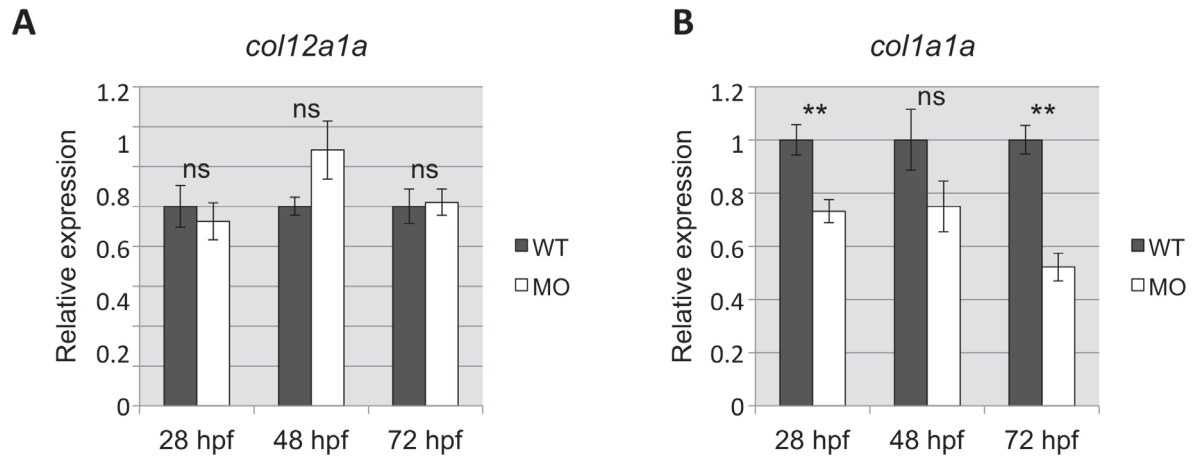


Figure S4: qRT-PCR analysis of *col12a1a* (A) and *col1a1a* (B) gene expression in *col22a1*-MO injected embryos (MO) at 28 hpf, 48 hpf and 72 hpf compared to uninjected (WT) siblings. Error bars represent \pm SEM (n=4). **p<0.01; ns, not significant.

Supplementary Figure 5

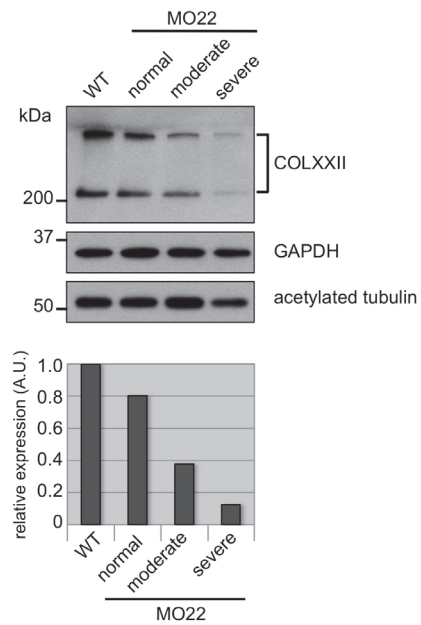


Figure S5: Western-blot of MO22b-injected (MO) and uninjected (WT) embryo protein extracts with antibodies to the COLXXII. MO22b-injected embryos were sorted according to their phenotype: normal, moderate and severe before proceeding to protein extraction. Loading controls are GAPDH and acetylated tubulin. Histogram shows densitometric quantification of relative COLXXII expression levels normalized to acetylated tubulin. Left, protein standard markers

Supplementary Figure 6

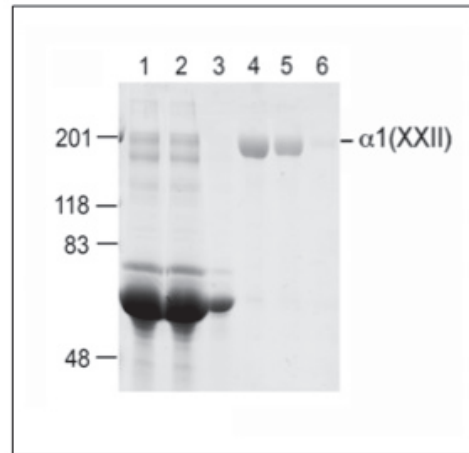


Figure S6: 6% SDS-PAGE analysis of the purified recombinant full-length human collagen XXII produced in 293-HEK cells as previously described (Koch et al, 2004). Lane 1, load; lane 2, flow; lane 3, wash; and lane 4-6 eluates). According to the gel, collagen XXII is highly purified and devoid of fragmentation products.



Movie 1: Videomicroscopy time lapse of swimming capacity of 5 dpf uninjected larvae (WT). The motility or lack of motility of larvae after touch stimulation of larvae tails with pins was recorded at different time intervals using a microscope (Macro-Fluo, Leica) with a digital camera system.



Movie 2: Videomicroscopy time lapse of swimming capacity of 5 dpf MO22-injected larvae (MO22). The motility or lack of motility of larvae after touch stimulation of larvae tails with pins was recorded at different time intervals using a microscope (Macro-Fluo, Leica) with a digital camera system.



Movie 3: Videomicroscopy time lapse of swimming rescue of 5 dpf MO22-injected larvae coinjected with human full length COLXXII (rescue). The motility or lack of motility of larvae after touch stimulation of larvae tails with pins was recorded at different time intervals using a microscope (Macro-Fluo, Leica) with a digital camera system.

Supplementary Tables

Table S1: List of primer sequences

Gene name	Accession No.	Primer name	Primer sequences (5'→3')
<i>col22al cloning and RT-PCR</i>			
collagen, type XXII, alpha 1	HE981211	Full length <i>col22al</i> _F	TAGGAATATCGGGGAACAAC
collagen, type XXII, alpha 1	HE981211	Full length <i>col22al</i> _R	AGGTTTTCAGGATTGTGAGG
collagen, type XXII, alpha 1	HE981211	<i>col22al</i> VWA_F	GTGGGCAAGGAGAATTTTGA
collagen, type XXII, alpha 1	HE981211	<i>col22al</i> VWA_R	CGTTTGACCTCC TCCAATGT
collagen, type XXII, alpha 1	HE981211	<i>col22al</i> COL4_F	GCAGGACCTCCAGGTATAG
collagen, type XXII, alpha 1	HE981211	<i>col22al</i> NC3_R	GCAGGACAATCTGAACACAC
actin, beta 1	NM_131031.1	<i>β1-actin</i> _F	AAGCAGGAGTACGATGAGTCTG
actin, beta 1	NM_131031.1	<i>β1-actin</i> _R	GGTAAACGGCTTCTGGAATGAC
<i>In situ hybridization probes</i>			
collagen, type XXII, alpha 1	HE981211	<i>col22al</i> VWA_F	TGTAAGAAACGTCCACTATGATC
collagen, type XXII, alpha 1	HE981211	<i>col22al</i> VWA_R	CCTGATCTTGTCTGATGGCGTCA
collagen, type XXII, alpha 1	HE981211	<i>col22al</i> TSPN_F	CCCAAAGCGCTCATGTCTTCC
collagen, type XXII, alpha 1	HE981211	<i>col22al</i> TSPN_R	AATAGGAACGCTGTCATAGAGCC
<i>qRT-PCR</i>			
actin, beta 2	ENS DART00000055194	<i>β2-actin</i> _F	CGAGTGTCTTCCCATCCA
actin, beta 2	ENS DART00000055194	<i>β2-actin</i> _R	TCACCAACGTAGCTGTCTTCTTG
collagen, type I, alpha 1a	NM_199214.1	<i>coll1a1a</i> _F	CTGCAAGAACAGCATTGCAT
collagen, type I, alpha 1a	NM_199214.1	<i>coll1a1a</i> _R	TAGGCAGACGGGATGTTTC
collagen, type XII, alpha 1a	AM941493.1	<i>coll2ala</i> _F	AGGGCTCGTCTGTGTCTGAT
collagen, type XII, alpha 1a	AM941493.1	<i>coll2ala</i> _R	GTTTGGCAGGATGACCCGAGT
collagen, type XIV, alpha 1a	XM_001922011.3	<i>coll4ala</i> _F	TGCTCATTTCTGAGGTGACG
collagen, type XIV, alpha 1a	XM_001922011.3	<i>coll4ala</i> _R	GCGAACAAC TIGCAATCTCGTA
polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D	NM_001002317.1	<i>polr2d</i> _F	CCAGATTCAGCCGCTTCAAG
polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D	NM_001002317.1	<i>polr2d</i> _R	CAAAC TGGGAATGAGGGCTT
TATA box binding protein	NM_200096.1	<i>tbp</i> _F	CTTACCCACCAGCAGTTAGCAG
TATA box binding protein	NM_200096.1	<i>tbp</i> _R	CCTTGGCACCTGTGAGTACGACTTTG

F, forward ; R, reverse

Supplementary Tables

Table S2. Percentage of embryos injected with mismatch control (MS), MO22a and MO22b morpholinos exhibiting moderate or severe phenotypes. Embryos were examined at 96 hpf.

Injection	n_injection	n_embryo	Phenotype (%)			
			Normal	Moderate	Severe	Premature death
uninjected	5	450	97.7	0.0	2.3	2.3
MS	5	550	89.3	0.8	0.0	10.0
MO22a	5	450	2.0	69.6	19.9	8.5
MO22b	5	550	0.7	63.2	28.8	7.3

Synopsis 2

Ce second article traite du projet majeur de ma thèse. Ce projet visait à confirmer et préciser le rôle du collagène XXII dans la formation et la fonctionnalité de la JMT, de l'embryon à l'âge adulte. J'ai développé (avec A. Guiraud lors de son post-doctorat, puis seule) la technique CRISPR-Cas9 dans l'équipe afin de travailler sur des stades larvaires plus tardifs que la première publication et sur des poissons adultes. J'ai également travaillé avec d'autres équipes pour analyser les performances de nage (collaboration avec C. Lefrançois) et le couplage excitation-contraction par des mesures de force de contraction (collaboration avec B. Allard). Tout cela m'amenant à surmonter de nombreuses difficultés techniques.

L'analyse ultra-structurale des poissons *col22a1*^{-/-}, de la jeune larve à l'adulte, montre que les interdigitations du sarcolemme, caractéristiques de la JMT, sont pratiquement absentes chez les mutants (comme chez les morphants), pouvant impacter la transmission des forces et/ou l'attachement du muscle aux myoseptes (tendons). De façon intéressante, pour les deux lignées, la même proportion de larves présente un phénotype très sévère entraînant la mort vers 2 semaines post-fécondation (spf). Les autres larves, elles, survivent et ne montrent pas de phénotype global particulier. En revanche, une forte réduction des interdigitations de la JMT est constatée et dans de rares cas, après challenge des poissons, une rupture musculaire est observée. Une première approche de q-PCR par gène candidat a été réalisée et il semble possible que les différences phénotypiques soient liées à des événements conjoints d'expressivité variable et de compensation génique. Enfin, utilisant un système original de test de nage à contre-courant par palier, j'ai montré que les poissons *col22a1*^{-/-} âgés de 6 mois ont une capacité de nage très diminuée et consomment d'avantage d'O₂ pendant l'effort comparés aux animaux sauvages. L'efficacité du système musculo-squelettique semble donc moindre en l'absence de collagène XXII.

Nos résultats devraient permettre de considérer COL22A1 comme un gène candidat pour les cas de dystrophies musculaires dont la cause génétique est non élucidée.

Il est à noter que la figure présentant les résultats de mesure de l'amplitude des contractions musculaires est une figure provisoire qui devra être complétée par des expériences complémentaires prévues à la rentrée 2018-2019. En effet, « n » est insuffisant pour l'analyse statistique du fait d'un souci technique (rupture de la minutie reliée au transducteur via une tige de graminée, voir le montage expérimental réalisé par Bruno Allard décrit dans la fiche protocole n°11). De plus, concernant les tests de performance de nage, l'intégralité des tests a été réalisée, cependant, nous complétons actuellement le traitement et l'analyse des données relatives à la « dette en oxygène » (comme évoquée dans le chapitre 3.9) avec l'expertise de C. Lefrançois. Ces données si elles s'avèrent intéressantes seront donc éventuellement ajoutées à l'article.

Variable expressivity of *col22a1* null-mutations in zebrafish results in mild to severe muscular dystrophic phenotype associated with postural defects and reduced swimming performance

Marilyne Malbouyres^{1*}, Alexandre Guiraud^{1*}, Christel Lefrançois², Mélanie Salamito¹, Pauline Nauroy¹, Laure Bernard¹, Bruno Allard³ and Florence Ruggiero^{1#}.

¹ Université de Lyon, ENSL, CNRS, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL), Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.

² Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266CNRS-Université de La Rochelle, La Rochelle Cedex 01, France

³ Université de Lyon, Institut NeuroMyoGène (INMG), Université Claude Bernard Lyon 1, UMR CNRS 5310, Inserm U1217, Faculté de Médecine et de Pharmacie Rockefeller, Lyon, France

*Both authors equally contributed to this work

corresponding author

Florence Ruggiero

Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon - ENS de Lyon

46 Allée d'Italie

F69364 Lyon cedex 07

France

Phone number: +33 472722657

Fax number: +33 472722602

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

Abstract

Collagen XXII (COLXXII) is a marker of the myotendinous junction, a specialized extracellular matrix that structurally connects skeletal muscle to tendon and transmits contractile muscle force to skeleton. Knockdown of zebrafish *col22a1* gene results in a dystrophic phenotype characterized by myotendinous junction disruption when subjected to repeated mechanical stress (Charvet et al, 2013). Muscular dystrophies are often progressive muscle disorders and the use of morpholinos limits gene function analysis to larval stages. Here we report for the first time the generation of two CRISPR/Cas9-mediated *col22a1* KO lines that give the unique opportunity to analyze *col22a1* function with genetic mutants. A first analysis of the phenotype revealed that both generated *col22a1* KO zebrafish lines comprise two distinct phenotypic classes: one showing an early dystrophic phenotype that eventually caused the death of larvae at around 2wpf, representing about 30% of the offspring and the remaining 70% displaying no apparent phenotype, referred to as n.a.p. mutants. In striking contrast to n.a.p. mutants that displayed no behavioral phenotype, videomicroscopy analyses revealed that 2wpf mutants with early dystrophic phenotype fail to maintain posture at a time they should have acquired this behavioral capacity, and show erratic movements when they managed to swim short distance. In agreement to this finding, measurements of muscle contractile performance showed reduced force development in mutants due to force transmission defects. However, transmission electron microscopy analysis of the trunk skeletal muscle ultrastructure demonstrated compromised musculotendinous system organization in both dystrophic homozygous mutants and n.a.p. mutants. This phenomenon, common in human disease, is referred to as variable expressivity and is partly attributed to genetic variation among populations. Using a swimming tunnel respirometer, we showed that the 6mpf *col22a1* n.a.p. mutants develop a mild late-onset dystrophic phenotype following overtraining that is characterized by greater muscle fatigue and increased oxygen consumption. Using q-PCR of selected genes, we showed that the linkage complex integrin *itga7* is downregulated in 2wpf n.a.p. mutants confirming the previously reported synergistic gene interaction between *col22a1* and *itga7*. On the contrary *col21a1*, a gene closely related to *col22a1*, whose function is unknown was instead upregulated, suggestive of a possible gene compensation. In all, we conclude that collagen XXII is required for proper development of the musculotendinous system and its function in the contractile force transmission. Lack of collagen XXII results in its systematic dysfunction but with variable expressivity, a phenomenon often observed in human diseases. Our data thus underscore *COL22A1* as a candidate gene for muscular dystrophies with unresolved genetic cause and provide a valuable genetic tool to investigate variable expressivity often observed in connective tissue human disease.

Introduction

The myomatrix is a specialized extracellular matrix (ECM) that plays a critical role in the formation, maintenance and integrity of muscle and, was shown to influence muscle stem cell proliferation and differentiation (Urciuolo et al, 2013; Baghdadi et al, 2018). Defects in structure and function of the myomatrix result in inherited muscular disorders, as laminin 2-deficient congenital muscular dystrophy or collagen VI-related myopathies (review in Mohassel et al, 2018). The myomatrix comprises the ECM that surrounds each muscle cells as they differentiate and the junctional region where tendon collagen fibers insert into muscle basement membrane. This region, called the myotendinous junction (MTJ) represents the major site of muscle force transmission to tendons. Two independent trans-sarcolemmal linkage systems localize at the MTJ: the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) and the $\alpha7\beta1$ integrin complex. Mutations in the integrin $\alpha7$ gene (*ITGA7*) cause congenital myopathy (Hayashi et al., 1998). But the impact of mutations in MTJ formation and/or function is poorly documented, particularly in the context of human diseases for which biopsies at this particular location would be too prejudicial for the patients.

The generation of animal models has proved tremendous useful to unravel the structure and function of MTJ. Mice that lack dystrophin (*mdx*; *Dmd*) (Law and Tidball, 1993; Law et al., 1995), laminin $\alpha2$ (*dy*; *Lama2*) (Desaki, 1992) or integrin $\alpha7$ (Miosge et al., 1999; Welser et al., 2009) all exhibit a striking reduction in the number of membrane folds at MTJ that impairs its function and results in progressive muscular dystrophy. In addition to its natural numerous advantages, zebrafish represents a uniquely valued model for studying the musculotendinous system since skeletal muscles constitute the major part of the zebrafish trunk and tail and they are directly visible through the transparent skin. The *sapje/dystrophin*, *caf/lama2* and *patchytail/dag1* mutants displayed compromised muscle attachments that result in muscular dystrophies of various severities (Ingham, 2009). Morpholino-knockdown of *itg7a* showed massive muscle detachment in developing embryos (Postel et al., 2008). In most of these mutants, skeletal muscles develop normally but the onset of muscle contractions provokes progressive muscle cell detachment from their insertion site and the subsequent degeneration of the axial myotome (Sztal et al., 2012). This demonstrates that MTJ components are unconditionally required for the initiation and maintenance of muscle fiber attachment to tendon. All these proteins provide a structural link that connects muscle cytoskeleton to the basement membrane components. But the protein(s) that further connect the BM to the tendon collagen I fibers at the MTJ remained unidentified.

Collagen XXII, a new member of FACIT (Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple Helix) subset of the collagen super family, was originally reported in mammals as a marker of

tissue junctions including the MTJ (Koch et al, 2004). Immunogold transmission electron microscopy (TEM) identified collagen XXII as a component of the outer surface of the muscle fiber BM (Koch et al, 2004). This specific localization as well as the structural characteristic of FACIT members to associate with other matrix components position this collagen as a good candidate for providing a structural link between muscle BM and tendon collagen fibers. We effectively showed that *col22a1* is expressed by skeletal muscle in zebrafish embryos as the MTJ develops and the protein specifically deposited at the junctional ECM (Charvet et al, 2013). Interestingly, morpholinos-knockdown of *col22a1* resulted in a muscular dystrophic phenotype characterized by occasional spontaneous muscle fiber detachment. But the application of series of electric stimuli to the larvae to challenge muscle ultimately provoked massive muscle detachment. We further showed that collagen XXII is a constitutive protein of the transmembrane $\alpha7\beta1$ linkage system that contributes to the mechanical stability of the MTJ by strengthening skeletal muscle attachments (Charvet et al, 2013). However, the use of morpholinos limits gene function analysis to larval stages while muscular dystrophies are often progressive muscle disorders.

Recent advances in genome editing technology in zebrafish based on the CRISPR/Cas9 technology offer unprecedented possibilities to generate genetic zebrafish models to detail the function of specific genes throughout its lifespan (Chang et al, 2013). Here we report for the first time the generation of two CRISPR/Cas9-mediated *col22a1* KO lines that give the unique opportunity to analyze *col22a1* function with genetic mutants. By combining behavioral assays, videomicroscopy and TEM, we further documented the requirement of collagen XXII for proper development of the musculotendinous system to ensure contractile force transmission and ultimately movements. Lack of collagen XXII results in the systematic dysfunction of musculotendinous system that impairs postural behavior and swimming performance but with variable expressivity. The *col22a1* KO lines we have generated and characterized provide a valuable genetic tool to investigate variable expressivity, an event often observed in connective tissue human disease but poorly understood.

Results

Generation of CRISPR/cas9 *col22a1* KO lines

To analyze the consequences of lack of *col22a* in larvae and adults, we have decided to generate *col22a1* knockout lines using CRISPR/Cas9 technology as previously described (Talbot and Amacher, 2014). Because of previously reported discrepancy between MO and KO lines (Kok et al, 2015; El-Brolosy and Stainier, 2017), we have decided to generate two different lines, one targeting exon 2 that encodes part of vWA domain (Figure 1A, upper

part), *col22a1*^{VWA} and the second that targets exon 6 encoding the TSPN domain (Figure 1A, lower part), *col22a1*^{TSPN}. To establish the KO lines, we have selected fish harboring a 8bp and a 4bp deletion that provoke a premature stop codon at the 5' extremity of exon 2 and exon 6 in *col22a1*^{VWA} and *col22a1*^{TSPN} offspring, respectively (Figure 1B). These deletions were efficiently transmitted to the F1 generation. The 2 lines were raised as heterozygous fish and crossed to obtain homozygous embryos, and then as homozygous fish from F3 generation. Whole-mount double immunostaining with antibodies to zebrafish COLXXII that recognize a peptide in the vWA domain (Figure 1B, Charvet et al, 2013) and, as a positive control, anti-zebrafish COLXII antibodies (Bader et al, 2009, 2013) that stained myosepta (Bader, 2009) were next performed to check the complete extinction of COLXXII expression in homozygous *col22a1*^{VWA/-} (not shown) and *col22a1*^{TSPN/-} mutants at 5 dpf (Figure 1B). These lines are the first *in vivo* animal models with a total loss of COLXXII protein. This represents an unique opportunity to examine possible discrepancies between dystrophic phenotype of *col22a1* morphants reported in (Charvet et al, 2013) and *col22a1* knockout phenotypes as well as the progressive modulation of the muscle phenotype which is one of the hallmark of muscular dystrophy.

Variable expressivity in the zebrafish *col22a1*^{-/-} phenotype

The *col22a1*^{VWA/-} and *col22a1*^{TSPN/-} fish appeared to develop normally and did not show any obvious gross phenotype during embryo development, and they hatched normally and reached adult stage (Figure 2A). If not genotyped, the homozygous and heterozygous fish were phenotypically indistinguishable from their WT siblings for the most part. However, when we checked possible embryo lethality, we observed that in both *col22a1*^{TSPN} and *col22a1*^{VWA} lines the number of homozygous individuals decreased by about 30% between 5dpf and adult stage; an unusual lethality rate that was not observed in WT animals (Table 1). A close examination of homozygous embryos during their development unexpectedly revealed that they developed normally until they reached about 2 wpf (Figure 2A). Then, about 30% of 2 wpf homozygous fish showed strong defects while the rest of the homozygous fish looked normal (Figure 2 and Table 1). We then raised homozygous fish with severe phenotype and with no apparent phenotype in separate tanks from about 2 wpf that represents the stage we can discriminate them. We observed that the juveniles with severe phenotype showed a statistically significant reduction of the total body length (Figure 2 B, quantification) and impaired motility and swimming capacity (Supplementary data, Movies S1-S3). In addition, movies strikingly revealed that the *col22a1*^{TSPN/-} and *col22a1*^{VWA/-} juveniles with severe dystrophic phenotype failed to maintain posture and displayed defects in buoyancy at a time they should have acquired this behavioral capacity (Glasauer and Straka, 2017) as confirmed with the movie of WT juveniles at the same age (Supplementary

data, Movie S1). The specific postural defect was impossible to observe in the *col22a1* morphants at 5-6 dpf. When some individuals managed to swim, they never succeeded to reach out the microscope field view in striking contrast to 2wpf WT or “unaffected” homozygous mutant individuals that reached out the observation field several times in the same time window (Supplementary data, Movie S1-S3). Images extracted from videos detailed the erratic movements and the postural defects of the *col22a1*^{TSPN^{-/-} and *col22a1*^{vWA^{-/-} mutants compared to WT and mutant siblings with no apparent dystrophic phenotype (Figure 3A). These behavioral defects suggested defects in muscle force generation, a phenotypic trait described in *col22a1* morphants (Charvet et al, 2013). We thus measured the electrically evoked muscle contractile performance of *col22a1*^{TSPN^{-/-} (Figure 3B). The contractile force generated by mutant muscles was considerably and statistically lower than that of WT and the mean amplitude of the twitch response was about six times smaller (Figure 3B, quantification). In addition, impaired motility and swimming capacity probably compromised food intake of severe phenotype because their intestines were optically empty compared to WT and homozygous mutants with no phenotype (Fig 2A). It is probably the cause of their death few hours after the critical 2wpf stage that corresponds to larval metamorphosis in zebrafish. To avoid any bias due to homozygous incrossing that could reduce gene diversity and increase the severity of the targeted-gene phenotype, *col22a1*^{vWA^{+/-} and *col22a1*^{TSPN^{+/-} individuals with no apparent phenotype were crossed and their progeny was genotyped before phenotype analysis. The results were identical showing the same frequency distribution of individuals with severe phenotype and with no apparent phenotype (as, for instance, in crossing 3, Table 1). Altogether, our findings are reminiscent to variable expressivity (if individuals with no apparent phenotype have in fact weak traits) or incomplete penetrance (30% in that case), two concepts described in many human inherited diseases (Lobo, 2008). We conclude that *col22a1* KO zebrafish comprised two distinct phenotypic classes: one showing an early dystrophic phenotype and one with no apparent dystrophic phenotype.}}}}}

Both dystrophic and non-dystrophic homozygous mutants showed compromised musculotendinous system

To investigate whether the lack of apparent phenotype in 70% of the homozygous individuals is due to incomplete penetrance or variable expressivity, we further detailed the phenotype of severe and “unaffected” homozygous mutants. We previously showed that *col22a1* morphants displayed a dystrophic phenotype characterized by reduction of MTJ folds and distended vertical myosepta (Charvet et al, 2013). We thus performed histology and TEM analysis of the trunk of *col22a1*^{TSPN^{-/-} larvae and WT siblings at 5dpf, when it was impossible}

to distinguish the severely affected and “unaffected” homozygous, and at 2wpf when the two phenotypical classes were easily identifiable.

At 5 dpf, the developmental stage analyzed in our previous study, *col22a1*^{TSPN^{-/-}} larvae were randomly selected before being processed. Before phenotype analysis, larvae were subjected (stimulated) or not (unstimulated) to repeated electric stimulations in order to challenge muscle contractile activity (Charvet et al, 2013). Bright field showed that abnormally wavy muscle fibers appeared in the *col22a1*^{TSPN^{-/-}} somites but not in WT after electrostimulation (Figure S1A) while birefringence was unchanged in all conditions (Figure S1B). In agreement with the defects observed in *col22a1* morphants (Charvet et al, 2013), an abnormal number of fibroblasts were present in *col22a1*^{TSPN^{-/-}} myosepta (Figure S1C) and distended myosepta containing sparse collagen fibrils were observed with transmission electron microscopy (TEM) (Figure S1D, upper part). Likewise, lack of sarcolemmal folds at the MTJ in *col22a1*^{TSPN^{-/-}} but not in WT was also noticed with TEM (Fig S1D, upper part). Despite apparent similar defects were observed in *col22a1* morphants (Charvet et al, 2013), no muscle detachment was observed even after repeated contractile activity in *col22a1*^{TSPN^{-/-}} mutants (Fig S1D, lower part) suggestive of subtle phenotypical differences between MO-knockdown embryos and CRISPR/Cas9 mediated KO lines, as previously shown for other genes (Schulte-Merker and Stainier, 2014).

We thus next analyzed the morphology of the junctional region between skeletal muscles from mutants showing severe or “unaltered” phenotypes with TEM. Muscle histology of 2 wpf “unaffected” *col22a1*^{TSPN^{-/-}} mutants appeared similar to those of WT showing aligned muscle fibers that span the entire myotome (Fig 4A,E). Nevertheless the vertical myosepta that separate adjacent myotomes were less compact compared to WT myosepta as judged by staining intensity on sections and the possibility to distinguish collagen fibers that appeared in orange after HES staining (Figure 4A,E). In contrast, muscle of *col22a1*^{TSPN^{-/-}} mutants with severe phenotype appeared severely damaged: myotomes demonstrated poor cohesiveness between muscle fibers and were delimited by barely visible vertical myosepta (Figure 4I). Interestingly, imaging at a significantly higher resolution the 2wpf *col22a1*^{TSPN^{-/-}} trunk muscles revealed structural defects in the musculotendinous system with a range of severity. As previously reported in *col22a1* morphants (Charvet et al, 2013), the differentiation and overall organization of sarcomeres as observed with TEM appeared not affected by the lack of collagen XXII in both phenotypic classes of *col22a1*^{TSPN^{-/-}} mutants (Figure 4F and J compared to B). In striking agreement with our previous study (Charvet et al, 2013), all mutants showed a reduced number of the characteristic MTJ finger-like folds and distended myosepta that contained loosely-organized collagen fibrils (Figure 4F,G and J,K compared to B,C). However, these structural defects of the MTJ and myosepta are much more severe in

mutants showing dystrophic phenotype than in the ones with no apparent phenotype. Specifically an abnormally low density of collagen fibrils was observed in the myosepta of mutants showing severe dystrophic phenotype but not in the mutants with no dystrophic phenotype or the WT (Figure 4J compared to B,D and F). More specific to the mutants with strong dystrophic phenotype is the lack of muscle cohesiveness. In agreement with histology, several detached fibrils scarred the deformed myotomes of *col22a1*^{TSPN^{-/-}} mutants with early dystrophic phenotype. In striking contrast to *col22a1* morphants, only rare muscle fiber detachment at the MTJ site was observed with histology (Figure 4I) and TEM (Figure 4J and L) and no MTJ disruption was observed in mutants with no apparent dystrophic phenotype (Figure 4E,F, G and H). Altogether, TEM analyses underline the key role of COLXXII at the MTJ and partially explain the swimming behavior differences between moderate and severe mutants. Our data strongly suggested that, as often observed in human connective tissue disease, the mutations in *col22a1* result in two phenotypic classes in both KO lines; a strong dystrophic phenotype that eventually caused the death of larvae at around 2wpf, and a more subtle phenotype showing structural defects in the musculotendinous system that did not seem to affect dramatically larval motility, swimming capacity and lifespan at least during the 6 first months. This phenomenon often observed in human disease is referred to as variable expressivity rather than incomplete penetrance that is when a fraction of the individuals carrying the disease-associated genotype fail to develop the abnormal phenotype (Montagutelli, 2000).

The *col22a1* mutants with no apparent phenotype develop a late mild dystrophic phenotype characterized by muscle fatigue following overtraining

We next wondered whether the subtle muscular dystrophic phenotype observed at 2 wpf evolves with age and continuous muscle use. Because these mutants can reach adulthood, we have been able to measure muscle performance of adult mutants using a swimming tunnel respirometer as previously described (Lucas et al, 2016). This is a unique system that is intended to cause fish to fatigue. Fish are placed in a tunnel where water flow is increased stepwise and the capacity of the fish to swim against the current is scored. U_{crit} represents the critical swimming speed originally defined as the maximal velocity a fish can reach during a swimming step protocol (Hammer 1995). In the meantime, measurements of oxygen consumption during swimming tests and during recovery periods allowed to determine fish metabolic performance. Two identical 170mL swimming respirometers were used in parallel and the protocol used was as depicted in Figure 5A. Because the tested WT females and males showed similar U_{crit} values, the mutant fish were selected for U_{crit} measurements regardless of their gender. The means of U_{crit} values were statistically lower in *col22a1*^{TSPN^{-/-}} mutant fish (6.98 ± 2.08 body length/second (BL.s⁻¹)) than in WT (10.89 ± 1.05 BL.s⁻¹) (Figure

5B). None of the tested mutant fish showed U_{crit} values above 8 BL.s.⁻¹. Oxygen consumption measurements (Figure 5C) showed a clear tendency for mutant fish to consume more oxygen than WT at identical flow steps though not statistically significant. This is due to a high dispersion of measurements observed for mutants suggestive of the variable expressivity of the muscle weakness phenotype in adult mutants. We thus conclude that collagen XXII is required for proper development and function of the musculoskeletal system and that lack of collagen XXII results in its systematic dysfunction but ranging from severe to moderate dystrophic phenotype as often observed in human diseases.

To investigate the effect of exercise on the muscular phenotype of *col22a1*^{-/-} mutants, we next examine with TEM the ultrastructure of challenged (fish subjected to the swimming tunnel assay) or unchallenged (fish let in their tank) adult skeletal muscle from 6 mpf mutant and WT. No noticeable differences were observed in sarcomeric organization of muscle from unchallenged (upper panel) or challenged (lower panel) WT (Figure 6A-C and G-I) or mutants (Figure 6D-F and J-M). The most striking defect was the complete lack of finger-like structures at the MTJ in mutants (Figure 8E,F,L) compared to WT (Figure 6C,H,I). As shown in 2 wpf mutants (Figure 3), mitochondrial mislocalization was observed in unchallenged (Figure 6D) and challenged (Figure 6J,K) mutant fish. The latter were observed between myofibrils (Figure 6D,J,K) while others (Figure 6L) are normally found along the periphery of the fibers as in WT (Figure 6C,H,I). Surprisingly, the structure of myosepta appeared normal in mutant fish (Figure 6 E,F) as compared to WT (Figure 6B,C) and unchanged after exercise (Figure 6 L,M). It is possible that the presence of bones that developed within the myosepta and the surrounding abundant ECM masked the defects observed at 2 wpf.

To next address the question of possible gene compensation that can explain why a high percentage of fish develops mild dystrophic phenotype, we performed RT-qPCR on RNA extracts from 2 wpf mutant and WT trunks to analyze differential gene expression of selected candidate genes (Figure 7): myoseptal ECM genes *col1a1a* and *fn1a*, and *col21a1*, a FACIT collagen closely related to *col22a1* that is present in the human and zebrafish genome but not in mice (Nauroy et al, 2017). As expected, *col22a1* deletion in *col22a1*^{TSPN^{-/-}} led to a dramatic reduction of *col22a1* transcript in individuals with mild dystrophic phenotype (Figure 7A). Knockout of *col22a1* led to a significant activation of *col1a1a* expression in 2wpf mutants that is in accordance with the TEM observations showing abnormal number of fibroblasts in mutant myosepta (Figure 7B). Finally, *fn1a* that is only expressed at the nascent MTJ was significantly upregulated in *col22a1*^{TSPN^{-/-}} mutants indicative of ECM remodeling of damaged myosepta and MTJ (Figure 7D). Whether activation of *col21a1* expression could compensate the lack of collagen XXII at the MTJ is questionable since its expression pattern and function have not been elucidated yet (Figure 7C). Expression of

lama2 and *dag1* expression, both encoding proteins of the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) was unchanged (Figure 7E,F). In contrast, gene expression of the integrin $\alpha 7$ gene is significantly downregulated in mutants compared to WT (Figure 7G). We have previously shown a synergistic gene interaction between *col22a1* and *itga7* (Charvet et al, 2013). Our present data suggested a common thread that connects the transcriptional regulation of these two genes and beyond, of *col21a1*, a gene closely related to *col22a1*.

Discussion

First established as a valuable vertebrate model system for studying development, zebrafish has emerged as an attractive animal system for modeling human diseases, specifically muscular disorders (Ingham, 2009; Urciuolo et al, 2013). Our study is adding value to this assumption by showing variable expressivity of a gene mutation in zebrafish. Variable expressivity that measures the extent to which a mutation displays its phenotypic expression is widespread in human genetics (Cooper et al, Hum Genet 2013).

In the present study, *col22a1* null-mutations resulted in phenotypic variability, a phenomenon attributed to variable expressivity of the *col22a1* knock-out. Variable expressivity and reduced penetrance are the two main sources of such phenotypic variability but the mechanism is still elusive. Some of these differences may reflect unlinked genetic and epigenetic disease modifiers or environmental factors (Cooper et al, Hum Genet 2013). But evidence is mounting that the genetic background remains an important factor in the disease symptoms (Kammenga, 2017). Contrary to other animal models commonly used in laboratories, individuals within a same zebrafish strain display a highly diverse genetic background (Guryev et al, Genome res, 2006). This high genetic heterogeneity between individuals among a same strain was initially considered as a problem to establish genetically engineered zebrafish lines. However, this variable genetic background may instead represent a unique advantage among other genetic models to generate reliable models for human disease and for drug screening. These will also represent helpful tools to address the question of expressivity and penetrance in human disease, and to uncover the underlying mechanisms. Variations between the phenotypes of MO knockdown and genetic mutants have been reported. These variations have been attributed to MO off-targets (Kok et al, 2016). The discrepancies reported between the phenotypes of mutant lines, mostly using CRISPR/Cas9 technology, and MO-knockdown generally point at much more subtle phenotype in genetic mutants (Kok et al, 2016). Genetic compensation that may include both transcriptional and posttranscriptional processes has been reported as a possible mechanism to explain the reported discrepancies (El-Brolosy and Stainier, 2017). Here, we

propose that these differences could also be attributed to variable expressivity or incomplete penetrance of phenotype in mutant lines. Experimenters might have not noticed the early death of developing embryos or young larvae due to the large number of offspring and have only analyzed the fish that have reached adulthood, and thus the ones that display milder if any phenotype.

Such subtle discrepancies were observed for *col22a1*. The muscle phenotype of the *col22a1* mutant lines we have generated in this study using CRISPR/Cas9, almost recapitulates the one reported for *col22a1* morphants (Charvet et al, 2013). We confirmed here that collagen XXII is required for the proper development of the musculotendinous system and that collagen XXII deficiency results in a dystrophic phenotype with compromised transmission of contractile muscle activity. However, some differences were observed. In agreement with our previous study, the dystrophic phenotype is associated with (1) distended myosepta that contain loosely-arranged and sparse collagen fibrils and (2) a lack of sarcolemmal folds at the MTJ. Though variable phenotypic severity is also observed in morphants, the early- and late-onset dystrophic phenotypes of the *col22a1* mutants is discussed above. The main difference remains the muscle detachment phenotype, a hallmark of mutants or morphants in one of the MTJ components, including the *col22a1* morphants (Charvet et al, 2013). The MTJ provides a structural link between intracellular and extracellular components through transmembrane proteins. As such, massive muscle detachment provoked by either natural or forced muscle contractile activity was steadily observed in zebrafish affected in (1) the intracellular MTJ components as the *sapje/dystrophin* and the integrin-linked kinase (ILK)-deficient lost-contact (*loc*) mutants (Postel et al., 2008), (2) the extracellular components as the *caf/lama2* and the *sof/lamb2* mutants (Jacoby et al., 2009), and (3) the transmembrane components as the *patchytail/dag1* mutants (Gupta et al., 2011) and the *itg7a* morphants (Postel et al., 2008).

The *col22a1* morphants expressed massive muscle detachment phenotype only after challenging the 5 dpf larvae with repeated electrical stimuli (Charvet et al, 2013), an original method we have developed in the lab to reveal propensity to muscle detachment phenotype. The *col22a1* mutants with early- and late-onset dystrophic phenotypes showed muscle weakness, as revealed by measuring the electrically-evoked muscle contractile performance and the swimming capacity and O₂ consumption using the swimming tunnel respirometer, respectively. Muscle weakness observed in the 2wpf *col22a1* mutants can be attributed to a transmission capacity reduction of the distended myosepta as reported for the morphants (Charvet et al, 2013). Interestingly, 2wpf *col22a1* showed striking postural defects. The vertical posture is acquired at around 15-20 dpf (Glasauer and Straka, 2017). At that stage, larvae are able to re-adjust their posture by swimming bouts, a way to fight against gravity,

and to this end, larvae control the speed and length of muscle contractions. If muscle contractile activity is reduced, swimming bouts are ineffective and the vertical posture cannot be maintained. Another common feature between the *col22a1* morphants and *col22a1* mutants concerns *igta7*. Synergistic interaction between *col22a1* and *igta7* was observed by micro-injecting sub-phenotypic doses of morpholinos against *col22a1* and *igta7* but not with *dag1* or *lama2* suggesting that collagen XXII is part of the integrin $\alpha7\beta1$ linkage complex (Charvet et al, 2013). Here we add evidence to this assumption by showing that in absence of *col22a1* expression, *igta7* but not *dag1* or *lama2* was down-regulated in 2wpf larvae with late-onset dystrophic phenotype.

However, histology and TEM analyses showed that when the contractile activity of 2wpf larvae and adult fish was challenged by applying series of electrical stimuli, this did not exacerbate muscle fiber detachment. We were not able to perform the experiment at 5 dpf which corresponds to the developmental stage analyzed for *col22a1* morphants, because at that stage we could not distinguish early-onset from late-onset dystrophic phenotypes. We cannot exclude that the muscle detachment phenotype is not any more visible at later stages because other MTJ components are later expressed and strengthen its structure. But gene compensation can also be invoked to explain this discrepancy as previously reported (Rossi et al., 2015). In support to the latter assumption, we have observed a significant activation of *col21a1*, a *col22a1* closely-related gene. This gene has the particularity to be present in the zebrafish and human genomes, but is not found in the mouse and rat genomes (Fitzgerald and Bateman, 2004). The function of this gene is still unknown. While *col21a1* transcripts were shown to be expressed, its expression pattern in developing zebrafish is still unclear (Malbouyres et al, unpublished results). Global transcriptomic analysis of the trunk of wildtype animals and mutants at 5dpf, 2 wpf and 6mpf will confirm this observation.

We conclude that collagen XXII is required for proper development and function of the musculotendinous system. By generating *col22a1* KO lines, we demonstrated that collagen XXII deficiency results in a systematic dysfunction of the musculotendinous system characterized by the formation of inefficient distended myosepta and a reduction of the MTJ folds. These phenotypic traits showed variable expressivity, a phenomenon often observed in human diseases. In the present study we thus underscore *COL22A1* as a candidate gene for muscular dystrophies with unresolved genetic cause and provide a valuable genetic tool to investigate variable expressivity often observed in connective tissue human diseases. Variable expressivity of the phenotype severity in mutants represents an important point to consider for the design of chemical screens.

Materials and Methods

Zebrafish strain, maintenance, specific treatments and ethics statement

Zebrafish of the strain AB/TU were raised and bred according to standard procedures (Bader et al., 2009) (PRECI, SFR Biosciences UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL; agreement number B693870602). The creation, maintenance and use of *col22a1*^{TSPN^{-/-}} and *col22a1*^{vWA^{-/-}} lines were approved by the local ethics committee (CECCAPP_IGFL_2014_002 and CECCAPP_PRECI_2017_003) and all procedures have been approved by the French ethical committee (#13345/agreement number pending). All anesthesia and lethal procedures were performed in tricain (MS222) solutions as recommended for zebrafish, and all efforts were made to reduce suffering. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, unless specified otherwise. The developmental stages are given in hours (hpf), days (dpf), weeks (wpf) and months (mpf) post-fertilization at 28°C, according to morphological criteria. From 24hpf, embryos were treated with phenylthiourea (Sigma P7629) to prevent pigmentation. Until 5dpf, embryos were raised in Danieau solution, replaced every 24 hours.

Generation of CRISPR/Cas9 KO lines

DR274 gRNA plasmids were purchased from Addgene. Cas 9 protein was purchased from New England Biolabs. CRISPR gRNAs were designed using CRISPR design softwares (<http://crispor.tefor.net/> and <http://crispr.dbcls.jp/>). Different sgRNAs have been tested and we selected the two with the highest mutagenesis efficiencies. The DNA binding sites targeted by these sgRNAs are localized in the vWA domain (5'-GGATAAGACACGTGTGGCAG -3') and in the TSPN domain (5'-GGATGGCGAGAACAGGGCGG -3'). Oligonucleotides were annealed in a thermo block at 95°C for 5 min followed by a slow cooling to room temperature (≈25°C) and cloned in DR274 gRNA plasmid between Bsal sites. All constructs were verified by sequencing. To make gRNA, the template DNA was linearized by Dral (NEB-R0129) digestion and purified using a NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel -740609) kit. gRNA was generated by *in vitro* transcription using a T7 MEGAscript transcription kit (AM1334- Ambion – Life Technologies). After *in vitro* transcription, the gRNA was purified using ammonium acetate precipitation and stored at -80°C. Cas9 protein (2.12 ng) and gRNA (133 pg) were co-injected in the cell at the one-cell stage and a quarter of the lay was used to evaluate mutagenesis efficiency by HRMA as previously described in Talbot and Amacher, 2014.

Genotyping

For gDNA extraction, embryos or fin clip were placed in PCR tubes in 200µL of NaOH 50mM, incubated 10 minutes at 95°C and immediately placed on ice. 20µL of Tris-HCL 1M pH8

were added to buffer the solution and gDNA were stored at 4°C. A double PCR was set up for each line to genotype. PCR primers were designed using Primer 3 Plus software (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi). The first PCR contained primers specific for the wild type allele and the second for the mutated allele. The 2 amplicons for each line were run simultaneously in a 2% agarose gel. In case of doubts, sequencing is realized.

Immunofluorescence staining

Whole-mount staining was performed as described previously (Bader et al., 2009). Stained embryos were observed with a Zeiss LSM 780 spectral confocal microscope. The primary and secondary antibodies are listed in Supplementary Material (Table S1). Nuclei were stained with Hoechst solution and F-actin with fluorescent phalloidin conjugates.

RNA extraction and quantitative real time PCR

Total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen). Reverse transcription was performed using M-MLV reverse transcriptase (Promega) for 1h at 37°C in presence of random hexamers (Promega). qPCR primers (Supplementary Material, Table S2) were designed to obtain amplicons about 200 bp. qPCR was performed using a SYBR Green mix and fast amplicon protocol according to manufacturer instructions (Roche). Data were analyzed using the Ct method and normalized to Pol II. Student's t-tests with Welch's corrections were used to determine statistical significance (n=3).

Birefringence assay

WT or *col22a1*^{TSPN-/-} 5 dpf larvae were anesthetized with tricain, placed on a glass slide between two polarizers (3Dlens, Taiwan) and observed with a Zeiss Axiozoom V16 equipped with a AxioCam MRm 1.4 megapixels camera before and after electrostimulation. The mean gray value of pixels in the trunk region was measured with ImageJ software. Values are expressed as the percentage of unstimulated WT larvae +/- SD (n=10). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Brown-Forsythe and Bartlett's multiple comparison tests (GraphPad Prism software).

Histology

Fish were euthanized with a lethal dose of tricain (0.4 mg/mL) freshly dissolved in system water. Entire embryos or larvae or adult muscle trunk samples were fixed with AFA, 24 hours at room temperature. After dehydration, tissue samples were paraffin embedded. Slices of 5 µm (2 slices/slide) were carried out with a microtome then glued with an albumin-glycerol mixture on untreated slides. Hematoxylin-Eosin-Saffron staining (HES) was performed as

follows: after dewaxing, sections were immersed successively in solutions of Harris hematoxylin, eosin, and saffron. After dehydration, sections were mounted between slide and cover slip using Entellan®. Observations were performed with a light microscope (Leica DM6000). Pictures were taken with a digital camera (Leica DFC 450/ CCD 5Mpixels/ pixel size 3.4 µm/sensor size 8,7mmx6.5 mm) and edited by image analysis software (Leica MM AF software (metamorph) and Leica LASsoftware).

Transmission electron microscopy

Zebrafish embryos and larvae were fixed in 1.5% (v/v) glutaraldehyde and 1.5% (v/v) paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) several days at 4°C followed by washing in 0.1 M cacodylate buffer, 8% sucrose (10 minutes, 3 times). Then, samples were quickly washed in distilled water. After post-fixation in 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer, 8% sucrose for 45 minutes at room temperature, samples were dehydrated in graded series of ethanol respectively 30-50-70-80-95-100 %, 5 minutes each), and propylene oxide during 10 minutes. Finally, samples were embedded in epoxy resin. Then, 0.5µm thin sections were placed on glass slides, stained with Richardson's solution of methylene blue/azur II (v:v) and mounted under a cover slip with Entellan® for optical microscopy observations. For transmission electron-microscope analysis, 70 nm ultra-thin sections were stained with 7% uranyl acetate in methanol and lead citrate, and observed with a Philips CM120 electron microscope (Centre Technologique des Microstructures, Université Lyon 1, France) equipped with a Gatan Orius 200 2Kx2K camera.

For adult muscle tissues, 6-months trunk muscles were dissected in the fixative buffer under stereoscopic control and skin was delicately removed thanks to tweezers. Those thicker samples were treated as follows: after fixation, washing steps are elongated to 15 minutes each. Dehydration baths are also elongated to 15 minutes each, then 3 passages in ethanol 100%, 15 minutes each are realised. An additional 15 minutes step in propylene oxide/ethanol 100% (v/v) is added followed by 2 steps of 15 minutes in propylene oxide. Times of incubation during the embedding steps were prolonged compared to above protocol.

Behavioral assay

Live 2 wpf larvae were placed in Danieau buffer. The motility of larvae was recorded using a Zeiss Axiozoom V16 stereoscopic microscope with a high resolution AxioCam HRm Rev.3 Firewire camera. To assess swimming activity of the fish, video-recorded at 5 ms/frame, during 25s was performed without any stimulation.

Muscle contraction measurements

Procedures and measurements were performed as previously reported in (Charvet et al, 2013). The detailed procedure and changes to the previous protocol are described in Supplementary Material and Methods.

Swimming performance tests and oxygen consumption measurements

Swimming performance tests and oxygen consumption measurements were performed as previously described in (Lucas et al., 2016). The detailed procedure and measurements are detailed in Supplementary Material and Methods.

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism software. Student's t-tests were used to compare 6 months WT and col22a1 -/- fish. For all tests, the results were considered to be significantly different when p-value is <0.05.

Acknowledgments: We thank Prof Manuel Koch (University of Cologne) for helpful discussion. We acknowledge the contribution of PRECI (SFR Biosciences-Gerland) facility, specifically Robert Renard, for his help and the 'Centre Technique des Microstructures' (UCBL, Villeurbanne) for technical assistance with transmission electron microscopy. This work was supported by the CNRS, the "Agence Nationale de la Recherche" [10BLAN121901] to FR and BA, and the "Association Française contre les Myopathies" [MNM1-2010] to F.R. AG is a recipient of a post-doc fellowship from the "Association Française contre les Myopathies". PN is a recipient of a 2016 French Fellowship L'Oréal-UNESCO For Women in Science, the French government (NMRT) and the "Fondation pour la Recherche Médicale" (FDT20160435169) fellowships.

References

- Bader, H.L., Keene, D.R., Charvet, B., Veit, G., Driever, W., Koch, M., and Ruggiero, F. (2009). Zebrafish collagen XII is present in embryonic connective tissue sheaths (fascia) and basement membranes. *Matrix Biol.* 28, 32–43.
- Baghdadi, M.B., and Tajbakhsh, S. (2018). Regulation and phylogeny of skeletal muscle regeneration. *Dev. Biol.* 433, 200–209.
- Chang, N., Sun, C., Gao, L., Zhu, D., Xu, X., Zhu, X., Xiong, J.W., and Xi, J.J. (2013). Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos. *Cell Res.* 23, 465–472.

- Charvet, B., Guiraud, A., Malbouyres, M., Zwolanek, D., Guillon, E., Bretaud, S., Monnot, C., Schulze, J., Bader, H.L., Allard, B. (2013). Knockdown of *col22a1* gene in zebrafish induces a muscular dystrophy by disruption of the myotendinous junction. *Development* 140, 4602–4613.
- Cooper, D.N., Krawczak, M., Polychronakos, C., Tyler-Smith, C., and Kehrer-Sawatzki, H. (2013). Where genotype is not predictive of phenotype: Towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease.
- Desaki, J. (1992). Scanning electron microscopical study of skeletal muscle fiber ends in normal and dystrophic mice. *Arch. Histol. Cytol.* 55(4), 449-452.
- El-Brolosy, M.A., and Stainier, D.Y.R. (2017). Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet.* 13, 1–17.
- Fitzgerald, J., and Bateman, J.F. (2004). Why mice have lost genes for COL21A1, STK17A, GPR145 and AHRI: evidence for gene deletion at evolutionary breakpoints in the rodent lineage. *Trends in Genetics.* 20(9), 408-412.
- Glasauer, S. and Straka, H. (2017). Postural control: learning to balance is a question of timing. *Curr. Biol.* 27(3):105-107.
- Gupta, V., Kawahara, G., Gundry, S.R., Chen, A.T., Lencer, W.I., Zhou, Y., Zon, L.I., Kunkel, L.M., and Beggs, A.H. (2011). The zebrafish *dag1* mutant: A novel genetic model for dystroglycanopathies. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1712–1725.
- Guryev, V., Koudijs, M.J., Berezikov, E., Johnson, S.L., Plasterk, R.H.A., Van Eeden, F.J.M., and Cuppen, E. (2006). Genetic variation in the zebrafish. *Genome Res.* 16, 491–497.
- Hammer, C. (1995). Fatigue and exercise tests with fish. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* 112, 1–20.
- Hayashi, Y.K., Chou, F.L., Engvall, E., Ogawa, M., Matsuda, C., Hirabayashi, S., Yokochi, K., Ziober, B.L., Kramer, R.H., Kaufman, S.J., et al. (1998). Mutations in the integrin $\alpha 7$ gene cause congenital myopathy. *Nat. Genet.* 19, 94–97.
- Ingham, P.W. (2009). The power of the zebrafish for disease analysis. *Hum. Mol. Genet.* 18, 107–112.
- Jacoby, A.S., Busch-Nentwich, E., Bryson-Richardson, R.J., Hall, T.E., Berger, J., Berger, S., Sonntag, C., Sachs, C., Geisler, R., Stemple, D.L., et al. (2009). The zebrafish dystrophic mutant *softy* maintains muscle fibre viability despite basement membrane rupture and muscle detachment. *Development* 136, 3367–3376.
- Kammenga, J.E. (2017). The background puzzle: how identical mutations in the same gene lead to different disease symptoms. *FEBS J.* 284, 3362–3373.
- Koch, M., Schulze, J., Hansen, U., Ashwodt, T., Keene, D.R., Brunken, W.J., Burgeson, R.E., Bruckner, P., and Bruckner-Tuderman, L. (2004). A novel marker of tissue junctions, collagen XXII. *J. Biol. Chem.* 279, 22514–22521.
- Kok, F.O., Shin, M., Ni, C-W., Gupta, A., Grosse, A.S., van Impel, A., Kirchmaier, B.C., Peterson-Maduro, J., Kourkoulis, G., Male, I., DeSantis, D.F., Sheppard-Tindell, S., Ebarasi, L., Betsholtz, C., Schulte-Merker, S., Wolfe, S.A. and Lawson, N.D. (2015). Reverse genetic screening reveals poor correlation between Morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev. Cell.* 32(1), 97-108.

- Law, D.J., and Tidball, J.G. (1993). Dystrophin deficiency is associated with myotendinous junction defects in pre-necrotic and fully regenerated skeletal muscle. *Am. J. Pathol.* 142, 1513–1523.
- Law, D.J., Caputo, A., and Tidball, J.G. (1995). Site and mechanics of failure in normal and dystrophin deficient skeletal muscle. *Muscle Nerve* 18, 216–223.
- Lobo, I. (2008). Same Genetic Mutation, Different Genetic Disease Phenotype. *Nature Education*. 1(1): 64.
- Lucas, J., Percelay, I., Larcher, T., and Lefrançois, C. (2016). Effects of pyrolytic and petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons on swimming and metabolic performance of zebrafish contaminated by ingestion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 145–152.
- Miosge, N., Klenczar, C., Herken, R., Willem, M., and Mayer, U. (1999). Organization of the myotendinous junction is dependent on the presence of alpha7beta1 integrin. *Lab Invest* 79, 1591–1599.
- Mohassel, P., Reghan Foley, A., and Bönnemann, C.G. (2018). Extracellular matrix-driven congenital muscular dystrophies. *Matrix Biol.* 71–72, 188–204.
- Montagutelli, X. (2000). Effect of the genetic background on the phenotype of mouse mutations. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:S101-105.
- Nauroy, P., Hughes, S., Naba, A., and Ruggiero, F. (2018a). The in-silico zebrafish matrisome: A new tool to study extracellular matrix gene and protein functions. *Matrix Biol.* 65, 5–13.
- Postel, R., Vakeel, P., Topczewski, J., Knöll, R., and Bakkers, J. (2008). Zebrafish integrin-linked kinase is required in skeletal muscles for strengthening the integrin-ECM adhesion complex. *Dev. Biol.* 318, 92–101.
- Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Hölper, S., Krüger, M., and Stainier, D.Y.R. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* 524, 230–233.
- Schulte-Merker, S., and Stainier, D.Y.R. (2014). Out with the old, in with the new: reassessing morpholino knockdowns in light of genome editing technology. *Development* 141, 3103–3104.
- Sztaf, T.E., Sonntag, C., Hall, T.E., and Currie, P.D. (2012). Epistatic dissection of laminin-receptor interactions in dystrophic zebrafish muscle. *Hum. Mol. Genet.* 21, 4718–4731.
- Talbot, J.C., and Amacher, S.L. (2014). A Streamlined CRISPR Pipeline to Reliably Generate Zebrafish Frameshifting Alleles. *Zebrafish* 11, 583–585.
- Urciuolo, A., Quarta, M., Morbidoni, V., Gattazzo, F., Grumati, P., Montemurro, F., Tedesco, F.S., Cossu, G., Vozi, G., Rando, T. a, et al. (2013). Regeneration.
- Welser, J. V., Rooney, J.E., Cohen, N.C., Gurrup, P.B., Singer, C.A., Evans, R.A., Haines, B.A., and Burkin, D.J. (2009). Myotendinous junction defects and reduced force transmission in mice that lack $\alpha 7$ integrin and utrophin. *Am. J. Pathol.* 175, 1545–1554.

Table 1: Variable expressivity of *col22a1*^{VW/-} and *col22a1*^{TSPN/-} phenotypes at 2wpf.

Lines	Generation	Crossing	Number of embryos	Larvae phenotype at 2wpf (%)					
				Wild type	Non apparent phenotype	Severe	Other	Total per line (n.a.p.)	Total per line (severe)
WT	F4	1	214	96.73	-	-	3.27	-	
WT	F4	2	225	98.22	-	-	1.78		
WT	F4	3	343	97.08	-	-	2.92		
<i>col22a1</i> ^{VWA/-}	F4	1	88	-	67.05	31.82	1.14	68.07	28.07
<i>col22a1</i> ^{VWA/-}	F4	2	113	-	74.34	23.89	1.77		
<i>col22a1</i> ^{VWA/-}	F4	3	84	-	60.71	29.76	2.38		
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-}	F4	1	109	-	68.81	29.36	1.83	68.82	29.41
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-}	F4	2	141	-	72.34	25.53	2.13		
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-}	F4	3	90	-	63.33	35.56	1.11		

wpf, weeks post-fecundation; the severity of the phenotype is scored as swimming capacity and posture impairment using a stereoscope. Crossing #1 and 2 correspond to incrossing and 3 correspond to outcrossing. n.a.p., non apparent phenotype.

Figures legends

Figure 1: Generation of the CRISPR/Cas9-mediated *col22a1* knockout zebrafish lines, *col22a1^{VWA}* and *col22a1^{TSPN}*. (A) Schematic representations of the *col22a1* regions in *col22a1* exon 2 (*col22a1^{VWA}* line) and exon 6 (*col22a1^{TSPN}* line) that were targeted by CRISPR/Cas9 technology. For each exon, the upper sequence corresponds to the WT sequence containing the sgRNA-targeted nucleotides (underlined nucleotides) followed by the PAM sequence (red nucleotides). The lower sequence corresponds to the resulting deletions of 8 nucleotides in exon 2 (*col22a1^{VWA}* line) and 4 nucleotides in exon 6 (*col22a1^{TSPN}* line). Each deleted nucleotide is represented by a space. (B) Schematic presentation of the domain structure of zebrafish collagen XXII. At the N-terminus, the VWA and TSPN domains represent the building blocks of the NC6 domain. COL1-COL5, collagenous domains, NC1-6, non-collagenous domains. Red bars are short interruptions of the Gly-X-Y repeat in COL1. In contrast to humans, zebrafish *col22a1* lacks a NC4 domain (resulting in a fused COL3-COL4 domain). Y points to the recombinant domain used to obtain antibodies to the zebrafish collagen XXII (Charvet et al, 2013), arrows indicate the predicting truncation of collagen XXII resulting from premature codon stop in exon 2 (*col22a1^{VWA}* line) and exon 6 (*col22a1^{TSPN}* line) domains. (C) Whole-mount immunofluorescence staining of 5 dpf *col22a1^{TSPN^{+/+}}* (left) and *col22a1^{TSPN^{-/-}}* (right) with anti-ColXXII (red) and anti-ColXII (green) as positive control. The upper cartoon shows orientation of the 5dpf larvae, the red box indicates the region imaged in the *col22a1^{TSPN^{-/-}}* and *col22a1^{TSPN^{+/+}}* larvae. dpf: days post fertilization.

Figure 2: Distinct phenotypical classes of *col22a1^{TSPN^{-/-}}* developing zebrafish. (A) Representative bright field images of 5 dpf, 2 wpf and 6 mpf *col22a1^{TSPN^{-/-}}* individuals and WT sibling showing total fish length and gross phenotype of apparently unaltered fish (*col22a1^{-/-}* n.a.p.) and fish with severe phenotype (*col22a1^{-/-}* severe) that have been classified based on their posture defect and swimming capacity. *col22a1^{TSPN^{-/-}}* fish exhibiting a severed dystrophic phenotype died at around 2wpf. (B) Quantification. Arrows point to the intestine that is empty in 2 wpf *col22a1^{TSPN^{-/-}}* fish showing severe phenotype. dpf, days post-fertilization; mpf, months post-fertilization.

Figure 3: Postural and swimming behaviors and muscle contractile performance of mutant larvae at 2wpf. (A) Single frame from videos showing swimming and posture behaviors of *col22a1^{VWA^{-/-}}* (rows 2,3) and *col22a1^{TSPN^{-/-}}* (rows 5,6) with no apparent (n.a.p.) (row 2,5) and severe (row 3,6) dystrophic phenotype and the corresponding wildtype controls (rows 1 and 4, respectively). s, seconds. (B) Recording of contraction in response to single supramaximal electric shocks applied to *col22a1^{TSPN^{-/-}}* with severe dystrophic phenotype and

wild-type larvae. Left, schema of experimental set up. Right, Twitch responses and mean contraction amplitudes of *col22a1*^{TSPN^{-/-}} (red) and wild-type (black) larvae. Data are mean ±SEM. ***P<0.001.

Figure 4: Structure of the musculotendinous system of 2 wpf *col22a1*-KO fish. (A, E, I) Histology – Haematoxylin and Eosin (H&E) staining of paraffin sections of the trunk of 2 wpf WT (A) and *col22a1*^{TSPN^{-/-}} fish with no apparent (E) and severe (I) phenotype. Representative images of a myotome delimited by vertical myosepta. Asterisk in (I) points to abnormal gap between muscle fibers. (B-D, F-H, J-L) Representative TEM images showing the ultrastructure of the musculotendinous system of 2 wpf WT (B-D) and *col22a1*^{TSPN^{-/-}} fish with no apparent (F-H) and severe (J-L) phenotype. All images are longitudinal sections of the trunk muscle. F and J showed distended myosepta that contain sparse bundles of collagen fibrils (J). MTJ interdigitations in WT (C, arrows) are absent in *col22a1*^{TSPN^{-/-}} fish with no apparent (F-H) and severe (J) phenotypes. Muscle fibers are disorganized in fish with severe phenotype (J-L). (K,L) Asterisks point to abnormal gap between muscle fibers. (L) Note that aberrant muscle organization with transverse (t-mf) and longitudinal (l-mf) myofibrils in the same section plane. Cf, Collagen fibres; m, mitochondria; ms, myosepta; mf, myofilaments; l-mf, longitudinal myofibrils; t-mf, transversal myofibrils.

Figure 5: Critical swimming speed and oxygen consumption of 6 mpf *col22a1*^{TSPN^{-/-}} mutants. (A) Flowchart of the experimental swimming step protocol. (B) Mean of critical swimming speed (U_{crit}) values in WT (white bar) and *col22a1*^{TSPN^{-/-}} mutants (black bar). Data are mean±s.e.m; ***p_value<0.001; n=number of fish analyzed. (C) Measurements of oxygen consumption (MO₂) during the step protocol of *col22a1*^{TSPN^{-/-}} (black diamond) and WT (red square) fish.

Figure 6: Ultrastructure of challenged musculotendinous system of 6 mpf *col22a1*^{TSPN^{-/-}} mutants. Representative TEM images of the trunk muscle from unchallenged (upper panel) and challenged (lower panel) *col22a1*^{TSPN^{-/-}} (D-F, J-M) and WT (A-C, G-I) fish. Challenged fish correspond to fish subjected to the last step of swimming tunnel assay. (C, I) Arrows point to MTJ interdigitations. ms, myosepta; mf, myofibrils, b; bone; Cf, Collagen fibers; m, mitochondria; v, vertebra.

Figure 7: Differential expression of selected musculotendinous system genes in *col22a1*^{TSPN^{-/-}}. Real time RT-PCR analysis of *col22a1* (A) as control, *col1a1a* (B), *col21a1* (C), *fn1a* (D), *lama2* (E) *dag1* (F) and *itga7* (G) gene expression in 2 wpf *col22a1*^{TSPN^{-/-}} fish with no apparent phenotype (black bars) and WT fish (white bars). Data are mean ±SEM (n=3). ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; ns, not significant.

Figure 1

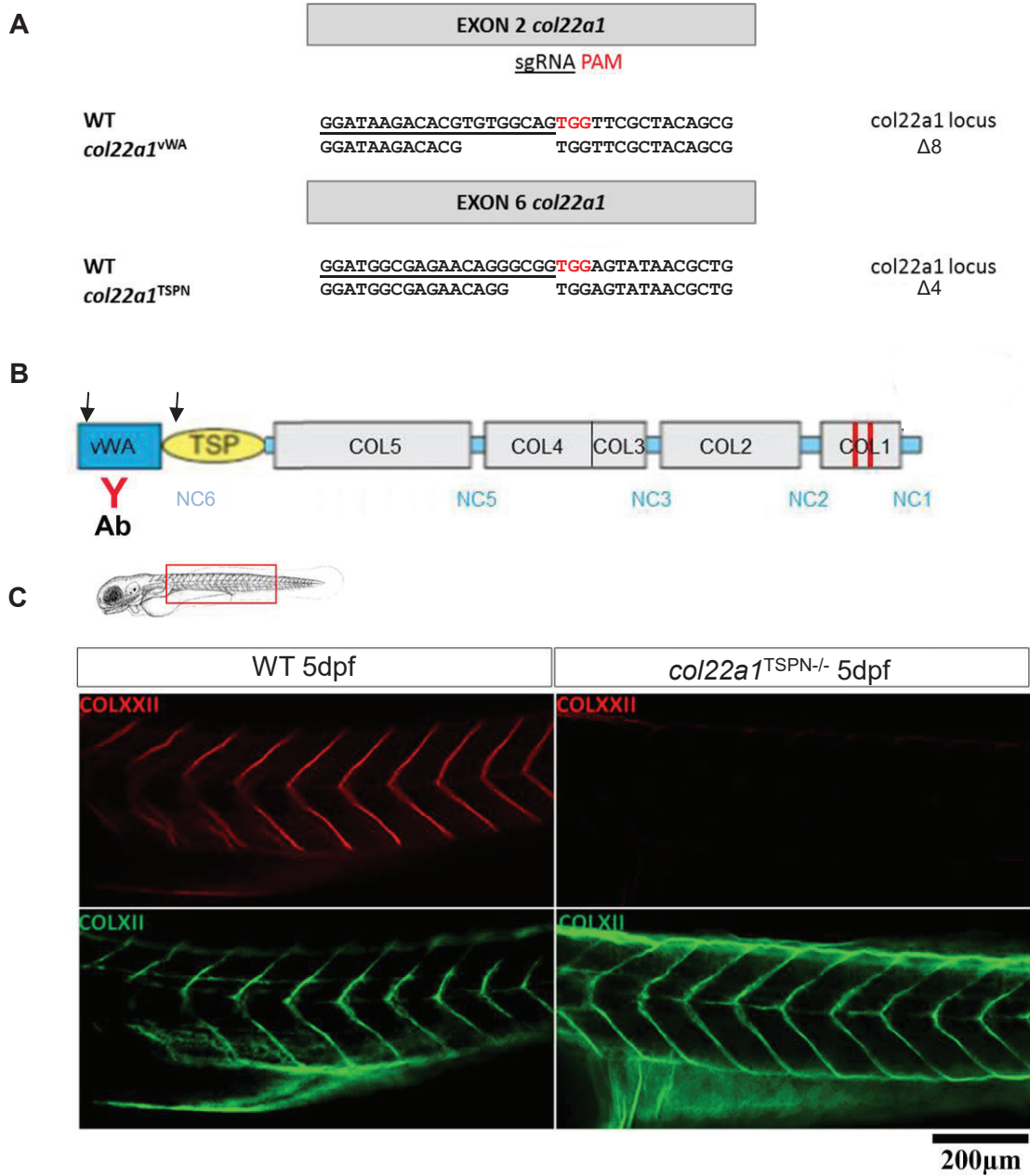


Figure 2

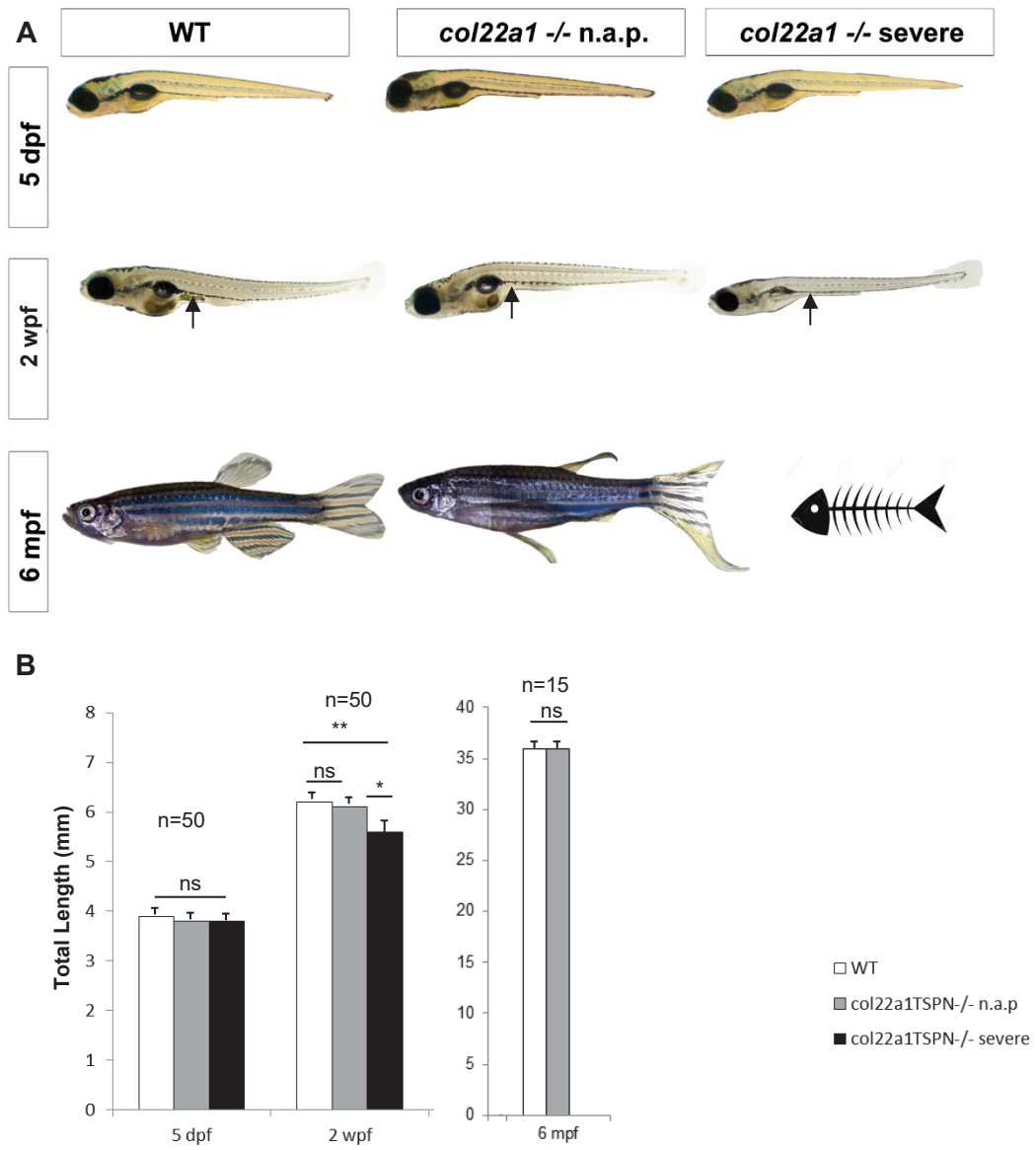


Figure 3

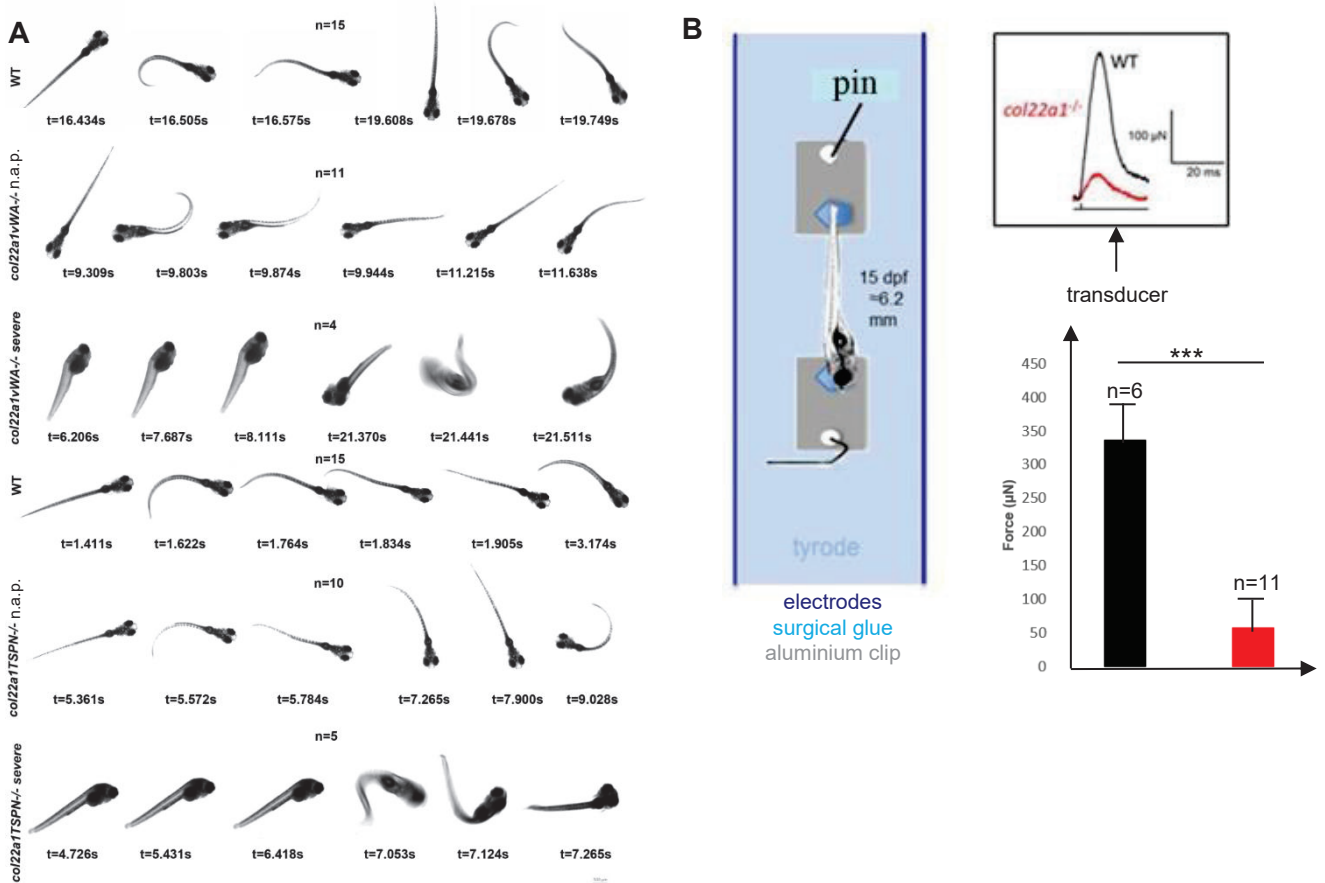


Figure 4

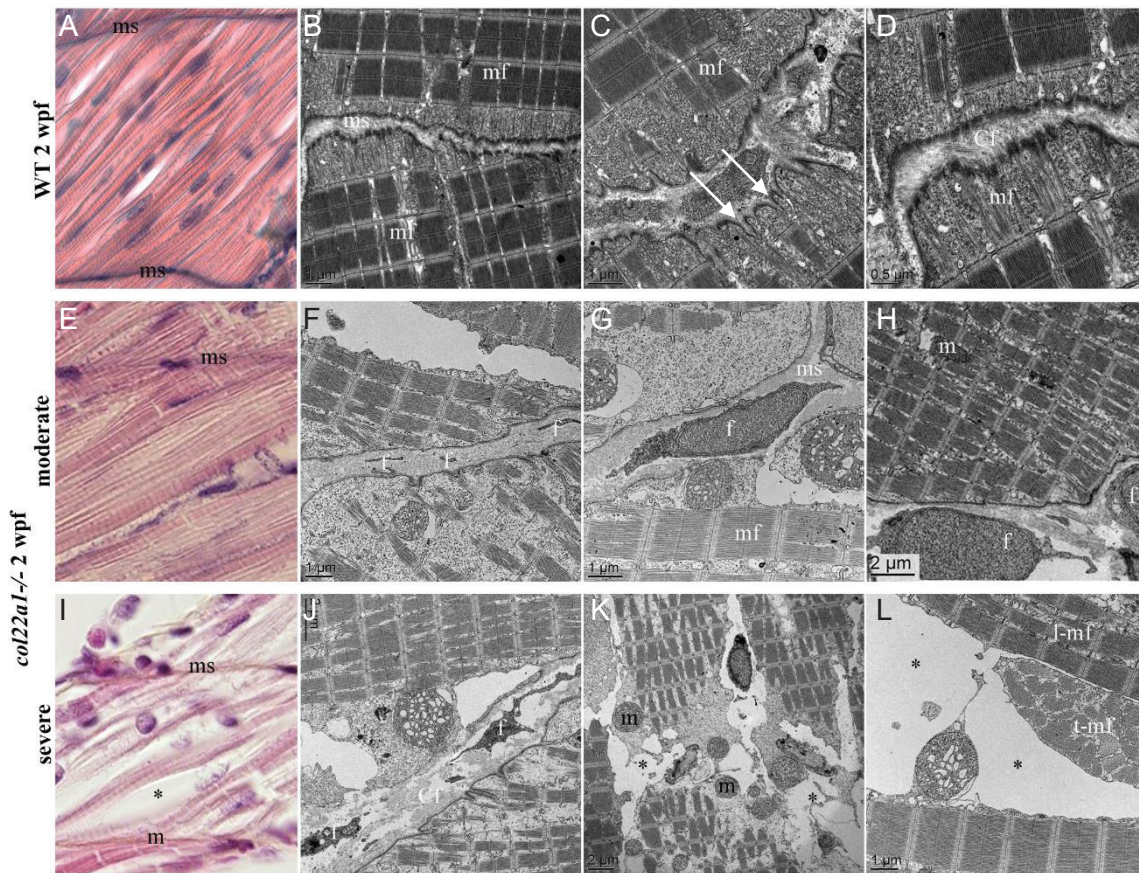


Figure 5

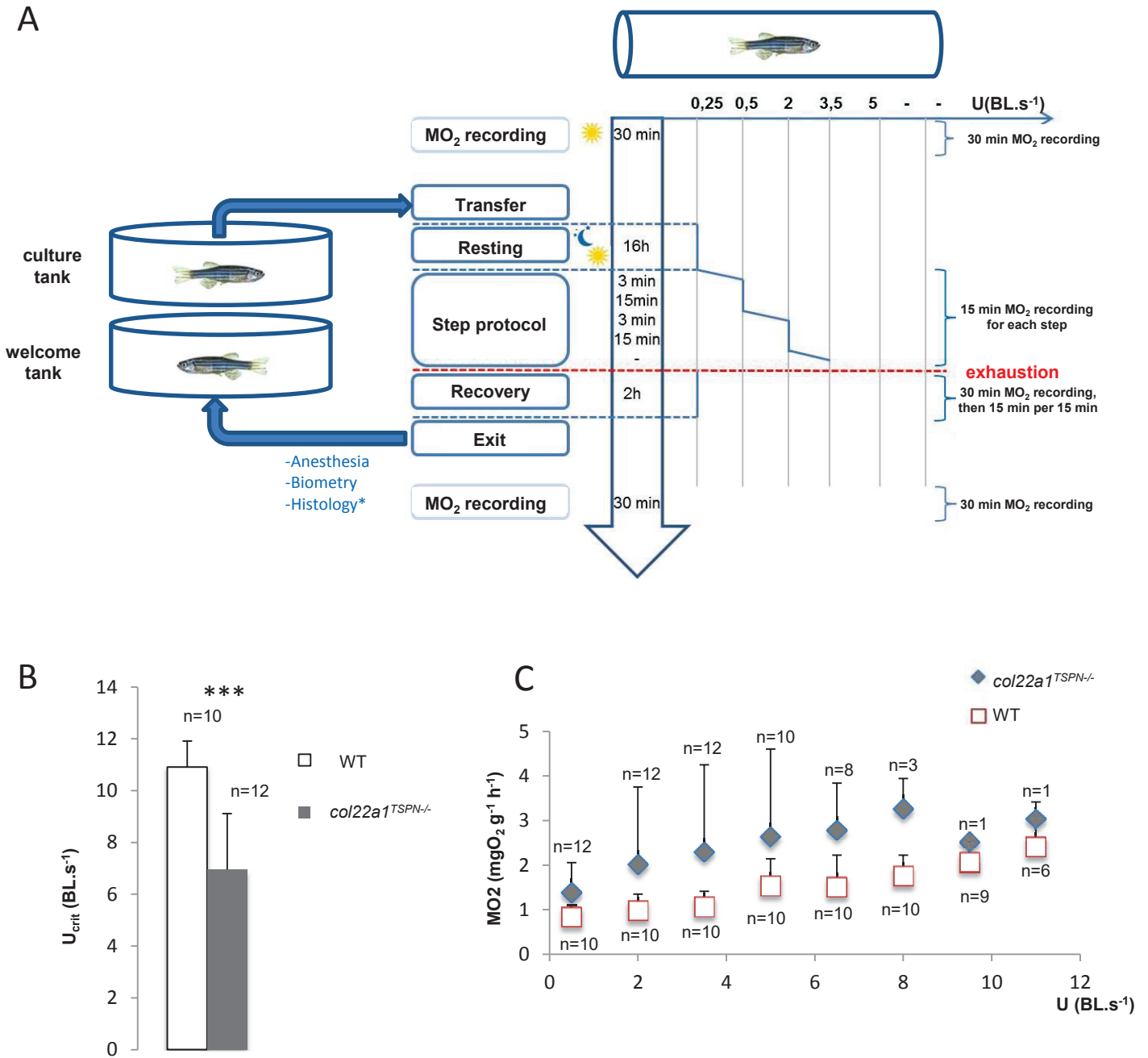


Figure 6

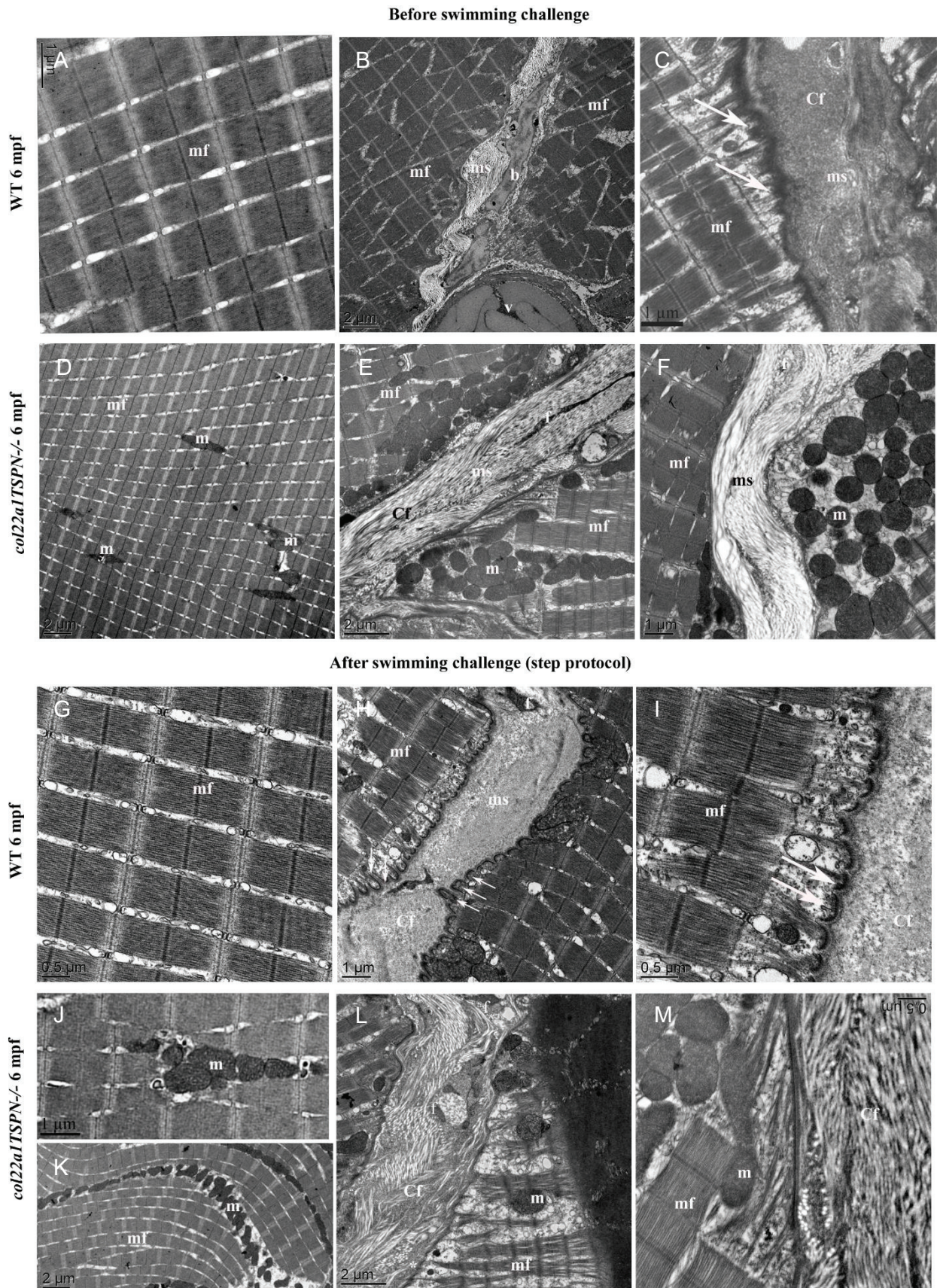
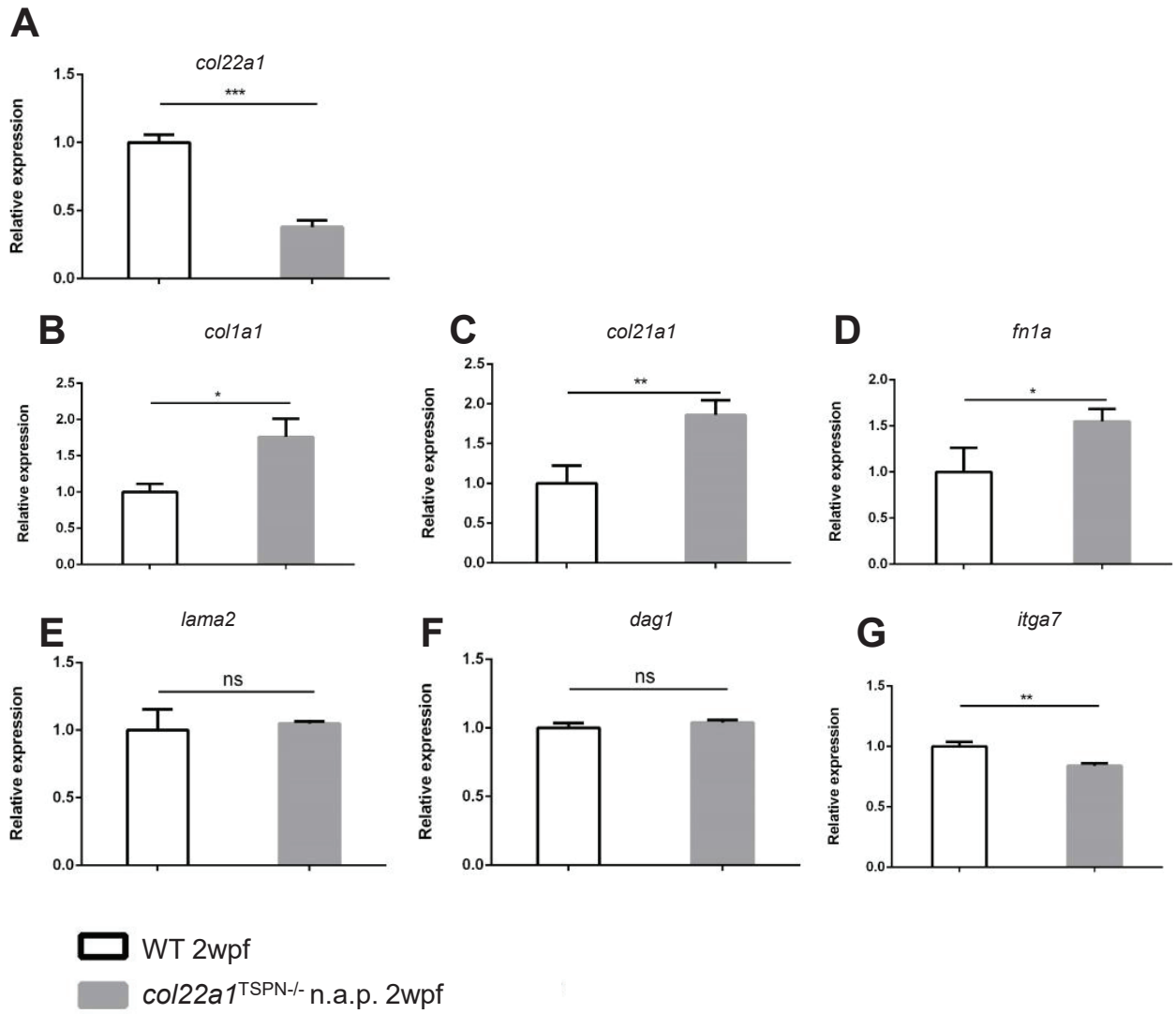


Figure 7



Supplementary Material and Methods

Muscle contraction measurements

Procedures and measurements were performed as previously reported (Charvet et al, 2013). Larvae are briefly placed in a beaker containing 0.168 mg /mL of tricain (3-amino benzoic acidethylester, Sigma-Aldrich, A5040) then the head is crushed to prevent any muscular contraction not activated by the electric stimuli. Then larvae are quickly transferred in a physiological solution of Tyrode (140 mm NaCl, 5 mm KCl, 2.5 mm CaCl₂, 1 mm MgCl₂, 10 mm Hepes, PH 7.2) so that the tricaïne does not interfere with the muscular answer led by the electrostimulation. A small drop of surgical glue is put down on each of both aluminum clips realized (homemade) before. Under binocular control, the larva is positioned between both aluminum clips. In contact with the slightly wet larva, the glue polymerizes and the fish then stands by both clips. The fish is then placed in a perpendicular way to the mecano-electric transducer AE801 and at equidistance between two electrodes immersed partially in a polymer, the head of the fish being side transducer. A small pin is introduced by the experimenter into the hole situated in the aluminum clip localized at the caudal part of the fish. Then, by means of a micromanipulator, the small pin connected with the transducer via a stalk of grass and picked in its extremity, is introduced into the hole situated near the larva head. The body fish stretching is adjusted with the micromanipulator under binocular control. The signal corresponding to the muscular strength of the fish is sampled with the frequency of 200 Hz and digitized by means of an analogue to digital converter (National Instrument) and recorded on computer via the software WinWCP (University of Strathclyde, UK). The whole muscle structure of the fish is stimulated by application of supraliminal electric impulses of 0.5 ms. For every tested fish, the intensity of the electric impulses is gradually increased until obtaining a maximal contractile answer. This intensity of stimulation, increased by 20 % is selected to realize the measures. Once the intensity of stimulation is determined, the fish body is gradually stretched until obtaining a maximal contractile answer. The transducer electric mechanic being sensitive to the vibrations, noises and lights, the manipulations are realized on an anti-vibratory table and a Faraday cage is used to limit the background noise generated by the other devices. The light of the binocular magnifying glass is turned off during measurements.

Swimming performance tests and oxygen consumption measurements

Swimming performance tests and oxygen consumption measurements were performed as previously described (Lucas et al., 2016). Locomotion performance in fish is considered to be a relevant biological function contributing to survival (e.g. Graham et al., 1990; Jones et al., 1974; Plaut, 2001; Stobutzki and Bellwood, 1994; Swanson et al., 1998), since it is related to predator–prey interactions, food research and migration (Drucker and Jensen, 1996; Hammer, 1995; Plaut, 2001; Reidy et al., 1995; Videler, 1993; Walker et al., 2005; Watkins, 1996). Critical swimming speed (i.e. the maximal velocity a fish can reach during a swimming step protocol, U_{crit} ; Hammer, 1995) is frequently employed as an indicator of swimming capacities. Since U_{crit} notably depends on the maximal ability of fish to provide energy during sustained swimming activity, these studies are often associated with the assessment of metabolic performance. Aerobic metabolic scope (AMS; Brett, 1964; Fry, 1947, 1971) is defined as the difference between the active metabolic rate (AMR), which is the highest metabolic rate the organism can sustain under maximal activity and the standard metabolic rate (SMR), the metabolic rate necessary to maintain vital functions and measured under resting conditions.

Experimental set-up - Two identical 170 mL swimming respirometers (Loligo Systems, Denmark) were used to assess the swimming and metabolic performance of fish. Each swimming respirometer was composed of (a) a swimming chamber, where the fish was placed to be tested, (b) a motor fitted with a three-bladed propeller to control water flow and (c) honeycomb placed at each side of the swimming chamber to laminarize the water flow.

Each swimming respirometer was submerged in a 20 L buffer tank, and filled with temperature controlled (i.e. 28°C) and oxygenated mixed water as in the rearing system. The oxygen consumption (MO_2 in $mg\ O_2\ g^{-1}h^{-1}$) associated with the activity of fish was measured by intermittent flow respirometry (Steffensen, 1989). Water supply in each swimming respirometer was provided by flush pumps, which controlled water flow from the buffer tank to the swimming respirometer. This allowed alternation between phases of oxygen renewal and phases of MO_2 measurement with a cycle of 3: 15 min. In addition, a peristaltic pump was used to create a continuous water flow from the respirometer to the oxygen probe (flow through an oxygen minisensor = fibre optic sensor, PreSens, Germany). The probe was connected to a multichannel oxygen measuring system (OXY 4 mini, PreSens, Germany) to record the level of dissolved oxygen in the water every 5 s. Optic fibers was calibrated once at the beginning of the swim test using 0% and 100% air saturation for a controlled temperature of 28°C. A conversion factor based on oxygen solubility into water was used to convert oxygen data from per cent saturation to mgO_2L^{-1} (i.e. 100% was equivalent to $7.94\ mgO_2\ L^{-1}$ for a 28°C temperature and 0 salinity).

Experimental procedure –The fish were starved the morning before being transferred individually (late afternoon) to a swimming respirometer i.e. 24h before the swimming challenge. As we have 2 swimming tunnels in the lab, each experimental trial consisted of challenging two fish in parallel. Each individual fish was left undisturbed with a water flow of $0.25\ BL\ s^{-1}$ for a night to permit recovery from handling stress. The swimming challenge started by increasing water flow by steps of $1.5\ BL\ s^{-1}$ from 0.5 to $12.5\ BL\ s^{-1}$. Each step lasted 15 min, during which fish MO_2 was measured. Note that between 2 steps, O_2 is renewed; and that each time, it takes 3 minutes to progressively increase the water flow to reach the next step. The experiment stopped when the fish fatigued, i.e. when it did not manage to swim against the current and stay on the honeycomb or when the fish O_2 saturation goes below 75%. Speed was then decreased to $0.25\ BL\ s^{-1}$ for a recovery period of 2 h. Fish were then removed from the swimming respirometer and anaesthetized using tricaine. Zebrafish are placed into a beaker containing $0.168\ mg/mL$ of Tricain (3-amino benzoic acidethylester, Sigma-Aldrich, A5040, stock solution at $4\ mg/mL$ dissolved in distiller water and stored at $-20^\circ C$) freshly dissolved in system water. Fish progressively stop moving and we consider that they are anesthetized when they stop reacting to an external stimulation (e.g. gently taping on the bench close to the beaker). Standard and total length, mass and sex of each individual were determined; characteristics of the fish tested in the swim tunnel are described in Table S3. Before and after each trial, a blank measurement was performed to quantify microbial oxygen consumption in the swimming respirometer. The average of these two values was subtracted from the measured oxygen consumption. Each fish was tested once. Note that during swimming challenge experiment, fish are maintained in the same water conditions (temperature, pH, osmolarity...) than in their original animal facility. Finally, after each individual test, equipment were fully cleaned.

Critical swimming speed - The critical swimming speed U_{crit} was calculated according to the formula of Brett (1964):

$$U_{crit} = U_t + t_1 \cdot t^{-1} \cdot U_1$$

where U_t (in $BL\ s^{-1}$) is the highest velocity maintained for an entire step, t_1 (in min) is the time spent until the exhaustion of fish at the last step, t (in min) is the swimming period for each step (i.e. 15 min in the present study) and U_1 is the increment velocity ($1.5\ BL\ s^{-1}$).

Oxygen consumption (MO_2) measurements - Oxygen consumption MO_2 is expressed in $mg\ O_2\ g^{-1}\ h^{-1}$ and calculated using the following formula:

$$MO_{2meas} = \Delta [O_2] \cdot V \cdot \Delta t^{-1} \cdot M_{meas}^{-1}$$

where $\Delta[O_2]$ (in $mg\ O_2\ L^{-1}$) is the variation in oxygen concentration during the measurement period Δt (in h), V (in L) is the volume of the respirometer minus the volume of the fish and M_{meas} (in g) is the fish mass measured.

An allometric relationship exists between oxygen consumption and body mass, which permits correction of MO_{2meas} using the following formula:

$$MO_{2cor} = MO_{2meas} \cdot (MO_{2meas} \cdot M_{cor}^{-1})^{1-b}$$

where MO_{2cor} (in $mg\ O_2\ g^{-1}\ h^{-1}$) is the oxygen consumption related to a standard fish of 1 g (M_{cor}), MO_{2meas} (in $mg\ O_2\ g^{-1}\ h^{-1}$) is the oxygen consumption estimated for experimental fish whose mass was M_{meas} (in g) and b is the allometric scaling exponent describing the relationship between oxygen consumption and body mass. Indeed, it has been demonstrated that intrinsic variables such as ontogeny and body size can influence metabolism independently of any effects of environmental conditions (Clarke & Jonston, 1999; Bokma, 2004; Killen et al., 2007, 2010; Moran&Wells, 2007). Lucas et al. (2014) has reported the allometric relationship between body mass (M) and metabolic rate in *D. rerio* and derive the species-specific scaling exponent. This was achieved by measuring AMR and SMR at three life stages. Previous studies on fishes (Post & Lee, 1996; Killen et al., 2007; Moran & Wells, 2007) have argued that the metabolic rate of larvae is likely to scale differently from juveniles and adults because of their incomplete development, but for *D. rerio*, these values did not differ significantly for either constant. Lucas et al., 2014 estimated b in zebrafish *D. rerio* from the relationship between AMR and body mass, i.e. b_{AMR} , and from the relationship between SMR and body mass, i.e. b_{SMR} . We used $b_{AMR}=0.926$ for the correction of AMR and $b_{SMR}=0.965$ for the correction of SMR.

Measurements of standard metabolic rate, active metabolic rate and aerobic metabolic scope - Active metabolic rate (AMR) is the maximal aerobic metabolic rate of an organism in a highly active state and standard metabolic rate (SMR) is the minimal metabolic rate necessary for supporting maintenance activities (e.g. ventilation) measured in resting, starved and non-maturing individual (Fry, 1947; Brett, 1964). Aerobic metabolic scope (AMS) is the difference between AMR and SMR and represents the capacity of an organism to provide oxygen to sustain energy-demanding activities (Fry, 1947). Oxygen consumption is known to increase exponentially with swimming speed (Brett, 1964). The following equation can be therefore fitted on data and allows the assessment of SMR:

$$MO_2 = SMR \cdot \exp^{bu}$$

where MO_2 is the oxygen consumption (in $mg\ O_2\ g^{-1}\ h^{-1}$), SMR is the intercept (i.e. the MO_2 when $U = 0\ BL\ s^{-1}$), b is a constant and U is the swimming speed (in $BL\ s^{-1}$). AMR is evaluated as the maximum oxygen consumption measured during the swimming challenge. AMS is the difference between AMR and SMR. U_{crit} , SMR, AMR and AMS were assessed for each fish.

References

- Bokma, F. (2004). Evidence against universal metabolic allometry. *Funct. Ecol.* 18, 184–187.
- Bönnemann, C.G. (2011). The collagen VI-related myopathies: Muscle meets its matrix. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 379–390.
- Brett, J.R. (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Board Canada* 21, 1183–1226.
- Charvet, B., Guiraud, A., Malbouyres, M., Zwolanek, D., Guillon, E., Bretaud, S., Monnot, C., Schulze, J., Bader, H.L., Allard, B., et al. (2013). Knockdown of *col22a1* gene in zebrafish induces a muscular dystrophy by disruption of the myotendinous junction. *Development* 140, 4602–4613.
- Clarke, A. & Johnston, N. M. (1999). Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of Animal Ecology* 68, 893–905.
- Drucker, E.G., Jensen, J.S. (1996). Pectoral fin locomotion in the striped surfperch. I. Kinematics effects of swimming speed and body size. *J. Exp. Biol.* 199, 2235-2242.
- Fry, F. E. J. (1947). The effects of the environment on animal activity. University of Toronto Studies. Biological Series 55, 1–62.

- Fry, F. E. J. (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. In *Fish Physiology*, Vol. VI (Hoar, W. S. & Randall, D. J., eds), pp. 1–98. New York, NY: Academic Press.
- Graham, J.B., Dewar, H., Lai, N.C., Lowell, W.R., Arce, S.M. (1990). Aspects of shark swimming performance determined using a large water tunnel. *J. Exp. Biol.* 151, 175-192.
- Hammer, C. (1995). Fatigue and exercise tests with fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 112, 1–20.
- Jones, D.R., Kiceniuk, J.K., Bamford, O.S. (1974). Evaluation of the swimming performance of several fish species from the Mackenzie River. *J. Fish. Res. Board Can.* 31, 1641-1647.
- Killen, S.S., Costa, I., Brown, J.A., and Gamperl, A.K. (2007). Little left in the tank: metabolic scaling in marine teleosts and its implications for aerobic scope. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274, 431–438.
- Killen, S.S., Atkinson, D., and Glazier, D.S. (2010). The intraspecific scaling of metabolic rate with body mass in fishes depends on lifestyle and temperature. *Ecol. Lett.* 13, 184–193.
- Lucas, J., Schouman, A., Lyphout, L., Cousin, X., and Lefrançois, C. (2014). Allometric relationship between body mass and aerobic metabolism in zebrafish *Danio rerio*. *J. Fish Biol.* 84, 1171–1178.
- Lucas, J., Percelay, I., Larcher, T., and Lefrançois, C. (2016). Effects of pyrolytic and petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons on swimming and metabolic performance of zebrafish contaminated by ingestion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 145–152.
- Moran, D., and Wells, R.M.G. (2007). Ontogenetic scaling of fish metabolism in the mouse-to-elephant mass magnitude range. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 148, 611–620.
- Plaut, I. (2000). Critical swimming speed: its ecophysiological relevance. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 126, 121.
- Post, J. R. & Lee, J. A. (1996). Metabolic ontogeny of teleost fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 910–923.
- Reidy, S.P., Nelson, J.A., Tang, Y., Kerr, S.R. (1995). Postexercise metabolic rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and its dependence upon the method of exhaustion. *J. Fish Biol.* 47, 377-386.
- Steffensen, J. F. (1989). Some errors in respirometry of aquatic breathers: how to avoid and correct for them. *Fish Physiology and Biochemistry* 6, 49–59.
- Stobutzki, I.C., Bellwood, D.R. (1994). An analysis of the sustained swimming abilities of pre- and post-settlement coral reef fishes. *J. Exp. Biol. Ecol.* 175, 275-286.
- Swanson, C., Young, P.S., Cech, Jr., J.J.(1998). Swimming performance of Delta smelt: maximum performance, and behavioral and kinematic limitations on swimming at submaximal velocities. *J. Exp. Biol.* 201, 333-345.
- Videler, J.J. (1993). *Fish Swimming*. Chapman and Hall, London.
- Walker, J.A., Ghalambor, C.K., Griset, O.L., McKenny, D., Reznick, D.N. (2005). Do faster starts increase the probability of evading predators? *Funct. Ecol.* 19 (5), 808-815.
- Watkins, T.B. (1996). Predator-mediated selection on burst swimming performance in tadpoles of the Pacific tree frog, *Pseudacris regilla*. *Physiol. Zool.* 69, 154-167.

Supplementary Tables and Figures

Supplementary Tables

Table S1: List of primary (in bold) and secondary antibodies used in this study

Primary and Secondary antibodies	Reference	Dilution used
anti-ColXXII	polyclonal, rabbit	1/1000 ^e
anti-ColXII	polyclonal, guinea pig	1 / 250 ^e
F310, myosin light chain 1	DSHB, F310, monoclonal, mouse	1/20 ^e
anti-rabbit Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11034	1 / 500 ^e
anti-mouse Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11029	1 / 500 ^e
anti-guinea pig Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11073	1 / 500 ^e
anti-rabbit Alexa Fluor 546	Invitrogen, A11035	1 / 500 ^e

Table S2: List of primers

Gene	Primers
<i>col1a1</i>	F-5'CTGCAAGAACAGCATTGCAT3' R-5'TAGGCAGACGGGATGTTTTTC3'
<i>col21a1</i>	F-5'CTGGACCTGAGGGACGAC3' R-5'CCGATCGGAGGATGTCTCT3'
<i>col22a1</i>	F-5'CAAGTGTGGGCAAGGAGAAT3' R-5'CGTTTGACCTCCTCCAATGT3'
<i>itga7</i>	F-5'CAGCTGGTACCCAAACACG3' R-5'CACAGAGTACCCGAATGAGGA3'
<i>lama2</i>	F-5'CCACTGGGGTCACGACAT3' R-5'CGGTGTTTCAGGTTACTACTGC3'
<i>fn1a</i>	F-5'ATTCAACGCACGTTCTACC3' R-5'TAATTTTGCCCTTGCCTGAC3'
<i>dag1</i>	F-5'TGTTGGAGCCTCTGTTACCC3' R-5'TGGGTTTCTTTGGAGGTCTCT3'
<i>pol II</i>	F-5'CCAGATTCAGCCGCTTCAAG3' R-5'CAAACCTGGGAATGAGGGCTT3'

Table S3: Biometry of fish used for step protocol.

Sample	Sex	Weight (g)	Size			
			SL (cm)	TL (cm)	Thickness (cm)	Height (cm)
WT2	M	0.4682	3.1	3.9	0.5	0.7
WT3	M	0.4587	3.2	3.9	0.5	0.7
WT5	F	0.4332	3.1	3.8	0.4	0.7
WT7	F	0.3759	2.7	3.3	0.3	0.7
WT8	F	0.4265	3.3	4	0.5	0.7
WT9	F	0.4529	3	3.7	0.4	0.7
WT10	F	0.4457	3	3.6	0.3	0.7
WT11	F	0.5777	3.2	3.9	0.4	0.8
WT12	F	0.609	3.2	3.8	0.6	0.85
WT13	M	0.4272	3.1	3.8	0.3	0.6
WT15	M	0.677	3.2	4.1	0.5	0.7
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-} 1	M	0.4620	3	4	0.5	0.7
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-} 2	M	0.4202	3.3	3.8	0.5	0.7
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-} 3	F	0.3689	3.1	4.2	0.5	0.7
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-} 4	F	0.4368	3	3.7	0.5	0.7
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-} 5	M	0.3690	3	3.5	0.4	0.7
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-} 7	M	0.3698	2.8	3.8	0.4	0.7
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-} 8	F	0.7692	2.5	3.3	0.5	0.7
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-} 9	F	0.3983	3	4	0.4	0.7
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-} 10	F	0.3309	3.1	3.5	0.4	0.7
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-} 11	F	0.5845	3.1	4	0.6	0.8
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-} 14	M	0.3893	2.8	3.5	0.4	0.6
<i>col22a1</i> ^{TSPN/-} 15	M	0.4219	3	3.5	0.4	0.7

M, male ; F, female ; SL, standart length ; TL, total length

Supplementary Figures

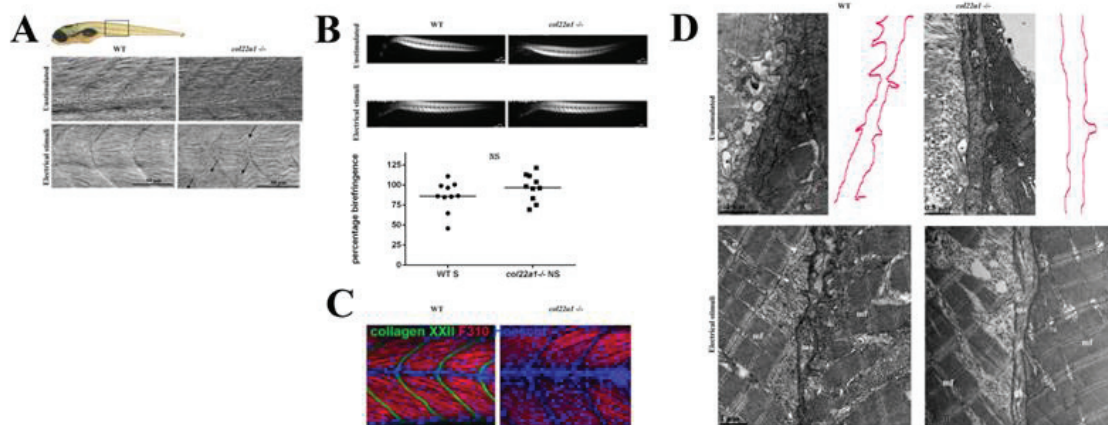


Figure S1: Muscle phenotype of 5 dpf *col22a1*^{TSPN-/-} trunks (mixed phenotypic classes). Embryos were randomly selected for this analysis.

A. Representative bright field images of mutant and WT larvae before (upper) and after repeated electric stimulation (lower). Arrows point to abnormally wavy muscle fibers after electrostimulation. B. Birefringence images of 5 dpf *col22a1*^{TSPN-/-} and wildtype larvae before (upper) and after repeated electric stimulations (lower). Quantification of birefringence measurements. Values represent mean birefringence normalized to unstimulated larvae. C. Whole-mount immunofluorescence staining of 5 dpf *col22a1*^{TSPN-/-} and wildtype larvae with anti-collagen XXII (in green), the myotendinous marker anti-collagen XII (in red). Nuclei are in blue. An abnormal high number of fibroblasts are observed in *col22a1*^{TSPN-/-} specimen. Anterior is towards the left. D. TEM images of the trunk of *col22a1*^{TSPN-/-} or WT embryos before (upper) and after (lower) electrostimulation. Mutants (n=5) all showed a reduction of sarcolemmal folds and distended myosepta with sparse collagen fibrils. Upper panel: red lines on the right delineate the MTJ. f, fibroblast; mf, muscle fiber; ms, myosepta.

Supplementary Movies

Movie S1: Videomicroscopy time lapse of swimming capacity of 2wpf *col22a1*^{TSPN+/+}. The swimming capacity and postural behavior were recorded at different time intervals using a Zeiss Axiozoom V16 stereoscopic microscope with a digital camera system.

Movie S2: Videomicroscopy time lapse of swimming capacity of 2wpf *col22a1*^{TSPN-/-} with severe phenotype. The swimming capacity and postural behavior were recorded at different time intervals using a Zeiss Axiozoom V16 stereoscopic microscope with a digital camera system.

Movie S3: Videomicroscopy time lapse of swimming capacity of 2wpf *col22a1*^{TSPN-/-} with no apparent phenotype. The swimming capacity and postural behavior were recorded at different time intervals using Zeiss Axiozoom V16 stereoscopic microscope with a digital camera system

Discussion générale et perspectives

Notre première publication portant sur le rôle du collagène XXII (Charvet et al., 2013) nous a permis dans un premier temps de caractériser le gène *col22a1* du poisson zèbre et de montrer que la protéine COLXXII est d'abord détectée dans les myotomes, alors que les cellules musculaires rapides se sont déjà allongées et attachées aux myoseptes verticaux (Charvet et al., 2011), pour être ensuite spécifiquement localisée à la JMT en formation puis mature. Ceci coïncide avec le patron d'expression des transcrits et de la protéine décrit chez la souris aux stades périnatal et adulte, même si la localisation protéique n'a pas été décrite, à ce jour, chez les embryons de souris (Koch et al., 2004). L'expression spatio-temporelle de *col22a1* chez le poisson zèbre, et de son orthologue chez la souris, est tout à fait compatible avec le rôle que nous proposons de lui attribuer dans le maintien de l'attachement des fibres musculaires au tendon et la transmission de la force.

Rappelons ici que le collagène XXII a été décrit comme un constituant de la surface de la lame basale par M. Koch, en 2004. L'expression de COLXXII commençant à 22 hpf soit avant que la lame basale ne soit complètement formée (Charvet et al., 2011), on aurait pu s'attendre à ce que l'absence de COLXXII affecte la formation de la lame basale jonctionnelle. Pourtant, les morphants comme les mutants ne présentent aucune discontinuité de la lame basale bien qu'elle soit irrégulière en épaisseur chez les morphants (Charvet et al., 2013). COLXXII serait donc impliqué dans la maturation et/ou le maintien de la lame basale mais n'est pas requis pour son assemblage initial. Mais de façon étonnante, chez le poisson zèbre, l'absence de 21 protéines essentielles à la formation de la lame basale ne semble pas affecter sa structure. C'est le cas par exemple du perlecan (Zoeller et al., 2008) ou de la laminine $\alpha 2$ (Hall et al., 2007), pourtant tous deux constituants majeurs des lames basales.

Bien que les morphants et les mutants homozygotes pour *col22a1* présentent tous deux un phénotype dystrophique, les lésions musculaires observées sont considérablement moins sévères que celles des mutants *sapje/dys* ou *locilik* pour lesquels des détachements massifs de fibres musculaires sont observées dans les somites dès les premiers mouvements des embryons (Basset et al., 2003; Postel et al., 2008), ce que nous observons chez les morphants mais seulement après activation imposée et répétée de la contraction. Chez les mutants *col22a1^{-/-}*, à des stades beaucoup plus tardifs (2 spf), une augmentation de lésions spontanées, conduisant à la mortalité d'un tiers des larves, est observée. L'absence de collagène XXII semble donc provoquer des lésions musculaires progressivement délétères à l'image d'autres mutants de la JMT tels que les mutants *softy/lamb2* dont seulement 64% atteignent l'âge adulte et sont fertiles. La survenue de ces lésions délétères chez un tiers des mutants *col22a1^{-/-}* semble globalement suivre la même cinétique que chez les mutants *patchytail/dag1*, qui meurent entre 8 et 10 jours.

Il paraît donc intéressant d'analyser les mutants *col22a1* à des stades intermédiaires (entre 5 jpf et 2 spf) mais également, pour les phénotypes plus modérés d'analyser des stades plus tardifs que ceux étudiés (au-delà de 6 mpf) pour mieux appréhender la progression du phénotype. J'ai d'ailleurs pu observer récemment que les poissons *col22a1^{-/-}* présentent à l'âge d'un an, une courbure du tronc plus ou moins prononcée et une difficulté à se reproduire comparées aux poissons sauvages de même stade. Il sera intéressant de confirmer ces observations préliminaires qui indiquent un phénotype dégénératif comme c'est le cas dans de nombreuses pathologies musculaires humaines. Alors, cela permettrait d'apporter une preuve supplémentaire au fait que le poisson est un bon modèle pour étudier les pathologies musculaires. En effet, cela a été montré par l'équipe récemment pour *col6a1* (Radev et al., 2015). Les auteurs montrent que, aux stades précoces du développement, les morphants (Telfer et al., 2010) et les mutants présentent des phénotypes similaires, mais que les mutants permettent en outre de retrouver l'aspect progressif observé chez l'humain.

Nous proposons que la répartition des poissons *col22a1^{-/-}* en phénotype de classe modérée (70%) ou sévère (30%) puissent s'expliquer par un phénomène de pénétrance/d'expressivité variable. Stoppa-Lyonnet et Lyonnet expliquent dans leur livre en 2017, que la pénétrance est la probabilité qu'un organisme exprime un phénotype alors qu'il est porteur d'un certain génotype. Une pénétrance incomplète correspond ainsi à l'absence de manifestation chez certains individus, organismes ou cellules présentant le génotype causal. Le génotype en question peut aller de la plus élémentaire des variations jusqu'à une combinaison complexe de variants génomiques. L'expression phénotypique en cause varie elle aussi, de manifestations cliniques globales (une maladie) à une mesure biologique, moléculaire, radiologique, faisant partie de cette manifestation générale. Ainsi, au sein même de l'ensemble complexe que représente une maladie, on peut distinguer des endophénotypes (parties du phénotype) pour lesquels la pénétrance est incomplète alors qu'elle est complète pour la maladie. Les années que nous vivons offrent une occasion inespérée d'étudier la pénétrance de certains génotypes dans des populations de plus grande taille et sous des conditions naturelles. Ainsi, le séquençage systématique de la population islandaise a montré de manière surprenante que 7,7 % des Islandais (en général des hommes) sont homozygotes pour des mutations sévères, connues pour être délétères dans d'autres populations, alors même qu'ils ne présentent aucune pathologie ou défaut phénotypique. Un total de 1 171 gènes est concerné par ce phénomène. Il est possible, bien que peu vraisemblable, que beaucoup de ces gènes ne soient d'aucune utilité pour notre organisme (on comprendrait alors mal qu'ils se soient maintenus évolutivement), il faut donc surtout chercher à comprendre comment les « survivants » que nous sommes ont échappé à certains de leurs génotypes. Cette recherche est essentielle en génétique, mais peut-être

plus encore pour comprendre et imaginer de nouvelles méthodes de compensation des génotypes morbides, c'est-à-dire des traitements innovants (Stoppa-Lyonnet and Lyonnet, 2017).

Prenons l'exemple chez l'Homme de la rétinite pigmentaire, affection rétinienne conduisant à la perte des photorécepteurs et donc la plupart du temps à la cécité. Il y a différents modes de transmission de la rétinite pigmentaire : autosomique dominant, autosomique récessif, liée à l'X ou mitochondrial. Dans un tiers des cas, la maladie est sporadique. La forme dominante (représentant environ 35% des cas) est associée à des mutations dans une vingtaine de gènes impliqués dans le métabolisme rétinien (une mutation sur chacun de ces gènes pouvant entraîner une forme dominante autosomique de la rétinite pigmentaire), en conséquence de quoi les formes cliniques de la maladie sont très hétérogènes (Thèse de Marie Darrason, 2014). Mais une étude de 2011 (Maubaret et al., 2011) montre que même lorsqu'on s'intéresse à un seul gène (en l'occurrence le gène PRPF8), les manifestations cliniques de la maladie sont hétérogènes d'un individu à un autre (expressivité variable) et les études familiales montrent des cas de pénétrance incomplète (les individus sont porteurs de la mutation mais ne développent pas la maladie). Dans cette étude, il s'agissait de comparer les corrélations génotype / phénotype parmi les dix individus de deux familles (chaque famille étant affectée par une mutation différente du gène PRPF8). Dans la première famille, tous les individus porteurs de la mutation ont exprimé à un moment donné de leur vie des signes d'héméralopie (perte de la vision nocturne, généralement considérée comme un des premiers signes de la maladie) mais à des âges très différents les uns des autres, vers l'âge de dix ans pour les plus jeunes et à la fin de la trentaine pour les plus vieux (phénomène d'expressivité variable). L'analyse de la seconde famille est encore plus intéressante. On y retrouve la même variabilité clinique intra-familiale, mais aussi un cas de pénétrance incomplète où le patient était porteur de la même mutation que le reste de la famille mais n'avait aucun symptôme clinique ou paraclinique (aucun symptôme infraclinique n'avait été révélé par ailleurs par les différents examens ophtalmologiques).

La pénétrance, jusqu'alors non décrite pour le poisson, pourrait assez aisément passer inaperçu. En effet, si l'on considère l'importance du nombre d'embryons par ponte, il est concevable qu'ils ne soient que rarement comptabilisés avec précision au cours du temps comme cela est fait pour d'autres modèles comme la souris. Cet argument pourrait expliquer pourquoi le phénotype des mutants générés par les technologies CRISPR ou TALEN semblent souvent plus subtils, les plus atteints n'étant pas détectés.

Comme indiqué plus haut, le détachement des fibres musculaires peut se produire spontanément chez quelques morphants *col22a1* mais il est grandement augmenté lorsque les morphants sont stimulés électriquement ou mécaniquement par des stimuli répétés forçant l'embryon à nager. Les mutants *col22a1^{-/-}*, quant à eux, ne présentent pas de phénotype dystrophique évident lors des premiers stades de développement et, chez les larves de 5dpf, ce n'est que le déclenchement de contractions par stimulation imposée et répétée qui provoque, dans de rares cas, le détachement des myofibrilles. Il faut attendre le stade de 2 spf pour que les mutants les plus sévèrement atteints présentent une réduction évidente du nombre global de fibres musculaires dans le tronc suggérant que le phénomène de détachement musculaire se produit massivement entre 5jpf et 2spf, sans avoir eu recours à des stimulations imposées. Une autre différence notable entre morphants et mutants est que les fibres ondulées (« wavy myofibrilles ») ne sont visibles que chez les mutants. Par contre, l'ultrastructure des muscles du tronc et de la JMT chez les morphants et mutants à 5 jpf est similaire. Enfin, si l'on revient plus en détail sur nos observations des mutants à 5jpf en MET, de façon intéressante, celles-ci confirment celles faites sur les morphants (Charvet et al., 2013) comme la réduction des interdigitations sarcolemmales, un élargissement des myoseptes, qui sont moins denses et contiennent des fibres collagéniques éparses ainsi qu'un nombre de fibroblastes visiblement augmenté. La seule différence observée entre morphants et mutants de 5 jpf qui ont été stimulés électriquement est le site de rupture. En effet, nous avons décrit dans notre première publication que le site de rupture est localisé entre la surface extérieure de la lame basale de la cellule musculaire et les fibres de collagène adjacentes du myosepte. En revanche, chez les mutants, on observe des cassures situées au sein des fibres musculaires provoquant leur détachement mais toujours à proximité immédiate de la JMT.

Ainsi, dans le cas du gène *col22a1*, le phénotype des mutants récapitule globalement plutôt bien celui des morphants. Mais comment interpréter les petites différences de phénotype observées entre nos expériences de knockdown (KD) et de knockout (KO)?

La première explication serait que dans le cas de la lignée *col22a1^{TSPN^{-/-}}*, tout ou partie du domaine vWA soit produit et qu'il ait lui-même une fonction compensant partiellement l'absence du collagène XXII. D'ailleurs, nous avons montré au laboratoire le sauvetage du phénotype des morphants *col22a1* par injection du domaine vWA (résultats non publiés). Par q-PCR, nous avons observé que l'ARNm *col22a1* est présent à 38% dans la lignée *col22a1^{TSPN^{-/-}}* comparativement au témoin (100%). Les ARNs « tronqués » devraient être éliminés par RNA decay mais ce phénomène est rarement complet. Les ARNs « tronqués » pourraient alors être responsables de la production de vWA. Or, la génération d'une seconde lignée *col22a1^{vWA^{-/-}}* KO présentant les mêmes caractéristiques phénotypiques que la lignée

col22a1^{TSPN^{-/-}} nous permet d'exclure cette hypothèse. D'autant plus que nous avons montré l'absence de la protéine dans les deux lignées. L'anticorps utilisé ayant été produit contre le domaine vWA recombinant, si celui-ci était produit dans la lignée col22a1^{TSPN^{-/-}}, nous devrions pouvoir le détecter.

Une seconde explication pourrait venir de l'utilisation même des « Morpholinos® » qui peut parfois engendrer des effets non spécifiques. En effet, plusieurs publications relatent des différences phénotypiques entre KD par injection de morpholinos et les KO générés par édition de génome, que ce soit TALEN ou CRISPR/Cas9, pour différentes espèces dont le poisson zèbre (Kok et al., 2015; El-Brolosy and Stainier, 2017). Il est vrai que l'expertise acquise dans l'utilisation des morpholinos (Pagnon-Minot et al., 2008; Baas et al., 2009; Bignon et al., 2011; Charvet et al., 2013; Guillon et al., 2016) par notre équipe a permis de constater que la multiplication des contrôles ainsi que la recherche de la concentration optimale à injecter sont autant de paramètres primordiaux. D'ailleurs, les mêmes auteurs qui ont décrié l'utilisation des morpholinos (Schulte-Merker and Stainier, 2014), préconisent plutôt aujourd'hui de suivre des recommandations strictes, qui avaient du reste déjà été publiées (Eisen and Smith, 2008), pour mener à bien les expérimentations (Stainier et al., 2017). De plus, l'efficacité des morpholinos n'est jamais totale (nous l'avons vérifié par western blot – Charvet et al., 2013) et sa durée d'action n'est que de 3 à 5 jours, nous pouvons donc légitimement penser que les différences phénotypiques observées entre les morphants et les mutants *col22a1* à 5 jpf sont dues à différents niveaux d'expression protéique.

Une dernière explication avancée est la possibilité de compensation génétique lors des expériences de KO (El-Brolosy et Stainier, 2017) qui pourrait minimiser le phénotype des mutants comparée aux morpholinos. En effet, les morphants *egfl7* présentent pour 40% d'entre eux de sévères défauts vasculaires (Parker et al., 2004) à la différence des 95% de mutants *egfl7^{-/-}* qui présentent des défauts vasculaires mineurs, voire aucun défaut. Les auteurs montrent que l'activation de l'expression du gène *emilin3a* (la quantité d'Emilin3a est quintuplée chez les mutants), compenserait l'invalidation d'*egfl7* dans les mutants (Rossi et al., 2015; El-Brolosy et Stainier, 2017). Ces données remettent en question notre interprétation des différences phénotypiques observées chez les mutants *col22a1^{-/-}*. Les mutants étant classés en deux catégories, modérée et sévère, les différences entre ces deux classes pourraient être la conséquence d'une compensation génétique dans le cas des mutants modérément atteints.

Rossi et ses collaborateurs n'expliquent pas dans leur publication pourquoi 5% des mutants *egfl7^{-/-}* présentent une hémorragie cérébrale à 72 hpf. Ne se pourrait-il pas, comme nous

l'avons évoqué précédemment, que ce pourcentage, même restreint de poisson, corresponde en effet aux individus les plus sévèrement atteints ? On pourrait donc, dans ce cas aussi, évoquer la pénétrance ?

Cependant, les questions de pénétrance et de compensation génétique ne seraient-elles pas intimement liées ? La compensation génétique est un phénomène dont on recherche encore les mécanismes. Plusieurs modèles d'adaptation transcriptionnelle et de mécanismes post-transcriptionnels sont envisagés (El-Brolosy and Stainier, 2017).

Une des perspectives envisagées pour ce travail est de réaliser des analyses transcriptomiques (ARN-seq) des poissons mutants modérés et sévères comparés aux poissons contrôles afin de vérifier une possible compensation génétique. La difficulté qui se pose dans cette analyse est de choisir le bon stade de développement, en effet, jusqu'à deux semaines, il est impossible de distinguer les mutants modérés et sévères autrement que par des techniques très invasives (MET). D'autre part, très rapidement autour de 2spf, les poissons sévèrement atteints présentent une telle gravité de phénotype que nous craignons que l'analyse ARN-seq soit difficile à interpréter. Il faudrait donc définir un stade entre 12 et 14jpf (dès que la différence de sévérité devient discernable mais avant que les embryons ne présentent un phénotype trop dommageable) afin de réaliser cette analyse. Toutefois, la première approche par gène candidat qui a été réalisée montre que chez les mutants *col22a1*^{-/-} modérés, l'expression d'*itga7* est significativement diminuée (Expression relative : 0.87) alors que l'expression de *lama2* et *dag1* n'est pas modifiée. De plus, l'expression de *Fn1a* et *col21a1* est significativement augmentée (Expressions relatives : 1.55x et 1.86x, respectivement). Or, comme nous l'avons évoqué précédemment, le collagène XXI est structurellement très proche du collagène XXII. Ces premiers résultats nous encouragent donc à poursuivre cette approche par q-PCR de tests des gènes du système d'ancrage. Une approche transcriptomique globale serait malgré tout nécessaire pour avoir une image globale du mécanisme moléculaire.

Il est possible que les différences phénotypiques, observées ici (et peut-être dans d'autres études pour d'autres mutants) soient liées conjointement à un phénomène de pénétrance et de compensation génétique. Cela reste à démontrer.

Un des faits marquants du phénotype des mutants et morphants est la quasi-absence des interdigitations du sarcolemme à la JMT et une altération des myoseptes. Ceci est retrouvé chez les mutants dystrophiques tels que *patchytail/dag1* (Gupta et al., 2011) et *soft/lamb2* (Jacoby et al., 2009) qui présentent aussi des défauts notables de la structure des myoseptes. Certains clichés de MET des mutants *popdc1* (Schindler et al., 2016) montrent une forte réduction des interdigitations du sarcolemme, bien que non décrite par les auteurs.

Il est intéressant de noter que ces défauts d'interdigitation sont retrouvés chez des mutants affectant des protéines de la lame basale (Lamb2), associées à la lame basale (COLXXII) ou transmembranaires (Dag1, Popdc1). Il est possible d'imaginer que, de part leur position, ces protéines puissent avoir un effet sur la rigidité de la lame basale ou de la membrane plasmique rendant ainsi la déformation de ces dernières moins aisée, limitant de ce fait la possibilité de former des invaginations. Une telle rigidification de la lame basale a par exemple été montrée au laboratoire dans la lignée de poissons zèbre KO pour *col14a1* qui est le gène codant le Collagène XIV, un FACIT associé à la lame basale de l'épiderme (Nauroy et al, 2018b).

Enfin, les défauts de la JMT observés chez les morphants et mutants *col22a1*, à 5 jpf, sont retrouvés chez les souris modèles de dystrophie musculaire, telles que les souris KO *itga7* (Miosge *et al*, 1999), *mdx/dystrophine* (Law and Tidball, 1993) et les double mutantes *mdx/itga7^{-/-}* et *itga7/utr^{-/-}* (utrophine) (Rooney et al., 2006; Welser et al., 2009), mais ne sont rapportées dans aucun modèle dystrophique poisson zèbre. Bien que l'absence de COLXXII résulte en un phénotype dystrophique, aucune pathologie humaine n'a été associée, à ce jour, à des mutations sur *COL22A1* contrairement à *DAG1* associé au WWS, *ITGA7* associé à la myopathie congénitale *ITGA7* ou *LAMA2* associée à la dystrophie congénitale *MDC1A* (Vajsar and Schachter, 2006 ; Lisi and Cohn, 2007 ; Yurchenco et al., 2017). Cependant, nous pouvons aussi supposer qu'une éventuelle pathologie humaine liée à l'absence de COLXXII soit difficile à caractériser du fait d'une possible létalité embryonnaire ou néonatale, comme c'est le cas par exemple pour certains patients atteints de la myopathie congénitale *ITGA7*.

Toutefois, un lien entre la JMT et des pathologies traumatiques a été récemment mis en avant, chez l'Homme, comme évoqué en introduction. Alors que la JMT a été longtemps considérée comme extrêmement solide, et pratiquement inaltérable, une susceptibilité à la rupture a été récemment démontrée plus importante au niveau de la JMT lors de traumatisme à l'exercice. Comme expliqué en introduction, la rupture s'accompagne de détachements des fibres musculaires parfois au niveau de la JMT elle-même et parfois au niveau de la bande A du sarcomère la plus proche de la JMT (Jakobsen et al., 2017). Ces sites de rupture sont ceux que l'on observe, respectivement chez les morphants et les mutants. Plus intéressant encore, les auteurs observent sur des prélèvements humains « normaux » une absence d'interdigitation en certaines zones du sarcolemme à la JMT, corrélée à l'absence d'expression du collagène XXII (Jakobsen et al., 2017).

Une caractéristique unique des morphants et mutants *col22a1* est la présence de nombreux fibroblastes au sein du myosepte endommagé à 5 jpf. Ce défaut peut s'expliquer chez les

morphants par la diminution d'expression de *col1a1a* à 28 et 72 hpf comparés aux poissons sauvages. Or, les fibroblastes sont les grands producteurs de collagène fibrillaire et pourraient être recrutés pour réparer les myoseptes altérés. D'ailleurs, chez les mutants modérés, à 2 spf, l'expression de *col1a1a* est cette fois significativement augmentée. Nos observations en MET confirment l'abondance de MEC dans les myoseptes des mutants de 2spf modérément atteints. Au même stade, les myoseptes des embryons présentant un phénotype sévère sont constitués d'un réseau collagénique plus épars. Il serait intéressant de compléter nos analyses de QPCR en réalisant les mêmes expériences chez les mutants sévères. Il pourrait être également intéressant de comparer le nombre de fibroblastes présents dans les myoseptes à 2 spf chez les poissons sauvages vs *col22a1^{-/-}* modérés vs *col22a1^{-/-}* sévères.

Chez les morphants, nous avons aussi montré que le détachement musculaire s'accompagne d'une activation de la voie Akt (Charvet et al., 2013). Cette observation est intéressante car il a été montré que la fixation de la laminine 2 sur l'intégrine $\alpha7\beta1$ déclenche une cascade de phosphorylations impliquant les voies Akt/PKB. Il en résulte l'activation de ILK/PINCH. En réponse à l'activation de la voie de signalisation initiée par ILK, il y a recrutement de protéines de la JMT, ce qui renforce la structure (Wang et al., 2008). Comme discuté dans notre premier article (Charvet et al., 2013), un taux élevé d'Akt est mesuré dans les muscles squelettiques de souris dystrophiques et de patients atteints de dystrophie musculaire (Peter and Crosbie, 2006). L'induction spécifique de l'expression d'*Akt* dans les muscles squelettiques de souris *mdx* promeut la régénération du muscle (Kim et al., 2011). De plus, l'augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha7\beta1$ chez les souris déficientes en dystrophine a un effet protecteur sur le muscle via l'activation de la voie ILK/Akt (Boppart et al., 2011). Le taux élevé d'Akt phosphorylé observé chez les morphants *col22a1* en réponse aux lésions musculaires pourrait donc être un processus visant à contrecarrer l'absence de COLXXII. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de regarder si l'activation d'Akt est modifiée chez les mutants modérés et sévères. Cette augmentation d'Akt phosphorylé en l'absence de COLXXII pourrait constituer un argument supplémentaire pour localiser préférentiellement COLXXII au niveau du complexe Laminine-Itga7: notre hypothèse serait qu'il y a activation d'Akt par surexpression de l'intégrine $\alpha7\beta1$ en absence de collagène XXII, chez les mutants sévères. Mais nous pouvons aussi imaginer que si le complexe DAPC est déstabilisé en l'absence de COLXXII, le complexe laminine-itga7, lui, est renforcé pour compenser.

Si la réduction des interdigitations du sarcolemme contribue à la fragilité de la JMT et de l'attachement musculaire, la structure lâche des myoseptes peut compromettre la transmission de la force contractile. En effet, le knockdown et le knockout de COLXXII

conduisent tous deux à une forte réduction de la force musculaire alors que l'intégrité musculaire est préservée (expression normale de marqueurs tardifs de la différenciation de la cellule musculaire, structure normale de l'appareil contractile en MET). Les myoseptes des morphants et des mutants présentent une plus faible densité des fibres collagéniques que les poissons sauvages. Ces myoseptes anormalement laxés sont moins efficaces pour transmettre la force contractile, mais causent aussi une plus grande vulnérabilité des muscles squelettiques aux stress mécaniques. La faiblesse musculaire observée par analyse du couplage excitation-contraction est donc attribuable à l'incapacité du myosepte à transmettre efficacement la force musculaire. On ne peut bien sûr pas exclure que cette faiblesse musculaire ne soit pas aussi associée au nombre réduit de fibres musculaires intactes dans les mutants et morphants.

L'étude de la nage des poissons mutants adultes (pourtant les moins affectés aux stades de jeunes larves) permet de renforcer notre hypothèse selon laquelle la faiblesse musculaire des poissons en absence de collagène XXII est due à un manque d'efficacité de transmission de la force contractile. La faiblesse musculaire a été confirmée par l'étude de la performance de nage chez les adultes *col22a1^{-/-}*. Celle-ci est non seulement très significativement altérée mais la consommation d'O₂ associée à l'effort de nage est supérieure chez les mutants *col22a1^{-/-}* comparativement aux témoins. L'efficacité du système musculo-squelettique semble donc moindre en l'absence de collagène XXII. De nombreuses mitochondries sont présentes en périphérie des muscles squelettiques mais chez les mutants *col22a1^{-/-}* de 6 mpf, on note également une accumulation de mitochondries au sein des cellules musculaires, non retrouvée chez les poissons sauvages de même stade. La présence d'accumulation de mitochondries au cœur des fibres musculaires rappelle les « necklace fibers » (fibres en collier) que l'on trouve dans les myopathies centronucléaires causées par des mutations de la Myotubularine ou de la Dynamine 2 (Bevilacqua et al., 2009 ; Liewluck et al., 2010). Quand ces fibres sont observées en coupe transversale, on peut observer les mitochondries accumulées à l'intérieur de la fibre sur un cercle concentrique avec le pourtour de la fibre. Ce cercle a alors l'aspect d'un collier. Cependant, dans ces fibres « necklace », les noyaux sont fréquemment retrouvés au centre de la fibre, ce qui n'est pas le cas dans les fibres musculaires des mutants *col22a1^{-/-}* pour lesquels les noyaux restent à la périphérie des cellules. Ce défaut de localisation des mitochondries des mutants *col22a1^{-/-}* fait donc probablement appel à un processus différent de celui à l'œuvre dans les fibres « necklace ». Quoi qu'il en soit, la présence de ces nombreuses mitochondries chez les mutants *col22a1^{-/-}* est peut-être le reflet de cette augmentation du métabolisme aérobie, les mitochondries pouvant se diviser indépendamment de la division cellulaire. Il sera intéressant de compléter nos analyses par le calcul de la dette en oxygène

des poissons mutants comparés aux témoins, et correspondant à l'oxygène nécessaire pour restaurer les stocks d'oxygène des tissus et cellules. En effet, nous avons pu démontrer qu'à chaque palier, les mutants ont tendance à consommer d'avantage d'oxygène que les témoins pour le même effort. Mais globalement, on ne sait finalement pas à quel point les poissons mutants ont besoin ou non de plus de temps de récupération pour restaurer leurs réserves en oxygène que les sauvages. On ne sait pas à quel point les poissons mutants ont puisé dans le métabolisme anaérobie. Grâce aux expériences de nage à contre-courant réalisées, nous disposons déjà de toutes les données nécessaires pour renseigner cette dette en oxygène et nous procédons actuellement à leur traitement avec l'aide du Dr C. Lefrançois.

La concordance globale de nos conclusions sur le rôle du collagène XXII consolide nos résultats et permet de défendre l'utilisation des morpholinos largement décrite ces dernières années. J'ajouterais que l'analyse du phénotype des mutants nous a été facilitée de par la connaissance du phénotype des morphants. Bien que la génération de mutants chez le poisson zèbre par la technologie CRISPR soit aujourd'hui relativement facile à mettre en œuvre à l'échelle d'un laboratoire, elle n'en demeure pas moins relativement longue du fait du temps de génération du poisson zèbre et reste relativement coûteuse en terme de frais d'animalerie et de temps humain. L'utilisation de morpholinos, plus facile à mettre en œuvre pourrait être utile dans un premier temps, lorsque peu ou pas d'information sont disponibles sur la fonction d'un gène, avant d'initier la génération d'une lignée CRISPR/Cas9. Mon expérience du modèle poisson et nos connaissances sur l'effet des morpholinos *col22a1* m'ont permis de détecter un phénotype plus subtil qu'attendu. Avec l'arrivée d'un grand nombre de lignées CRISPR/Cas9, le développement des connaissances et des méthodes d'analyse chez le poisson zèbre à des stades plus tardifs que 5jpf sera indispensable pour analyser les larves et adultes mutants lorsqu'ils sont viables.

De par la localisation spécifique du collagène XXII à la JMT et du fait de la similarité de phénotype avec d'autres mutants dystrophiques, nous nous sommes posés la question dès la première publication en 2013 du positionnement du COLXXII au sein du complexe DAPC et/ou du complexe lié à l'intégrine. Ce rôle de lien structural est d'ailleurs cohérent pour un FACIT (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005), ceux-ci étant connus pour prendre part à des complexes protéiques et interagir avec d'autres molécules. Notre équipe a ainsi récemment montré que le collagène XIV-A, un autre membre des FACIT, jouerait le rôle de « spacer » moléculaire transitoirement mais spécifiquement requis pour la structuration de la lame base de l'épiderme lors de la régénération de la nageoire caudale (Nauroy et al., 2018b).

La conclusion de notre étude des interactions synergiques *in vivo* nous a permis de proposer le COLXXII comme un composant du complexe lié à l'intégrine $\alpha7\beta1$. Cette interaction pourrait impliquer le domaine vWA, qui est capable de médier des interactions protéine-protéine via son motif MIDAS, de manière dépendante des ions divalents comme le Mg^{2+} (Lacy et al., 2004). Mais Zwolanek et ses collaborateurs ont aussi identifié deux nouveaux motifs GLQGER et GFKGER permettant l'interaction entre COLXXII et intégrine (Zwolanek et al., 2014). Les résultats de Q-PCR réalisées à 2spf sur les mutants *col22a1*^{-/-} modérés semblent conforter notre hypothèse, *itga7* étant significativement diminuée (Expression relative: 0.87) en absence de COLXXII alors que l'expression de *lama2* et *dag1* n'est pas modifiée. Mais nous aurions également pu nous attendre à ce que l'expression d'*itga7* soit au contraire augmentée pour compenser l'absence de COLXXII chez les mutants modérés. Il faudra donc réitérer ces analyses chez les mutants sévères pour voir si l'expression d'*itga7* est modifiée de la même façon ou non que chez les poissons modérément atteints.

De nombreuses questions restent en suspens comme le caractère direct ou indirect de cette interaction avec l'intégrine. On ne peut pas exclure une interaction directe, puisqu'il a été montré que le collagène XXII humain recombinant interagit avec les cellules via l'intégrine $\alpha2\beta1$ et/ou $\alpha11\beta1$. Les auteurs identifient ainsi deux nouveaux motifs GLQGER et GFKGER permettant l'interaction entre COLXXII et l'intégrine (Zwolanek et al., 2014). Cependant, le fait que les zones de rupture observées en MET soient externes à la lame basale nous permet plutôt de proposer une interaction indirecte. Pour autant, la co-injection de doses sub-phénotypiques de morpholinos *col22a1* et *lama2* donne un phénotype plus modéré que la co-injection de morpholinos *col22a1* et *itga7*, bien que *lama2* participe aux deux complexes de la JMT. La double injection des morpholinos *dag1* et *col22a1* à doses sub-phénotypiques montre que COLXXII ne semble pas participer en premier lieu au complexe DAPC. Il est donc possible que COLXXII interagisse avec l'intégrine $\alpha7\beta1$ via la liaison à une autre isoforme de laminine.

Les cellules musculaires expriment différentes isoformes de laminine au cours de leur développement et des expériences d'épistasie conduites chez le poisson zèbre suggèrent elles aussi que différentes isoformes de laminines contribuent à l'attachement musculaire et au maintien de son intégrité (Sztal et al., 2012). Le KD de *lama4* ou *itga7* conduit à la perte d'ILK à la JMT, démontrant que la laminine $\alpha4$ est également impliquée dans l'attachement du muscle au tendon (Postel et al., 2008). La chaîne laminine $\alpha4$ pourrait donc être cette isoforme de laminine permettant l'interaction indirecte (si cette interaction est effectivement indirecte) entre COLXXII et l'intégrine $\alpha7\beta1$. Dans l'ensemble, nos résultats sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle COLXXII est une protéine du complexe transmembranaire intégrine $\alpha7\beta1$ à la JMT qui contribue à l'ancrage du sarcolemme à la MEC du myosepte. Il

serait judicieux d'injecter des morpholinos ciblant individuellement les divers partenaires de la JMT (et en priorité *itga7-MO*) à concentration sous-phénotypique chez les poissons KO *col22a1^{-/-}* pour vérifier notre hypothèse. Nous pourrions également injecter ces morpholinos chez les mutants hétérozygotes et regarder si le phénotype est aggravé. Cela serait d'autant plus intéressant si nous réalisons une analyse transcriptomique des mutants afin de révéler une éventuelle compensation génique. Une des priorités de la suite de mes recherches sera ainsi d'identifier les partenaires directs du collagène XXII à la JMT. Différentes méthodes d'investigation des interactions protéine-protéine existent et notamment des méthodes biochimiques. Au laboratoire, nous avons déjà tenté d'identifier des partenaires de COLXXII par co-immunoprécipitation, malheureusement sans succès...De plus, cette méthode ne permet pas de cribler des interactions mais de vérifier une interaction que l'on suppose déjà et révèle à la fois des interactions directes et indirectes (On peut toutefois analyser le co-immunoprécipitat du COLXXII en spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines présentes). Des méthodes d'imagerie sont également utilisables comme le FRET (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes) et plus récemment la BIFC (bimolecular fluorescence complementation) utilisée par d'autres équipes de notre institut et qui permet de cribler des interactions et des régulateurs que l'on pourrait utiliser. Notre collaborateur M. Koch nous a également parlé d'une technique récente de spectrométrie de masse disponible dans son laboratoire et que j'envisage d'utiliser en priorité.

L'*itga7* n'est pas le seul gène à présenter une expression modifiée en l'absence de COLXXII puisque nos résultats de q-PCR montrent une augmentation de l'expression de *fn1a* (codant pour la fibronectine) chez les poissons *col22a1^{-/-}* modérés de 2 spf. Or, les composants de la MEC comme la fibronectine contribuent directement au potentiel régénératif du muscle. En effet, il a été montré que la fibrose, riche en fibronectine, est une étape initiale essentielle à la régénération pour activer la prolifération des CS (Bentzinger et al., 2013). Les progéniteurs des TC, FAPs et PICs pourraient être autant de sources potentielles de fibronectine et ainsi pourraient contribuer à la fibrose observée au cours de la régénération musculaire. Il est également important de noter que les CS activées, peuvent elles-mêmes libérer de la fibronectine dans leur microenvironnement et ainsi s'auto-réguler (Bentzinger et al., 2013). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'en absence de COLXXII, *Itga7* est elle aussi diminuée et donc le complexe *Itga7-Lama2* est fragilisé de même que la JMT et ainsi, l'augmentation de fibronectine viendrait contrebalancer ce défaut pour tenter de maintenir l'intégrité musculaire. La surexpression du collagène XXI chez les poissons *col22a1^{-/-}* adultes paraît elle-aussi très intéressante. En effet, à part un patron d'expression controversé chez l'Homme, rien n'est connu à ce jour sur la fonction de ce collagène, membre de la famille des FACITs également et très proche structurellement du COLXXII. Il est d'autant plus

intéressant d'étudier ce collagène, son patron d'expression et son rôle chez le poisson zèbre qu'il est absent chez plusieurs rongeurs dont la souris qui a perdu ce gène au cours de l'évolution.

Au cours de ma thèse, j'ai pu confirmer l'existence du collagène XXI et déterminer sa séquence chez le poisson zèbre. J'ai également pu montrer par RT-PCR que *col21a1* est exprimé maternellement (détectable au stade 2 cellules). Indétectable après 3hpf, son expression réapparaît entre 12 et 18hpf, et augmente fortement entre 18 et 48 hpf (au moment du début de l'expression du collagène XXII) et diminue entre 5 et 6 jpf. Malgré plusieurs tentatives, je n'ai pas réussi à établir le patron d'expression de *col21a1* par hybridation in situ (HIS) mais il serait intéressant de persévérer et de développer d'autres outils pour son analyse (autres sondes, anticorps spécifiques). J'avais entrepris la création de lignées KO pour *col21a1* mais j'ai dû finalement me concentrer sur les lignées KO pour *col22a1*. Si les résultats de q-PCR et d'analyse transcriptomique confirment la modification de l'expression de *col21a1* en l'absence de *col22a1*, alors il serait pertinent de relancer la création de cette lignée, j'ai déjà pu sélectionner les sgARN qui fonctionnent.

Comme évoqué dans l'introduction bibliographique de ma thèse, la MEC spécialisée qui entoure les cellules musculaires au cours de leur différenciation joue un rôle primordial dans la formation et le maintien de l'intégrité du muscle. Le nombre de gènes de la MEC associé à des dystrophies musculaires est en constante évolution (Lisi and Cohn, 2007; Berger et al., 2012; Gibbs et al., 2013; Goody et al., 2017). L'émergence des techniques d'édition du génome risque encore d'augmenter le nombre de gènes candidats et permettra très probablement d'améliorer la connaissance du rôle de la MEC dans la fonction du muscle. C'est d'ailleurs ce qu'a déjà montré notre équipe avec le mutant *col15a1b* qui a permis d'identifier une nouvelle fonction de guidage axonal du collagène XV (Guillon et al., 2016). La création de nouveaux modèles animaux reproduisant des myopathies permettra également d'apporter une meilleure connaissance de la pathogenèse d'une myopathie. Notre équipe a ainsi généré un modèle poisson de la myopathie de Bethlem par TALEN-Exon skipping (Radev et al., 2015).

Le phénotype dystrophique des morphants *col22a1* et son sauvetage après injection de la protéine humaine recombinante, la forte conservation de séquence entre les gènes humains et de poisson zèbre, la gravité du phénotype des poissons mutants les plus sévèrement atteints à 2spf ainsi que la diminution des capacités de nage des poissons permettent de proposer *COL22A1* comme un gène candidat pour des myopathies non encore élucidées. D'autres recherches devront être effectuées dans ce sens pour tenter d'identifier des mutations du gène *COL22A1* chez les patients négatifs pour les autres gènes causatifs. La

concordance phénotypique et la proportion identique d'individus modérément et sévèrement atteint dans les 2 lignées knockout générées renforcent encore nos conclusions. Nous proposons ainsi le modèle poisson zèbre comme un très bon modèle pour aborder la question de pénétrance des maladies génétiques.

Beaucoup de perspectives à court terme à ce travail :

1. Il serait intéressant d'étudier les capacités régénératives du muscle en l'absence du collagène XXII. En effet, peu d'études s'intéressent au rôle de la JMT au cours de la régénération musculaire. Une lésion peut par exemple être créée par injection de cardiotoxine (Seger et al., 2011).

2. Une expression du collagène XXII dans les muscles de la tête des embryons de poisson zèbre a été détectée (Guiraud et al., résultats non publiés) sans que nous puissions parvenir à la définir précisément. Or, les mutants adultes de 6 mois présentent des défauts au niveau de la mâchoire inférieure visibles en imagerie par rayons X (réalisée avec M. Bouchet, plateforme μ CTscan, UMS Biosciences Gerland). Il sera intéressant de mieux caractériser ces défauts. COLXXII a d'ailleurs été immunolocalisé à la jonction cartilage/ fluide synovial dans le cartilage articulaire de souris (Koch et al., 2004).

3. Nous avons montré que les transcrits *col22a1* et la protéine COLXXII augmentent considérablement au moment où les contractions du muscle squelettique augmentent dans le chorion et au moment de l'éclosion, suggérant une régulation de *col22a1* par un signal mécanique. D'ailleurs, le fait d'anesthésier les embryons réduit l'expression de COLXXII par western blot de façon significative. Comme évoqué dans le chapitre « Contribution non-myogénique au développement musculaire », l'interaction entre le muscle et le tendon est encore largement méconnue. La conviction actuelle est qu'il y a une communication bidirectionnelle entre muscle et tendon. Or, des expériences préliminaires conduites précédemment au laboratoire laissent supposer que l'expression du collagène XXII serait induite par une cascade signalétique induite par des signaux chimiques puis maintenue par un stress mécanique. En effet, il a été montré par hybridation *in situ* au laboratoire que *fgf8* est exprimé dans le tendon vers 18 hpf juste avant l'expression de *col22a1* (22hpf); l'utilisation, à partir de 18 hpf, de la drogue SU5204 qui inhibe la signalisation FGF entraîne l'absence de COLXXII par western blot, et enfin, chez les mutants *ace/fgf8*, le collagène XXII n'est pas détecté par immunofluorescence à 72 hpf (Figure 56) (Charvet, Guiraud et al., résultats non publiés). Il sera important de vérifier ces résultats préliminaires. Il serait également intéressant de regarder par HIS si l'expression de *fgf8* est perturbée chez les mutants KO *col22a1* que nous avons générés afin d'identifier un éventuel rétro-contrôle de l'expression de *fgf8* par COLXXII.

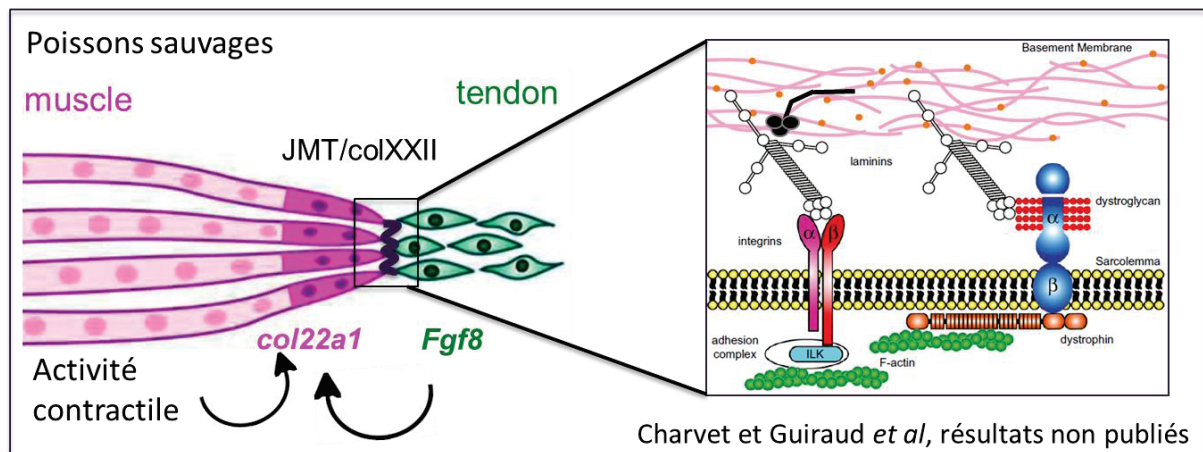


Figure 56: Communication bidirectionnelle entre muscle et tendon ? L'expression du collagène XXII serait induite par cascade signalétique (Fgf8...) puis maintenue par un stress mécanique: l'activité contractile. Inspirée d'un schéma de F. Ruggiero.

En conclusion, mes travaux de thèse contribuent à considérer davantage le rôle de la JMT et plus particulièrement du collagène XXII dans le développement et le maintien de l'activité du muscle squelettique. J'espère qu'ils permettront d'inclure le gène *COL22a1* dans la liste des gènes candidats pouvant expliquer des pathologies musculaires dont l'origine génétique reste non élucidée. Mon travail de thèse a aussi permis de développer au laboratoire différents outils pour analyser les phénotypes musculaires chez l'embryon, la larve et l'adulte. Notamment, l'étude de la performance de nage est un outil pertinent de description phénotypique, à utiliser au même titre que le marquage de l'actine par la phalloïdine, la MET ou l'analyse par biréfringence dans l'étude des modèles animaux de dystrophie et autres pathologies musculaires.

Bibliographie

Bibliographie

A

Abou-khalil, R., Yang, F., Lieu, S., Julien, A., Perry, J., Pereira, C., Relaix, F., Micalau, T., Marcucio, R. and Colnot, C. (2015). Role of muscle stem cells during skeletal regeneration. *Stem Cells*. **33**, 1501-1511.

Ackley, B.D., Crew, J.R., Elamaa, H., Pihlajaniemi, T., Kuo, C.J., and Kramer, J.M. (2001). The Nc1/Endostatin Domain of *Caenorhabditis elegans* Type XVIII Collagen Affects Cell Migration and Axon Guidance. *J. Cell Biol.* **152**, 1219 LP-1232.

Adams, M.E., Mueller, H.A., and Froehner, S.C. (2001). In vivo requirement of the α -syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4. *J. Cell Biol.* **155**, 113–122.

Albadri, S., Del Bene, F., and Revenu, C. (2017). Genome editing using CRISPR/Cas9-based knock-in approaches in zebrafish. *Methods* **121–122**, 77–85.

Alberton, P., Popov, C., Prägert, M., Kohler, J., Shukunami, C., Schieker, M., and Docheva, D. (2012). Conversion of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into Tendon Progenitor Cells by Ectopic Expression of Scleraxis. *Stem Cells Dev.* **21**, 846–858.

Angelini C. (2014) Congenital Muscular Dystrophy with Integrin-Alpha-7 Deficiency. In: Genetic Neuromuscular Disorders. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-07500-6_21

Ansorge, H.L., Meng, X., Zhang, G., Veit, G., Sun, M., Klement, J.F., Beason, D.P., Soslowsky, L.J., Koch, M., and Birk, D.E. (2009). Type XIV collagen regulates fibrillogenesis: Premature collagen fibril growth and tissue dysfunction in null mice. *J. Biol. Chem.* **284**, 8427–8438.

B

Baas, D., Malbouyres, M., Haftek-Terreau, Z., Le Guellec, D., and Ruggiero, F. (2009). Craniofacial cartilage morphogenesis requires zebrafish col11a1 activity. *Matrix Biol.* **28**, 490–502.

Bader, H.L., Keene, D.R., Charvet, B., Veit, G., Driever, W., Koch, M., and Ruggiero, F. (2009). Zebrafish collagen XII is present in embryonic connective tissue sheaths (fascia) and basement membranes. *Matrix Biol.* **28**, 32–43.

Bader, H.L., Lambert, E., Guiraud, A., Malbouyres, M., Driever, W., Koch, M., and Ruggiero, F. (2013). Zebrafish collagen XIV is transiently expressed in epithelia and is required for proper function of certain basement membranes. *J. Biol. Chem.* **288**, 6777–6787.

Bassett, D.I. (2003). Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development* **130**, 5851–5860.

Bateman, J.F., Wilson, R., Freddi, S., Lamandé, S.R., and Savarirayan, R. (2005). Mutations of COL10A1 in Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Hum. Mutat.* **25**, 525–534.

Batut, J., Duboé, C., and Vandell, L. (2011). The methyltransferases PRMT4/CARM1 and PRMT5 control differentially myogenesis in zebrafish. *PLoS One* **6**.

- Bedal, K.B., Grässel, S., Oefner, P.J., Reinders, J., Reichert, T.E., and Bauer, R. (2014). Collagen XVI induces expression of MMP9 via modulation of AP-1 transcription factors and facilitates invasion of oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 9, 1–10.
- Bendig, G., Grimmmer, M., Huttner, I.G., Wessels, G., Dahme, T., Just, S., Trano, N., Katus, H.A., Fishman, M.C., and Rottbauer, W. (2006). Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart. *Genes Dev.* 20, 2361–2372.
- Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., Dumont, N.A., and Rudnicki, M.A. (2013). Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep.* 14, 1062–1072.
- Berger, J., Berger, S., Hall, T.E., Lieschke, G.J., and Currie, P.D. (2010). Dystrophin-deficient zebrafish feature aspects of the Duchenne muscular dystrophy pathology. *Neuromuscul. Disord.* 20, 826–832.
- Berger, J., Berger, S., Jacoby, A.S., Wilton, S.D., and Currie, P.D. (2011). Evaluation of exon-skipping strategies for Duchenne muscular dystrophy utilizing dystrophin-deficient zebrafish. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 2643–2651.
- Berger, J., and Currie, P.D. (2012). Zebrafish models flex their muscles to shed light on muscular dystrophies. *Dis. Model. Mech.* 5, 726–732.
- Berger, J., Tarakci, H., Berger, S., Li, M., Hall, T.E., Arner, A., and Currie, P.D. (2014). Loss of Tropomodulin4 in the zebrafish mutant *trage* causes cytoplasmic rod formation and muscle weakness reminiscent of nemaline myopathy. *Dis. Model. Mech.* 7, 1407–1415.
- Berger, J., Berger, S., Li, M., and Currie, P.D. (2017). Myo18b is essential for sarcomere assembly in fast skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* 26, 1146–1156.
- Bignon, M., Pichol-Thievend, C., Hardouin, J., Malbouyres, M., Bréchet, N., Nasciutti, L., Barret, A., Teillon, J., Guillon, E., Etienne, E., et al. (2011). Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. *Blood* 118, 3979–3989.
- Biswas, S. (2001). Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2415–2423.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. (2009). Breaking the Code of DNA Binding. *Science* (80-.). 1509, 1509–1512.
- Bokma, F. (2004). Evidence against universal metabolic allometry. *Funct. Ecol.* 18, 184–187.
- Bönnemann, C.G. (2011). The collagen VI-related myopathies: Muscle meets its matrix. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 379–390.
- Boncompagni, S., d'Amelio, L., Fulle, S., Fano, G. and Protasi, F. (2006). Progressive Disorganization of the Excitation-Contraction Coupling Apparatus in Aging Human Skeletal Muscle as Revealed by Electron Microscopy: A possible role in the decline of muscle performance. *J. of gerontology.* 61A (10), 995-1008
- Boot-Handford, R.P., Tuckwell, D.S., Plumb, D.A., Farrington Rock, C., and Poulosom, R. (2003). A novel and highly conserved collagen (pro α 1(XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *J. Biol. Chem.* 278, 31067–31077.

Boppart MD, Burkin DJ, K.S. (2011). Activation of AKT signaling promotes cell growth and survival in $\alpha 7\beta 1$ integrin-mediated alleviation of muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta.* 1812, 439–446.

Boudko, S.P., Engel, J., and Bächinger, H.P. (2008). Trimerization and triple helix stabilization of the collagen XIX NC2 domain. *J. Biol. Chem.* 283, 34345–34351.

Brent, A.E. (2005). Genetic analysis of interactions between the somitic muscle, cartilage and tendon cell lineages during mouse development. *Development* 132, 515–528.

Brent, A.E., Schweitzer, R., and Tabin, C.J. (2003). A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* 113, 235–248.

Brett, J.R. (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Board Canada* 21, 1183–1226.

Brustein, E., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., and Drapeau, P. (2003). Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J. Physiol. Paris* 97, 77–86.

C

Canty, E.G., and Kadler, K.E. (2002). Collagen fibril biosynthesis in tendon: A review and recent insights. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 133, 979–985.

Canty, E.G., Lu, Y., Meadows, R.S., Shaw, M.K., Holmes, D.F., and Kadler, K.E. (2004). Coalignment of plasma membrane channels and protrusions (fibropositors) specifies the parallelism of tendon. *J. Cell Biol.* 165, 553–563.

Canty, E.G., Starborg, T., Lu, Y., Humphries, S.M., Holmes, D.F., Meadows, R.S., Huffman, A., O'Toole, E.T., and Kadler, K.E. (2006). Actin filaments are required for fibropositor-mediated collagen fibril alignment in tendon. *J. Biol. Chem.* 281, 38592–38598.

Cescon, M., Gattazzo, F., Chen, P., and Bonaldo, P. (2015). Collagen VI at a glance. *J. Cell Sci.* 128, 3525–3531.

Chakrabarti, S., Streisinger, G., Singer, F., and Walker, C. (1983). Frequency of γ -ray induced specific locus and recessive lethal mutations in mature germ cells of the zebrafish, *brachydanio rerio*. *Genetics* 103, 109–123.

Chang, N., Sun, C., Gao, L., Zhu, D., Xu, X., Zhu, X., Xiong, J.W., and Xi, J.J. (2013). Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos. *Cell Res.* 23, 465–472.

Charvet, B., Malbouyres, M., Pagnon-Minot, A., Ruggiero, F., and Le Guellec, D. (2011). Development of the zebrafish myoseptum with emphasis on the myotendinous junction. *Cell Tissue Res.* 346, 439–449.

Charvet, B., Guiraud, A., Malbouyres, M., Zwolanek, D., Guillon, E., Bretaud, S., Monnot, C., Schulze, J., Bader, H.L., Allard, B., et al. (2013). Knockdown of *col22a1* gene in zebrafish induces a muscular dystrophy by disruption of the myotendinous junction. *Development* 140, 4602–4613.

Chazaud, C. (2008). L'embryogenèse précoce des mammifères. 1043–1048.

Chen, J.W., and Galloway, J.L. (2014). The development of zebrafish tendon and ligament

progenitors. *Development* 141, 2035–2045.

Chen, J.W., and Galloway, J.L. (2017). Using the zebrafish to understand tendon development and repair. *Methods Cell Biol.* 138, 299–320.

Chiquet, M., Birk, D.E., Bönemann, C.G., and Koch, M. (2014). Collagen XII: Protecting bone and muscle integrity by organizing collagen fibrils. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 53, 51–54.

Chou, M.Y., and Li, H.C. (2002). Genomic organization and characterization of the human type XXI collagen (COL21A1) gene. *Genomics* 79, 395–401.

Cohn, R.D., Henry, M.D., Michele, D.E., Barresi, R., Saito, F., Moore, S.A., Flanagan, J.D., Skwarchuk, M.W., Robbins, M.E., Mendell, J.R., et al. (2002). Disruption of *Dag1* in differentiated skeletal muscle reveals a role for dystroglycan in muscle regeneration. *Cell* 110, 639–648.

D

Dedhar, S. (2000). Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 250–256.

Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11211–11216.

Dooley, K., and Zon, L.I. (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 252–256.

Dou, Y., Andersson-Lendahl, M., and Arner, A. (2008). Structure and Function of Skeletal Muscle in Zebrafish Early Larvae. *J. Gen. Physiol.* 131, 445–453.

Dubińska-Magiera, M., Daczewska, M., Lewicka, A., Migocka-Patrzałek, M., Niedbalska-Tarnowska, J., and Jagla, K. (2016). Zebrafish: A model for the study of toxicants affecting muscle development and function. *Int. J. Mol. Sci.* 17.

E

Edom-Vovard, F., and Duprez, D. (2004). Signals Regulating Tendon Formation during Chick Embryonic Development. *Dev. Dyn.* 229, 449–457.

Ehmsen, J., Poon, E., and Davies, K. (2002). The dystrophin- complex The Dystrophin-Associated Protein Complex. *J. Cell Sci.* 2002, 2801–2803.

Eisen, J.S., and Smith, J.C. (2008). Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* 135, 1735–1743.

Eklund, L., Piuholta, J., Komulainen, J., Sormunen, R., Ongvarrasopone, C., Fassler, R., Muona, A., Ilves, M., Ruskoaho, H., Takala, T.E.S., et al. (2001). Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 1194–1199.

El-Brolosy, M.A., and Stainier, D.Y.R. (2017). Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet.* 13, 1–17.

F

Fässler, R., Schnegelsberg, P.N., Dausman, J., Shinya, T., Muragaki, Y., McCarthy, M.T., Olsen, B.R., and Jaenisch, R. (1994). Mice lacking alpha 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 5070–5074.

Figeac, N., Daczewska, M., Marcelle, C., and Jagla, K. (2007). Muscle stem cells and model systems for their investigation. *Dev. Dyn.* *236*, 3332–3342.

Figueiredo, M.A., Mareco, E.A., Silva, M.D.P., and Marins, L.F. (2012). Muscle-specific growth hormone receptor (GHR) overexpression induces hyperplasia but not hypertrophy in transgenic zebrafish. *Transgenic Res.* *21*, 457–469.

Fish, F.E. (2001). Swimming in fish. *Encycl. Life Sci.* 1–6.

Fitzgerald, J., and Bateman, J.F. (2001). A new FACIT of the collagen family: COL21A1. *FEBS Lett.* *505*, 275–280.

Fitzgerald, J., and Bateman, J.F. (2004). Why mice have lost genes for *COL21A1*, *STK17A*, *GPR145* and *AHRI*: evidence for gene deletion at evolutionary breakpoints in the rodent lineage. *Trends in Genetics.* *20(9)*, 408–412.

Font, B., Aubertfoucher, E., Goldschmidt, D., Eichenberger, D., and VanderRest, M. (1993). Binding of Collagen-XIV with the Dermatan Sulfate Side-Chain of Decorin. *J. Biol. Chem.* *268*, 25015–25018.

Font, B., Eichenberger, D., Rosenberg, L.M., and Van Der Rest, M. (1996). Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon, decorin and fibromodulin. *Matrix Biol.* *15*, 341–348.

Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* *123*, 4195–4200.

Frolova, E.G., Drazba, J., Krukovets, I., Kostenko, V., Blech, L., Harry, C., Vasanji, A., Drumm, C., Sul, P., Jenniskens, G.J., et al. (2014). Control of Organization and Function of Muscle and Tendon by Thrombospondin-4. *Matrix Biol* *37*, 35–48.

Fry, C.S., Kirby, T.J., Kosmac, K., Mccarthy, J.J., and Peterson, C.A. (2017). Myogenic progenitor cells control extracellular matrix production by fibroblasts during skeletal muscle hypertrophy HHS Public Access. *Cell Stem Cell Cell Stem Cell January 05*, 56–69.

G

Gaut, L., and Duprez, D. (2016). Tendon development and diseases. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *5*, 5–23.

Gebauer, J.M., Kobbe, B., Paulsson, M., and Wagener, R. (2016). Structure, evolution and expression of collagen XXVIII: Lessons from the zebrafish. *Matrix Biol.* *49*, 106–119.

Gerecke, DR., Meng, X., Liu, B and Birk, DE. (2004). Complete primary structure and genomic organization of the mouse Col14a1 gene. *Matrix Biol.* *22*, 595–601.

Gerger, C.J., Thomas, J.K., Janz, D.M., and Weber, L.P. (2014). Acute effects of β -naphthoflavone on cardiorespiratory function and metabolism in adult zebrafish (*Danio rerio*).

Fish Physiol. Biochem. 41, 289–298.

Gheyara, A.L., Vallejo-Illarramendi, A., Zang, K., Mei, L., St-Amaud, R., Dedhar, S., and Reichardt, L.F. (2007). Deletion of integrin-linked kinase from skeletal muscles of mice resembles muscular dystrophy due to $\alpha 7\beta 1$ -integrin deficiency. *Am. J. Pathol.* 171, 1966–1977.

Giacomotto, J., Brouilly, N., Walter, L., Mariol, M.C., Berger, J., Ségalat, L., Becker, T.S., Currie, P.D., and Gieseler, K. (2013). Chemical genetics unveils a key role of mitochondrial dynamics, cytochrome c release and ip3r activity in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4562–4578.

Gibbs, E.M., Horstick, E.J., and Dowling, J.J. (2013). Swimming into prominence: The zebrafish as a valuable tool for studying human myopathies and muscular dystrophies. *FEBS J.* 280, 4187–4197.

Gieseler, K., Grisoni, K., and Ségalat, L. (2000). Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 10, 1092–1097.

Girgenrath, M., Kostek, C.A., and Miller, J.B. (2005). Diseased muscles that lack dystrophin or laminin- $\alpha 2$ have altered compositions and proliferation of mononuclear cell populations. *BMC Neurol.* 5, 1–11.

Gonzalez, J.P., Crassous, P.A., Schneider, J.S., Beuve, A., and Fraidenraich, D. (2015). Neuronal nitric oxide synthase localizes to utrophin expressing intercalated discs and stabilizes their structural integrity. *Neuromuscul. Disord.* 25, 964–976.

Goody, M.F., Kelly, M.W., Reynolds, C.J., Khalil, A., Crawford, B.D., and Henry, C.A. (2012). NAD⁺ Biosynthesis Ameliorates a Zebrafish Model of Muscular Dystrophy. *PLoS Biol.* 10.

Goody, M.F., Carter, E. V., Kilroy, E.A., Maves, L., and Henry, C.A. (2017). “Muscling” Throughout Life: Integrating Studies of Muscle Development, Homeostasis, and Disease in Zebrafish (Elsevier Inc.).

Gordon, M.K., and Hahn, R.A. (2011). Collagens. *Cell Tissue Res.* 339, 247–257.

Grady, R.M., Grange, R.W., Lau, K.S., Maimone, M.M., Nichol, M.C., Stull, J.T., and Sanes, J.R. (1999). Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nat. Cell Biol.* 1, 215–220.

Granato, M., van Eeden, F.J., Schach, U., Trowe, T., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., et al. (1996). Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. *Development* 123, 399–413.

Grässel, S., and Bauer, R.J. (2013). Collagen XVI in health and disease. *Matrix Biol.* 32, 64–73.

Grimal, S., Puech, S., Wagener, R., Ventéo, S., Carroll, P., and Fichard-Carroll, A. (2010). Collagen XXVIII is a distinctive component of the peripheral nervous system nodes of Ranvier and surrounds nonmyelinating glial cells. *Glia* 58, 1977–1987.

Grounds, M.D., Sorokin, L., and White, J. (2005). Strength at the extracellular matrix-muscle interface. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* 15, 381–391.

Guillon, E., Breaud, S., and Ruggiero, F. (2016). Slow Muscle Precursors Lay Down a Collagen XV Matrix Fingerprint to Guide Motor Axon Navigation. *J Neurosci* 36, 2663–2676.

Gupta, V., Kawahara, G., Gundry, S.R., Chen, A.T., Lencer, W.I., Zhou, Y., Zon, L.I., Kunkel, L.M., and Beggs, A.H. (2011). The zebrafish *dag1* mutant: A novel genetic model for dystroglycanopathies. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1712–1725.

Gupta, V.A., Kawahara, G., Myers, J.A., Chen, A.T., Hall, T.E., Manzini, M.C., Currie, P.D., Zhou, Y., Zon, L.I., Kunkel, L.M., et al. (2012). A splice site mutation in Laminin- α 2 results in a severe muscular dystrophy and growth abnormalities in Zebrafish. *PLoS One* 7, 1–9.

Guyon, J.R., Steffen, L.S., Howell, M.H., Pusack, T.J., Lawrence, C., and Kunkel, L.M. (2007). Modeling human muscle disease in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1772, 205–215.

Guyon, J.R., Goswami, J., Jun, S.J., Thorne, M., Howell, M., Pusack, T., Kawahara, G., Steffen, L.S., Galdzicki, M., and Kunkel, L.M. (2009). Genetic isolation and characterization of a splicing mutant of zebrafish dystrophin. *Hum. Mol. Genet.* 18, 202–211.

H

Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J.B., Schneider-Maunoury, S., Shkumatava, A., Teboul, L., Kent, J., et al. (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol.* 17, 1–12.

Haffter, P., Granato, M., and Brand, M. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*.

Hall, T.E., Bryson-Richardson, R.J., Berger, S., Jacoby, A.S., Cole, N.J., Hollway, G.E., Berger, J., and Currie, P.D. (2007). The zebrafish *candyfloss* mutant implicates extracellular matrix adhesion failure in laminin 2-deficient congenital muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 7092–7097.

Hall, J.G. (2014). Arthrogryposis (multiple congenital contractures): Diagnostic approach to etiology, classification, genetics, and general principles. *Eur. J. Med. Genet.* 57, 464–472.

Hammer, C. (1995). Fatigue and exercise tests with fish. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.* 112, 1–20.

Hansen, N.U.B., Willumsen, N., Sand, J.M.B., Larsen, L., Karsdal, M.A., and Leeming, D.J. (2016). Type VIII collagen is elevated in diseases associated with angiogenesis and vascular remodeling. *Clin. Biochem.* 49, 903–908.

Hashimoto, T., Wakabayashi, T., Watanabe, A., Kowa, H., Hosoda, R., Nakamura, A., Kanazawa, I., Arai, T., Takio, K., Mann, D.M.A., et al. (2002). CLAC: A novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *EMBO J.* 21, 1524–1534.

Heikkinen, A., Tu, H., and Pihlajaniemi, T. (2012). Collagen XIII: A type II transmembrane protein with relevance to musculoskeletal tissues, microvessels and inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 714–717.

Heljasvaara, R., Aikio, M., Ruotsalainen, H., and Pihlajaniemi, T. (2017). Collagen XVIII in tissue homeostasis and dysregulation — Lessons learned from model organisms and human

patients. *Matrix Biol.* 57–58, 55–75.

Herrmann, R., Straub, V., Blank, M., Kutzick, C., Franke, N., Jacob, E.N., Lenard, H.G., Kröger, S., and Voit, T. (2000). Dissociation of the dystroglycan complex in caveolin-3-deficient limb girdle muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2335–2340.

Hicks, D., Farsani, G.T., Laval, S., Collins, J., Sarkozy, A., Martoni, E., Shah, A., Zou, Y., Koch, M., Bönnemann, C.G., et al. (2014). Mutations in the collagen XII gene define a new form of extracellular matrix-related myopathy. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2353–2363.

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503.

Huang, C. -c. (2003). Laminin subunits and their role in *C. elegans* development. *Development* 130, 3343–3358.

Huang, AH., Riordan, TJ., Wang, L., Eyal, S., Zelzer, E., Brigande, JV and Schweitzer, R. (2013). Re-positioning forelimb superficialis muscles: tendon attachment and muscle activity enable active relocation of functional myofibers. *Dev. Cell.* 26(5), 544-551.

Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Kaini, P., Sander, J.D., Joung, J.K., Peterson, R.T., and Yeh, J.R.J. (2013). Heritable and Precise Zebrafish Genome Editing Using a CRISPR-Cas System. *PLoS One* 8, 1–9.

Hynes, R.O., and Naba, A. (2012). Overview of the matrisome-An inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.

I

Izu, Y., Sun, M., Zwolanek, D., Veit, G., Williams, V., Cha, B., Jepsen, K.J., Koch, M., and Birk, D.E. (2011). Type XII collagen regulates osteoblast polarity and communication during bone formation. *J. Cell Biol.* 193, 1115–1130.

J

Jacoby, A.S., Busch-Nentwich, E., Bryson-Richardson, R.J., Hall, T.E., Berger, J., Berger, S., Sonntag, C., Sachs, C., Geisler, R., Stemple, D.L., et al. (2009). The zebrafish dystrophic mutant softy maintains muscle fibre viability despite basement membrane rupture and muscle detachment. *Development* 136, 3367–3376.

Jagla, K., Kalman, B., Boudou, T., Hénon, S., and Batonnet-Pichon, S. (2017). Beyond mice: Emerging and transdisciplinary models for the study of early-onset myopathies. *Semin. Cell Dev. Biol.* 64, 171–180.

Jaka, O., Casas-Fraile, L., Lázpeiz De Munain, A., and Sjöenz, A. (2015). Costamere proteins and their involvement in myopathic processes. *Expert Rev. Mol. Med.* 17.

Jakobsen, J.R., Mackey, A.L., Knudsen, A.B., Koch, M., Kjær, M., and Krogsgaard, M.R. (2017). Composition and adaptation of human myotendinous junction and neighboring muscle fibers to heavy resistance training. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* 27, 1547–1559.

Jayadev, R., and Sherwood, D.R. (2017). Basement membranes. *Curr. Biol.* 27, R207–R211.

Jeannet, P.Y., Bassez, G., Eymard, B., Laforêt, P., Urtizbera, J.A., Rouche, A., Guicheney, P., Fardeau, M., and Romero, N.B. (2004). Clinical and histologic findings in autosomal

centronuclear myopathy. *Neurology* 62, 1484–1490.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA – Guided. *Science* (80-). 337, 816–822.

K

Kadler, K.E. (2017). Fell Muir Lecture: Collagen fibril formation in vitro and in vivo. *Int. J. Exp. Pathol.* 98, 4–16.

Kalson, N.S., Starborg, T., Lu, Y., Mironov, A., Humphries, S.M., Holmes, D.F., and Kadler, K.E. (2013). Nonmuscle myosin II powered transport of newly formed collagen fibrils at the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E4743–E4752.

Kameya, S., Miyagoe, Y., Nonaka, I., Ikemoto, T., Endo, M., Hanaoka, K., Nabeshima, Y., and Takeda, S. (1999). Alpha1-Syntrophin Gene Disruption Results in the Absence of Neuronal- Type Nitric-Oxide Synthase At the Sarcolemma But Does Not Induce Muscle Degeneration. *J.Biol.Chem.* 274, 2193–2200.

Kao, G., Huang, C.C., Hedgecock, E.M., Hall, D.H., and Wadsworth, W.G. (2006). The role of the laminin β subunit in laminin heterotrimer assembly and basement membrane function and development in *C. elegans*. *Dev. Biol.* 290, 211–219.

Kassner, A., Hansen, U., Miosge, N., Reinhardt, D.P., Aigner, T., Bruckner-Tuderman, L., Bruckner, P., and Grässel, S. (2003). Discrete integration of collagen XVI into tissue-specific collagen fibrils or beaded microfibrils. *Matrix Biol.* 22, 131–143.

Kawahara, A., Hisano, Y., Ota, S., and Taimatsu, K. (2016). Site-specific integration of exogenous genes using genome editing technologies in zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 9–11.

Killen, S.S., Costa, I., Brown, J.A., and Gamperl, A.K. (2007). Little left in the tank: metabolic scaling in marine teleosts and its implications for aerobic scope. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274, 431–438.

Killen, S.S., Atkinson, D., and Glazier, D.S. (2010). The intraspecific scaling of metabolic rate with body mass in fishes depends on lifestyle and temperature. *Ecol. Lett.* 13, 184–193.

Kim, M.H., Kay, D.I., Rudra, R.T., Chen, B.M., Hsu, N., Izumiya, Y., Martinez, L., Spencer, M.J., Walsh, K., Grinnell, A.D., et al. (2011). Myogenic Akt signaling attenuates muscular degeneration, promotes myofiber regeneration and improves muscle function in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1324–1338.

Knappe, S., Zammit, P.S., and Knight, R.D. (2015). A population of Pax7-expressing muscle progenitor cells show differential responses to muscle injury dependent on developmental stage and injury extent. *Front. Aging Neurosci.* 7, 1–17.

Knudsen, A.B., Larsen, M., Mackey, A.L., Hjort, M., Hansen, K.K., Qvortrup, K., Kjær, M., and Krogsgaard, M.R. (2015). The human myotendinous junction: An ultrastructural and 3D analysis study. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* 25, e116–e123.

Koch, M., Foley, J.E., Hahn, R., Zhou, P., Burgeson, R.E., Gerecke, D.R., and Gordon, M.K. (2001). $\alpha 1(\text{XX})$ Collagen, a New Member of the Collagen Subfamily, Fibril-associated Collagens with Interrupted Triple Helices. *J. Biol. Chem.* 276, 23120–23126.

Koch, M., Laub, F., Zhou, P., Hahn, R.A., Tanaka, S., Burgeson, R.E., Gerecke, D.R.,

Ramirez, F., and Gordon, M.K. (2003). Collagen XXIV, a Vertebrate Fibrillar Collagen with Structural Features of Invertebrate Collagens: Selective expression in developing cornea and bone. *J. Biol. Chem.* 278, 43236–43244.

Koch, M., Schulze, J., Hansen, U., Ashwodt, T., Keene, D.R., Brunken, W.J., Burgeson, R.E., Bruckner, P., and Bruckner-Tuderman, L. (2004). A novel marker of tissue junctions, collagen XXII. *J. Biol. Chem.* 279, 22514–22521.

Kok, F.O., Shin, M., Ni, C-W., Gupta, A., Grosse, A.S., van Impel, A., Kirchmaier, B.C., Peterson-Maduro, J., Kourkoulis, G., Male, I., DeSantis, D.F., Sheppard-Tindell, S., Ebarasi, L., Betsholtz, C., Schulte-Merker, S., Wolfe, S.A. and Lawson, N.D. (2015). Reverse genetic screening reveals poor correlation between Morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev. Cell.* 32(1), 97-108.

Kuang, W., Xu, H., Vilguin, J.T. and Engvall, E. (1999). Activation of the lama2 gene in muscle regeneration: abortive regeneration in laminin alpha2-deficiency. *Lab. Invest.* 79(12), 1601-1613.

Kvist, M., Hurme, T., Kannus, P., Järvinen, T., Maunu, V.M., Jozsa, L., and Järvinen, M. (1995). Vascular Density at the Myotendinous Junction of the Rat Gastrocnemius Muscle After Immobilization and Remobilization. *Am. J. Sports Med.* 23, 359–364.

L

Lacy, D.B., Wigelsworth, D.J., Scobie, H.M., Young, J.A.T., and Collier, R.J. (2004). Crystal structure of the von Willebrand factor A domain of human capillary morphogenesis protein 2: an anthrax toxin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6367–6372.

Lamboley, C.R., Murphy, R.M., Mckenna, M.J., and Lamb, G.D. (2014). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and leak properties, and SERCA isoform expression, in type I and type II fibres of human skeletal muscle. *J. Physiol.* 592, 1381–1395.

Law, D.J., and Tidball, J.G. (1993). Dystrophin deficiency is associated with myotendinous junction defects in pre necrotic and fully regenerated skeletal muscle. *Am. J. Pathol.* 142, 1513–1523.

Law, D.J., Caputo, A., and Tidball, J.G. (1995). Site and mechanics of failure in normal and dystrophin deficient skeletal muscle. *Muscle Nerve* 18, 216–223.

Lebakken, C.S., Venzke, D.P., Hrstka, R.F., Consolino, C.M., Faulkner, J. a, Williamson, R. a, and Campbell, K.P. (2000). Sarcospan-deficient mice maintain normal muscle function. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1669–1677.

Legate, KR., Montanez, E., Kudlacek, O. and Fässler, R. (2006). ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7(1), 20-31.

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.

Léjard, V., Brideau, G., Blais, F., Salingcamboriboon, R., Wagner, G., Roehrl, M.H.A., Noda, M., Duprez, D., Houillier, P., and Rossert, J. (2007). Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro- α 1(I) collagen gene in tendon fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 282, 17665–

17675.

Li, M., Hromowyk, K.J., Amacher, S.L., and Currie, P.D. (2017). Muscular dystrophy modeling in zebrafish. *Methods Cell Biol.* 138, 347–380.

Li, T., Huang, S., Zhao, X., Wright, D.A., Carpenter, S., Spalding, M.H., Weeks, D.P., and Yang, B. (2011). Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 39, 6315–6325.

Lisi, M.T., and Cohn, R.D. (2007). Congenital muscular dystrophies: New aspects of an expanding group of disorders. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1772, 159–172.

Liu, X., Homma, A., Sayadi, J., Yang, S., Ohashi, J., and Takumi, T. (2016). Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 6, 1–9.

Lucas, J., Schouman, A., Lyphout, L., Cousin, X., and Lefrançois, C. (2014). Allometric relationship between body mass and aerobic metabolism in zebrafish *Danio rerio*. *J. Fish Biol.* 84, 1171–1178.

Lucas, J., Percelay, I., Larcher, T., and Lefrançois, C. (2016). Effects of pyrolytic and petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons on swimming and metabolic performance of zebrafish contaminated by ingestion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 145–152.

Luna, V.M., Daikoku, E., and Ono, F. (2015). “Slow” skeletal muscles across vertebrate species. *Cell Biosci.* 5, 4–9.

Luo, Y., Sinkeviciute, D., He, Y., Karsdal, M., Henrotin, Y., Mobasher, A., Önnerrfjord, P., and Bay-Jensen, A. (2017). The minor collagens in articular cartilage. *Protein Cell* 8, 560–572.

M

Mackinnon, A.C., Qadota, H., Norman, K.R., Moerman, D.G., and Williams, B.D. (2002). *C. elegans* PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr. Biol.* 12, 787–797.

Makareeva, E., and Leikin, S. (2007). Procollagen triple helix assembly: An unconventional chaperone-assisted folding paradigm. *PLoS One* 2.

Marie Darrason thesis. (2014). Y a-t-il une théorie génétique de la maladie. Université Paris 1 Panthéon Sorbonne, Ecole Doctorale de Philosophie.

Marro, J., Pfefferli, C., De Charles, A.S.P., Bise, T., and Jaźwińska, A. (2016). Collagen XII contributes to epicardial and connective tissues in the zebrafish heart during ontogenesis and regeneration. *PLoS One* 11, 1–23.

Martin, P.T., Shelton, G.D., Dickinson, P.J., Sturges, B.K., Xu, R., LeCouteur, R.A., Guo, L.T., Grahn, R.A., Lo, H.P., North, K.N., et al. (2008). Muscular dystrophy associated with α -dystroglycan deficiency in Sphynx and Devon Rex cats. *Neuromuscul. Disord.* 18, 942–952.

Maubaret, C.G., Vaclavik, V., Mukhopadhyay, R., Waseem, N.H., Churchill, A., Holder, G.E., Moore, A.T., Bhattacharya, S.S., and Webster, A.R. (2011). Autosomal dominant retinitis pigmentosa with intrafamilial variability and incomplete penetrance in two families carrying mutations in *prpf8*. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 9304–9309.

- Mazzorana, M., Cogne, S., Goldschmidt, D., and Aubert-Foucher, E. (2001). Collagenous Sequence Governs the Trimeric Assembly of Collagen XII. *J. Biol. Chem.* 276, 27989–27998.
- Mazzotti, A.L., and Coletti, D. (2016). The need for a consensus on the locution “central nuclei” in striated muscle myopathies. *Front. Physiol.* 7, 1–4.
- McKeown, K.A., Downes, G.B., and Hutson, L.D. (2009). Modular laboratory exercises to analyze the development of zebrafish motor behavior. *Zebrafish* 6, 179–185.
- McVey, M., and Lee, S.E. (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director’s cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.* 24, 529–538.
- Melançon, E., Liu, D.W., Westerfield, M., and Eisen, J.S. (1997). Pathfinding by identified zebrafish motoneurons in the absence of muscle pioneers. *J. Neurosci.* 17, 7796–7804.
- Menke, A.L., Spitsbergen, J.M., Wolterbeek, A.P.M., and Woutersen, R.A. (2011). Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicol. Pathol.* 39, 759–775.
- Mione, M.C., and Trede, N.S. (2010). The zebrafish as a model for cancer. *Dis. Model. Mech.* 3, 517–523.
- Miosge, N., Klenczar, C., Herken, R., Willem, M., and Mayer, U. (1999). Organization of the myotendinous junction is dependent on the presence of alpha7beta1 integrin. *Lab Invest* 79, 1591–1599.
- Misawa, K., Kanazawa, T., Imai, A., Endo, S., Mochizuki, D., Fukushima, H., Misawa, Y., and Mineta, H. (2014). Prognostic value of type XXII and XXIV collagen mRNA expression in head and neck cancer patients. *Mol. Clin. Oncol.* 2, 285–291.
- Miyagoe, Y., Hanaoka, K., Nonaka, I., Hayasaka, M., Nabeshima, Y., Arahata, K., Nabeshima, Y.I., and Takeda, S. (1997). Laminin α 2 chain-null mutant mice by targeted disruption of the Lama2 gene: A new model of merosin (laminin 2)-deficient congenital muscular dystrophy. *FEBS Lett.* 415, 33–39.
- Moran, D., and Wells, R.M.G. (2007). Ontogenetic scaling of fish metabolism in the mouse-to-elephant mass magnitude range. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 148, 611–620.
- Morcos, P.A., Li, Y., and Jiang, S. (2008). Vivo-Morpholinos: A non-peptide transporter delivers Morpholinos into a wide array of mouse tissues. *Biotechniques* 45, 613–623.
- Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Haffter, P., and Nüsslein-Volhard, C. (1994). Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr. Biol.* 4, 189–202.
- Murchison, N.D., Price, B.A., Conner, D.A., Keene, D.R., Olson, E.N., Tabin, C.J., and Schweitzer, R. (2007). Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. *Development* 134, 2697–2708.
- Myers, J.C., Li, D., Amenta, P.S., Clark, C.C., Nagaswami, C., and Weisel, J.W. (2003). Type XIX collagen purified from human umbilical cord is characterized by multiple sharp kinks delineating collagenous subdomains and by intermolecular aggregates via globular, disulfide-linked, and heparin-binding amino termini. *J. Biol. Chem.* 278, 32047–32057.

Myllyharju, J. (2003). Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol.* 22, 15–24.

Myllyharju, J., and Kivirikko, K.I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 20, 33–43.

N

Naba, A., Clauser, K.R., Hoersch, S., Liu, H., Carr, S.A., and Hynes, R.O. (2012b). The Matrisome: *In Silico* Definition and *In Vivo* Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices. *Mol. Cell. Proteomics* 11, M111.014647.

Naba, A., Hoersch, S., and Hynes, R.O. (2012a). Towards definition of an ECM parts list: An advance on GO categories. *Matrix Biol.* 31, 371–372.

Naba, A., Clauser, K.R., Ding, H., Whittaker, C.A., Carr, S.A., and Hynes, R.O. (2016). The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era. *Matrix Biol.* 49, 10–24.

Nakata, K., Ono, K., Miyazaki, J., Olsen, B.R., Muragaki, Y., Adachi, E., Yamamura, K., and Kimura, T. (1993). Ostioarthritis associated with mild chondrodysplasia in transgenic mice expressing alpha 1(IX) collagen chains with a central deletion. *Proc Natl. Acad Sci USA* 90, 2870–2874.

Nasevicius, A., and Ekker, S. (2000). Effective targeted gene ‘knockdown’ in zebrafish. *Nat. Genet.* 26, 216–220.

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, 1–17.

Nauroy, P., Hughes, S., Naba, A., and Ruggiero, F. (2018a). The in-silico zebrafish matrisome: A new tool to study extracellular matrix gene and protein functions. *Matrix Biol.* 65, 5–13.

Nauroy, P., Guiraud, A., Chlasta, J., Malbouyres, M., Gillet, B., Hughes, S., Lambert, E., and Ruggiero, F. (2018b). Gene profile of zebrafish fin regeneration offers clues to kinetics, organization and biomechanics of basement membrane. *Matrix Biol.*

Newey, S.E., Benson, M.A., Ponting, C.P., Davies, K.E., and Blake, D.J. (2000). Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr. Biol.* 10, 1295–1298.

Newey, S.E., Howman, E. V., Ponting, C.P., Benson, M.A., Nawrotzki, R., Loh, N.Y., Davies, K.E., and Blake, D.J. (2001). Syncoilin, a Novel Member of the Intermediate Filament Superfamily That Interacts with α -Dystrobrevin in Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 276, 6645–6655.

Newman, M., Ebrahimie, E., and Lardelli, M. (2014). Using the zebrafish model for Alzheimer’s disease research. *Front. Genet.* 5, 1–10.

Nguyen-Chi, M.E., Bryson-Richardson, R., Sonntag, C., Hall, T.E., Gibson, A., Sztal, T., Chua, W., Schilling, T.F., and Currie, P.D. (2012). Morphogenesis and Cell Fate Determination within the Adaxial Cell Equivalence Group of the Zebrafish Myotome. *PLoS Genet.* 8.

Norwood, F.L.M., Sutherland-Smith, A.J., Keep, N.H., and Kendrick-Jones, J. (2000). The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in

this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Structure* 8, 481–491.

O

O'Brien, D.P., Johnson, G.C., Liu, L.A., Guo, L.T., Engvall, E., Powell, H.C., and Shelton, G.D. (2001). Laminin α 2 (merosin)-deficient muscular dystrophy and demyelinating neuropathy in two cats. *J. Neurol. Sci.* 189, 37–43.

Olsen, R. (1997). *MOLECULES.* 29, 555–558.

Ordan, E., and Volk, T. (2015). A non-signaling role of Robo2 in tendons is essential for Slit processing and muscle patterning. *Development* 142, 3512–3518.

Oudart, J.B., Monboisse, J.C., Maquart, F.X., Brassart, B., Brassart-Pasco, S., and Ramont, L. (2017). Type XIX collagen: A new partner in the interactions between tumor cells and their microenvironment. *Matrix Biol.* 57–58, 169–177.

P

Pagnon-Minot, A., Malbouyres, M., Haftek-Terreau, Z., Kim, H.R., Sasaki, T., Thisse, C., Thisse, B., Ingham, P.W., Ruggiero, F., and Le Guellec, D. (2008). Collagen XV, a novel factor in zebrafish notochord differentiation and muscle development. *Dev. Biol.* 316, 21–35.

Palma, L.D., Marinelli, M., Pavan, M., and Bertoni-Freddari, C. (2011). Involvement of the muscle-tendon junction in skeletal muscle atrophy: An ultrastructural study. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 52, 105–109.

Parker, L.H., Schmidt, M., Jin, S.W., Gray, A.M., Bels, D., Pham, T., Frantz, G., Palmieri, S., Hillan, K., Stainier, D.Y.R., de Sauvage, F.J. and Ye, W. (2004). The endothelial-cell-derived secreted factor Eg 7 regulates vascular tube formation. *Nature* 428, 1–5.

Pan, T.C., Zhang, R.Z., Markova, D., Arita, M., Zhang, Y., Bogdanovich, S., Khurana, T.S., Bönnemann, C.G., Birk, D.E., and Chu, M.L. (2013). COL6A3 protein deficiency in mice leads to muscle and tendon defects similar to human collagen VI congenital muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.* 288, 14320–14331.

Pan, T.C., Zhang, R.Z., Arita, M., Bogdanovich, S., Adams, S.M., Gara, S.K., Wagener, R., Khurana, T.S., Birk, D.E., and Chu, M.L. (2014). A mouse model for dominant collagen VI disorders Heterozygous Deletion of Col6a3 EXON 16. *J. Biol. Chem.* 289, 10293–10307.

Parsons, M.J., Campos, I., Hirst, E.M. a, and Stemple, D.L. (2002). Removal of Dystroglycan Causes Severe Muscular Dystrophy in Zebrafish Embryos. *Development* 129, 3505–3512.

Patton, B.L., Wang, B., Tarumi, Y.S., Seburn, K.L., and Burgess, R.W. (2008). A single point mutation in the LN domain of LAMA2 causes muscular dystrophy and peripheral amyelination. *J. Cell Sci.* 121, 1593–1604.

Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Mawji, N., Deng, J.T., Leung, D., Yan, J., Sanghera, J., Walsh, M.P., and Dedhar, S. (2001). Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: Critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J. Biol. Chem.* 276, 27462–27469.

Peter, A.K., and Crosbie, R.H. (2006). Hypertrophic response of Duchenne and limb-girdle muscular dystrophies is associated with activation of Akt pathway. *Exp. Cell Res.* 312, 2580–2591.

Pipalia, T.G., Koth, J., Roy, S.D., Hammond, C.L., Kawakami, K., and Hughes, S.M. (2016). Cellular dynamics of regeneration reveals role of two distinct Pax7 stem cell populations in

larval zebrafish muscle repair. *Dis. Model. Mech.* 9, 671–684.

Plaut, I. (2000). Critical swimming speed: its ecophysiological relevance. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 126, 121.

Postel, R., Vakeel, P., Topczewski, J., Knöll, R., and Bakkers, J. (2008). Zebrafish integrin-linked kinase is required in skeletal muscles for strengthening the integrin-ECM adhesion complex. *Dev. Biol.* 318, 92–101.

Powell, A.M., Sakuma-Oyama, Y., Oyama, N., and Black, M.M. (2005). Collagen XVII/BP180: A collagenous transmembrane protein and component of the dermoepidermal anchoring complex. *Clin. Exp. Dermatol.* 30, 682–687.

Q

Quijano-Roy, S., Mbieleu, B., Bönnemann, C.G., Jeannet, P.Y., Colomer, J., Clarke, N.F., Cuisset, J.M., Roper, H., De Meirleir, L., D'Amico, A., et al. (2008). De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 64, 177–186.

R

Radev, Z., Hermel, J.M., Elipot, Y., Bretaud, S., Arnould, S., Duchateau, P., Ruggiero, F., Joly, J.S., and Sohm, F. (2015). A TALEN-exon skipping design for a bethlem myopathy model in zebrafish. *PLoS One* 10, 1–31.

Ramachandran, J., Schneider, J.S., Crassous, P.A., Zheng, R., Gonzalez, J.P., Xie, L.H., Beuve, A., Fraidenraich, D. and Peluffo, D. (2013). Nitric oxide signalling pathway in Duchenne muscular dystrophy mice: up-regulation of L-arginine transporters. *Biochem J.* 449(1), 133-142.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., et al. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154, 1380–1389.

Rasi, K., Pihola, J., Czabanka, M., Sormunen, R., Ilves, M., Leskinen, H., Rysä, J., Kerkelä, R., Janmey, P., Heljasvaara, R., et al. (2010). Collagen XV is necessary for modeling of the extracellular matrix and its deficiency predisposes to cardiomyopathy. *Circ. Res.* 107, 1241–1252.

Ratnayake, D., and Currie, P.D. (2017). Stem cell dynamics in muscle regeneration: Insights from live imaging in different animal models. *BioEssays* 39, 1–9.

Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–19.

Ricard-Blum, S., and Ruggiero, F. (2005). The collagen superfamily: From the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol. Biol.* 53, 430–442.

Richardson, S.H., Starborg, T., Lu, Y., Humphries, S.M., Meadows, R.S., and Kadler, K.E. (2007). Tendon Development Requires Regulation of Cell Condensation and Cell Shape via Cadherin-11-Mediated Cell-Cell Junctions. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6218–6228.

Rodríguez-Marí, A., Cañestro, C., BreMiller, R.A., Nguyen-Johnson, A., Asakawa, K., Kawakami, K., and Postlethwait, J.H. (2010). Sex reversal in zebrafish fancl mutants is caused by Tp53-mediated germ cell apoptosis. *PLoS Genet.* 6, 1–14.

Rooney, J.E. (2006). Severe muscular dystrophy in mice that lack dystrophin and β 7 integrin. *J. Cell Sci.* 119, 2185–2195.

Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Hölper, S., Krüger, M., and Stainier, D.Y.R. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* 524, 230–233.

Ruparelia, A.A., Zhao, M., Currie, P.D., and Bryson-Richardson, R.J. (2012). Characterization and investigation of zebrafish models of filamin-related myofibrillar myopathy. *Hum. Mol. Genet.* 21, 4073–4083.

Ruparelia, A.A., Oorschot, V., Ramm, G., and Bryson-Richardson, R.J. (2016). FLNC myofibrillar myopathy results from impaired autophagy and protein insufficiency. *Hum. Mol. Genet.* 25, 2131–2142.

S

Sander, J.D., Cade, L., Khayter, C., Reyon, D., Peterson, R.T., Joung, J.K., and Yeh, J.R.J. (2011). Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat. Biotechnol.* 29, 697–698.

Sanger, J.W., Wang, J., Holloway, B., Du, A., and Sanger, J.M. (2009). Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells in zebrafish. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66, 556–566.

Sarrazin, S., Lamanna, W.C., and Esko, J.D. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–33.

Sato, K., Yomogida, K., Wada, T., Yoriyuzi, T., Nishimune, Y., Hosokawa, N., and Nagata, K. (2002). Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *J. Biol. Chem.* 277, 37678–37684.

Schindler, R.F. (2016). POPDC1S201F causes muscular dystrophy and arrhythmia by affecting protein trafficking. *J. Clin. Invest.* 126, 239–253.

Schulte-Merker, S., and Stainier, D.Y.R. (2014). Out with the old, in with the new: reassessing morpholino knockdowns in light of genome editing technology. *Development* 141, 3103–3104.

Screen, HRC., Birk, DE., Kadler, KE., Ramirez, F. and Young, MF. (2016). Tendon Functional Extracellular Matrix. *J Orthop Res.* 33(6), 793-799.

Seger, C., Hargrave, M., Wang, X., Chai, R.J., Elworthy, S., and Ingham, P.W. (2011). Analysis of Pax7 expressing myogenic cells in zebrafish muscle development, injury, and models of disease. *Dev. Dyn.* 240, 2440–2451.

Snow, C.J., and Henry, C.A. (2010). *NIH Public Access.* 9, 37–42.

Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., and Driever, W. (1994). Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. *Genetics* 136, 1401–1420.

Stainier, D.Y.R., Raz, E., Lawson, N.D., Ekker, S.C., Burdine, R.D., Eisen, J.S., Ingham, P.W., Schulte-Merker, S., Yelon, D., Weinstein, B.M., et al. (2017). Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS Genet.* 13, 6–10.

Stellabotte, F., Dobbs-McAuliffe, B., Fernandez, D.A., Feng, X., and Devoto, S.H. (2007). Dynamic somite cell rearrangements lead to distinct waves of myotome growth. *Development* 134, 1253–1257.

Stickney, H.L., Barresi, M.J.F., and Devoto, S.H. (2000). A PEER REVIEWED FORUM Somite Development in Zebrafish. *Dev. Dyn.* 303, 287–303.

Stoppa-Lyonnet, D. & Lyonnet, S. (2017). Chapitre II - Hérité et maladie. Dans Les 100 mots de la génétique (pp. 20-35). Paris cedex 14, France: Presses Universitaires de France.

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., and Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291, 293–296.

Subramanian, A., and Schilling, T.F. (2014). Thrombospondin-4 controls matrix assembly during development and repair of myotendinous junctions. *Elife* 2014, 1–21.

Sumiyoshi, H., Mor, N., Lee, S.Y., Doty, S., Henderson, S., Tanaka, S., Yoshioka, H., Rattan, S., and Ramirez, F. (2004). Esophageal muscle physiology and morphogenesis require assembly of a collagen XIX-rich basement membrane zone. *J. Cell Biol.* 166, 591–600.

Sundvik, M., Chen, Y.-C., and Panula, P. (2013). Presenilin1 Regulates Histamine Neuron Development and Behavior in Zebrafish, *Danio rerio*. *J. Neurosci.* 33, 1589–1597.

Sztaf, T.E., Sonntag, C., Hall, T.E., and Currie, P.D. (2012). Epistatic dissection of laminin-receptor interactions in dystrophic zebrafish muscle. *Hum. Mol. Genet.* 21, 4718–4731.

T

Talbot, J.C., and Amacher, S.L. (2014). A Streamlined CRISPR Pipeline to Reliably Generate Zebrafish Frameshifting Alleles. *Zebrafish* 11, 583–585.

Tanaka, T., Wakabayashi, T., Oizumi, H., Nishio, S., Sato, T., Harada, A., Fujii, D., Matsuo, Y., Hashimoto, T., and Iwatsubo, T. (2014). CLAC-P/Collagen Type XXV Is Required for the Intramuscular Innervation of Motoneurons during Neuromuscular Development. *J. Neurosci.* 34, 1370–1379.

Tao, G., Levay, A.K., Peacock, J.D., Huk, D.J., Both, S.N., Purcell, N.H., Pinto, J.R., Galantowicz, M.L., Koch, M., Lucchesi, P.A., Birk, D.E and Lincoln, J. (2013). Collagen XIV is important for growth and structural integrity of the myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 53(5), 626-638.

Telfer, W.R., Busta, A.S., Bonnemant, C.G., Feldman, E.L., and Dowling, J.J. (2010). Zebrafish models of collagen VI-related myopathies. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2433–2444.

Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Gialeli, C., and Karamanos, N.K. (2016). Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97, 4–27.

Thorpe, C.T., Birch, H.L., Clegg, P.D., and Screen, H.R.C. (2013). The role of the non-collagenous matrix in tendon function. *Int. J. Exp. Pathol.* 94, 248–259.

Tidball, J.G., and Lin, C. (1989). Structural changes at the myogenic cell surface during the formation of myotendinous junctions. *Cell Tissue Res.* 257, 77–84.

Tidball, J.G. and Daniel, T.L. (1986). Myotendinous junctions of tonic muscle cells: structure

and loading. *Cell Tissue Res.* 245, 315–322.

U

Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., and Iguchi, T. (2002). Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J. Exp. Biol.* 205, 711–718.

Urciuolo, A., Quarta, M., Morbidoni, V., Gattazzo, F., Grumati, P., Montemurro, F., Tedesco, F.S., Cossu, G., Vozzi, G., Rando, T. a, et al. (2013). *Regeneration.*

V

Vajsar, J. and Schachter, H. (2006). Walker-Warburg syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*, 1:29.

Van der rest, M and Garronne, R. (1991). Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5, 2814-2823

Vieira, NM., Spinazzola, JM., Alexander, MS., Moreira, YB., Kawahara, G., Gibbs, DE., Mead, LC., Verjovski-Almeida, S., Zatz, M and Kunkel, LM. (2017). Repression of phosphatidylinositol transfer protein α ameliorates the pathology of Duchenne muscular dystrophy. *PNAS* 114(23), 6080-6085.

W

Wälchli, C., Koch, M., Chiquet, M., Odermatt, B.F., and Trueb, B. (1994). Tissue-specific expression of the fibril-associated collagens XII and XIV. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 2, 669–681.

Walker, C., and Streisinger, G. (1983). Induction of Mutations by gamma-Rays in Pregonial Germ Cells of Zebrafish Embryos. *Genetics* 103, 125–136.

Wang, H.V., Chang, L.W., Brixius, K., Wickström, S.A., Montanez, E., Thievessen, I., Schwander, M., Müller, U., Bloch, W., Mayer, U., et al. (2008). Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage. *J. Cell Biol.* 180, 1037–1049.

Webb, P.W. (1984). Body Form, Locomotion and Foraging in Aquatic Vertebrates. *Am. Zool.* 24, 107–120.

Wehner, D., Tsarouchas, T.M., Michael, A., Haase, C., Weidinger, G., Reimer, M.M., Becker, T., and Becker, C.G. (2017). Wnt signaling controls pro-regenerative Collagen XII in functional spinal cord regeneration in zebrafish. *Nat. Commun.* 8, 1–16.

Weitkunat, M., Kaya-Çopur, A., Grill, S.W., and Schnorrer, F. (2014). Tension and force-resistant attachment are essential for myofibrillogenesis in drosophila flight muscle. *Curr. Biol.* 24, 705–716.

Welser, J. V., Rooney, J.E., Cohen, N.C., Gurpur, P.B., Singer, C.A., Evans, R.A., Haines, B.A., and Burkin, D.J. (2009). Myotendinous junction defects and reduced force transmission in mice that lack $\alpha 7$ integrin and utrophin. *Am. J. Pathol.* 175, 1545–1554.

Wiwchar, L.D., Gilbert, M.J.H., Kasurak, A.V., and Tierney, K.B. (2018). Schooling improves critical swimming performance in zebrafish (*Danio rerio*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 75, 653–

661.

Wolff, C., Roy, S., and Ingham, P.W. (2003). Multiple Muscle Cell Identities Induced by Distinct Levels and Timing of Hedgehog Activity in the Zebrafish Embryo. *Current Biology*. 13, 1169-1181.

X

Xu, H., Christmas, P., Wu, X.R., Wewer, U.M., and Engvall, E. (1994). Defective muscle basement membrane and lack of M-laminin in the dystrophic dy/dy mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5572–5576.

Y

Young, R.D., Knupp, C., Pinali, C., Png, K.M.Y., Ralphs, J.R., Bushby, A.J., Starborg, T., Kadler, K.E., and Quantock, A.J. (2014). Three-dimensional aspects of matrix assembly by cells in the developing cornea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 687–692.

Z

Zervas, C.G., Gregory, S.L., and Brown, N.H. (2001). *Drosophila* integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 152, 1007–1018.

Zhang, G., Young, B.B., Ezura, Y., Favata, M., Soslowsky, L.J., Chakravarti, S., and Birk, D.E. (2005). Development of tendon structure and function: Regulation of collagen fibrillogenesis. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 5, 5–21.

Zoeller, J.J., McQuillan, A., Whitelock, J., Ho, S.Y., and Iozzo, R. V. (2008). A central function for perlecan in skeletal muscle and cardiovascular development. *J. Cell Biol.* 181, 381–394.

Zou, Y., Zwolanek, D., Izu, Y., Gandhi, S., Schreiber, G., Brockmann, K., Devoto, M., Tian, Z., Hu, Y., Veit, G., et al. (2014). Recessive and dominant mutations in COL12A1 cause a novel EDS/myopathy overlap syndrome in humans and mice. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2339–2352.

Zwolanek, D., Veit, G., Eble, J.A., Gullberg, D., Ruggiero, F., Heino, J., Meier, M., Stetefeld, J., and Koch, M. (2014). Collagen XXII binds to collagen-binding integrins via the novel motifs GLQGER and GFKGER. *Biochem. J.* 459, 217–227.

Annexes

Annexe 1

Sollicitée par la revue SCDB pour écrire une revue abordant la fonction des collagènes chez le poisson zèbre, F. Ruggiero m'a proposé de prendre part à ce travail, ce qui a représenté une nouvelle étape pour moi. Je me suis tout particulièrement impliquée dans la recherche bibliographique et la rédaction de la partie traitant de la fonction des collagènes dans le développement des systèmes nerveux et neuromusculaires du poisson zèbre. Avec mes collègues S. Bretaud et P. Nauroy, nous avons également réalisé la figure 1 de cette revue qui illustre l'organisation de la MEC dans le cartilage, la peau et les myoseptes du poisson zèbre en microscopie électronique à transmission.

Résumé : Les collagènes sont les protéines les plus abondantes de la MEC des vertébrés. Ils forment une superfamille de 28 membres présentant une diversité dans leur organisation moléculaire et supramoléculaire et dans leur distribution tissulaire. De nombreuses mutations identifiées dans les gènes codant pour des collagènes résultent en une variété de pathologies du tissu conjonctif. Mais les fonctions et structures des membres de cette superfamille sont toujours loin d'être entièrement élucidées. Cette dernière décennie, le poisson zèbre est apparu, comme un puissant modèle pour étudier la fonction des gènes. Il présente de nombreux avantages pour l'étude des collagènes, dont le développement récent de diverses techniques d'édition du génome et la caractérisation du matrisome du poisson zèbre. On peut prédire que le poisson zèbre deviendra rapidement le modèle vertébré de choix pour étudier le rôle des collagènes au cours du développement, mais aussi lors de pathologies et au cours des mécanismes de régénération, comme discuté dans cette revue.



Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cell & Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcdb

Fishing for collagen function: About development, regeneration and disease

Sandrine Bretaud, Pauline Nauroy, Marilyne Malbouyres, Florence Ruggiero*

Université de Lyon, ENSL, CNRS, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, 46 allée d'Italie F-69364 Lyon, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Extracellular matrix
Collagens
Zebrafish
Collagenopathies
Regeneration
Development

ABSTRACT

Collagens are the most abundant vertebrate extracellular matrix proteins. They form a superfamily of 28 members that show a remarkable diversity in molecular and supramolecular organization, tissue distribution and function and mutations in collagen genes result in a wide range of inherited connective tissue diseases. In the recent years, unexpected and very diverse regulatory and mechanical collagen functions have been reported. But the structural and functional landscape of the collagen superfamily is still far from being complete. Zebrafish has emerged over the last decades as a powerful model to interrogate gene function and there are numerous advantages of using zebrafish for collagen research, including recent advances in genome editing technologies and the characterization of the zebrafish matrisome. One can confidently predict that zebrafish will rapidly become a popular vertebrate model to investigate the role of collagens in development, disease and regeneration as discussed in this chapter.

1. Introduction

The extracellular matrix (ECM) is essential for the molecular mechanisms that determine cell survival, differentiation and movement in all multicellular organisms [1]. Cells in tissues are structurally and functionally integrated with their surrounding ECM through dynamic connections. The ECM harbors a remarkable versatility of organization in tissues that is supported by a relatively small set of structural proteins encoded by ~300 genes in vertebrates [2,3]. But the ECM, as defined by the matrisome [2], contains another category of proteins: the matrisome-associated proteins. The latter category encompasses the ECM regulators such as the matrix enzymes and represents no fewer than two thirds of the entire matrisome. The ECM regulators as well as the ECM secreted factors (e.g. growth factors and cytokines) can fine-tune ECM activities in a narrow window of time and thereby confer to them additional functions in a given tissue. How ECM molecules assemble to form organized tissues and how crucial interactive domains within ECM proteins are structurally organized to allow network formation or signaling through cellular receptor recognition remain important questions that are far from being fully addressed. It is particularly true for the collagen superfamily that contains large multi-domain

proteins and are often expressed ubiquitously in tissues [4].

The collagen field undoubtedly regains attractiveness with the emergence of new concepts (cell niche, regulation of growth factor bioavailability, mechanotransduction, cell microenvironment sensing) and new tools to investigate their *in vivo* functions (atomic force microscopy (AFM), second harmonic generation (SHG) imaging, genome editing, gene reporter lines...). Growing evidence showed that they sustain functions that would have been difficult to predict based on *in vitro* and *in cellulo* data. In that, the use of diverse animal models has proven to be useful to fully understand collagen function in their entire diversity, from the simplest invertebrates like hydra to high vertebrates [5]. This has been beautifully illustrated with the story of the discovery of the collagen XVIII *in vivo* function. While the knockout of *Col18a1* in mice showed no obvious phenotype, lack of expression of its orthologs, *cle-1* in *C. elegans* or *Mp* in *Drosophila*, was strikingly coupled to axon guidance defects [6,7]. This established a link with the Knobloch syndrome in humans and further allowed revisiting the *Col18a1*-null mouse phenotype [8].

More recently, zebrafish (*Danio rerio*) has proven to be a powerful animal model to interrogate ECM function in development and disease [9–11]. It came out as no surprise since, in a mere two decades,

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; AFM, atomic force microscopy; SHG, second harmonic generation; CRISPR, Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats; BM, basement membrane; TEM, transmission electronic microscopy; dpf, day post-fertilisation; MTJ, myotendinous junction; WGD, whole genome duplication; ER, endoplasmic reticulum; MO, morpholino; ENU, ethylnitrosourea; TALEN, Transcription Activator-Like Effector Nuclease; RGC, retinal ganglion cell; UCMD, Ullrich congenital muscular dystrophy; OI, osteogenesis imperfecta; mPTP, mitochondrial permeability transition pore; hpf, hour post-fertilisation

* Corresponding author at: Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon - ENS de Lyon, 46 Allée d'Italie, F69364, Lyon cedex 07, France.

E-mail address: florence.ruggiero@ens-lyon.fr (F. Ruggiero).

<https://doi.org/10.1016/j.semcb.2018.10.002>

Received 6 May 2018; Received in revised form 6 September 2018; Accepted 8 October 2018

1084-9521/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

zebrafish has become one of the most popular model organisms used in basic and medical research [12]. Besides the genetic tractability of this model, zebrafish are unmatched in their maintenance, breeding, raising and feeding. Moreover, zebrafish is highly amenable to live imaging approaches because of its small size, its external development and the transparency of embryos and larvae [13]. Lastly but not the least, this small vertebrate represents a good alternative model to implement the “3R” principles of ethical experimentations in disease modeling and drug screening [14]. While zebrafish has largely gained its reputation on its amenability to forward genetics in the 90’s, the development of reverse genetic approaches in this small vertebrate proved challenging. The real revolution arose from recent advances on the so-called Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/Cas9 genome editing technology that offered unprecedented possibilities for genome manipulation and the investigation of specific physiological functions not only during embryonic and larval development but also during adulthood and aging [15,16].

We believe that the recent advances in gene editing methods and the increasing availability of “omics” data together with our recent characterization of the zebrafish matrixome showing that ECM proteins are well conserved between mammals and fish [3] are factors, among others, propitious to rapidly propel zebrafish as one of the leading models in ECM research. Here we specifically discuss mounting evidence highlighting the suitability of the zebrafish model to investigate the collagen functions in development, tissue regeneration and disease.

2. The zebrafish extracellular matrix

Two main types of ECM organization can be observed in tissues: interstitial ECM and basement membrane (BM) that are both easily identifiable with transmission electron microscopy (TEM) in vertebrates, and zebrafish is not an exception (Fig. 1). Collagens are central components of these highly structured and tissue-specific supra-molecular aggregates. Interstitial matrices and BM found in zebrafish tissues and organs are generally similar in composition and structure than the mammalian ones, but zebrafish ECM also exhibit a few unique features.

Specifically, skin ECM displays striking particularities. At early stage, epidermis is only composed of two cell layers and starts to

thicken from 15 dpf (day post-fertilisation) to become multilayered in adults [17]. As in mammals, the epidermis is separated from the sub-jacent dermis by a BM whose structure and organization is indistinguishable at TEM from the mammalian one (Fig. 1B). Along this line, a global time-course transcriptomic analysis of BM formation during caudal fin regeneration revealed that BM gene expression kinetics recapitulates that the one described in mammals [18]. However, unlike other vertebrates, the lamina lucida contains electron-dense small aggregates aligned regularly between the inner surface of the lamina lucida and the epidermal cell surface (Fig. 1B) [17,19]. These structures, termed adepidermal granules, are not present in adults [20]. The epidermal cells are most likely responsible for their production, but their composition is unknown.

The dermal ECM also shows specificities. During zebrafish embryogenesis, the epidermis is composed of the outer periderm and the inner basal keratinocytes, which are responsible for the initial deposition of ECM in the primitive acellular dermis [17]. The dermal endothelial cells, a species-specific cell type located at the interface between dermis and hypodermis, were shown to also contribute to the production of the developing dermal ECM. After metamorphosis (20–26 dpf), when juveniles seem miniature versions of the adults, fibroblast-like cells progressively invade the dermis. The epithelial ECM production ceases and dermal fibroblasts take over the synthesis and deposition of the collagen fibrils [17]. While dermis in mammals is composed of collagen fibrils showing no preferential orientation, the dermal ECM of the zebrafish comprises regular orthogonal layers of collagen fibrils [17] (Fig. 1B). Strikingly, this plywood-like structure is reminiscent to the mammalian corneal stroma whose principal role is to contribute to the transparency of the cornea. The strict orthogonal organization of the dermal ECM might contribute, in the same way, to its optical transparency. Along this line, the deposition by basal epithelial cells of a primary stroma containing orthogonal layers of collagen fibrils, that act as a template for subsequent ECM deposition by invading fibroblasts, reminds us the development of the chick corneal stroma [21].

The development and physiology of cartilage and bones are highly similar in mammals and teleosts validating the zebrafish as a reliable vertebrate model in this field [22]. Expression of genes and the molecular pathways involved in the endochondral ossification are well

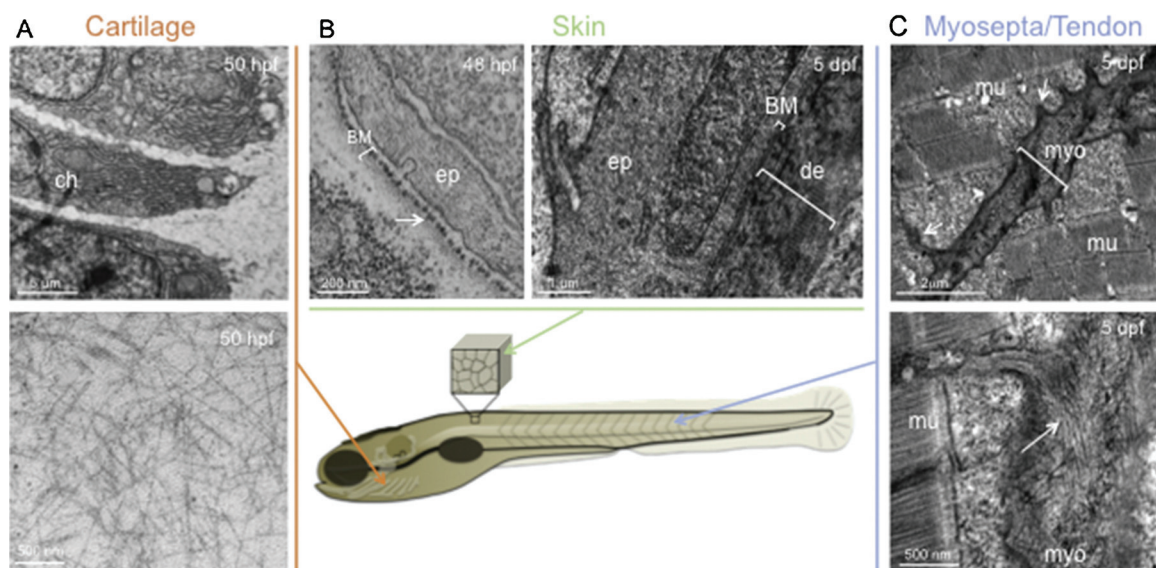


Fig. 1. Transmission electron microscopy of zebrafish extracellular matrices. A. Ultrathin section of cartilage at 50 hpf showing the characteristic stacking of chondrocytes (upper panel); zoomed image of the cartilaginous extracellular matrix that surrounds the chondrocytes (lower panel). B Ultrathin section of the skin at 48 hpf, arrow indicates adepidermal granules (left panel) and at 5 dpf (right panel) showing the epidermal basement membrane and the dermis composed of orthogonal layers of collagen fibrils (arrows); (upper panel) Arrows point to finger-like folds, (lower panel) zoomed image of the oblique organization of the collagen fibrils (arrows) in the vertical myosepta. C. Ultrathin section of vertical myosepta at 5 dpf; (upper panel) Arrows point to finger-like folds, (lower panel) zoomed image of the oblique organization of the collagen fibrils (arrows) in the vertical myosepta. Ch, chondrocyte; ep, epidermis; de, dermis; BM, basement membrane; mu, muscle; myo, vertical myosepta; hpf: hour post-fertilisation; dpf, day post-fertilisation.

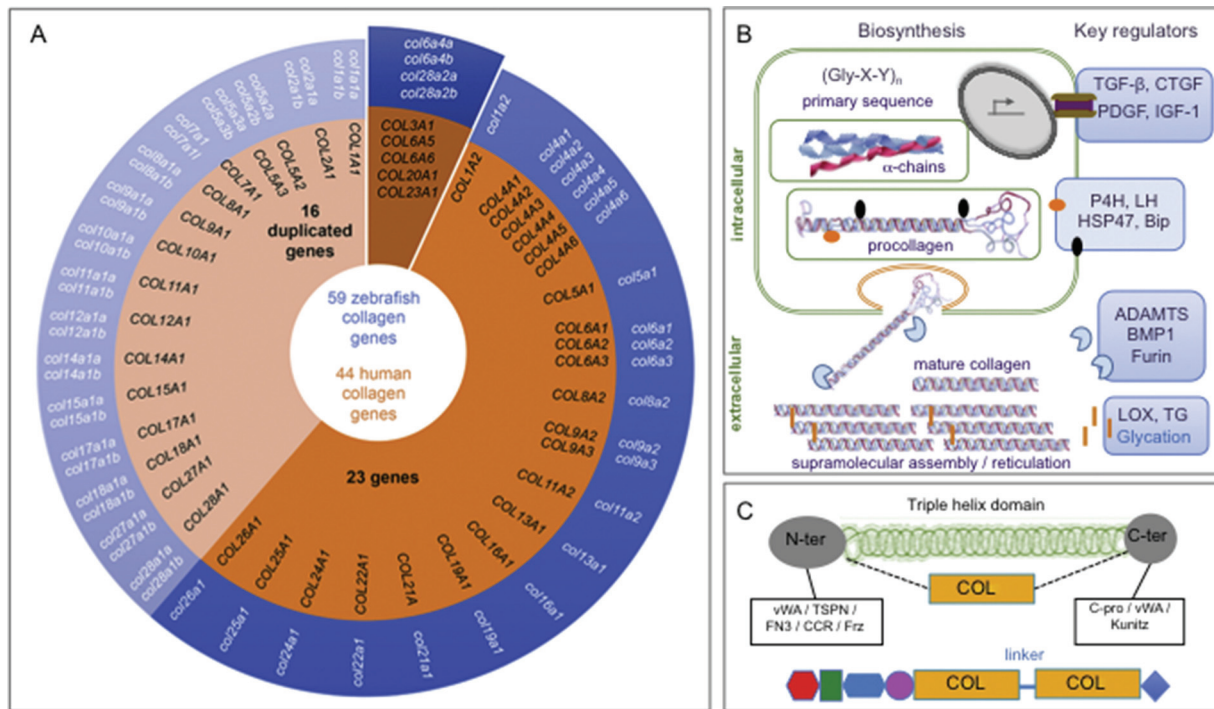


Fig. 2. A. Zebrafish collagen genes - Multidimensional pie chart showing the distribution of collagen genes that are present in the zebrafish (blue) or human (orange) genomes. Genes that are duplicated in zebrafish genome are in shaded colors. B–C Collagen biosynthesis: from intracellular to extracellular events. (B) Diagrammatic representation of biosynthesis of fibril-forming collagens and key regulators. (C) Collagens are modular proteins made of collagenous domains (COL) linked by short linker regions and flanked by N-terminal and C-terminal non-collagenous domains of various natures. FN3, Fibronectin type III repeat TSPN, Thrombospondin N-terminal like domain; CCR, Cysteine Rich Repeats; vWA, von Willebrand factor A domain; Frz, Frizzled; C-pro, C-propeptide.

conserved. For instance, as in mammals, Sox9, a key regulator of chondrogenesis was shown to regulate genes encoding cartilage-specific ECM in zebrafish embryos [23]. As such, the cartilage-specific collagens (types II, IX and XI) and proteoglycan, aggrecan, and the main matricellular proteins, as matrilins and chondromodulin, are expressed in the zebrafish cartilage (review in Luderma et al. [24]). At the ultrastructural level, the organization and distribution of collagen and proteoglycan networks are highly similar to mammalian ECM cartilage (Fig. 1A). Dermal bones that develop from the direct differentiation of mesenchymal cells into osteoblasts (a process known as intramembranous ossification) are found in fin rays, scales and gill covers [25]. The skeleton of zebrafish fins comprises the segmented parenthesis-shaped dermal bones called lepidotrichia and the unsegmented non-mineralized distal structures of ectodermal origin, the actinotrichia. Lepidotrichia is different from any other skeletal tissue that appears to be the result of a unique combination of collagen genes required for its development. Notably, *col10a1*, known as a specific marker of hypertrophic chondrocytes in higher vertebrates is expressed in the zebrafish bony rays [25]. Actinotrichia are composed of collagen fibrils and non-collagenous proteins that aggregate into supramolecular structure referred to as elastoidin [26]. The nature of the ECM constituents of the zebrafish scales is less defined and the current knowledge on the matrix organization of the scales comes almost exclusively from TEM studies [27]. Elasmoid scales, the scale type of zebrafish and medaka, start to develop at 26 dpf, when fibroblast-like cells from which derived the scale-forming cells invade the dermis [27,28]. These mineralized structures made of orthogonal layers of collagen fibrils and elasmodin develop within the dermis and protrude into the epidermis. But the limiting layer of the scale, close to the epidermis, is devoid of collagen fibrils [27].

The trunk of the zebrafish embryo consists of a characteristic chevron-shaped block of muscles separated by the vertical myosepta. These thin connective tissue sheets transmit muscular forces to axial structures during swimming. In that, they are structurally and

functionally equivalent to mammalian tendons. Muscle fibers insert into the myoseptal connective tissue via a highly specialized region referred to as the myotendinous junction (MTJ) [29,30]. The zebrafish MTJ is highly similar to that observed in mammals [30]. Specifically, this structure displays finger-like folds that increase contact between muscle and the adjacent myosepta (Fig. 1C). Ultrastructural studies showed that myosepta remain acellular until 72 hours post-fertilisation (hpf) [30], suggesting that muscle cells are responsible for the synthesis and deposition of the ECM components present in the myosepta (mainly composed of collagen I fibrils) and the MTJ which contains BM zone components such as laminins and fibronectin [29], collagen XV-B [31] and the MTJ marker collagen XXII [32]. Later in development, fibroblasts are observed in myosepta and their presence coincides with the production of a dense network of collagen fibrils and the subsequent thickening of the myosepta [30]. The myoseptal fibroblasts were reported to express the classical collagenous tendon markers, collagens I and XII [33,34]. Even though their composition is highly similar, the ECM organization in myosepta and tendons are different. While mammalian tendons are composed of parallel bundles of collagen fibers, myosepta consist of tightly packed collagen fibers with an oblique arrangement adapted to the undulatory swimming of the fish (Fig. 1C).

Notochord is a transient structure differentiating at early stage during embryogenesis that is at the origin of vertebral bodies in all vertebrates. In zebrafish, it is composed of vacuolated cells surrounded by a unique ECM structure improperly called notochordal BM. As in chicken and amphibians, this ECM sheath consists of 3 layers: a “true” BM inner layer, a dense fibrous medial layer and a fibrous outer layer [11]. It is not thus surprising that BM notochordal cells express both typical BM zone components, such as laminins [35], *col18a1* [36] and *col15a1a* [37], and fibrillar collagen genes, such as *col2a1a* [38] and *col11a1* [39]. Expression of the collagen genes in the notochord is transient, decreasing by 24 hpf and ceasing after 48 hpf. We refer the interested readers to an existing excellent review on the composition, structure and function of the notochordal BM [40].

3. The zebrafish collagen super family: common features and specificities

Collagens are the most abundant vertebrate ECM proteins. In mammals, they form a superfamily of 28 distinct members that show a remarkable diversity in molecular and supramolecular organization, tissue distribution and function. Filling the space between cells, they play a unique role in providing a supportive scaffold to which cells attach and in maintaining the structural integrity of many tissues. In addition to their contribution to matrix biomechanical properties, collagens are also closely involved in various morphogenetic events and display highly specialized functions. Collagens clearly have both regulatory and mechanical functions in tissues during development and repair.

Collagens are encoded by 44 genes in humans and by 58 genes in zebrafish [3]. Very recently, a fourth collagen XXVIII gene, *col28a2b*, was identified in the GRCz11 version of the zebrafish genome (<https://zfin.org/>) bringing the total number of zebrafish collagen genes to 59 (Fig. 2A). The elevated number of collagen genes contained in the zebrafish genome results from a further round of whole-genome duplication (WGD) referred to as teleost-specific-WGD (TS-WGD) that took place 320–350 millions years ago and resulted in a massive increase of protein coding genes. Duplicated collagen genes can have different fates including non-functionalization of one of the duplicated gene as a consequence of lack of selective constraint or sub-functionalization, neofunctionalization or dosage selection, that make zebrafish fascinating from a phylogenetic perspective [41]. These mechanisms act through evolution for the loss, maintenance or functionalization of duplicated collagen genes resulting in specific features of the zebrafish collagen gene repertoire [3]. All in all, 16 collagen genes are duplicated in zebrafish compared to mammals and the function of only some of them have been interrogated so far. Specifically, the zebrafish genome contains 4 collagen XXVIII genes, *col28a1a*, *col28a1b*, *col28a2a* and *col28a2b*, consequential to the duplication of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ branch although the $\alpha 2$ branch was then lost in mammals [42]. As many other teleost fish, zebrafish does not have any collagen III gene that was probably lost during early diversification of this infraclass [43]. Finally, some of the collagen paralogs have diverged during evolution and displayed distinct expression patterns and functions as we reported for collagen XV paralogs, *col15a1a* and *col15a1b* [31,37,44]. While collagen XV is expressed widely in the BM zones of various organs in mice and humans, *col15a1b* is specifically expressed in slow muscle precursors and *col15a1a* is mainly expressed in notochord [37,44]. Exploiting the existence of collagen paralogs for discovering new functions will undoubtedly bring new insights in the multiple roles of collagen genes in human development and disease.

Collagen genes encode long polypeptidic chains called α -chains that contain unique structural signature, the presence in their primary structure of the [Gly-X-Y] amino-acid repeats, where X and Y are often a proline and a hydroxyproline respectively. This results in the formation of a triple helix, hallmark of the collagen superfamily (Fig. 2B). Collagens are secreted proteins and their biosynthesis ends in the extracellular space where they can form different supramolecular aggregates (banded fibrils, beaded filaments, hexagonal networks, anchoring fibrils) [4]. This main extracellular step in collagen biosynthesis is mediated by fine-tuned combination of self-assembly and cell-driven processes that are still far from being completely understood. Overall, zebrafish collagen fibrils are structurally indistinguishable from the ones of other vertebrates with TEM (Fig. 1) and they can be revealed by the classical histology and imaging technics such as SHG microscopy [45–48]. Although collagen chain assembly is rarely studied in zebrafish, the presence of duplicated genes can lead to differences compared to mammals. Collagen I mostly occurs as a heterotrimer with two $\alpha 1(I)$ chains and one $\alpha 2(I)$ chain, but zebrafish contain an additional α -chain, originally called $\alpha 3(I)$ chain (encoded by the *col1a1b* gene) that forms with the two other chains the heterotrimeric molecule

$\alpha 1(I)\alpha 2(I)\alpha 3(I)$. The collagen I chains are expressed in connective tissues (skin, bones, tendons...) as in other vertebrates. In addition, the actinotrichia contains another molecular species, the homotrimeric form $[\alpha 1(I)]_3$ [49]. Interestingly, high amounts of collagen I homotrimer was also reported in fetal calf bones [50].

Although the presence of at least one triple helix domain is typically the collagen signature, collagens are modular proteins composed of a succession of collagenous (COL) and non-collagenous domains (NC) that are both involved in collagen functions and in receptor binding. COL domains are linked by short linker regions of about 20 residues, while larger NC domains are found at the N- and/or C-terminal ends of the α -chains and can represent more than two-third of the entire collagen molecule (Fig. 2C). Protein sequence alignments revealed that NC domains are generally well conserved in zebrafish [3,19,34,39,44] but their specific functions in zebrafish await further studies. Collagen molecules undergo a series of post-translational modifications both intracellularly and extracellularly that are most often mediated by key enzymatic activities, as the collagen prolyl 4-hydroxylases (P4Hs) and the lysyl-hydroxylases (LHs) that both reside within the endoplasmic reticulum and the lysyl oxidase (LOX), a matrix crosslinking enzyme (Fig. 2B). Most of the post-translational modifications are shared with all collagen types, but specificities exist. In zebrafish such modifications are also present. For instance, the *plod2* mutant carrying a mutation in the lysyl-hydroxylase-2 encoding gene showed a severe disruption of the three-dimensional collagen I fibril network in vertebral bones [51]. Another hallmark is the extremely large size of collagen molecules, the huge amount of collagen molecules that are secreted in the extracellular space in a very short time window and their rapid secretion during development or repair. The secretory vesicles have to accommodate the large size of collagen molecules. It has been shown that the fibrillar collagens are transported from the ER to the Golgi complex in a COPII (coat protein II complex)-dependent manner. Additional ER associated proteins were shown to assist collagen macromolecules transport into vesicular carriers. Specifically, the auxiliary protein Sar1 and the recruited heterodimers Sec23/Sec24 proteins are proven to be essential for vesicle biogenesis and collagen molecule exportation [52]. Interestingly, collagen trafficking is impaired in the *crusher/sec23a* mutant. This prevents collagen II secretion and causes severe cartilage defects [53]. The *feelgood* mutant also manifests severe skeletal defects. Melville and co-workers [54] reported that the *feelgood* mutation causes a single amino acid substitution within the sequence encoding the DNA-binding domain of transcription factor Creb3l2, which specific targets are genes encoding the COPII proteins *sec23a*, *sec23b* and *sec24d*. Despite intracellular accumulation of collagen, no activation of ER stress response genes was observed [54].

4. Collagen function(s) in zebrafish development

Among the zebrafish community, collagen genes were first valued as tissue markers. For instance, the *col10a1* gene, encoding collagen X, was first reported as a reliable marker of both osteoblasts and chondrocytes in zebrafish [55] and the *col2a1* gene was commonly used as a notochord marker in early embryos [38]. Finally collagen I genes were used to probe fibrosis as in all vertebrates [56,57]. Thanks to the development of gene modulation technologies (morpholino (MO)-knock-down, mutagenesis, transgenesis and targeted genome editing), the description of collagen expression patterns and the investigation of collagen gene functions in developing zebrafish embryos have largely expanded, giving significant insights into their functional diversity and most importantly, the underlying mechanisms (Table 1). The generation of specific antibodies to the zebrafish proteins has proven, in our lab and others, to be instrumental for the analysis of collagen function in developing zebrafish [19,31,32,34,56,58] (Table 1). The recent generation of fluorescent collagen I-fusion zebrafish lines represents unique tools to investigate collagen dynamics [59] and opens up new avenue for the study of collagen biosynthesis and remodelling in living

Table 1
Function of zebrafish collagens.

Collagen genes	Genetic tools	Tissue affected	Expression pattern ^{a,b}	References
<i>col1a1a</i>	MO ENU, <i>chihuahua</i>	Skeleton, fin	ISH, IF	[72,87,88]
<i>col2a1a,b</i> <i>col4a5</i>	MO ENU, <i>dragnet</i>	Fin Tectum, cerebellum, motor nerve	ISH, IF, ISH	[72], [61,63, 82]
<i>col4a6</i>	ENU, <i>shioaneki</i>	Cerebellum	ISH	[63]
<i>col6a1</i>	MO TALEN	skeletal muscle	IF	[48,90,93]
<i>col6a3</i> <i>col6a4a,b</i> <i>col8a1</i>	MO MO MO ENU, <i>leviathan</i> <i>gulliver</i>	motor axon skeletal muscle notochord	ISH, WB ISH	[94] [95] [73,74]
<i>col9a1</i>	MO ENU, <i>persistent</i> <i>plexus</i>	regenerated fin vessels	ISH	[79]
<i>col11a1</i>	MO	craniofacial cartilage	ISH	[39]
<i>col12a1a,b</i>	<i>vivo</i> -MO transient CRISPR	regenerated spinal cord	ISH, IF	[34,56]
<i>col14a1a</i>	MO, CRISPR line	basement membrane	ISH, IF	[18, 19]
<i>col15a1a</i>	MO	notochord, muscle	ISH, IF	[37]
<i>col15a1b</i>	MO TILLING	motor axon, muscle	ISH, IF	[31,44]
<i>col17a1a,b</i>	MO	Skin, neural system,	ISH, IF	[76]
<i>col18a1</i> <i>col19a1</i>	MO MO ENU, <i>stumpy</i>	motor axon motor axon	ISH ISH	[36,65] [64]
<i>col22a1</i>	MO	myotendinous junction	ISH, IF, WB	[32]
<i>col27a1a,b</i>	MO	notochord, head cartilage	ISH	[75]

^a The reference of the original paper is mentioned when no expression pattern was performed in the functional study.

^b ISH *in situ* hybridization, IF immunofluorescence, WB western blot.

animals. Our objective here was to report on the main advances in collagen function research, and we now apologize that other important functional studies have not been quoted due to word limitation.

4.1. Nervous system and neuromuscular system

Although ECM of nervous system is mainly composed of hyaluronic acid, associated glycoproteins and proteoglycans, non-fibril forming collagens are expressed by neuronal cells and other cell types and participate to neural circuit formation [60]. Zebrafish has proven to be essential to highlight the *in vivo* role of collagens both in peripheral and central nervous system. For instance, the zebrafish mutant line *dragnet* that exhibited defects in retino-tectal projection, was then reported to carry a premature stop codon in *col4a5* identifying collagen IV α 5 as a novel contact-mediated guidance cue [61]. To reach their target, axons are instructed during their extension by attractive and repulsive guidance cues that are secreted in the extracellular space. *In vivo* genetic interaction and biochemical analysis using mammalian recombinant or purified proteins revealed that the zebrafish BM collagen IV acts on target selection of retinal ganglion cells (RGC) through its interaction with the conserved guidance molecule slit2 [62]. However, more recent studies showed that, in both *dragnet* and *shioaneki* (*col4a6*) mutants, collagen IV rather acts on axogenesis of RGC and granule cells of the

cerebellum by regulating the integrity of the BM [63]. Whether collagen IV operates as an instructive protein or a structural protein (or both) is thus still unclear.

Several collagens (*stumpy/col19a1*, *col18a1* and *col15a1b*) expressed in the peripheral nervous system were reported to provide motor neuron axons with important cues during their navigation towards their muscle target [31,64,65]. The above-mentioned myotomal collagens, *stumpy/col19a1*, *col18a1* and *col15a1b*, are all produced by adaxial cells as revealed by *in situ* hybridisation. These cells are slow muscle progenitors that are apposed next to the notochord in early somitogenesis. They then migrate radially towards the surface of the myotome where they differentiate into superficial slow muscle fibers (SSF). Thanks to the generation of specific antibodies to zebrafish collagens, our group was able to demonstrate the unexpected physical presence of one of these contact-mediated guidance cues, collagen XV-B, in the axonal motor path [31]. We showed that the protein is secreted and deposited specifically all along the motor axon path before the onset of adaxial cell migration, through a two-step mechanism involving two independent signaling pathways, Hedgehog and *Unplugged/MusK*. As such, these cells leaved a specific matrix fingerprint that delineates motor axon path behind them a few hours before motor axons project from the spinal cord. This key result was also instrumental in deciphering the unique function of collagen XV-B in motor axon navigation [31]. In mammals, collagen XV is primarily expressed in skeletal and cardiac muscles, and loss of its expression in mice results in a mild skeletal myopathy [66] and cardiovascular and nerve defects [67]. Expression of the second paralog, *col15a1a*, was restricted to notochord in embryos, and its knockdown provoked defects in muscle maintenance through Shh signalling [37]. Based on the expression patterns of the two paralogs, their sequence alignment and synteny comparison, it has been suggested that collagen XV-B could fulfil similar function than the mammalian ortholog [44]. However, none of the functions identified for zebrafish collagen XV genes match so far with the known functions of the mouse gene.

Myoblasts are another source of collagens. Developing skeletal muscles spatially and temporally shape collagen-containing matrices that are critical for proper function of the neuromuscular system as exemplified above with collagen XV-B. The myotomal collagen XXII is a marker of the MTJ that was first characterized by Koch and co-workers in 2004 [68]. Its *in vivo* function remained uninvestigated for several years owing to a lack of available genetically-modified animal models. Again, zebrafish was helpful to dissect the function of this collagen. We showed that *col22a1* transcripts were expressed throughout the myotome at 22–24 hpf and transcripts progressively and specifically localized at muscle ends when MTJ formation is initiated. The protein product, collagen XXII, followed the same pattern and integrated the junctional ECM as transcripts started to be expressed at the muscle cell ends. *Col22a1* knockdown in developing zebrafish resulted in muscular dystrophy-like phenotype with massive muscle fibre detachment from their myoseptal insertion in response to repeated muscle contractions, showing that collagen XXII strengthened skeletal muscle attachments during contractile activity [32]. As in humans, zebrafish muscle fibres attach to the MTJ using two linkage systems: the dystrophin glycoprotein complex and the α 7 β 1 integrin complex [69]. Synergistic gene interaction experiments further suggested that collagen XXII is part of the α 7 β 1 integrin complex. Although the muscle phenotype was reminiscent to reported ECM related myopathies [69], no human disease has been associated to mutation in the human gene so far.

4.2. Cartilage and bones

Cartilage is a connective tissue in which the fibrillar collagens type II and XI are highly represented. As such, collagen II probes were heavily used as a notochord marker in zebrafish [37] (Table 1). Several transgenic lines were recently created after isolation of *col2a1a* regulatory elements that finally allowed to directly visualize the notochord

along with craniofacial cartilage, ear, floor plate and fins [70,71]. The regulatory elements of the *col10a1* promoter were also isolated to create a reporter line that monitors the presence of this collagen in bones [71]. As highlighted by Mitchell and collaborators, such tools can be now used to study genes involved in osteoarthritis [71]. Besides, the function of collagens in developing bones and cartilage was investigated using MO-knockdown or ENU-mutants. Thereby, *col1a1a* and *col2a1b* that are both expressed in the skeletal elements of the fins were shown to be required for proper fin fold morphogenesis [72]. Two mutants, called *gulliver* and *leviathan*, were isolated in a mutant screen searching for genes involved in notochord morphogenesis. These mutants that exhibited notochord distortion showed complementation as the mutations both mapped to the *col8a1a* gene [73,74]. Zebrafish also allowed establishing the importance of another collagen gene in notochord development although it was not expected to play such function regarding its expression in mammals. As mentioned above (paragraph 4.1), the expression pattern of *col15a1a*, one of the paralog of the human gene *COL15A1*, was restricted to the notochord and deposited in the ECM of the peri-notochordal sheath [37]. Ultrastructural analysis of *col15a1a* morphants revealed that collagen XV-A is important to maintain the integrity of the notochordal BM. Remarkably, despite the transient effect of MOs, Christiansen and collaborators showed that knockdown of *col27a1a* and *col27a1b*, two paralogs expressed in the notochord during zebrafish embryogenesis, provokes the curvature of the notochord at early developmental stages but also scoliosis in older animals at 21 dpf [75]. Finally, loss of function of *col11a1* in zebrafish was shown to act on spatial organization and maturation of chondrocytes, resulting in important defects in craniofacial cartilage reminiscent to collagen XI-related chondrodysplasia in humans [39].

4.3. Skin

Only a few functional studies have been conducted so far and most of them have interrogated the role of epidermal BM-associated collagens. Collagen XVII is an integral component of the hemidesmosome, a structure that ensured the dermo-epidermal cohesion by anchoring the basal epidermal cells within the underlying BM. In zebrafish, *col17a1a* is expressed in a punctuated pattern within the skin while its paralog *col17a1b* is restricted to the lateral line, a fish specific sensory organ [76]. Knockdown of *col17a1a* in embryos caused defects in the BM structure that resulted in a skin blistering phenotype with occasional detachment of the epidermis [76]. Remarkably, similar defects were observed after injection of *col14a1a* MOs in zebrafish [19]. An intriguing additional observation was made in embryos knocked-down for collagen XIV-A in which an uneven distribution of the adepidermal granules was observed with the presence of frequent gaps [19]. To our best knowledge, this represents the first evidence for a gene involved in the formation of the adepidermal granules. The *col14a1a* paralog is transiently expressed in proliferative epithelia and the corresponding protein persisted in BM at later stages [19] where staining partially overlaps with the closely related mesenchymal collagen XII [34]. Collagen XII is ubiquitously expressed in all connective tissues in zebrafish [34] but its function in skin has not been investigated yet.

All these studies underscored the importance of BM-associated collagens for its formation and integrity and confirmed that zebrafish is a relevant model to study BM associated disorders [11]. In 2013, Richardson and collaborators have identified zebrafish as a new valuable model for cutaneous wound healing thus paving a new way for skin research [77].

5. Collagens as new drivers of zebrafish tissue regeneration

Contrary to mammals, zebrafish possess very high regeneration capacities and thereby represent a versatile model to study tissue and organ regeneration. Adult fish can fully reconstruct their brain, spinal cord, retina, kidney, liver, pancreas and all its appendages [78]. For

evident reasons related to human regenerative medicine, the heart reconstruction was highly studied as well as the caudal fin regeneration for practical reasons.

Collagen IX was involved in the formation of the vascular plexus during adult zebrafish caudal fin regeneration, a structure that is abnormally persistent at 10 days post-amputation (dpa) in *persistent plexus* mutants (*prp*). This mutant carries a point mutation causing a single leucine (176)-to-histidine change in the collagen IX TSPN subdomain. This mutation in the collagen IX gene resulted in smaller fins with rounded edges and osteoblast mispatterning. Both *prp* embryos and adult animals exhibited defects in fin skeleton regeneration, a collagen II-rich structure to which collagen IX is associated [79]. The possible role of collagen IX in angiogenesis is intriguing and has not been described in mammals.

Several fibrillar collagens are expressed in fin skeleton, the collagen types I, II, V, XI and XXIV and XXVII [43]. As mentioned above, fish bones also express collagen type X. Collagen I is encoded by four genes in zebrafish: *col1a1a*, *col1a1b*, *col1a2a* and *col1a2b*. Analysis of collagen I gene expression during fin skeleton regeneration suggested that, while *col1a2a* was not detected, *col1a2b* is highly expressed and could assemble with one of the two other chains to form collagen I heterotrimers [43]. *In situ* hybridization at 4 dpa showed that *col1a1b*, *col5a1*, *col10a1*, *col24a1*, *col27a1* are restricted to the proximal regenerate that will form the collagenous lepidotrichia part of the fin skeleton while *col1a1a* and *col2a1b* are also present in the distal outgrowth corresponding to unmineralized actinotrichia bundles [43]. The fin skeleton regeneration is also regulated by the Hsp47 procollagen chaperone. Its knockdown reduced cell proliferation and the length of the different segments that compose the fin skeleton, resulting in smaller fins [80]. As illustrated by collagen II staining, the regeneration of fin skeleton is compromised in *hsp47* MO-injected fins. This suggested that Hsp47 is required for proper fin growth and patterning probably through its collagen chaperone activity. Finally, the collagen-based ECM was shown to be critical for proper wounding and its formation and reorganization at the leading edge of the wound was dependent on reactive oxygen species and vimentin [81].

Collagens are also critical for spinal cord regeneration. A conditional heat-inducible mutant for lysyl hydroxylase 3 (*lh3*), encoding a glycosyltransferase required for collagen secretion and deposition has been generated. *Lh3* invalidation caused defects in axons target-selective regeneration through its main substrate in Schwann cells, collagen IV $\alpha 5$ chain [82]. Interestingly, the collagen IV $\alpha 5$ chain was shown to destabilize mistargeted axons during regeneration in order to ensure target-selective regeneration through interaction with the axonal repellent *slit1a*. Collagen IV $\alpha 5$ could sequester Slit1a to form a repulsive barrier that directs axons onto their original path.

The FACIT collagen XII is also part of the zebrafish embryo axonal regenerative program. Its expression was induced in fibroblast-like cells by Wnt/ β -catenin signalling after spinal lesion in zebrafish larvae [56]. The collagen XII-containing ECM was necessary for axons navigation within the damaged site to promote axonal bridging through the lesion and functional recovery. Strikingly, *col12a1a* overexpression was sufficient to rescue the effects of Wnt/ β -catenin inhibition showing that collagen XII actively promotes axonal regeneration. Similarly, a collagen XII-rich ECM was critical for adult zebrafish heart regeneration. After cryoinjury, collagen types XII and I were highly upregulated at the wound site upon TGF- β signalling [83]. In the regenerating edge of the myocardium, collagen XII partially co-localized with tenascin C and fibronectin that composed the transitional regenerative ECM. Together, these studies positioned collagen XII as a new actor of the provisional ECM. Overall, ECM components actively contribute to regeneration. This has been illustrated by a recent study showing that decellularized ECM from zebrafish heart promotes cardiac functional recovery in mammals [84] opening a new area of future regenerative medicine.

Recently, we have created CRISPR/Cas9-mediated *col14a1a* knockout fish to interrogate the function of *col14a1a* during

regeneration using the caudal fin model. Using AFM, we showed that collagen XIV-A transiently acts as a molecular spacer responsible for BM biomechanics possibly by helping laminins integration within regenerative BM. These data indicated that 3D-organization of BM is finely regulated by minor components of the BM zone while the integral components of BM are involved in the assembly of its backbone [18]. In addition, our study unexpectedly provided new insights into the analysis of the epidermal BM topography and mechanics [18]. AFM and 3D reconstruction revealed that the epidermal BM is organized as a checkerboard structure made of alternation of soft and rigid regions. Interestingly, in absence of collagen XIV-A, the checkerboard organization is compromised leading to a more compact structure, suggesting that this collagen may act as a molecular organizer of the BM network [18].

6. Zebrafish is a versatile model for collagenopathies

The critical roles of collagens have been clearly illustrated by the wide spectrum of diseases that affect various tissues: osteogenesis imperfecta (OI, bone), Alport syndrome (kidney), Ehlers-Danlos syndrome (skin, joints and vessels), Bethlem myopathy and Ulrich congenital muscular dystrophy (UCMD) (skeletal muscle), epidermolysis bullosa (skin), Knoblock syndrome (retina)... [5,85]. These diseases are caused by more than 1,500 mutations identified in genes encoding more than 12 different collagen types. In common diseases, such as fibrotic disorders, tumor stroma, fibrosis, atherosclerosis inflammation, and neurodegenerative disease, the imbalance in the rates of collagen synthesis and breakdown is critical [85]. Mutations in collagen genes often led to intracellular assembly defects that induced ER stress if proteins are not properly degraded [85]. Glycine substitutions are the most common mutations found in collagens. They result in interruptions in the Gly-X-Y sequence that subsequently affect triple helix assembly. Frame exon skipping mutations are also a frequent cause of disease. They result in the synthesis of shorter collagenous domains that, in turn, affect proper assembly of the three α chains [86].

In the last 15 years, zebrafish has become an emerging model for studying human diseases (Table 1). Random mutagenesis has generated many mutants that can model a particular disease and even sometimes have help connecting a particular locus with a human disease [12]. In order to identify new genes involved in skeletal dysplasia, an adult fish skeletal defect screen of mutants generated by ENU mutagenesis was performed using X-ray radiography [87]. Over the 2,000 fish examined, only one mutant that was 20% shorter than wildtype fish was identified and named *chihuahua*. Mutation in *col1a1a* gene leading to a replacement of a glycine by an aspartate (G574D) in collagen I $\alpha 1$ chain was shown to be responsible for *chihuahua* phenotype. Collagen I is the most abundant protein in bones and mutations in any of the collagen I genes led to classical OI. This disorder is characterized by bone fragility and growth deficiency, as reported for the *chihuahua* mutant [88,89]. At the cell level, *chihuahua* mutant also recapitulated the human disease since ER stress caused by intracellular retention of misfolded collagen in ER [85] was observed in fin bones. Interestingly, this model opens new perspectives of investigation for OI treatment as the *chihuahua* phenotype could be improved in adults by treating embryos with the chemical chaperone 4PBA [88].

Zebrafish was also used to model collagen VI-related myopathies. The use of splicing MOs is a method particularly adapted to recapitulate type VI collagen disease as many exon skipping mutations in the three main collagen VI genes are present in the human genome of patients [86]. Depending on the exon deleted in the zebrafish *col6a1* gene, Telfer and co-workers were able to induce either a severe or a mild muscle phenotype in agreement with the degree of severity observed in the two targeted myopathies, UCMD and Bethlem myopathy [90]. Zebrafish larvae showed the typical ultrastructural features of UCMD and Bethlem myopathy such as the abnormal structure of mitochondria and the swollen sarcoplasmic reticulum. The mitochondrial defects

have been rescued after treatment with the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) inhibitor cyclosporin A [90] as in the mouse model [91]. This drug has been successfully tested in clinical trials, but unfortunately it cannot be used for long term treatment due to its immunosuppressive properties [92]. In an attempt to find new treatment, another PTP inhibitor (NIM811) with non immunosuppressive properties was tested in zebrafish embryos and showed even stronger phenotype rescue than cyclosporin A [93]. Nevertheless, all these studies could be only performed during early development due to the transient efficiency of MOs. Using TALEN genome editing strategy, Radev and co-workers were able to create a stable line harboring a deletion in a splice donor site that led to the skipping of *col6a1* exon14 that is the most frequent mutation found in Bethlem myopathy patients [48]. They also observed dilated sarcoplasmic reticulum and mitochondria defects and, most importantly, better recapitulated the Bethlem myopathy progressive disease. Such a stable line will be useful to dissect the pathophysiological mechanisms of the disease as well as to fully interrogate the function of collagen VI in muscle physiology and regeneration.

In frame exon 41 skipping of *COL6A3* has been suspected to be responsible for isolated dystonia in several human kindreds without muscular defects [94]. In order to validate their hypothesis, the authors used zebrafish to selectively knock down several exons in *col6a3* and found a negative impact on motor neuron pathfinding only after exon 41 ortholog deletion. This observation suggested that the C3-C4 domains encoded by exon 41 are not important for muscle physiology but in peripheral nervous system in humans as well as in zebrafish. This paper nicely underscored the usefulness of zebrafish model in linking gene mutations to human disease. However, some mutants do not recapitulate the corresponding human disease. This is the case of the *COL4A5* gene. Mutations in *COL4A5* were reported to be responsible for the Alport Syndrome that mainly affects kidney function whereas the *dragnet/col4a5* mutant does not manifest renal defects. Further investigation is clearly needed to clarify such discrepancies.

7. Outlook

Beside the fundamental point of view, understanding the function of collagens and their mechanisms of action has significant and broad impact on human health issues such as connective tissue disease treatment, wound repair, tissue regeneration and tissue ageing prevention. Zebrafish has proven to be a relevant animal model to interrogate collagen gene functions. The generation in zebrafish of reporter gene lines and transgenic lines expressing fluorescent fusion collagen will allow to further develop an imaging approach unmatched in its ability to image in real-time the dynamics of collagen synthesis, secretion, extracellular assembly and remodeling. Mutations in 34 human collagen genes result in disease [85]. Zebrafish models for the various human diseases associated with collagen deficiency are also needed to enable a clear understanding of the pathophysiological mechanisms and to provide a suitable preclinical model for drug screening. We have no doubt that this will be rapidly achieved. The generation of zebrafish stable transgenic lines that represented a long and difficult task until a very short time ago is now largely facilitated thanks to the recent advances in genome editing technologies.

Acknowledgements

We acknowledge the contribution of SFR Biosciences (UMS3444/CNRS, ENS de Lyon, University of Lyon) zebrafish facility, specifically Laure Bernard and Robert Renard for their technical assistance and of the “Centre Technologique des Microstructures” (University of Lyon, France). This work was supported by the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-16-CE18-0023-03) and the AFM-Téléthon (#21064). PN is a recipient of a “Fondation l’Oréal” 2016 French Fellowship L’Oréal-UNESCO For Women in Science, the French government (NMRT) and the “Fondation pour la Recherche Médicale”

(FDT20160435169).

References

- [1] C. Frantz, K.M. Stewart, V.M. Weaver, The extracellular matrix at a glance, *J. Cell Sci.* 123 (2010) 4195–4200, <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>.
- [2] A. Naba, K.R. Clauser, H. Ding, C.A. Whittaker, S.A. Carr, R.O. Hynes, The extracellular matrix: tools and insights for the “Omics” era, *Matrix Biol.* (2015), <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.06.003>.
- [3] P. Nauroy, S. Hughes, A. Naba, F. Ruggiero, The in-silico zebrafish matrixome: a new tool to study extracellular matrix gene and protein functions, *Matrix Biol.* 65 (2018) 5–13, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.07.001>.
- [4] S. Ricard-Blum, The collagen family, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011) 1–19, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.
- [5] S. Ricard-Blum, F. Ruggiero, The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane, *Pathol. Biol.* 53 (2005) 430–442, <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.12.024>.
- [6] B.D. Ackley, J.R. Crew, H. Elamata, P. Pihlajaniemi, C.J. Kuo, J.M. Kramer, The NC1/endostatin domain of Caenorhabditis elegans type XVIII collagen affects cell migration and axon guidance, *J. Cell Biol.* 152 (2001) 1219–1232 <http://jcb.rupress.org/content/152/6/1219.abstract>.
- [7] F. Meyer, B. Moussian, Drosophila multiplexin (Dmp) modulates motor axon pathfinding accuracy, *Dev. Growth Differ.* 51 (2009) 483–498, <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01111.x>.
- [8] R. Heljasvaara, M. Aikio, H. Ruotsalainen, T. Pihlajaniemi, Collagen XVIII in tissue homeostasis and dysregulation — lessons learned from model organisms and human patients, *Matrix Biol.* 57–58 (2017) 55–75, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.10.002>.
- [9] J.R. Jessen, Recent advances in the study of zebrafish extracellular matrix proteins, *Dev. Biol.* 401 (2015) 110–121, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.12.022>.
- [10] R.A. Wyatt, J.Y. Keow, N.D. Harris, C. a Haché, D.H. Li, B.D. Crawford, The zebrafish embryo: a powerful model system for investigating matrix remodeling, *Zebrafish* 6 (2009) 347–354, <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0609>.
- [11] N.M. Feitosa, R. Richardson, W. Bloch, M. Hammerschmidt, Basement Membrane Diseases in Zebrafish, (2011), <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381320-6.00008-4>.
- [12] G.J. Lieschke, P.D. Currie, Animal models of human disease: zebrafish swim into view, *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 353–367, <https://doi.org/10.1038/nrg2091>.
- [13] A.J. Udvardi, E. Linney, Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish, *Dev. Biol.* 256 (2003) 1–17, [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00083-0](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00083-0).
- [14] A. Fleming, Zebrafish as an alternative model organism for disease modelling and drug discovery: implications for the 3Rs, *NC3Rs* 10 (2007) 1–7 www.nc3rs.org.uk.
- [15] W.Y. Hwang, Y. Fu, D. Reyon, M.L. Maeder, S.Q. Tsai, J.D. Sander, R.T. Peterson, J.R.J. Yeh, J.K. Joung, Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system, *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) 227–229, <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>.
- [16] N. Chang, C. Sun, L. Gao, D. Zhu, X. Xu, X. Zhu, J.W. Xiong, J.J. Xi, Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos, *Cell Res.* 23 (2013) 465–472, <https://doi.org/10.1038/cr.2013.45>.
- [17] D. Le Guellec, G. Morvan-Dubois, J.Y. Sire, Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish, *Int. J. Dev. Biol.* 48 (2004) 217–231, <https://doi.org/10.1387/ijdb.15272388>.
- [18] P. Nauroy, A. Guiraud, J. Chlasta, M. Malbouyres, B. Gillet, S. Hughes, E. Lambert, F. Ruggiero, Gene profile of zebrafish fin regeneration offers clues to kinetics, organization and biomechanics of basement membrane, *Matrix Biol.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.07.005>.
- [19] H.L. Bader, E. Lambert, A. Guiraud, M. Malbouyres, W. Driever, M. Koch, F. Ruggiero, Zebrafish collagen XIV is transiently expressed in epithelia and is required for proper function of certain basement membranes, *J. Biol. Chem.* (2013), <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.430637>.
- [20] J.B. Nadol, J.R. Gibbins, K.R. Porter, A reinterpretation of the structure and development of the basement lamella: an ordered array of collagen in fish skin, *Dev. Biol.* 20 (1969) 304–331, [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(69\)90017-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(69)90017-7).
- [21] D.E. Birk, Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly, *Micron* 32 (2001) 223–237, [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(00\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(00)00043-3).
- [22] P.E. Witten, M.P. Harris, A. Huysseune, C. Winkler, Small Teleost Fish Provide New Insights into Human Skeletal Diseases, Elsevier Ltd., 2017, <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.09.001>.
- [23] Y.L. Yan, C.T. Miller, R.M. Nissen, A. Singer, D. Liu, A. Kirn, B. Draper, J. Willoughby, P.A. Morcos, A. Amsterdam, B.C. Chung, M. Westerfield, P. Haffter, N. Hopkins, C. Kimmel, J.H. Postlethwait, A zebrafish *sox9* gene required for cartilage morphogenesis, *Development* 129 (2002) 5065–5079 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12397114%5Cnhttp://dev.biologists.org/content/129/21/5065.full.pdf>.
- [24] L.N. Luderman, G. Unlu, E.W. Knapik, Zebrafish Developmental Models of Skeletal Diseases, 1st ed., Elsevier Inc., 2017, <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.11.004>.
- [25] M. Mari-Beffa, J.A. Santamaría, C. Murciano, L. Santos-Ruiz, J.A. Andrades, E. Guerado, J. Becerra, Zebrafish fins as a model system for skeletal human studies, *Sci. World J.* 7 (2007) 1114–1127, <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.190>.
- [26] M. Mari-Beffa, M.C. Carmona, J. Becerra, Elastoidin turn-over during tail fin regeneration in teleosts. A morphometric and radioautographic study, *Anat. Embryol. (Berl)* 180 (1989) 465–470 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2619089>.
- [27] J.Y. Sire, M.A. Akimenko, Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (*shh*) expression in the zebrafish (*Danio rerio*), *Int. J. Dev. Biol.* 48 (2004) 233–247, <https://doi.org/10.1387/ijdb.15272389>.
- [28] J.Y. Sire, F. Allizard, O. Babiari, J. Bourguignon, A. Quilhac, Scale development in zebrafish (*Danio rerio*), *J. Anat.* 190 (Pt 4) (1997) 545–561 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12397114%5Cnhttp://dev.biologists.org/content/129/21/5065.full.pdf>.
- [29] C.J. Snow, C.A. Henry, Dynamic formation of microenvironments at the myotendinous junction correlates with muscle fiber morphogenesis in zebrafish, *Gene Expr. Patterns*. 9 (2009) 37–42, <https://doi.org/10.1016/j.gep.2008.08.003>.
- [30] B. Charvet, M. Malbouyres, A. Pagnon-Minot, F. Ruggiero, D. Le Guellec, Development of the zebrafish myoseptum with emphasis on the myotendinous junction, *Cell Tissue Res.* 346 (2011) 439–449, <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1266-7>.
- [31] E. Guillon, S. Bretaud, F. Ruggiero, Slow muscle precursors Lay down a collagen XV matrix fingerprint to guide motor axon navigation, *J. Neurosci.* 36 (2016) 2663–2676, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2847-15.2016>.
- [32] B. Charvet, A. Guiraud, M. Malbouyres, D. Zwolanek, E. Guillon, S. Bretaud, C. Monnot, J. Schulze, H.L. Bader, B. Allard, M. Koch, F. Ruggiero, Knockdown of *col22a1* gene in zebrafish induces a muscular dystrophy by disruption of the myotendinous junction, *Development* 140 (2013) 4602–4613, <https://doi.org/10.1242/dev.096024>.
- [33] G.M. Dubois, Z. Haftek, C. Crozet, R. Garrone, D. Le Guellec, Structure and spatio temporal expression of the full length DNA complementary to RNA coding for $\alpha 2$ type I collagen of zebrafish, *Gene* 294 (2002) 55–65, [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00770-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00770-9).
- [34] H.L. Bader, D.R. Keene, B. Charvet, G. Veit, W. Driever, M. Koch, F. Ruggiero, Zebrafish collagen XII is present in embryonic connective tissue sheaths (fascia) and basement membranes, *Matrix Biol.* 28 (2009) 32–43, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2008.09.580>.
- [35] T. Sztal, S. Berger, P.D. Currie, T.E. Hall, Characterization of the laminin gene family and evolution in zebrafish, *Dev. Dyn.* 240 (2011) 422–431, <https://doi.org/10.1002/dvdy.22537>.
- [36] Z. Haftek, G. Morvan-Dubois, B. Thisse, C. Thisse, R. Garrone, D. Le Guellec, Sequence and embryonic expression of collagen XVIII NC1 domain (endostatin) in the zebrafish, *Gene Expr. Patterns* 3 (2003) 351–354, [https://doi.org/10.1016/S1567-133X\(03\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S1567-133X(03)00027-9).
- [37] A. Pagnon-Minot, M. Malbouyres, Z. Haftek-Terreau, H.R. Kim, T. Sasaki, C. Thisse, B. Thisse, P.W. Ingham, F. Ruggiero, D. Le Guellec, Collagen XV, a novel factor in zebrafish notochord differentiation and muscle development, *Dev. Biol.* 316 (2008) 21–35, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.12.033>.
- [38] Y.L. Yan, K. Hatta, B. Riggleman, J.H. Postlethwait, Expression of a type II collagen gene in the zebrafish embryonic axis, *Dev. Dyn.* 203 (1995) 363–376, <https://doi.org/10.1002/aja.1002030308>.
- [39] D. Baas, M. Malbouyres, Z. Haftek-Terreau, D. Le Guellec, F. Ruggiero, Craniofacial cartilage morphogenesis requires zebrafish *coll11a1* activity, *Matrix Biol.* 28 (2009) 490–502, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.07.004>.
- [40] A. Scott, D.L. Stemple, Zebrafish notochordal basement membrane: signaling and structure, *Curr. Top. Dev. Biol.* 65 (2004) 229–253, [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(04\)65009-5](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(04)65009-5).
- [41] S.M.K. Glasauer, S.C.F. Neuhauss, Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences, *Mol. Genet. Genomics* 289 (2014) 1045–1060, <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>.
- [42] J.M. Gebauer, B. Kobbe, M. Paulsson, R. Wagener, Structure, evolution and expression of collagen XXVIII: lessons from the zebrafish, *Matrix Biol.* 49 (2016) 106–119, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.07.001>.
- [43] I. Duran, F. Csukasi, S.P. Taylor, D. Krakow, J. Becerra, A. Bombarely, M. Mari-Beffa, Collagen duplicate genes of bone and cartilage participate during regeneration of zebrafish fin skeleton, *Gene Expr. Patterns* 19 (2015) 60–69, <https://doi.org/10.1016/j.gep.2015.07.004>.
- [44] S. Bretaud, A. Pagnon-Minot, E. Guillon, F. Ruggiero, D. Le Guellec, Characterization of spatial and temporal expression pattern of *Coll15a1b* during zebrafish development, *Gene Expr. Patterns* 11 (2011) 129–134, <https://doi.org/10.1016/j.gep.2010.10.004>.
- [45] J.M. Topczewska, R.A. Shoela, J.P. Tomaszewski, R.B. Mirmira, A.K. Gosain, The morphogenesis of cranial sutures in zebrafish, *PLoS One* 11 (2016) 1–23, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165775>.
- [46] D.C. LeBert, J.M. Squirrel, A. Huttenlocher, K.W. Eliceiri, Second Harmonic Generation Microscopy in Zebrafish, (2016), pp. 55–68, <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.01.005>.
- [47] A.C. Johnson, A.J. Turko, J.M. Klaiman, E.F. Johnston, T.E. Gillis, Cold acclimation alters the connective tissue content of the zebrafish (*Danio rerio*) heart, *J. Exp. Biol.* 217 (2014) 1868–1875, <https://doi.org/10.1242/jeb.101196>.
- [48] Z. Radev, J.M. Hermel, Y. Elipot, S. Bretaud, S. Arnaud, P. Duchateau, F. Ruggiero, J.S. Joly, F. Sohm, A TALEN-exon skipping design for a bethlem myopathy model in zebrafish, *PLoS One* 10 (2015) 1–31, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133986>.
- [49] C. Gistelnic, R. Gioia, A. Gagliardi, F. Tonelli, L. Marchese, L. Bianchi, C. Landi, L. Bini, A. Huysseune, P.E. Witten, A. Staes, K. Gevaert, N. De Rocker, B. Menten, F. Malfait, S. Leikin, S. Carra, R. Tenni, A. Rossi, A. De Paep, P. Coucke, A. Willaert, A. Forlino, Zebrafish collagen type I: molecular and biochemical characterization of the Major structural protein in bone and skin, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–14, <https://doi.org/10.1038/srep21540>.
- [50] S. Perret, C. Merle, S. Bernocco, P. Berland, R. Garrone, D.J.S. Hulmes, M. Theisen, F. Ruggiero, Unhydroxylated triple helical collagen I produced in transgenic plants provides new clues on the role of hydroxyproline in collagen folding and fibril formation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 43693–43698, <https://doi.org/10.1074/jbc.M105507200>.
- [51] C. Gistelnic, P.E. Witten, A. Huysseune, S. Symoens, F. Malfait, D. Larionova, P. Simeons, M. Dierick, L. Van Hoorebeke, A. De Paep, R.Y. Kwon, M.A. Weis, D.R. Eyre, A. Willaert, P.J. Coucke, Loss of type I collagen telopeptide lysyl hydroxylation causes musculoskeletal abnormalities in a Zebrafish model of Bruck syndrome, *J. Bone Miner. Res.* 31 (2016) 1930–1942, <https://doi.org/10.1002/jbmr.2977>.
- [52] G. Unlu, D.S. Levic, D.B. Melville, E.W. Knapik, Trafficking mechanisms of

- extracellular matrix macromolecules: insights from vertebrate development and human diseases, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 47 (2014) 57–67, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.11.005>.
- [53] M.R. Lang, L.A. Lapiere, M. Frotscher, J.R. Goldenring, E.W. Knapik, Secretory COPII coat component Sec23a is essential for craniofacial chondrocyte maturation, *Nat. Genet.* 38 (2006) 1198–1203, <https://doi.org/10.1038/ng1880>.
- [54] D.B. Melville, M. Montero-Balaguer, D.S. Levic, K. Bradley, J.R. Smith, A.K. Hatzopoulos, E.W. Knapik, The feeblood mutation in zebrafish dysregulates COPII-dependent secretion of select extracellular matrix proteins in skeletal morphogenesis, *Dis. Model. Mech.* 4 (2011) 763–776, <https://doi.org/10.1242/dmm.007625>.
- [55] Y. Il Kim, S. Lee, S.H. Jung, H.T. Kim, J.H. Choi, M.S. Lee, K.H. You, S.Y. Yeo, K.W. Yoo, S. Kwak, J.N. Lee, R. Park, S.K. Choe, C.H. Kim, Establishment of a bone-specific col10a1:GFP transgenic zebrafish, *Mol. Cells* 36 (2013) 145–150, <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0117-7>.
- [56] D. Wehner, T.M. Tsarouchas, A. Michael, C. Haase, G. Weidinger, M.M. Reimer, T. Becker, C.G. Becker, Wnt signaling controls pro-regenerative collagen XII in functional spinal cord regeneration in zebrafish, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1–16, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00143-0>.
- [57] K. Landgraf, S. Schuster, A. Meusel, A. Garten, T. Riemer, D. Schleinitz, W. Kiess, A. Körner, Short-term overfeeding of zebrafish with normal or high-fat diet as a model for the development of metabolically healthy versus unhealthy obesity, *BMC Physiol.* 17 (2017) 1–10, <https://doi.org/10.1186/s12899-017-0031-x>.
- [58] V. Thorimbert, D. König, J. Marro, F. Ruggiero, A. Jaźwińska, Bone morphogenetic protein signaling promotes morphogenesis of blood vessels, wound epidermis, and actinotrichia during fin regeneration in zebrafish, *FASEB J.* 29 (2015) 4299–4312, <https://doi.org/10.1096/fj.15-272955>.
- [59] J.L. Morris, S.J. Cross, Y. Lu, K.E. Kadler, Y. Lu, S.L. Dallas, P. Martin, Live imaging of collagen deposition during skin development and repair in a collagen I – GFP fusion transgenic zebrafish line, *Dev. Biol.* 441 (2018) 4–11, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.06.001>.
- [60] M.A. Fox, Novel roles for collagens in wiring the vertebrate nervous system, *Curr. Opin. Cell Biol.* 20 (2008) 508–513, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.05.003>.
- [61] T. Xiao, H. Baier, Lamina-specific axonal projections in the zebrafish tectum require the type IV collagen Drgnet, *Nat. Neurosci.* 10 (2007) 1529–1537, <https://doi.org/10.1038/nn2002>.
- [62] T. Xiao, W. Staub, E. Robles, N.J. Gosse, G.J. Cole, H. Baier, Assembly of lamina-specific neuronal connections by slit bound to type IV collagen, *Cell* 146 (2011) 164–176, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.016>.
- [63] M. Takeuchi, S. Yamaguchi, S. Yonemura, K. Kakiguchi, Y. Sato, T. Higashiyama, T. Shimizu, M. Hibi, Type IV collagen controls the axogenesis of cerebellar granule cells by regulating basement membrane integrity in zebrafish, *PLoS Genet.* 11 (2015) 1–24, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005587>.
- [64] J.D. Hilario, C. Wang, C.E. Beattie, Collagen XIXa1 is crucial for motor axon navigation at intermediate targets, *Development* 137 (2010) 4261–4269, <https://doi.org/10.1242/dev.051730>.
- [65] V.A. Schneider, M. Granato, The myotomal diwanka (lh3) glycosyltransferase and type XVIII collagen are critical for motor growth cone migration, *Neuron* 50 (2006) 683–695, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.024>.
- [66] L. Eklund, J. Pihola, J. Komulainen, R. Sormunen, C. Ongvarrasopone, R. Fassler, A. Muona, M. Ilves, H. Ruskoaho, T.E.S. Takala, T. Pihlajaniemi, Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001) 1194–1199, <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.1194>.
- [67] K. Rasi, M. Hurskainen, M. Kallio, S. Staven, R. Sormunen, A.M. Heape, R.L. Avila, D. Kirschner, A. Muona, U. Tolonen, H. Tanila, P. Huhtala, R. Soiminen, T. Pihlajaniemi, Lack of collagen XV impairs peripheral nerve maturation and, when combined with laminin-411 deficiency, leads to basement membrane abnormalities and sensorimotor dysfunction, *J. Neurosci.* 30 (2010) 14490–14501, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2644-10.2010>.
- [68] M. Koch, J. Schulze, U. Hansen, T. Ashwot, D.R. Keene, W.J. Brunken, R.E. Burgeson, P. Bruckner, L. Bruckner-Tuderman, A novel marker of tissue junctions, collagen XXII, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 22514–22521, <https://doi.org/10.1074/jbc.M400536200>.
- [69] J.R. Guyon, L.S. Steffen, M.H. Howell, T.J. Pusack, C. Lawrence, L.M. Kunkel, Modeling human muscle disease in zebrafish, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1772 (2007) 205–215, <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2006.07.003>.
- [70] R.M. Dale, J. Topczewski, Identification of an evolutionarily conserved regulatory element of the zebrafish col2a1a gene, *Dev. Biol.* 357 (2011) 518–531, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.06.020>.
- [71] R.E. Mitchell, L.F.A. Huitema, R.E.H. Skinner, L.H. Brunt, C. Severn, S. Schulte-Merker, C.L. Hammond, New tools for studying osteoarthritis genetics in zebrafish, *Osteoarthr. Cartil.* 21 (2013) 269–278, <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.11.004>.
- [72] I. Durán, M. Mari-Beffa, J.A. Santamaría, J. Becerra, L. Santos-Ruiz, Actinotrichia collagens and their role in fin formation, *Dev. Biol.* 354 (2011) 160–172, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.03.014>.
- [73] J.M. Gansner, J.D. Gitlin, Essential role for the alpha 1 chain of type VIII collagen in zebrafish notochord formation, *Dev. Dyn.* 237 (2008) 3715–3726, <https://doi.org/10.1002/dvdy.21779>.
- [74] R.S. Gray, T.P. Wilm, J. Smith, M. Bagnat, R.M. Dale, J. Topczewski, S.L. Johnson, L. Solnica-Krezel, Loss of col8a1a function during zebrafish embryogenesis results in congenital vertebral malformations, *Dev. Biol.* 386 (2014) 72–85, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.11.028>.
- [75] H.E. Christiansen, M.R. Lang, J.M. Pace, D.M. Parichy, Critical early roles for col27a1a and col27a1b in zebrafish notochord morphogenesis, vertebral mineralization and post-embryonic axial growth, *PLoS One* 4 (2009) 1–10, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008481>.
- [76] S.H. Kim, H.Y. Choi, J.H. So, C.H. Kim, S.Y. Ho, M. Frank, Q. Li, J. Uitto, Zebrafish type XVII collagen: Gene structures, expression profiles, and morpholino “knock-down” phenotypes, *Matrix Biol.* 29 (2010) 629–637, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2010.07.002>.
- [77] R. Richardson, K. Slanchev, C. Kraus, P. Knyphausen, S. Eming, M. Hammerschmidt, Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound-healing research, *J. Invest. Dermatol.* 133 (2013) 1655–1665, <https://doi.org/10.1038/jid.2013.16>.
- [78] M. Gemberling, T.J. Bailey, D.R. Hyde, K.D. Poss, The zebrafish as a model for complex tissue regeneration, *Trends Genet.* 29 (2013) 611–620, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.07.003>.
- [79] C. chen Huang, T.C. Wang, B.H. Lin, Y.W. Wang, S.L. Johnson, J. Yu, Collagen IX is required for the integrity of collagen II fibrils and the regulation of vascular plexus formation in zebrafish caudal fins, *Dev. Biol.* 332 (2009) 360–370, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.06.003>.
- [80] J. Bhadra, M.K. Iovine, Hsp47 mediates Cx43-dependent skeletal growth and patterning in the regenerating fin, *Mech. Dev.* 138 (2015) 364–374, <https://doi.org/10.1016/j.mod.2015.06.004>.
- [81] D. Lebert, J.M. Squirrell, C. Freisinger, J. Rindy, N. Golenberg, G. Frecentese, A. Gibson, K.W. Eliceiri, A. Huttenlocher, Damage-induced reactive oxygen species regulate vimentin and dynamic collagen-based projections to mediate wound repair, *Elife* 7 (2018) 1–26, <https://doi.org/10.7554/eLife.30703>.
- [82] J. Isaacman-Beck, V. Schneider, C. Franzini-Armstrong, M. Granato, The lh3 glycosyltransferase directs target-selective peripheral nerve regeneration, *Neuron* 88 (2015) 691–703, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.004>.
- [83] J. Marro, C. Pfefferli, A.S.P. De Charles, T. Bise, A. Jaźwińska, Collagen XII contributes to epicardial and connective tissues in the zebrafish heart during ontogenesis and regeneration, *PLoS One* 11 (2016) 1–23, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165497>.
- [84] W.C.W. Chen, Z. Wang, M.A. Missinato, D.W. Park, D.W. Long, H.-J. Liu, X. Zeng, N.A. Yates, K. Kim, Y. Wang, Decellularized zebrafish cardiac extracellular matrix induces mammalian heart regeneration, *Sci. Adv.* 2 (2016), <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600844> e1600844–e1600844.
- [85] Bonod-Bidaud Christelle, Fl. Ruggiero, Inherited Connective Tissue Disorders of Collagens: Lessons from Targeted Mutagenesis, in: D. Figriski (Ed.), *Genet. Manip. DNA Protein. Examples from Curr. Res.*, 2013: pp. 253–270.
- [86] A.K. Lampe, Y. Zou, D. Sudano, K.K. O'Brien, D. Hicks, S.H. Laval, R. Charlton, C. Jimenez-Mallebrera, R.Z. Zhang, R.S. Finkel, G. Tennekoon, G. Schreiber, M.S. Van Der Knaap, H. Marks, V. Straub, K.M. Flanigan, M.L. Chu, F. Muntoni, K.M.D. Bushby, C.G. Bönnemann, Exon skipping mutations in collagen VI are common and are predictive for severity and inheritance, *Hum. Mutat.* 29 (2008) 809–822, <https://doi.org/10.1002/humu.20704>.
- [87] S. Fisher, P. Jagadeeswaran, M.E. Halpern, Radiographic analysis of zebrafish skeletal defects, *Dev. Biol.* 264 (2003) 64–76, [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00399-3](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00399-3).
- [88] R. Gioia, F. Tonelli, I. Ceppi, M. Biggiogera, S. Leikin, S. Fisher, E. Tenedini, T.A. Yorgan, T. Schinck, K. Tian, J.M. Schwartz, F. Forte, R. Wagener, S. Villani, A. Rossi, A. Forlino, The chaperone activity of 4PBA ameliorates the skeletal phenotype of Chihuahua, a zebrafish model for dominant osteogenesis imperfecta, *Hum. Mol. Genet.* 26 (2017) 2897–2911, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx171>.
- [89] I.A.K. Fiedler, F.N. Schmidt, E.M. Wölfel, C. Plumeyer, P. Milovanovic, R. Gioia, F. Tonelli, H.A. Bale, K. Jahn, R. Besio, A. Forlino, B. Busse, Severely impaired bone material quality in Chihuahua zebrafish resembles classical dominant human osteogenesis imperfecta, *J. Bone Miner. Res.* 33 (2018) 1489–1499, <https://doi.org/10.1002/jbmr.3445>.
- [90] W.R. Telfer, A.S. Busta, C.G. Bonnemann, E.L. Feldman, J.J. Dowling, Zebrafish models of collagen VI-related myopathies, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) 2433–2444, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq126>.
- [91] W.A. Irwin, N. Bergamin, P. Sabatelli, C. Reggiani, A. Megighian, L. Merlini, P. Braghetta, M. Columbaro, D. Volpin, G.M. Bressan, P. Bernardi, P. Bonaldo, Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency, *Nat. Genet.* 35 (2003) 367–371, <https://doi.org/10.1038/ng1270>.
- [92] L. Merlini, P. Bernardi, Therapy of collagen VI-related myopathies (Bethlem and Ullrich), *Neurotherapeutics* 5 (2008) 613–618, <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2008.08.004>.
- [93] A. Zulian, E. Rizzo, M. Schiavone, E. Palma, F. Tagliavini, B. Blaauw, L. Merlini, N.M. ario Maraldi, P. Sabatelli, P. Braghetta, P. Bonaldo, F. Argenton, P. Bernardi, NIM811, a cyclophilin inhibitor without immunosuppressive activity, is beneficial in collagen VI congenital muscular dystrophy models, *Hum. Mol. Genet.* 23 (2014) 5353–5363, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu254>.
- [94] M. Zech, D.D. Lam, L. Francescatti, B. Schormair, A.V. Salminen, A. Jochim, T. Wieland, P. Lichtner, A. Peters, C. Gieger, H. Lochmüller, T.M. Strom, B. Haslinger, N. Katsanis, J. Winkelmann, Recessive mutations in the $\alpha 3$ (VI) collagen Gene COL6A3 cause early-onset isolated dystonia, *Am. J. Hum. Genet.* 96 (2015) 883–893, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.04.010>.
- [95] L. Ramanoudjame, C. Rocancourt, J. Lainé, A. Klein, L. Joassard, C. Gartioux, M. Fleury, L. Lyphout, E. Kabashi, S. Ciura, X. Cousin, V. Allamand, Two novel COLVI long chains in zebrafish that are essential for muscle development, *Hum. Mol. Genet.* 24 (2015) 6624–6639, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv368>.

Annexe 2

L'article suivant, dont je suis le second auteur, décrit les changements morphologiques de la JMT au cours du développement du poisson zèbre et schématise les principales étapes de ce processus. Lors de différentes études (portant sur les collagènes XII, XV et XXII) menées dans notre équipe de recherche, nous nous sommes intéressés à la relation muscle-tendon. Or, la littérature concernant la description ultrastructurale du développement du myosepte et de la JMT était quasi inexistante, nous freinant dans l'interprétation des résultats. Aussi, nous avons entrepris la réalisation d'un atlas ultra-structural montrant les différentes étapes de formation du système myo-tendineux.

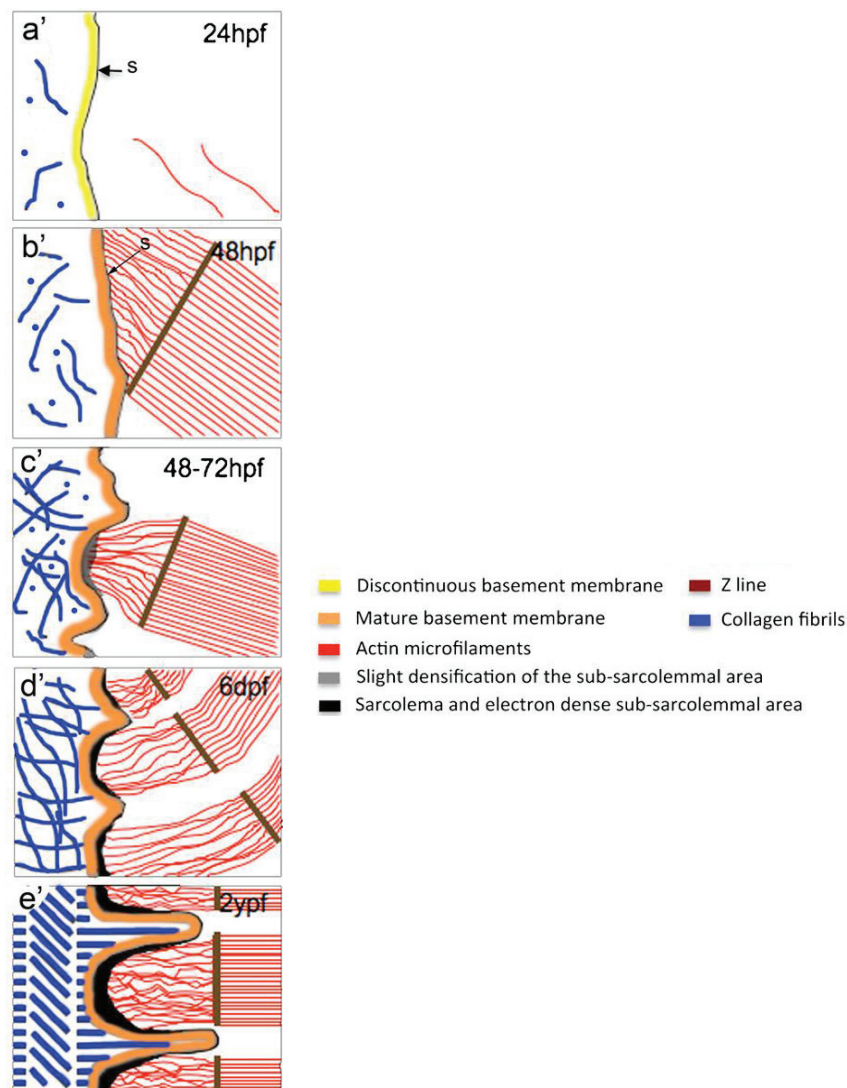
J'ai choisi de faire figurer cet article en annexe, car ma contribution à ce projet a plus été d'ordre technique, en réalisant les travaux de microscopie électronique sur un modèle que je maîtrisais bien, le poisson zèbre. Bien entendu, ma place de second auteur témoigne de mon implication dans ces travaux (obtention, analyse et interprétation des résultats) mais je ne considère pas cet article comme étant le témoignage de l'évolution de mes fonctions, raison pour laquelle je me suis engagée dans la réalisation d'une thèse.

Les observations en microscopie électronique à transmission de poissons zèbre âgés de 24hpf à 2 ans nous ont permis de montrer que la mise en place de la JMT est intimement liée au développement coordonné du muscle et du tendon.

Résumé : A 24 hpf, l'ultrastructure du muscle révèle une différenciation inachevée de ce tissu. Concomitant à l'élongation des fibres musculaires, les premiers microfilaments d'actine, qui constitueront les sarcomères, et leur ancrage au sarcolemme au niveau de la future JMT, sont observés. Le myosepte est acellulaire et ne contient que très peu de matériel matriciel. L'interface muscle/myosepte est rectiligne. La mise en place de la jonction commence par la production inachevée à 24hpf d'une lame basale, par les cellules musculaires. A 48 hpf, les régions en forme de triangle, formées par la rencontre de deux somites consécutifs et de la notochorde, sont colonisées par des cellules de type fibroblastique. Ces cellules vont émettre des prolongements cellulaires qui pénètrent le myosepte sur toute sa longueur. A ce stade de développement, le myosepte forme une bande de tissu fibreux, d'une épaisseur d'environ 200 nm. Il contient des fibres de collagène éparses de 30 nm de diamètre sans organisation particulière. La lame basale qui sépare le muscle du myosepte est complètement formée et le sarcolemme commence à s'invaginer. On observe alors l'apparition de densifications sub-sarcolemmales où les microfilaments d'actine issus de la dernière strie Z viennent s'ancrer. A 72 hpf, aucun changement morphologique majeur n'est observé, excepté une augmentation importante de l'épaisseur du myosepte qui s'élève alors à 500 nm, et du matériel qu'il contient. Au niveau de la JMT,

les invaginations du sarcolemme se font plus profondes au point de rencontre entre les filaments d'actine et le sarcolemme. A 6 jours de développement, un profond changement de morphologie est observé : les fibres de collagène qui composent le myosepte sont nombreuses et régulièrement espacées. Dans certaines zones du myosepte, les fibres de collagène (de diamètre inchangé) sont organisées en feuillets perpendiculaires. D'avantage de cellules de type fibroblastique colonisent le myosepte. Les filaments d'actine et les fibres de collagène s'alignent sur un même axe. Un lien nettement visible, car très dense aux électrons, est observé entre le cytosquelette sarcomérique et les fibres de collagène au niveau de la JMT à l'âge adulte.

Chez le poisson adulte, le myosepte mesure 3mm d'épaisseur et est composé de fibres de collagène de 50 nm de diamètre, organisées en contre-plaqué, selon des axes orthogonaux. La JMT est formée d'interdigitations régulières entre le sarcolemme et la matrice fibreuse du myosepte. Le cytosquelette de la fibre musculaire vient s'ancrer dans le creux de ces invaginations au niveau des densifications sub-sarcolemmales. A partir de ces observations, nous avons pu établir un modèle schématique décrivant les étapes clés de la formation de la JMT.



Development of the zebrafish myoseptum with emphasis on the myotendinous junction

Benjamin Charvet · Marilyne Malbouyres ·
Aurélien Pagnon-Minot · Florence Ruggiero ·
Dominique Le Guellec

Received: 31 May 2011 / Accepted: 17 October 2011 / Published online: 16 November 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Zebrafish myosepta connect two adjacent muscle cells and transmit muscular forces to axial structures during swimming via the myotendinous junction (MTJ). The MTJ establishes transmembrane linkages system consisting of extracellular matrix molecules (ECM) surrounding the basement membrane, cytoskeletal elements anchored to sarcolemma, and all intermediate proteins that link ECM to actin filaments. Using a series of zebrafish specimens aged between 24 h post-fertilization and 2 years old, the present paper describes at the transmission electron microscope level the development of extracellular and intracellular elements of the MTJ. The transverse myoseptum development starts during the segmentation period by deposition of sparse and loosely organized collagen fibrils. During the hatching period, a link between actin filaments and sarcolemma is established. The basal lamina underlining sarcolemma is well differentiated. Later, collagen fibrils

display an orthogonal orientation and fibroblast-like cells invade the myoseptal stroma. A dense network of collagen fibrils is progressively formed that both anchor myoseptal fibroblasts and sarcolemmal basement membrane. The differentiation of a functional MTJ is achieved when sarcolemma interacts with both cytoskeletal filaments and extracellular components. This solid structural link between contractile apparatus and ECM leads to sarcolemma deformations resulting in the formation of regular invaginations, and allows force transmission during muscle contraction. This paper presents the first ultrastructural atlas of the zebrafish MTJ development, which represents an useful tool to analyse the mechanisms of the myotendinous system formation and their disruption in muscle disorders.

Keywords Extracellular matrix · Myosepta · Myotendinous junction · Collagen · Zebrafish, *Danio rerio* (Teleostei)

Florence Ruggiero and Dominique Le Guellec contributed equally to this work.

The work was supported by ANR (Muscolten) and AFM to F.R. B.C. was supported by FRM and by the University of Lyon.

B. Charvet · M. Malbouyres · A. Pagnon-Minot · F. Ruggiero
Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyon, ENS de Lyon,
UMR CNRS 5242, Université Lyon 1,
46 Allée d'Italie,
69364 Lyon cedex 07, France

D. Le Guellec
IFR128 Lyon Biosciences Dysfonctionnement de l'Homéostasie
Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique,
Université Lyon 1, CNRS, FRE 3310,
Lyon, France

D. Le Guellec (✉)
IBCP,
7 passage du Vercors,
Lyon 69367 Lyon cedex 07, France
e-mail: d.leguellec@ibcp.fr

Introduction

Myotome is comprised of skeletal muscle fibres derived from somites. Somites are repeated structures that are delineated by the formation of somites boundaries. In fish, many different terms including myotendinous junction (MTJ), myoseptum, myoseptal tendon and myomomal junction refer to the boundaries that separate myotomes. The myoseptum, which corresponds to the connective tissue that separates two adjacent somites, is functionally homologous to the mammalian tendon, and the MTJ is the major site of force transmission during swimming behaviour (Gemballa and Vogel 2002). As in humans, the fish MTJ can also react to compressive loads (Summers and Koob 2002). The MTJ derives from the initial epithelial somite boundary and links two adjacent muscle cells. Muscles and the MTJ constitute an integrated mechanical

unit. Structurally, the MTJ consists of actin microfilaments that extend from the last Z-line, actin-binding proteins that bundle the actin filaments together, proteins that link the actin filament bundles to the sarcolemma, transmembrane protein complexes that link cytoskeletal elements to basal lamina components, and proteins that link the basal lamina to the collagen fibril-rich matrix outside it. Two separate transmembrane-linkage systems have been described in the MTJ. The first linkage system contains the dystrophin-associated glycoproteins complex (DGC), which forms a pivotal link between the muscle cytoskeleton and the extracellular matrix. Many critical members of the DGC have been described in zebrafish (Guyon et al. 2003), including dystrophin, β -dystroglycan, and β -, δ -, ϵ -, γ -, and ζ -sarcoglycan. Dystrophin and the DGC in zebrafish may play a highly conserved role in muscle architecture and contraction. The second linkage system contains the main collagen receptors, the integrins, which are associated to actin microfilaments on the cytoplasm side of sarcolemma and ECM molecules on the extracellular side. Several focal adhesion molecules including vinculin, FAK, paxillin and talin have been identified in zebrafish (Henry et al. 2001; Crawford et al. 2003; Costa et al. 2008; Câmara-Pereira et al. 2009). The molecular composition of the myoseptal matrix also remains elusive. Myosepta and skin are firmly interconnected in the region between the dorsal and ventral backward flexure of the myoseptum. The major proteins described in mammalian tendons, including collagen (Morvan-Dubois et al. 2002), periostin (Kudo et al. 2004), tenascin (Tongiorgi 1999), fibronectin (Snow and Henry 2009; Latimer and Jessen 2010), and laminin (Gawlik et al. 2006; Pollard et al. 2006; Dolez et al. 2011) have been characterized in zebrafish. The role of laminin and fibronectin in muscle or notochord development is well documented (Pollard et al. 2006; Snow et al. 2008; Jacoby et al. 2009; Dolez et al. 2011), but their role in myosepta development is unclear. Snow and Henry (2009) have shown that fibronectin plays a role in the formation of a microenvironment within the MTJ that allows the attachment of fast twitch myofibers to the MTJ. The localisation and function of periostin is well documented but periostin is not present in mammalian tendons (Kudo et al. 2004). The collagen-fibre architecture of myosepta shows a high uniformity in gnathostomes indicating a functional importance of myosepta in axial undulatory swimming (Gemballa et al. 2003). The formation of the collagen network and the composition of collagen fibrils are largely unknown, though it has been shown that the collagenous tendon markers are also expressed in myoseptal fibroblasts, such as collagens I and XII (Morvan-Dubois et al. 2002; Bader et al. 2009).

The analysis of the complex and dynamic interactions between muscle cell and ECM components is vital to understand the functional physiology of myosepta. In this

paper, we described the ultrastructure of the MTJ to establish an atlas of its development in zebrafish.

Materials and methods

Zebrafish strains and breeding

All experiments were conducted with wild-type (AB/TU) strain. General maintenance, collection and staging of adult and embryo zebrafish were carried out at the zebrafish facilities (PRECI-IFR128, Biosciences Gerland, Lyon, France). They were reared and maintained at a constant temperature of 28°C in a 14-h light cycle in compliance with the UK Home Office and French Government guidelines.

Ultrastructural studies

As described previously (Le Guellec et al. 2004), zebrafish embryos were fixed in 1.5% glutaraldehyde and 1.5% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) overnight at 4°C followed by washing in 0.1 M cacodylate buffer, 10% sucrose (1 h, 2 times). After post-fixation in 1% osmium tetroxide for 1 h at room temperature, samples were dehydrated in graded series of ethanol (from 30 to 100%), and embedded in epoxy resin. Then, 1- μ m thin sections were fixed on glass slides and stained with methylene blue/azur II (v:v) for optical microscopy observations. For transmission electron-microscope analysis, ultra-thin 50-nm sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed with a Philips CM120 electron microscope (Centre Technologique des Microstructures, Université Lyon 1, France) equipped with a Gatan Orius 200 2 K \times 2 K digital numeric camera.

Results

The following description of myosepta and MTJ development in zebrafish is based on parasagittal sections of the trunk region, at the level of the elongated part of the yolk. It is important to note this point because somite differentiation progresses from anterior to posterior, and thus the features of the zebrafish myosepta and MTJ morphology in embryo, larva, juveniles and adults can differ along the antero-posterior axis. Our description is focused on vertical myosepta from 24 h, which correspond to the first morphological observations of a nascent myoseptum to adult stage corresponding to mature and functional myoseptum. We define myoseptum as the area between two adjacent myotomes. The MTJ, as described above, consists of actin filaments anchored in sarcolemma, sarcolemma

with the transmembrane linkage system, the basement membrane, and the MEC outside it.

Myoseptum develops during the segmentation period as somite form. Myoseptum derives from the initial epithelial somite boundary. These epithelial cells anchor to the surrounding ECM through different cell transmembrane proteins such as integrin or dystroglycan complex (DGC) (Guyon et al. 2003). Adaxial cells, the precursors of slow-twitch fibres migrate laterally from the medial region of the somite through the fast-twitch muscle region that occupy the central part of the somite (Devoto et al. 1996). The migration process is accompanied by fast-twitch muscle cell elongation, which attach to the nascent MTJ (Henry and Amacher 2004). As indicated before, the description of the myoseptal, MTJ development is based on parasagittal sections. So, the sections encompass only the fast fibre domain. At 24 hpf, the migration of adaxial cells is achieved and slow-twitch fibres occupy the most superficial layer of muscle. At this stage of development, somites are entirely separated by myosepta (arrow in Fig. 1a). A low number of myofibrils are observed in muscle cells (Fig. 1b, c). These myofibrils are preferentially located in the cortex area of the cells. Sarcolemma (underlined by dotted lines in Fig. 1c–d) does not exhibit folds as observed at later stages and the basement membrane is not well differentiated. The sheet-like structure of the basement membrane is often fragmented and sometimes hardly visible along the muscle cells (arrow in Fig. 1c). At this stage, myosepta are acellular and are composed of thin sparse collagen fibrils. Muscle cell processes are visible in myosepta (asterisks in Fig. 1b). Non-muscular cell processes can be observed at the intersection between myoseptal stroma and the primary stroma of the dermis (data not shown). The myoseptal collagen fibrils with a mean diameter of about 30 nm are randomly arranged and irregularly spaced (short arrowheads in Fig. 1c, d).

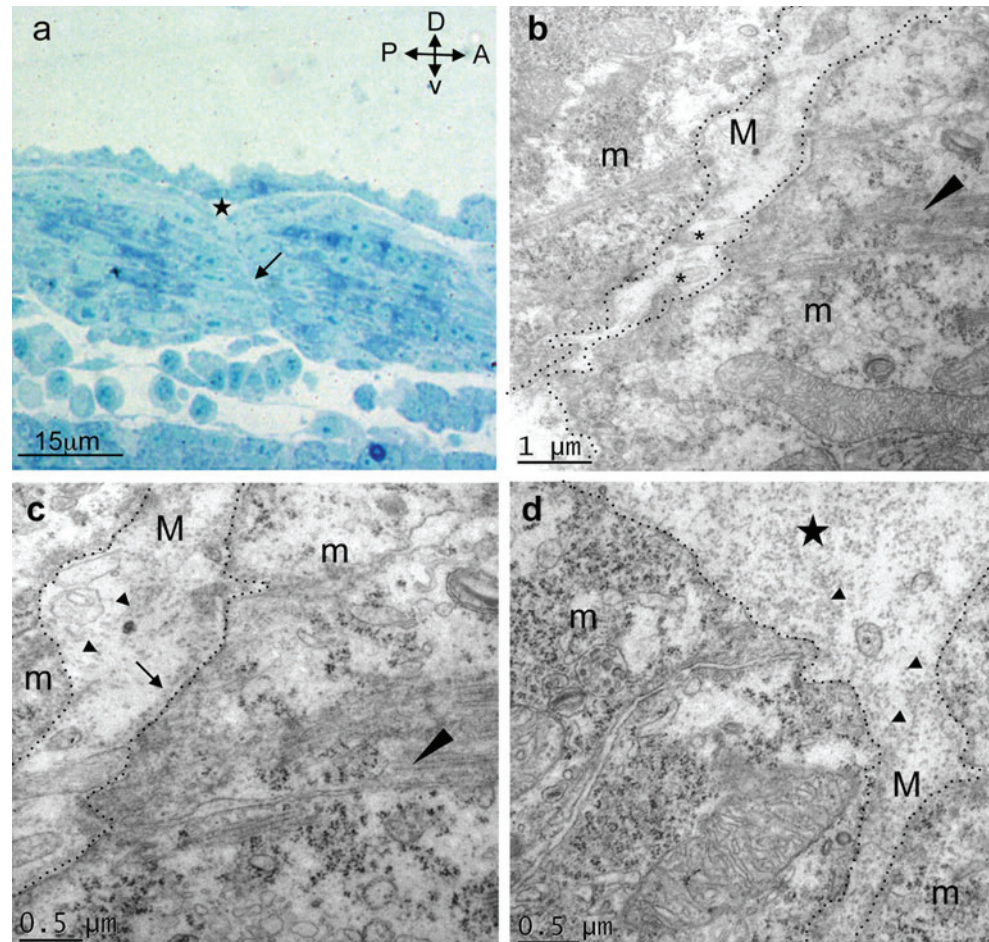
In 48-hpf zebrafish embryos, myofibrils are completely formed and the cytoplasm is overgrown of myofibrils (Fig. 2a, b). Each myofibril is surrounded by a well-developed sarcoplasmic reticulum (arrow in Fig. 2b). A few granular reticulum sarcoplasmic (ER in Fig. 2d) is also visible in muscle cells attesting a synthesis of secreted proteins. From the last Z-line, thin microfilaments link to the muscle cell membrane (Fig. 2b). The anchorage of these actin-filaments is either perpendicular (Fig. 2b, d) or oblique (Fig. 2c) to the membrane surface. A high density of polysomes (white arrows in Fig. 2d) is observed between the thin filament bundles, indicating intense protein synthesis activity. The muscle cell membrane is folded into finger-like extensions and invaginations that extend the surface of interaction between muscle cell and myoseptum (Fig. 2b, d). However, in some areas, the sarcolemmal invaginations are not observed and the membrane is almost linear (Fig. 2c). The morphology of the interface between

the sarcolemma and the myosepta looks like an adhesive joint corresponding to dense material observed in the muscle cell membrane (white arrowhead in Fig. 2d). The lamina lucida and lamina densa form a thick differentiated basement membrane, which separates muscle cells from the upper region of the myoseptal stroma. At 48 hpf, myoseptum remains acellular and is 150 to 300 nm thick. It enlarges near dermis and notochord forming triangular regions in which fibroblast-like cells are observed (asterisk in Fig. 2a). The myoseptal stroma presents features that are very similar to those described at 24 hpf. The thin collagen fibrils of 30 nm diameter are still present. Longitudinal and transversal collagen fibrils are observed without particular orientation. In the same way, no particular arrangement between collagen fibrils and myofibrils can be distinguished. No particular interaction between collagen fibrils and basement membrane can be observed.

At 72 hpf, myosepta present an undulated sarcolemma (arrow in Fig. 3a). Myofibrils are dense and a high number of polysome is found between the last Z-line and the sarcolemma (black arrowheads in Fig. 3b). Granular endoplasmic reticulum is also observed. A thick and continuous basal lamina separates muscle cells and myosepta (Fig. 3b, c). The architecture of myosepta is similar to the previous stages (Fig. 3b). At this stage of development the particular features are the enlargement of myoseptum to up to 500 nm, the increase in collagen fibril number, and the presence of cell processes (Fig. 3b). Sarcolemma is deeply invaginated (Fig. 3b). Myosepta consists of a high density of longitudinal and transversal collagen fibrils, which do not exhibit particular arrangements (Fig. 3c). Cells processes observed in myosepta derived from cells found in the triangular areas at the intersection between myosepta and dermis (asterisk in Fig. 3d). The presence of dilated granular endoplasmic reticulum in the cell processes is the expression of active ECM protein synthesis.

At 6 dpf (Fig. 4), a remarkable change in the organisation of the primary myoseptal stroma occurs. Indeed, the collagen fibrils change their spacing, orientation and organisation. From a loose primary myoseptal stroma composed of irregularly-spaced and randomly organized fibrils, it is now turned into a dense, regularly spaced network of collagen fibrils (Fig. 4d). In some regions, the fibrils are organised into two or three layers that show an orthogonal orientation with respect to each other (arrow in Fig. 4d). Each layer of the plywood structure is composed by one row of individual, regularly spaced collagen fibrils (Fig. 4d). The orthogonal array of collagen fibrils is not observed throughout the myoseptal thickness. The regular fibril diameter of about 30 nm remains unchanged. Another remarkable feature is the presence of elongated fibroblast-like cells in the myosepta, surrounded by collagen fibrils (Fig. 4a, c). These cells contain large granular endoplasmic

Fig. 1 Parasagittal section of a 24-hpf zebrafish embryo trunk region. **a** A thin acellular myoseptum (*arrow*) separates two adjacent somites. Myoseptum is in continuity with the primary stroma of the dermis (*star*). **b, c** At this stage, myoseptum (*M*) shows thin and sparse collagen fibrils (*arrowheads*), which are not anchored in basal lamina (*arrow*). A few muscular processes are visible (*asterisks*). Muscle cells (*m*) contain a low number of microfilaments (*arrowhead*) and are delimited by a non-interdigitated sarcolemma (*underlined by dotted lines*). **c** High magnification showing the thin and not completely differentiated basal lamina (*arrow*) and actin filaments (*arrowhead*). **d** Focus on the triangular structure (*star*) that is in continuity with the dermal collagenous stroma and that contains a sparse network of thin collagen fibrils (*arrowheads*)



reticulum attesting for intense protein synthesis activity. These cells could be derived from cells found at the intersection between dermis and myosepta (Fig. 4b). In muscle cells, actin microfilaments from the last Z-line are strongly anchored to sarcolemma (Fig. 4e).

At 2 months, the striking change is the new organisation of collagen fibrils in myosepta, which is at that stage about 3 μm thick (Fig. 5a–d). An evident structural link is observed between muscle cells from adjacent myotomes that are separated by myoseptum, and fibroblasts (Fig. 5c, d). A continuous structural link is formed by collagen fibrils, which orientation is similar that of the myofibrils on sarcolemma at attachment sites (Fig. 5b). At these attachment sites, collagen fibrils (thick dotted lines in Fig. 5b) are anchored to the basement membrane and are parallel to myofilaments (thin dotted lines in Fig. 5b) with which they seem to be in continuity. At the insertion of collagen fibrils to sarcolemma, the basement membrane is thicker and the sarcolemma is highly electron dense. The other extremity of collagen fibrils is often found anchored to the cell membrane of fibroblasts (Fig. 5c). Thus, this particular ECM organisation forms an integrate unit that stabilizes myosepta

structure and that is well-adapted to force transmission from skeletal muscle to myoseptum.

The myosepta observed in 2-year-old zebrafish show a dense ECM composed of about 50-nm collagen fibrils that display an orthogonal orientation (Fig. 5a, e). As observed in 2-month-old zebrafish, collagen fibrils are firmly anchored to the thick basement membrane. Sarcolemma shows regular and deep invaginations at the sites of interaction with myofilaments. The actin microfilaments are inserted into the hollows of invaginations and form the characteristic interdigitations of MTJ (Fig. 5e).

Discussion

In this paper, we described the development sequences of myosepta and MTJ at the electron-microscope level. In zebrafish, the development of myosepta starts concomitantly with the elongation and attachment of muscle cells. The first myoseptal matrix starts to be deposited before the end of segmentation period (data not shown). Together with the first deposited ECM, the first elements of the basement membrane line immature muscle cells. From this initial

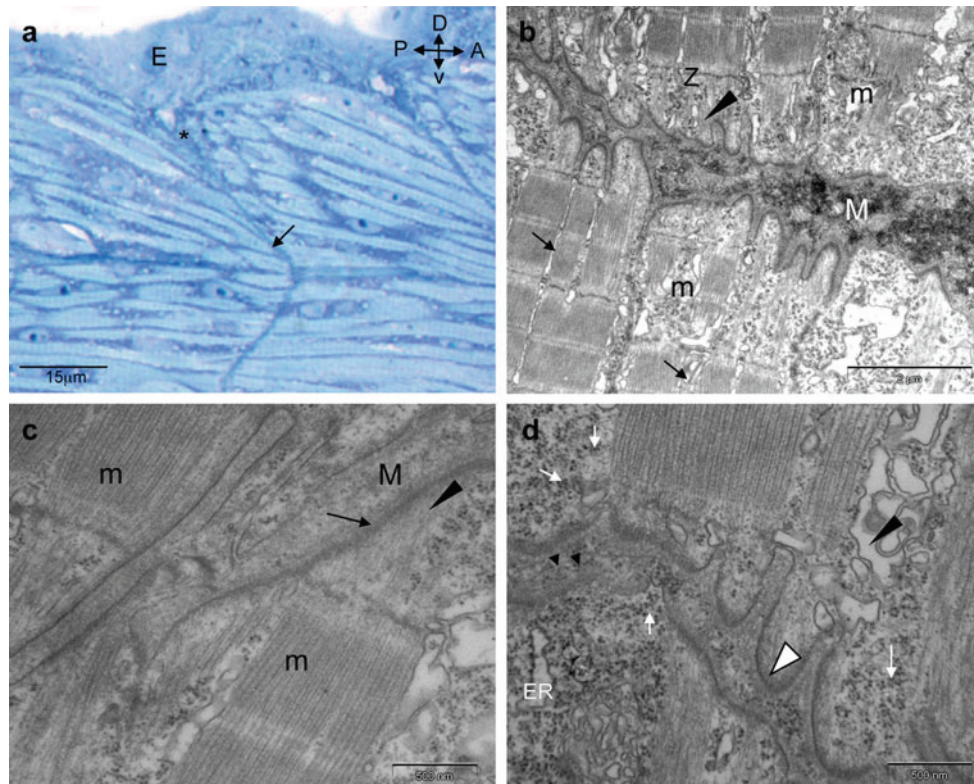


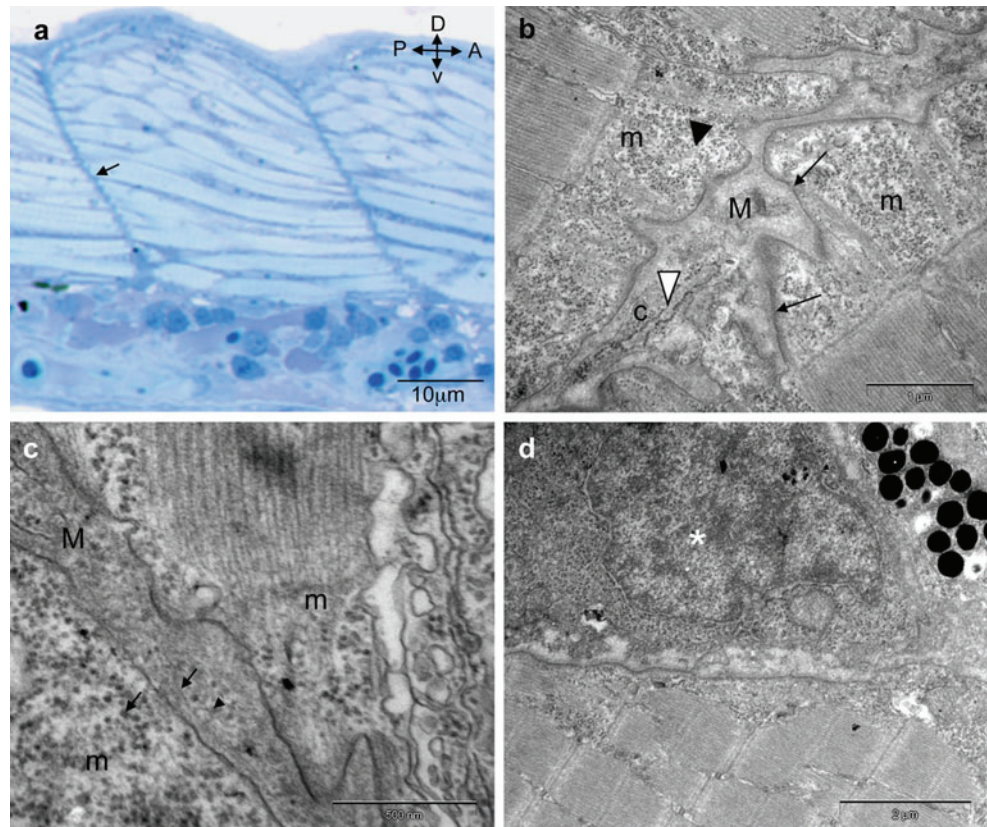
Fig. 2 Parasagittal section in the trunk region of a 48-hpf zebrafish. **a** The V-shaped myoseptum (*arrow*) that separates well-differentiated muscle cells remains acellular (*E*, epidermis). **b** Sarcolemma is folded into finger-like extensions. The 150- to 300-nm-thick myoseptum is electron dense and contains a dense collagen network with no particular orientation. Actin filaments (*arrowhead*) from the last Z-line (*Z*) are anchored perpendicularly or obliquely (**c**) to sarcolemma. **c** Basal lamina (*arrow*) is thick and well differentiated. **d** The actin

filament anchorage regions of sarcolemma are electron dense and look like adhesive joints (*white arrowhead*). Sarcoplasmic reticulum separating each myofibrils is now well developed (*black arrowhead*). Granular endoplasmic reticulum (*ER*) is also observed in muscle cells. Cytoplasmic areas located beneath sarcolemma are rich in polysomes (*white arrow*). Sparse longitudinal and transversal collagen fibrils that show any particular organisation are visible in myosepta (*black arrowheads*)

stage onwards, the following morphological changes have been identified in myosepta and MTJ. During the first 6 days of development, collagen fibrils do not show any particular orientation and the myoseptal matrix is acellular. From the 6th day of development, or some time before, the typical orthogonal arrangement (plywood-like) organisation of the collagen fibrils appears, first near the basement membrane, then throughout the whole myoseptal ECM. Ordered arrays of collagen fibrils have been already reported in teleost skin (Le Guellec et al. 2004), bone (Ascenzi and Bonucci 1968), fish scale (Sire et al. 1987), chick tendon (Birk and Trelstad 1986) and cornea (Trelstad and Coulombre 1971). The mechanism of three-dimensional assembly of collagen molecules is unknown (for review, see Ploetz et al. 1991; Kadler et al. 2008). Physicochemical forces are sufficient to lead to a self-assembly of collagen fibrils as reported in several in vitro studies (Giraud-Guille et al. 2000), but cells that produce ECM can regulate the process of fibrils formation by modification of the spatial and temporal matrix deposition (Holmes et al. 2001; Forgacs et al. 2003; Kadler et al. 2008). In zebrafish, we previously

showed that orthogonal arrangement starts in the upper layer of primary dermal stroma that is acellular until 26 dpf. Therefore, the hypothesis was that epidermal basal cells are responsible for ECM production and can regulate fibril assembly. Several studies have shown a correlation between the cell contractile force and matrix orientation (Wakatsuki and Elson 2003; Kalston et al. 2010). In mammalian tendons, it is known that, in response to the contractile force of the developing muscle during the late fetal and early neonatal period, tenocytes and extracellular components start to align themselves in the direction of applied forces (Kostrominova et al. 2009). It is thus conceivable that, in zebrafish, the contractile force of skeletal muscle cells, to which myoseptal collagen fibrils are anchored, initiate the orthogonal arrangement of myoseptal collagen fibrils. Nevertheless, the orthogonal arrangement of collagen fibrils in the myoseptal stroma is concomitant with the invasion of the primary dermal stroma by fibroblast-like cells, suggesting that fibroblasts may also be responsible for the myoseptal plywood organization of collagen fibrils. In mammalian tendons, it has been shown that collagen fibrils are deposited

Fig. 3 Parasagittal section in the trunk region of a 72-hpf zebrafish. **a** At the optical level, myosepta now appear extremely undulated (*arrow*). **b** Myoseptum (*M*) is enlarged (up to 500 nm thick) and is delimited by deeply invaginated sarcolemma (*arrows*). A high number of polysomes are visible (*black arrowhead*). Cell processes (*c*) that stem from cells located in the triangular regions are observable between collagen fibrils. These cells show dilated granular endoplasmic reticulum (*white arrowhead*) (*m*, muscle cells). **c** High magnification shows a high density of longitudinal (*arrow*) and transversal (*arrowhead*) collagen fibrils (*M*, myoseptum; *m*, muscle cell). At this stage of development, collagen fibrils do not show particular arrangements. **d** Detail of a fibroblast-like cell located in the triangular region (*asterisk*)



during tendinogenesis into cell surface channels that are contiguous from one cell to another (Birk and Trelstad 1985). These cell surface channels called fibripositors are actin-rich plasmamembrane protrusions that contain the narrow collagen fibrils (Canty et al. 2006; Kalston et al. 2010). No fibripositor-like structures were observed in the myoseptal fibroblasts. The mechanism by which fibroblasts may regulate the orientation of collagen fibrils in myosepta is likely close to that in mammalian and chick cornea (Birk and Trelstad 1984) and in zebrafish skin (Le Guellec et al. 2004) in which collagen plywood structures have been described. However, this mechanism remains to be elucidated. It is noteworthy that, as in zebrafish skin, the first sheets of the plywood are composed by one line of collagen fibrils. Later in development, the fibrils are grouped in bundles that are organised into orthogonal array. In corneal stroma, the orthogonal arrangement of collagen fibrils is required for optical transparency. In the same way, this arrangement provides skin transparency in fish. The transparency of the dermis is required for the activity of the pigment cells, most chromatophores being located underneath the collagen fibrils layers. In myosepta, this specific array likely increases the myoseptal mechanical resistance to the contractile forces and appears appropriate to high-speed undulatory locomotion. The first collagen row next to muscle cells is anchored to the sarcolemma through direct or indirect interactions with

transmembrane protein complex that extend from the last Z-line. These strong interaction sites lead to the formation of sarcolemma interdigitations. We showed that skeletal muscle is attached to the myoseptum either perpendicularly or with an obtuse angle that is appropriate to force transmission. This indicates that the mechanical work would go into pulling perpendicularly or obliquely on the myoseptum and causes a displacement or deformation of the structure to which the myoseptal tendon is attached.

We observed that the diameter of collagen fibrils remains constant during at least the first 2 months (about 30 nm), indicating that fibril growth is stabilised. The regulation of the fibril diameter involves multiple factors such as the degree of collagen glycosylation, procollagen processing, collagen/proteoglycan interaction and heterotypic collagen interactions (Kadler et al. 2008). The increase of collagen fibril diameter occurs after 2 months post-fertilization, so much later than in skin in which change in diameter is visible from the 26th day of development (Le Guellec et al. 2004). This suggests that the regulation of the collagen fibril diameter and the composition of ECM are different in myosepta compared to the skin. The knowledge of the composition of ECM in myosepta is still rudimentary. Collagen I, laminin and tenascin C have been detected in transverse myosepta (Morvan-Dubois et al. 2002; Parsons et al. 2002; Weber et al. 1998). Collagen I is probably the

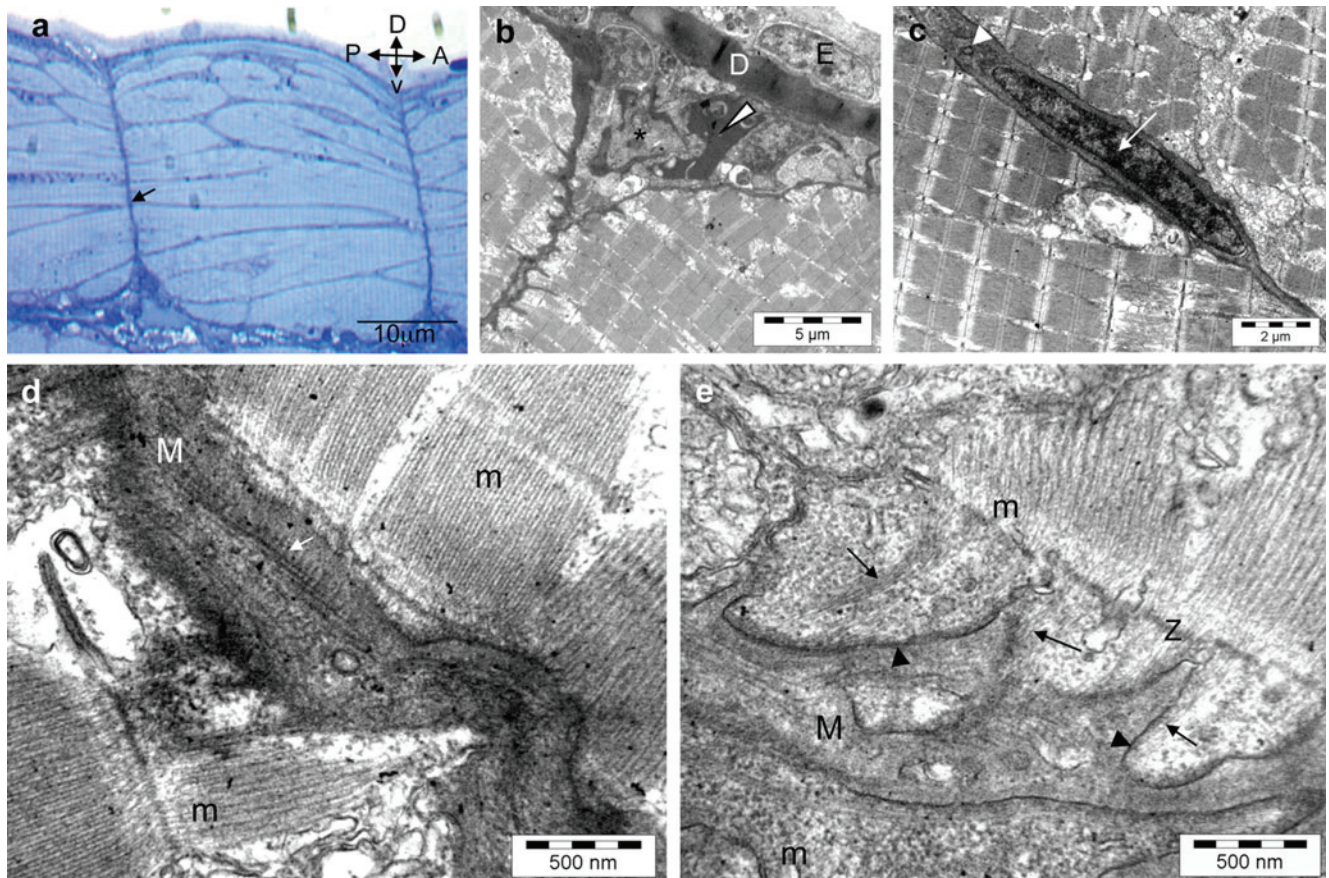


Fig. 4 Parasagittal section at the trunk level of a 6-dpf zebrafish. **a** At this stage of development, myosepta are thicker compared to the previous stage and are invaded by fibroblast-like cells (*arrow*). **b** Detail of the triangular region showing cell (*asterisk*) at the interface between dermis and myoseptum, and blood vessel (*white arrowhead*) (*D*, dermis; *E*, epidermis). **c** From 6 dpf, an elongated fibroblasts-like

cell (*white arrow*) that has invaded the myoseptal stroma. The cell presents dilated granular endoplasmic reticulum (*white arrowhead*). **d** The orthogonal arrangements of collagen fibrils (*arrow*) represent the main feature of this stage. **e** Actin microfilaments (*arrows*) from the last Z-line (*Z*) are strongly anchored to sarcolemma (*arrowhead*)

major collagen in myosepta. The fact that myosepta are acellular during the initial stages of development raises the question of the origin of the myoseptal matrix. Two different types of cells can deposit extracellular components, muscle cells and cells located in the triangular regions, which extend cell processes in myosepta. The matrix remains acellular during the first 4–6 days of development. At day 6, the matrix is invaded by fibroblasts-like cells. The stromal origin of these cells is still unclear. Based on our observations, the likely hypothesis is that they derived from the cells located in the triangular regions where myosepta and skin are interconnected. We can thus speculate that ECM proteins are synthesized in cell bodies located in the triangular region, transported via the cytoplasmic processes, and secreted in the extracellular space. However, muscle cells also synthesize ECM proteins, which are deposited at the MTJ. For example, it has been shown that periostin (Kudo et al. 2004) and collagen XXII (Charvet et al., submitted) were expressed in developing muscle

cells. However, the tetrapod tendon marker collagen XII has been recently described in zebrafish; its expression by fibroblasts in somite boundaries was attested by in situ hybridization. Together with previous work, the recent description of this tendon marker in developing zebrafish confirms that most of the ECM tendon markers are present in zebrafish myosepta (Bader et al. 2009). Zebrafish myoseptal region certainly concentrates a number of other ECM components. Interestingly, fibronectin appears to be regulated as somites differentiate (Crawford et al. 2003) Fibronectin, which is highly expressed in somite boundaries at the 20 somites stage, is down-regulated concomitantly to the slow-twitch fibres migration whereas laminin level remains constant (Snow and Henry 2009). This suggests that the composition of the microenvironment of myosepta is important for its biomechanical properties and function but can also directly influence myogenesis. From the 6th day of development, we observed that collagen fibres are regu-

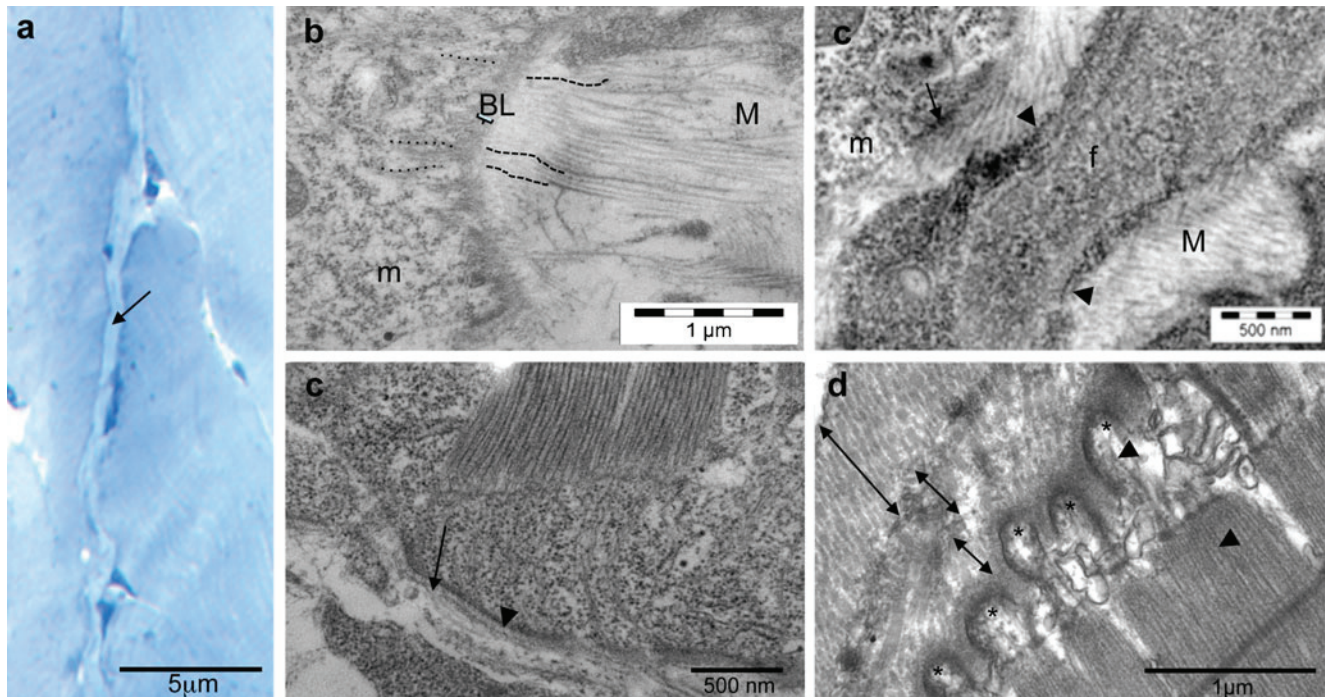


Fig. 5 Morphology of the myotendinous junction in zebrafish 2 months (**b–d**) and 2 years (**a, e**) old. **a** Two-year-old zebrafish shows 3- μ m-thick myosepta (*arrow*) with flattened fibroblast-like cells inside. **b** Collagen fibrils (*thick dotted lines*) close to the basement membrane (*BL*) are strongly anchored perpendicularly to sarcolemma and establish an evident structural link with intracellular microfilaments (*thin dotted lines*), which seem to be in continuity with collagen fibrils (*m*, muscle cell; *M*, myosepta). **c** A link is established between muscle cells (*m*) and fibroblast-like cells (*f*) through interactions of collagen fibrils with both sarcolemma (*arrow*) and

fibroblast cell membrane (*arrowhead*) (*M*, myoseptum). **d** The myotendinous junction shows a dense basement membrane with fibrillar components visible in the lamina lucida (*arrow*) and an electron-dense sarcolemma (*arrowhead*). **e** The 2-year-old zebrafish myosepta show regular electron-dense sarcolemmal invaginations (*) at the sites of interaction with actin microfilaments (*arrowheads*). Note that the actin microfilaments are inserted in the hollows of invaginations. The myoseptal stroma is characterized by a plywood-like organization (*arrows*)

larly spaced. We can speculate that molecules such as proteoglycans, tensilin (Tipper et al. 2002; Tamori et al. 2006) or collagen XII (Bader et al. 2009) fill the empty spaces between collagen fibres, and play significant functional roles in transferring stress between adjacent fibrils. Along this line, it has been reported that collagen XII is part of a protein complex linking collagen fibrils through multiple interactions with proteoglycans and tenascin. The formation of this supramolecular network was suggested to play a role in biomechanical properties of tissues (Veit et al. 2006).

In conclusion, the important steps of the transverse myoseptum development leading to the formation of a functional myotendinous junction can be summarized as follow (Fig. 6):

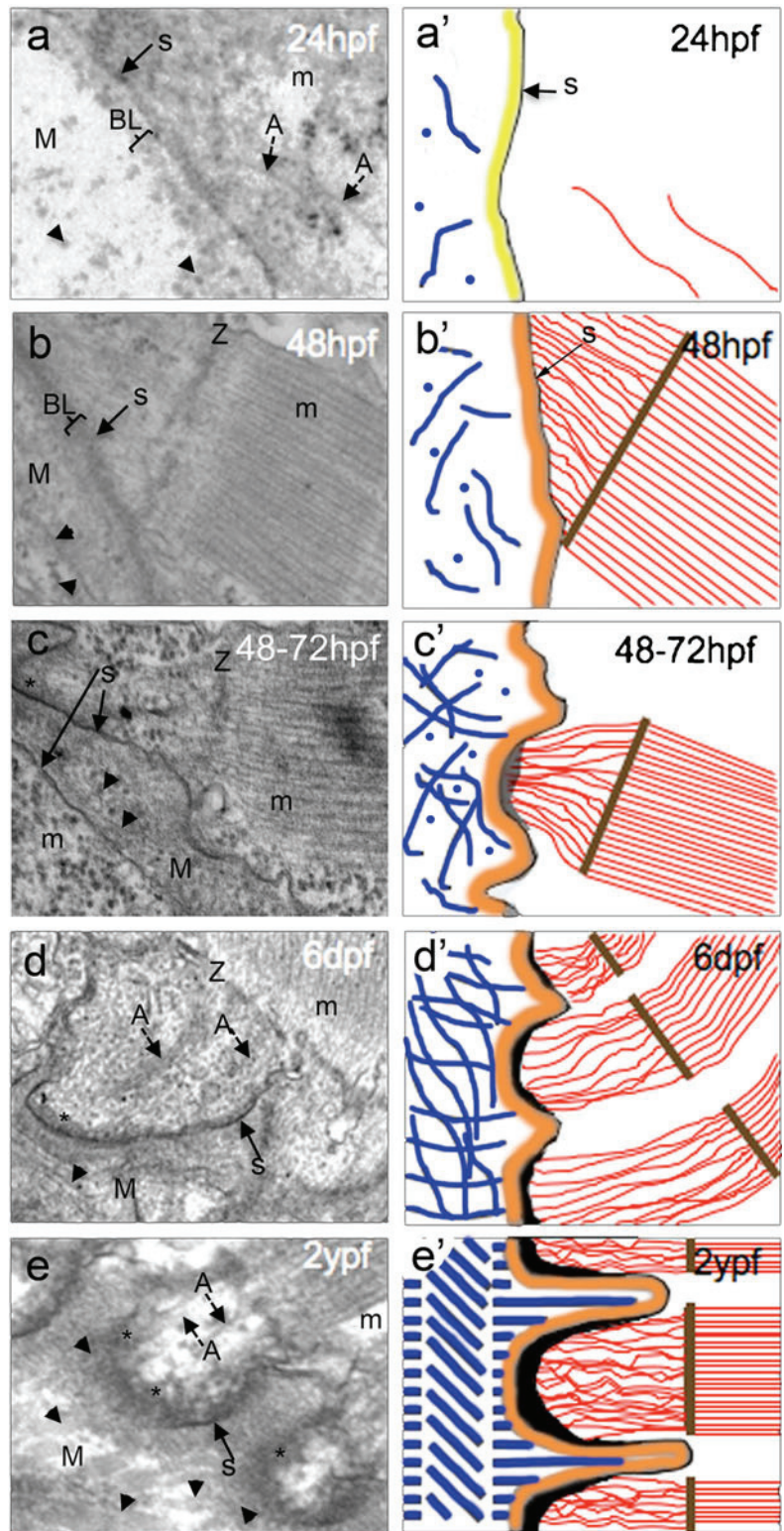
1- During the segmentation period, concomitantly with the myofibrillogenesis, the components of ECM are deposited in the future myosepta formed by sparse, loosely organised collagen fibrils. ECM and muscle cells are separated by a discontinuous basal lamina (Figs. 1c and 6a, a').

2- During the hatching period, actin filaments of the last Z-line link to sarcolemma. A dense and uninterrupted basal lamina is now well differentiated and collagen fibrils are more abundant in acellular myosepta (Figs. 2d and 6b, b', c, c'). At this stage, the MTJ is not fully differentiated and appears fragile.

3- A functional MTJ is formed following the orthogonal arrangement of collagen fibres, the solid direct or indirect interactions between collagen fibres and sarcolemma proteins including dystroglycan complex, which interacts with actin myofilaments (Figs. 3d, e and 6d, d', e, e'). Then, the two MTJ that delimit each myoseptum co-ordinate mechanical force between adjacent muscle cells.

This work represents the first atlas of the myotendinous development. Although the origin of myoseptal fibroblasts and the molecular composition of the myoseptal matrix are not fully elucidated, the use of zebrafish as model for muscular disorders makes this atlas a useful tool for phenotype analysis of mutants which display dystrophic phenotype.

Fig. 6 Interpretative drawings of the various steps of the myotendinous junction development drawn from light and TEM micrographs of parasagittal sections of zebrafish myosepta from 24 hpf to adult. In drawings, collagen fibrils (*arrowheads*) in myoseptum (*M*) are in blue, basal lamina (*BL*) is in yellow or orange, Z line (*Z*) is in brown, actin microfilaments (*A* with *dot-dotted arrow*) are in red, and sarcolemma (*S* with *arrow*) of muscle cells (*m*) and sub-sarcolemmal area (*) are in grey or in black. **a, a'** First deposition of collagen fibrils in the primary myoseptal stroma concomitantly with the myofibrillogenesis. Basal lamina surrounding muscle cell is discontinuous. **b, b'** Actin microfilaments from the last Z-line link to sarcolemma. Basal lamina surrounding muscle cell is well differentiated. Collagen fibrils are more numerous, sparse and randomly organised. Myoseptum is acellular. **c, c'** Sarcolemma shows extensions and invaginations to which actin microfilaments are anchored. The sub-sarcolemmal area is electron-dense. Longitudinal and transversal collagen fibrils in myosepta do not yet interact with sarcolemma. **d, d'** The myoseptal stroma is now organised as a dense, regularly-spaced network of collagen fibrils. Organisation of collagen fibrils in a plywood structure starts to be visible. Fibroblast-like cells invade the myoseptal stroma. **e, e'** A functional MTJ characterized by the orthogonal arrangement of collagen fibrils, the interactions between collagen fibrils and sarcolemma, which itself interact with actin microfilaments, is formed



- Discontinuous basement membrane
- Mature basement membrane
- Actin microfilaments
- Slight densification of the sub-sarcolemmal area
- Sarcolemma and electron dense sub-sarcolemmal area
- Z line
- Collagen fibrils

Acknowledgment We thank L. Bernard (PRECI, IFR 128 Biosciences Gerland, Lyon) for fish maintenance and helpful advice.

References

- Ascenzi A, Bonucci E (1968) The compressive properties of single osteons as a problem of molecular biology. *Calcif Tissue Res Suppl*: 44–44a
- Bader HL, Keene DR, Charvet B, Veit G, Driever W, Koch M, Ruggiero F (2009) Zebrafish collagen XII is present in embryonic connective tissue sheaths (*fascia*) and basement membranes. *Matrix Biol* 28:32–43
- Birk D, Trelstad RL (1984) Extracellular compartments in matrix morphogenesis: collagen fibril, bundle, and lamellar formation by corneal fibroblasts. *J Cell Biol* 99:2024–2033
- Birk D, Trelstad RL (1985) Fibroblasts create compartments in the extracellular space where collagen polymerizes into fibrils and fibrils associate into bundles. *Ann NY Acad Sci* 460:258–266
- Birk D, Trelstad RL (1986) Extracellular compartments in tendon morphogenesis: collagen fibril, bundle, and macroaggregate formation. *J Cell Biol* 103:231–240
- Câmara-Pereira ES, Campos LM, Vanier-Santos MA, Mermelstein CS, Costa ML (2009) Distribution of cytoskeletal and adhesion proteins in adult zebrafish skeletal muscle. *Histol Histopathol* 24:187–196
- Canty EG, Starborg T, Lu Y, Humphries SM, Homes DF, Meadows RS, Huffman A, O'Toole ET, Kadler KE (2006) Actin filaments are required for fibropositor-mediated collagen fibril alignment in tendon. *J Biol Chem* 281:38592–38598
- Costa ML, Escalera RC, Jazenko F, Mermelstein CS (2008) Cella adhesion in zebrafish myogenesis: distribution of intermediate filaments, microfilaments, intracellular adhesion structures and extracellular matrix. *Cell Motil Cytoskeleton* 65:801–815
- Crawford BD, Henry CA, Clason TA, Becker AL, Hille MB (2003) Activity and distribution of paxillin, focal adhesion kinase, and cadherin indicate cooperative roles during zebrafish morphogenesis. *Mol Biol Cell* 14:3065–3081
- Devoto SH, Melançon E, Eisen JS, Westerfield M (1996) Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development* 122:3371–3380
- Dolez M, Nicolas JF, Hirsinger E (2011) Laminins, vi heparin sulfate proteoglycans, participate in zebrafish myotome morphogenesis by modulating pattern of Bmp responsiveness. *Development* 138:97–106
- Forgacs G, Newman SA, Hinner B, Maier CW, Sackmann E (2003) Assembly of collagen matrices as a phase transition revealed by structural and rheologic studies. *Biophys J* 84:1272–1280
- Gawlik KI, Mayer U, Blomberg K, Sonnenberg A, Ekblom P, Durbej M (2006) Laminin alpha1 chain mediated reduction of laminin alpha2 chain deficient muscular dystrophy involves integrin alpha7beta1 and dystroglycan. *FEBS Lett* 580:1759–1765
- Gemballa S, Vogel F (2002) Spatial arrangement of white muscle fibers and myoseptal tendons in fishes. *Comp Biochem Physiol* 133A:1013–1037
- Gemballa S, Ebmeyer L, Hagen K, Hoja K, Treiber K, Vogel F, Weitbrecht GW (2003) Evolutionary transformations of myoseptal tendons in gnathostomes. *Proc R Soc Lond B* 270:1229–1235
- Giraud-Guille MM, Besseau L, Chopin C, Durant P, Herbage D (2000) Structural aspects of fish skin which forms ordered arrays via liquid crystalline states. *Biomaterials* 21:899–906
- Guyon R, An M, Zhou Y, O'Brien KF, Sheng X, Chiang K, Davidson AJ, Volinski JM, Zon LI, Kunkel LM (2003) The dystrophin associated protein complex in zebrafish. *Hum Mol Genet* 12:601–615
- Henry CA, Amacher SL (2004) Zebrafish slow muscle cell migration induces a wave of fast muscle morphogenesis. *Dev Cell* 7:917–923
- Henry CA, Crawford BD, Yan YL, Postlethwait J, Cooper MS, Hille MB (2001) Roles for zebrafish focal adhesion kinase in notochord and somite morphogenesis. *Dev Biol* 240:474–487
- Holmes DF, Gilpin CJ, Baldock C, Ziese U, Koster AJ, Kadler KE (2001) Corneal collagen fibril structure in three dimensions: structural insights into fibril assembly, mechanical properties, and tissue organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7307–7312
- Jacoby AS, Busch-Nentwich E, Bryson-Richardson RJ, Hall TE, Berger J, Berger S, Sonntag C, Sachs C, Geisler R, Stemple DL, Currie PD (2009) The zebrafish dystrophic mutant softy maintains muscle fibre viability despite basement membrane rupture and muscle detachment. *Development* 136:3367–3376
- Kadler KE, Hill A, Canty-Laird (2008) Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol* 20:495–501
- Kalston NS, Holmes DF, Kapacee Z, Otermin I, Lu Y, Ennos RA, Canty-Laird EG, Kadler KE (2010) An experimental model for studying the biomechanics of embryonic tendon: evidence that the development of mechanical properties depends on the actinomyosin machinery. *Matrix Biol* 29:678–689
- Kostrominova TY, Clave S, Arruda EM, Larkin LM (2009) Ultrastructure of myotendinous junctions in tendon-skeletal muscle constructs engineered in vitro. *Histol Histopathol* 24:541–550
- Kudo H, Amizuka N, Araki K, Inohaya K, Kudo A (2004) Zebrafish periostin is required for the adhesion of muscle fiber bundles to the myoseptum and for the differentiation of muscle fibers. *Dev Biol* 267:473–87
- Latimer A, Jessen JR (2010) Extracellular matrix assembly and organization during zebrafish gastrulation. *Matrix Biol* 29:89–96
- Le Guellec D, Morvan-Dubois G, Sire JY (2004) Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int J Dev Biol* 48:217–231
- Morvan-Dubois GM, Haftek Z, Crozet C, Garrone R, Le Guellec D (2002) Structure and spatio-temporal expression of the full length DNA complementary to RNA coding for alpha2 type I collagen of zebrafish. *Gene* 294:55–65
- Parsons MJ, Campos I, Hirst EM, Stemple DL (2002) Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development* 129:3505–3512
- Ploetz C, Zycband EI, Birk DE (1991) Collagen fibril assembly and deposition in the developing dermis: segmental deposition in extracellular compartment. *J Struct Biol* 106:73–81
- Pollard SM, Parsons MJ, Kamei M, Kettleborough RN, Thomas KA, Pham VN, Bae MK, Scott A, Weinstein BM, Stemple DL (2006) Essential and overlapping roles for laminin alpha chains in notochord and blood vessel formation. *Dev Biol* 289:64–76
- Sire JY, Géraudie J, Meunier FJ, Zylberberg L (1987) On the origin of ganoine: histological and ultrastructural and ultrastructural data on the experimental regeneration of the scales of *Calamoichthys calabaricus* (*Osteichthyes, Brachyopterygii, Polypteridae*). *Am J Anat* 180:391–402
- Snow CJ, Henry CA (2009) Dynamic formation of microenvironments at the myotendinous junction correlates with muscle fiber morphogenesis in zebrafish. *Gene Expr Patterns* 9:37–42
- Snow CJ, Peterson MT, Khalil A, Henry CA (2008) Muscle development is disrupted in zebrafish embryos deficient for fibronectin. *Dev Dyn* 237:2542–2553
- Summers AP, Koob TJ (2002) The evolution of tendon. *Comp Biochem Physiol* 133:1159–1170
- Tamori M, Yamada A, Nishida N, Motobayashi Y, Oiwa K, Motokawa T (2006) Tensilin-like stiffening protein from *Holothuria*

- leucospilota* does not induce the stiffest state of catch connective tissue. *J Exp Biol* 209:1594–1602
- Tipper JP, Lyons-Levy G, Atkinson MA, Trotter JA (2002) Purification, characterization and cloning of tensilin, the collagen-fibril binding and tissue-stiffening factor from *Cucumaria frondosa* dermis. *Matrix Biol* 21:625–635
- Tongiorgi E (1999) Tenascin-C expression in the trunk of wild-type, cyclops and floating head zebrafish embryos. *Brain Res Bull* 48:79–88
- Trelstad RL, Coulombre AJ (1971) Morphogenesis of the collagenous stroma in chick cornea. *J Cell Biol* 50:840–858
- Veit G, Hansen U, Keene DR, Bruckner P, Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M, Koch M (2006) Collagen XII interacts with avian tenascin-X through its NC3 domain. *J Biol Chem* 281:27461–27470
- Wakatsuki T, Elson EL (2003) Reciprocal interaction between cells and extracellular matrix during remodeling of tissue constructs. *Biophys Chem* 10:593–605
- Weber P, Montag D, Schachner M, Bernhardt RR (1998) Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family. *J Neurobiol* 35:1–16

Annexe 3

Bien que n'ayant pas de lien thématique direct avec mon projet de thèse, j'ai tenu à faire figurer dans cette annexe cet article dont je suis co-auteur. En effet, il manquait aux résultats de nos collaborateurs, des preuves *in vivo* des propriétés de LOXL2 observées en système cellulaires, et c'est dans cette démarche qu'ils ont fait appel à notre laboratoire pour effectuer ces recherches. Ma responsable d'équipe m'a alors confié l'intégralité de ce travail que j'ai conduit en complète autonomie et qui a constitué une étape clé dans l'évolution de mes responsabilités dans l'équipe et plus généralement dans l'évolution de mon travail de recherche.

Résumé : Le processus d'angiogenèse est associé à un remodelage important de la matrice extracellulaire (MEC). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la reconstruction du microenvironnement vasculaire et leurs impacts sur la formation des capillaires restent méconnus. Nos collaborateurs ont donc réalisé une analyse protéomique différentielle à partir d'extraits de la MEC produite par des cellules endothéliales maintenues en normoxie ou en hypoxie, inducteur majeur de l'angiogenèse. Leurs études ont permis de proposer l'enzyme lysyl-oxydase-like 2 (LOXL2) comme une cible de l'hypoxie. LOXL2 est en effet exprimée dans les vaisseaux en formation et accumulée dans la MEC des cellules endothéliales. LOXL2 appartient à la famille des lysyl oxydases sécrétées et impliquées dans le remodelage et la stabilité de la MEC. J'ai donc été sollicitée par nos collaborateurs, pour apporter des preuves *in vivo* des propriétés de LOXL2 observées en système cellulaires. Pour cela, j'ai utilisé la stratégie anti-sens utilisant les morpholinos et la lignée transgénique *fli1:egfp* permettant de visualiser la formation des vaisseaux au cours du développement embryonnaire du poisson. Les analyses des morphotypes par imagerie ont permis de montrer que l'absence de LOXL2 dans les stades embryonnaires de développement du poisson zèbre conduit à des défauts de circulation sanguine et affecte plus particulièrement les vaisseaux inter-segmentaires. Mes travaux ont également montré que LOXL2 est nécessaire à une formation correcte des capillaires. Ces résultats ont été renforcés par les résultats obtenus *in vitro* par nos collaborateurs, montrant par des expériences de perte et de gain de fonction que LOXL2 est indispensable à la tubulogenèse et que cette enzyme est requise pour l'assemblage du collagène IV, composant essentiel des lames basales entourant les cellules endothéliales des vaisseaux. De plus, l'absence de LOXL2 diminue la migration et la prolifération cellulaire.

L'ensemble de nos résultats a permis de démontrer le rôle majeur de LOXL2 dans la régulation de la formation des vaisseaux sanguins en orchestrant l'assemblage de la lame basale nécessaire à la maturation des vaisseaux. De plus, nos expériences montrent que le domaine catalytique de LOXL2 ne semble pas responsable de cette fonction.

Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane

*Marine Bignon,¹⁻³ *Cathy Pichol-Thievend,¹⁻³ †Julie Hardouin,⁴ †Marilyne Malbouyres,⁵ Nicolas Bréchet,¹⁻³ Luiz Nasciutti,¹⁻³ Alain Barret,¹⁻³ Jérémie Teillon,¹⁻³ Emilie Guillon,⁵ Eric Etienne,¹⁻³ Michel Caron,⁴ Raymonde Joubert-Caron,⁴ Catherine Monnot,¹⁻³ Florence Ruggiero,⁵ Laurent Muller,¹⁻³ and Stéphane Germain¹⁻³

¹College de France, Center for Interdisciplinary Research in Biology, Paris, France; ²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 7241, Paris, France; ³Inserm U1050, Paris, France; ⁴Laboratoire de Biochimie des Protéines et Protéomique, UMR CNRS 7033, Université Paris 13, Bobigny Cedex, France; and ⁵Institut de Génomique Fonctionnelle, ENS-Lyon, UMR CNRS 5242, Université de Lyon, Lyon Cedex, France

Sprouting angiogenesis is associated with extensive extracellular matrix (ECM) remodeling. The molecular mechanisms involved in building the vascular microenvironment and its impact on capillary formation remain elusive. We therefore performed a proteomic analysis of ECM from endothelial cells maintained in hypoxia, a major stimulator of angiogenesis. Here, we report the characterization of lysyl oxidase-like protein-2 (LOXL2) as a hypoxia-target expressed in neovessels

and accumulated in the endothelial ECM. LOXL2 belongs to the lysyl oxidase family of secreted enzymes involved in ECM crosslinking. Knockdown experiments in *Tg(fli1:egfp)y1* zebrafish embryos resulted in lack of intersegmental vessel circulation and demonstrated LOXL2 involvement in proper capillary formation. Further investigation in vitro by loss and gain of function experiments confirmed that LOXL2 was required for tubulogenesis in 3D fibrin gels and demonstrated

that this enzyme was required for collagen IV assembly in the ECM. In addition, LOXL2 depletion down-regulated cell migration and proliferation. These data suggest a major role for LOXL2 in the organization of endothelial basal lamina and in the downstream mechanotransductive signaling. Altogether, our study provides the first evidence for the role of LOXL2 in regulating angiogenesis through collagen IV scaffolding. (*Blood*. 2011;118(14):3979-3989)

Introduction

Angiogenesis occurs during development and tissue remodeling, and in the pathologic context of cardiovascular ischemic diseases or tumor growth. Sprouting of new vessels is initiated by stimulation of endothelial cells (ECs) by a combination of signals from the microenvironment that includes oxygen tension and growth factors. Cells from not yet vascularized tissue and ECs that invade this microenvironment are both hypoxia targets through the Hypoxia Inducible Factor (HIF) pathway. HIF activates transcription of genes coding for autocrine/paracrine factors like vascular endothelial growth factor (VEGF) and extracellular matrix (ECM) components.¹ Synergy between these responses is assumed through local concentration of growth factors in the ECM where they function as attractant for ECs. Specialized ECs, called tip cells, lead vascular growth by sending out filopodia to explore the hypoxic microenvironment.² Tip cells are thus continuously exposed to low oxygen concentration.³ Stalk cells, located behind the tip cells, serve to vessel growth by proliferation, lumen formation and junction establishment.⁴

Vascular ECM undergoes major remodeling during angiogenesis, consisting in ECM/basement membrane degradation, provisional ECM generation and assembly of a new basement membrane. ECM-mediated mechanotransductive signaling regulates 3D multicellular organization, including lumen formation and tubulogenesis. Thus, in addition to storing angiogenic factors and providing structural features, ECM is a dynamic promoter of

angiogenesis.⁵ Subendothelial basement membrane is composed of nonfibrillar collagen IV, laminin, perlecan and nidogens. Other collagens (VIII, XV, and XVIII), fibronectin and matricellular proteins (thrombospondin-1, Cyr61) are associated with the basement membrane. There is only little data concerning the assembly of the vascular microenvironment and its impact on angiogenesis. Genes encoding ECM components and enzymes involved in their assembly and stabilization are targets of hypoxia in ECs.¹ To identify key regulators of the angiogenesis-associated ECM remodeling, we performed a proteomic analysis of endothelial ECM generated in vitro under hypoxic conditions. We found that the ECM cross-linking enzyme, lysyl oxidase-like protein-2 (LOXL2) is a major target of hypoxia. Lysyl oxidases, consisting in lysyl oxidase (LOX) and 4 lysyl oxidase-like proteins (LOXL 1 to 4), catalyze the deamination of lysines and hydroxylysines, generating aldehydes that spontaneously react to form covalent cross-links.^{6,7} These secreted enzymes are characterized by a conserved C-terminal catalytic domain that contains the lysyl tyrosyl quinone cofactor and the copper-binding site. The N-terminal part is specific to each member and is thought to confer partner and/or substrate specificity.⁶ Deletion of *lox* or *lox1l* gene leads to vascular defects.^{8,9} *Lox1l* knockout only affects elastogenesis, whereas *lox* knockout phenotype is more severe, consisting in perinatal lethality because of aortic rupture caused by defects in both elastin and fibrillar collagen organization.

Submitted October 13, 2010; accepted July 19, 2011. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, August 11, 2011; DOI 10.1182/blood-2010-10-313296.

*M.B. and C.P.-T. contributed equally to this article.

†J.H. and M.M. contributed equally to this article.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2011 by The American Society of Hematology

LOXL2 expression profile has not been characterized in detail and its physiologic role remains unresolved.⁶ Its expression is up-regulated in several pathologic contexts, and its involvement in fibrosis and cancer has been shown.¹⁰⁻¹³ LOXL2 was identified in EC in vitro,¹⁴ but its role in vascular cells has yet to be determined. Considering its activity as an ECM cross-linking enzyme and the importance of microenvironment stiffness and ECM assembly in 3D multicellular organization,¹⁵ we investigated the impact of LOXL2 on angiogenesis. Knocking down its expression in zebrafish embryo prevented formation of intersegmental vessels (ISV). Similarly, capillary formation in 3D fibrin gel was impaired by LOXL2 depletion. These effects were mediated by the regulation of collagen IV assembly in the vascular ECM and of EC migration and proliferation.

Methods

Antibodies, reagents, and oligonucleotide sequences

Detailed information is provided in supplemental Methods (available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were prepared and grown as previously described.¹⁶ Human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) were purchased from Clonetics. Experiments were performed between passages 2 and 5. Normal dermal human fibroblasts were purchased from Promocell. In some experiments, cells were incubated in hypoxia (1% O₂) or with 500 μM β-aminopropionitrile (β-APN).

Expression vector, lentivirus, siRNA, and shRNA tools

Human *lox12* cDNA was purchased from Origene and cloned in pcDNA3.1 (Invitrogen) for transient overexpression using a nucleofector device (Amaxa). *Loxl2* cDNA was cloned in pLenti6/V5-DEST using the Gateway LR Clonase™ II (Invitrogen). Plasmids coding for shRNA were purchased from Sigma-Aldrich. Lentivirus production was performed using either ViralPower lentiviral expression system (Invitrogen) or Mission lentiviral Packaging Mix (Sigma-Aldrich). ECs isolated from 1 umbilical cord were split in 2 and infected before the first passage with control or LOXL2 targeting lentivirus. Infections were repeated on HUVECs from 3 different cords. Cells were selected with either blasticidin (5 μg/mL) or puromycin (0.5 μg/mL).

Mouse model of hindlimb ischemia

Unilateral critical ischemia was generated by ligation of epigastric artery and excision of the femoral artery in C57BL/6 mice (Charles River) as previously described.¹⁷ This study conforms to the standards of Inserm regarding the care and use of laboratory animals, in accordance with European Union Council Directives (86/609/EEC) and was approved by the institutional research ethics committee IDF - Paris - Comité 1 (2008004).

Zebrafish experiments

General maintenance of zebrafish was carried out according to common practices at 28°C. Morpholino oligonucleotides designed complementary to the sequence near the start of translation (Gene Tools) or human *lox12* mRNA were microinjected into one to 2-cell stage embryos in 1× Danieau buffer. Embryos were mounted in 1% agarose and anesthetized with 0.01% Tricaine. Morphology and blood circulation were analyzed with a Leica stereoscope. GFP-expressing ECs were visualized in *Tg(fli1:egfp)*^{y1} zebrafish with a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems). Stacks of 20-30 focal planes were processed with MetaMorph. In some experiments 10mM β-APN (Sigma-Aldrich) was added in egg water.

Immunohistochemistry, immunofluorescence, and in situ hybridization

For whole mount staining, eyes were fixed in 4% PFA and retinas were dissected and stained as previously described.¹⁸ For immunohistochemistry, eyes were embedded in cryoblock medium (Labonord) on dry ice. Eye and sections were incubated with anti-LOXL2 before fixation with acetone and further processing with secondary antibodies. Immunohistochemistry and in situ hybridization of mouse *tibialis anterior* muscles was performed as described.^{17,19} For immunofluorescence, cells seeded on coverslips were fixed with cold methanol.²⁰ Coverslips were mounted in Mowiol containing DAPI or TO-PRO-3 as nuclear stains. Images were acquired with a Leica DMLB microscope equipped with a Qicam camera or a Leica TCS SP5 confocal microscope.

Protein extraction and immunoblotting

Confluent ECs grown for 5 days were detached on ice by sequential incubation with 10mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 10mM EDTA, and the same solution containing 0.2% Triton-X100. ECM proteins were extracted in Laemmli buffer. Proteins from overnight serum-free secretion medium were TCA-precipitated before treatment with Laemmli buffer. Mouse frozen tissues were lysed in 2% SDS, 20mM Tris pH 6.8, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM DTT, and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Zebrafish embryos were lysed in 25mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% DOC, 0.5% NP40, and protease inhibitor cocktail, centrifuged for 30 minutes at 15 000g. Supernatants and pellets were both treated with Laemmli buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Immunologic detection was performed with alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies, using AttoPhos (Promega) as a substrate. Quantification was done with an FX Pro+ PhosphorImager and QuantityOne 4.6 software (Bio-rad).

RT-PCR analysis

RNA was extracted from cells or tissues using Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel) or Trizol (Invitrogen), respectively. Reverse transcription was carried out using Superscript II Reverse transcriptase with random hexamers (Invitrogen). Band intensity was quantified using QuantityOne (Bio-Rad). For RT-qPCR, cDNA were amplified using an iQ SYBR green supermix (Bio-Rad) and an iCycler equipped with a MyiQ optical module (Bio-Rad).

LOXL2 activity assay

Lysyl oxidase activity was determined using 1,5-diaminopentane as a substrate in a fluorescent assay previously described.²¹ Lysyl oxidase activity was calculated as the difference between the total amine oxidase activity and the activity measured in the presence of 500 μM β-APN.

2D motility assays and time-lapse microscopy

HUVEC motility was analyzed by time-lapse videomicroscopy in 12-well plates coated with 10 μg/mL fibronectin, in the presence of 10 ng/mL of VEGF and bFGF. Eight fields per well were randomly chosen and images were acquired every 5 minutes over the following 12 hours with a Leica DMIRBE microscope in a Life Imaging Services incubator. Motility was measured using MetaMorph 7.7 software (Molecular Devices).

3D migration and tube formation assays

Three-dimensional fibrin gel assays were carried out as previously described.²² Briefly, HUVECs were seeded either on Cytodex beads (GE Healthcare) 24 hours before embedding in a 2.5 mg/mL fibrin gel or directly in the gel. Fibroblasts were plated on top of the gel and incubated in complete medium containing 10 ng/mL bFGF. For time-lapse video microscopy, images were acquired every 20 minutes for 16 hours with the Leica DMIRBE microscope. Tube length was measured using MetaMorph.

Proliferation assay

HUVECs infected with lentivirus coding for control or *lox* or *lox2* shRNA were plated in 96-well plates and cultured in 0.5% FBS during 24 hours, before stimulation with 5% FBS for 48 hours. Total DNA content was quantified using CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen).

Statistics

Statistical evaluation of data was performed with the Mann-Whitney *U* test for expression analyses and with the Student *t* test for tube formation and migration analyses.

Results

Hypoxia induces endothelial ECM assembly and up-regulates LOXL2

Angiogenesis-associated ECM remodeling was assessed during vascularization of mouse retina, which extends from the optic nerve head to reach the periphery at postnatal day 7 (P7). Endothelial tip cells migrate toward a hypoxic environment in response to VEGF secreted by astrocytes.^{2,3} Immunostaining of collagen IV and fibronectin was performed at P5. At the vascular front, collagen IV was only detected in ECs, both as intracellular staining and in the basement membrane, except at sites of filopodia protrusion (Figure 1A). Fibronectin was detected both associated with ECs and in the avascular zone (Figure 1A). This latter staining corresponds to fibronectin deposited by astrocytes. Tip cell filopodia extend along this fibronectin network. Differences in the pattern and intensity of endothelial and astrocytic fibronectin indicated its fibrillogenesis and remodeling by ECs. Tip cells are thus involved in both de novo synthesis and assembly of basement membrane and reorganization of the preexisting ECM.

To gain insight into ECM remodeling in hypoxia, we characterized collagen IV and fibronectin deposition by ECs in vitro. Assembly of both proteins was increased by hypoxia as a dense fibrillar network (Figure 1B). Similar results were obtained for collagen XVIII,²³ and with both HUVECs and HDMECs (M.B., L.N., and L.M., unpublished data, August 2006). Hypoxia is thus sufficient for stimulating ECM synthesis and assembly as observed during retina vascularization. Confocal analysis demonstrated the polarized deposition of collagen IV at the basal side of ECs, suggesting its assembly in a basement membrane-like manner (supplemental Figure 1A). Furthermore, distribution and amount of collagen IV in the ECM were not altered by detaching cells (Figure 1B and supplemental Figure 1B). ECM generated in normoxic or hypoxic conditions were then separated by 2D gel electrophoresis. A train of proteins at a molecular weight of 100 kDa ranging from pI 6.2-6.6 were highly up-regulated by hypoxia in HDMEC and HUVECs (Figure 2A). Mass spectrometry analysis identified 2 of these spots as LOXL2 (supplemental Figure 2). LOXL2 expression and localization were further investigated in HUVECs. LOXL2 secretion was increased by hypoxia, at a molecular weight of 100 kDa, and resulted in its accumulation in the ECM (Figure 2B). It was weakly detected in the ECM in normoxic conditions, in sparse extracellular fibers spanning over several cells labeled at cell-cell adhesion using CD31 (Figure 2C). Hypoxia strikingly increased the density of this ECM network. In hypoxic ECM, LOXL2 was colocalized with collagen IV and fibronectin, but not with the matricellular protein Cyr61 which binds heparan-sulfate proteoglycans (Figure 2D). Increased *lox2* mRNA content was observed after 2 and 5 days in hypoxia, reaching 168.7% and

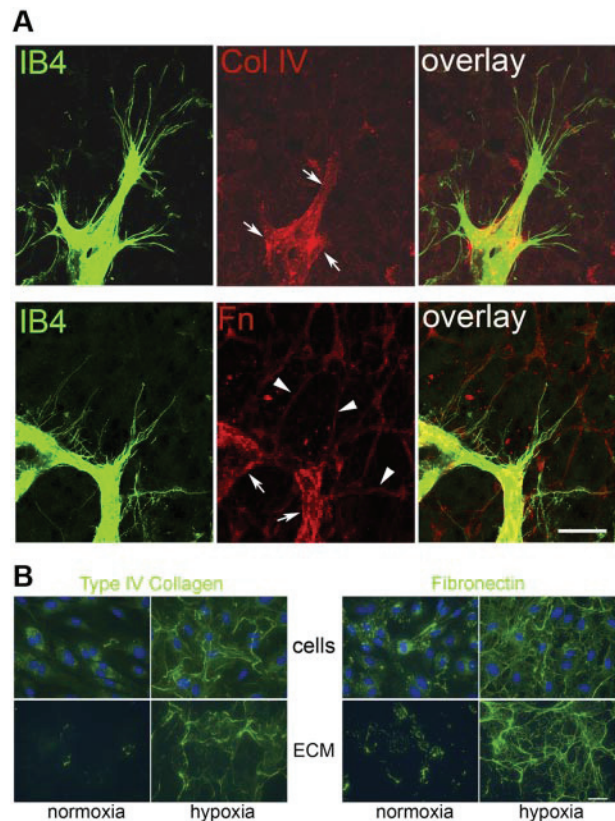


Figure 1. Hypoxia-induced deposition of collagen IV and fibronectin in endothelial ECM. (A) Whole mount immunofluorescence of P5 mouse retina was performed for detection of collagen IV (Col IV) and fibronectin (Fn). ECs were stained with isolectin B4 (IB4). Images correspond to the projection of 6 confocal sections at the vascular front. Arrows indicate sites of deposition of collagen IV and fibronectin by tip cells in the basement membrane. Arrowheads indicate the fibronectin network in the avascular zone. Bar: 20 μ m. (B) HUVECs were cultured in normoxia or hypoxia for 5 days. Immunofluorescence of collagen IV (left panel) and fibronectin (right panel) was performed on either whole cell layer (cells) or ECM after detaching cells (ECM). Nuclei were stained with DAPI. Bar: 30 μ m. See also supplemental Figure 1.

141.7% respectively (Figure 2E), suggesting that stable mRNA might lead to LOXL2 accumulation in the hypoxic ECM.

We then investigated the impact of increased LOXL2 on lysyl oxidase activity. HUVECs are known to express LOX and LOXL2, which are targets of hypoxia.^{14,24,25} Both enzymes possess lysyl oxidase activity sensitive to β -APN.⁷ Hypoxia increased 2.7-fold the total β -APN-sensitive lysyl oxidase activity in ECs, compared with normoxic conditions (Figure 2F). We used a gene silencing approach by siRNA to knock down either *lox* or *lox2* (supplemental Figure 3). Transfecting ECs with *lox2* siRNA reduced β -APN-sensitive lysyl oxidase activity by 62.3% in hypoxia, whereas *lox* siRNA diminished lysyl oxidase activity by 28.2% compared with control siRNA (Figure 2G), thus demonstrating that whereas both enzymes are active, LOXL2 is the main source of β -APN-sensitive lysyl oxidase activity in hypoxic ECs.

LOXL2 is expressed in the vascular basement membrane and up-regulated in neovessels

We then investigated the expression of LOXL2 in developmental and pathologic angiogenesis. LOXL2 protein was detected in rat retina EC at P5, as demonstrated by colocalization with von Willebrand factor, and by its presence on the luminal side of the basement membrane stained with collagen IV (Figure 3A). In addition, LOXL2 was colocalized with collagen IV in the basement membrane.

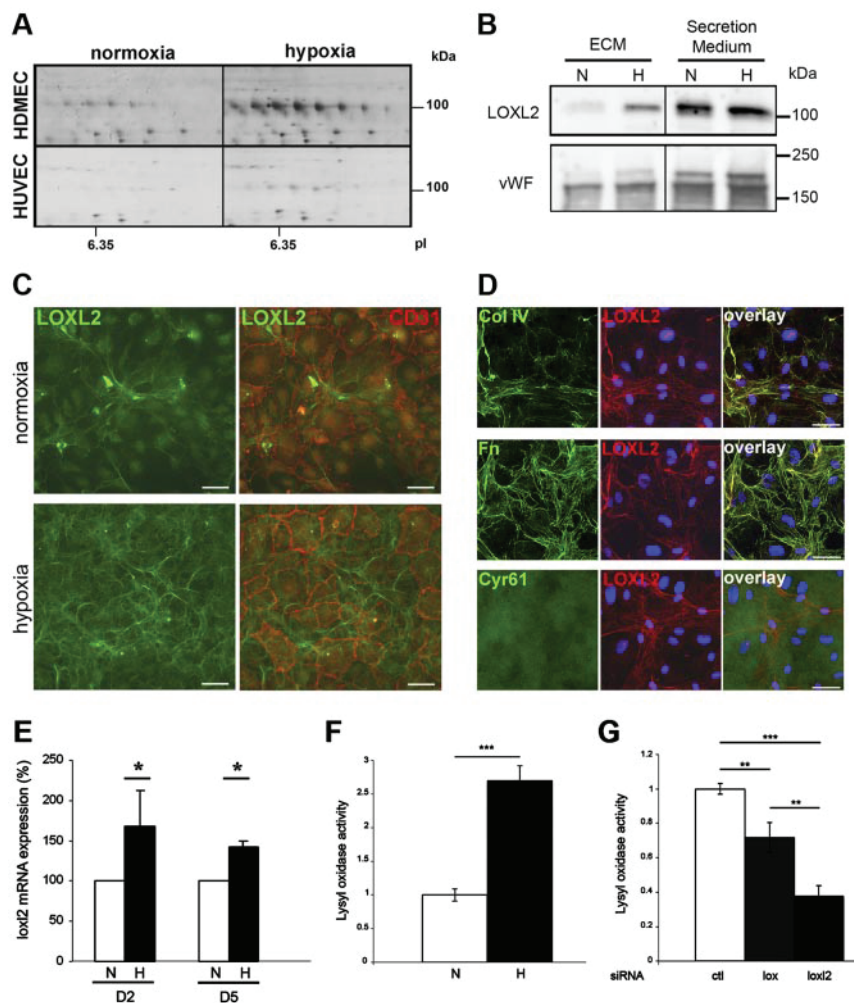


Figure 2. LOXL2 expression, ECM localization and activity are induced by hypoxia in endothelial ECM in vitro. (A) Two-dimensional silver stained gels of ECM from HDMEC or HUVECs cultured in normoxia or hypoxia for 5 days. Areas corresponding to similar molecular weights and pI are shown. (B) LOXL2 and von Willebrand factor (VWF) were immunodetected in ECM extracts or secretion medium from HUVECs cultured in normoxia (N) or hypoxia (H). von Willebrand factor was used as a control ECM-binding protein secreted by EC, whose amount and distribution between the secretion medium and the ECM were not modified by hypoxia. (C) Epifluorescence of HUVECs cultured in normoxia or hypoxia and double-stained for LOXL2 and CD31. (D) Confocal images of HUVECs cultured in hypoxia. Double-immunofluorescence of LOXL2 and either collagen IV (Col IV), or fibronectin (Fn) or Cyr61 was performed. Nuclei were stained with TO-PRO-3. Bars: 20 μ m (C and D). (E) Semi-quantitative RT-PCR of *loxl2* mRNA from HUVECs cultured in normoxia (N) or hypoxia (H) for 2 (D2) or 5 (D5) days. *Actin* was used as a control. The mean expression of 3 independent experiments is represented \pm SD. * $P < .05$. (F-G) Lysyl oxidase activity was measured as the amine oxidase activity inhibited by β -APN. (F) HUVECs were cultured in normoxia (N) or hypoxia (H). (G) HUVECs silenced for either *lox* or *lox2* using siRNA were cultured in hypoxia. Lysyl oxidase activity was normalized to the mean of controls. Graphs represents the mean of 3 independent experiments values \pm SEM. ** $P < .005$ and *** $P < .001$. See also supplemental Figures 2-3.

For studying postischemic revascularization, we used a mouse model of hindlimb ischemia. Tissue revascularization is initiated within 2 days and reaches its maximum rate 6 days after surgery.²⁶ LOXL2 protein and mRNA increased 9.8- and 14.7-fold, respectively, in ischemic *tibialis anterior* muscle (Figure 3B-C). The highest expression of *loxl2* mRNA was detected by in situ hybridization in areas containing high capillary density and regenerating myofibers, whereas it was low or absent in areas with low capillary density, corresponding to either necrotic or preserved muscle areas (Figure 3D and supplemental Figure 4).¹⁷ To identify cells expressing *loxl2*, serial sections were immunostained for CD31: colocalization indicated that *loxl2* mRNA is expressed in newly formed capillaries (Figure 3D and supplemental Figure 4).

Altogether, this first set of experiments showed that the ECM remodeling associated with angiogenesis involved modulation of both expression and organization of its major components, collagen IV and fibronectin. In this context, the hypoxia-driven induction of LOXL2 in endothelial ECM suggested that it could be a promoter of such remodeling and of angiogenesis.

LOXL2 participates to intersegmental vessel formation in zebrafish embryo

To investigate the functional involvement of LOXL2 in angiogenesis, dynamic analysis of ISV development in zebrafish embryo was performed. Zebrafish genome encodes 2 *loxl2* genes (*loxl2a* and *loxl2b*). Whereas *loxl2b* expression is initiated during early

development throughout the notochord and extinguished between 24 and 48 hours after fertilization (hpf),²⁷ the expression pattern of *loxl2a* has not been reported yet. *Loxl2a* mRNA increased between 20 and 48 hpf and was detected in ISV (Figure 4A-B). In parallel, 2 proteins were detected by immunoblot: (–1) a weak 100 kDa band in the soluble fraction of both 24 and 48 hpf samples; (–2) an intense band migrating at 240 kDa in the detergent resistant fraction at 48 hpf only (Figure 4C). Both bands were recognized by 2 LOXL2 monoclonal antibodies. LOXL2a mRNA and protein were thus induced between 24 and 48 hpf in sprouting ISV.

We performed knockdown experiments using 2 distinct morpholino oligonucleotides targeting *loxl2a*. Injection of 4 ng of *loxl2a* morpholino 1 (*loxl2a*-MO1) suppressed ISV blood circulation in 65% of embryos (supplemental Videos 1-2), which appeared otherwise unaffected (supplemental Figure 5A). Similar circulation defects were observed with *loxl2a*-MO2, whereas embryos injected with up to 16 ng of mismatch morpholino (ms-MO) were not affected. Lack of ISV circulation is not because of developmental delay of the cardiovascular system as attested by the correct formation and perfusion of the dorsal aorta (DA) and cardinal vein (CV; supplemental Video 2) and by normal heart development and heartbeat (data not shown). *Loxl2a*-MO1 decreased LOXL2 expression at 24 hpf (supplemental Figure 5B) and the absence of ISV circulation was correlated with a strong decrease in LOXL2 protein expression at 48 hpf (Figure 4D). These results also demonstrated that the 240 kDa protein corresponds to LOXL2a (Figure 4D).

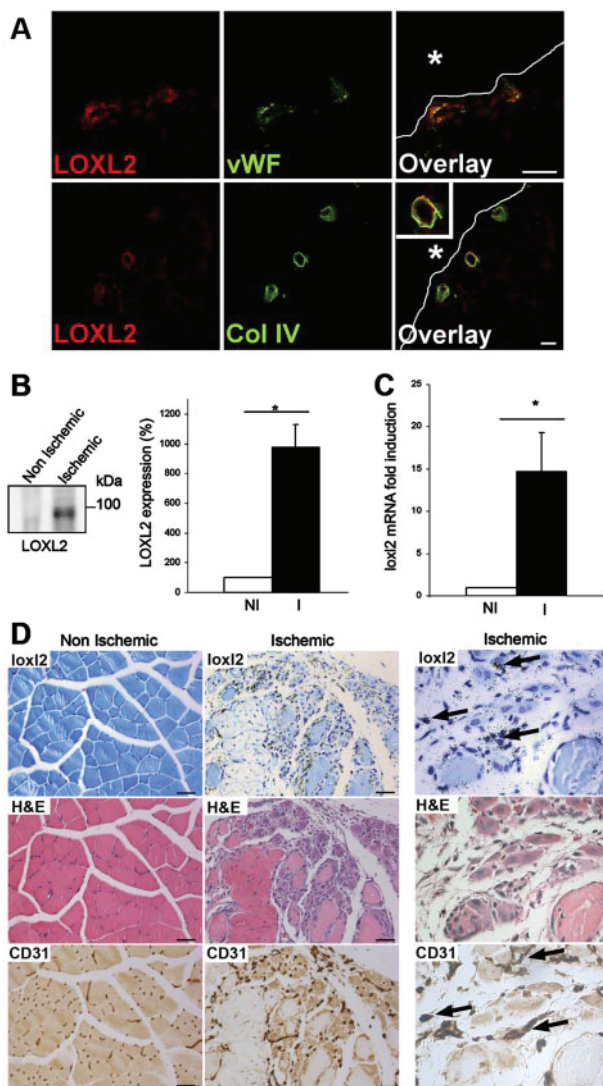


Figure 3. LOXL2 is expressed by ECs in developmental and pathologic angiogenesis. (A) Immunofluorescence was performed on cryosections of P6 rat eye for detection of LOXL2 and either von Willebrand factor (VWF) or collagen IV (Col IV). Vitreous humor is indicated by asterisks and white lines. Bar: 20 μ m. (B-D) Unilateral critical ischemia (I; ischemic) was analyzed 6 days postsurgery, using contralateral hindlimb as control (NI; non ischemic). (B) Fifty micrograms of total protein extracts were subjected to immunoblotting of LOXL2 (left panel). LOXL2 amount was quantified in extracts from 3 mice (right panel). Results are represented \pm SD. (C) Quantification of *loxl2* mRNA induction by real-time quantitative PCR. For each mouse ($n = 3$), actin was used as control. Mean relative induction in ischemic muscle (I) is represented \pm SD. (D) In situ hybridization of *loxl2* mRNA was performed on sections of non ischemic or ischemic tibialis anterior muscle (top lane). Slides were counterstained with toluidine blue. Serial sections were stained with H&E (middle lane), and CD31 was immunostained (bottom lane). Arrows indicate colocalization of *loxl2* and CD31 in high magnification images (right panel). Bar: 200 μ m. See also supplemental Figure 4.

Coinjection of the mRNA coding for human LOXL2 with *loxl2a*-MO1 rescued the phenotype as it restored normal circulation at 48 hpf (supplemental Video 3), resulting in only 10.8% non circulating embryos. EC sprout from the DA at 20 hpf, reach the dorsal roof and fuse to form the dorsal longitudinal anastomotic vessels (DLAV) at 36 hpf; by 48 hpf, they have established a perfused lumen.²⁸ ISV of *Tg(fli1:egfp)y1* embryos injected with ms-MO displayed a normal pattern of development, whereas some sprouts had not emerged from the DA in *loxl2a*-MO1-injected zebrafish at 24 hpf (Figure 4E top panel). By 48 hpf, some ISV had not reached the dorsal roof, while others had lost connection to the

DA (supplemental Figure 5C). They were unable to form a continuous DLAV (Figure 4E bottom panel; supplemental Figure 5C). LOXL2 depletion however did not result in any guidance defect. In addition, no hemorrhage was detected using O-dianisidine staining (supplemental Figure 5A). Finally, the role of LOXL2 in blood vessel formation was further supported by defects of branchial arch vessels (supplemental Figure 5D).

To analyze the involvement of lysyl oxidase catalytic activity in ISV formation, embryos were treated with β -APN either at an early stage (3 hpf) or at initiation of ISV formation (23 hpf). β -APN treatment of 3 hpf embryos resulted in striking notochord distortion (Figure 4F), a defect involving LOX, LOXL1, and LOXL5b,^{27,29} and altered vascular patterning with distortion of the DA and irregular distribution of ISV (Figure 4H). Even though ISV have all migrated to the dorsal roof and formed the DLAV, embryos displayed very variable number of perfused ISV at 48 hpf (Figure 4G). These vascular defects might thus be secondary to notochord distortion and somit disorganization. Embryos were then treated with β -APN at 23 hpf, when notochord development is almost completed. At this time point, β -APN affected notochord only in the caudal section confirming inhibition of lysyl oxidase activity (Figure 4F). Similar results were obtained when β -APN was added at 20 hpf, that is, before sprouting of tip cells (data not shown). This data show that β -APN did not affect ISV formation nor perfusion (Figure 4G-H), suggesting that lysyl oxidase catalytic activity was not essential to ISV formation.

LOXL2 regulates capillary formation in vitro

To gain insight into the role of LOXL2 in capillary formation, we investigated in vitro endothelial tubulogenesis. When embedded in 3D fibrin gel in the presence of bFGF and VEGF, HUVECs migrate inside the gel but are unable to engage a tubulogenic program. When cocultured with fibroblasts, they generate vessel-like structures with a patent lumen (supplemental Figure 6).²² The expression of endothelial *loxl2* mRNA was increased 1.3-fold by coculture (Figure 5A) and both LOXL2 and collagen IV deposition were induced in the endothelial ECM (Figure 5B). Collagen IV assembly was also induced in the basement membrane during tubulogenesis in 3D fibrin gels (Figure 5C and supplemental Figure 6C) and colocalized with LOXL2 (supplemental Figure 6D).

LOXL2 overexpression increased capillary formation (Figure 5D). The involvement of LOXL2 was further demonstrated using shRNA-mediated depletion in HUVECs (Figure 5E). Knocking down LOX expression slightly affected tube formation, whereas LOXL2 knockdown dramatically decreased tubulogenesis (Figure 5F and supplemental Figure 6E). We then tested the involvement of LOX and LOXL2 catalytic activity using β -APN with cells depleted for LOXL2 and LOX, respectively. Whereas 48% of the tubes generated in the presence of LOX were affected, β -APN only inhibited 16% of LOXL2-mediated tube formation (Figure 5F). Time-lapse microscopy demonstrated that β -APN did not block cell migration but rather resulted in the formation of unstable capillaries, with transient lumen formation (supplemental Videos 3-4). Furthermore, adding β -APN after capillary were formed triggered their regression within 4 days of treatment, thus demonstrating that lysyl oxidase enzyme activity is required for maintaining the capillary structure (Figure 5G). We then set up a system in which single EC suspension was seeded both inside the fibrin gel and on the bottom of the culture dish. When maintained with fibroblasts, HUVECs established a 3D network inside the gel and a 2D network under the gel. As shown above (Figure 5F and

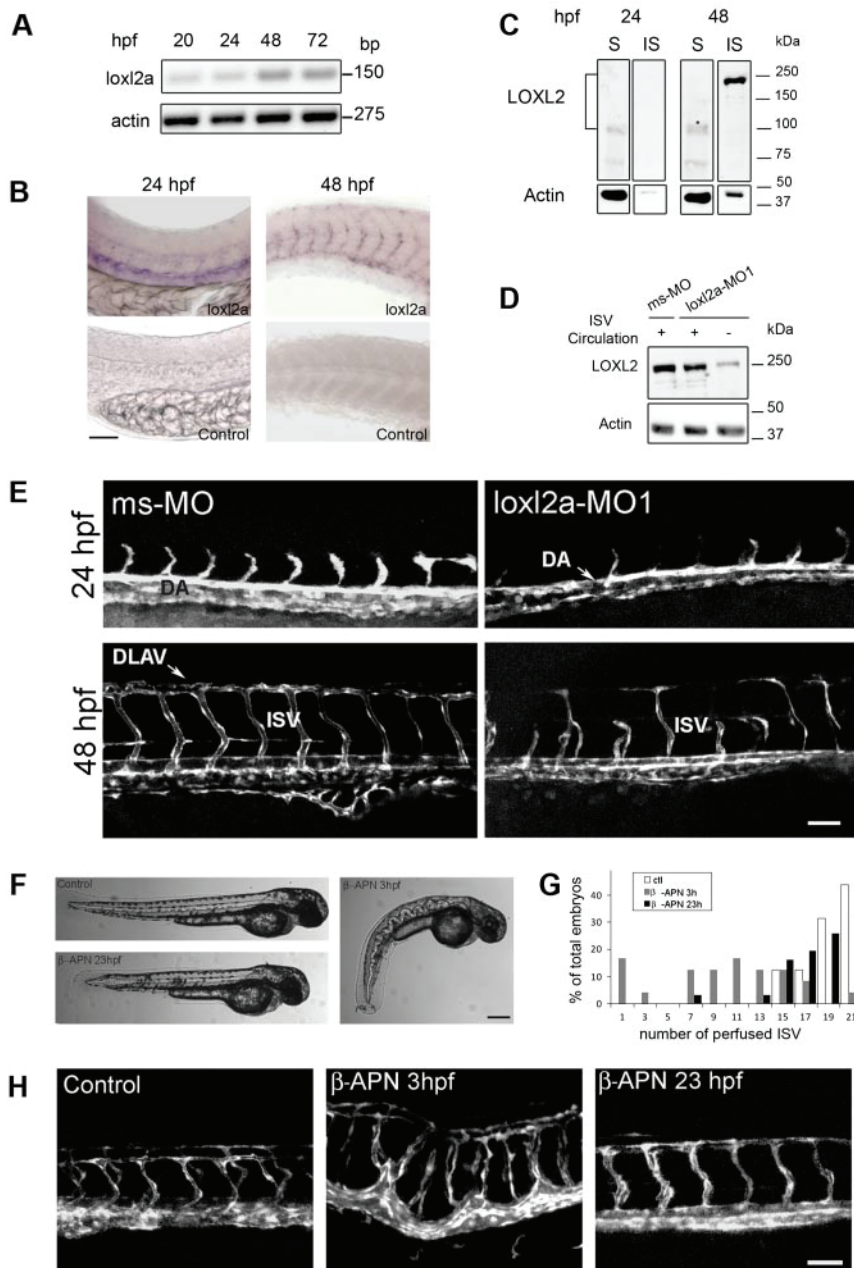


Figure 4. LOXL2 is required for proper formation of intersegmental vessels in zebrafish. (A) Semiquantitative RT-PCR of *loxl2a* and *actin* mRNA from zebrafish embryos was performed at different developmental stages (20-72 hpf). (B) Whole-mount in situ hybridization of *loxl2a* in zebrafish embryos at 24 and 48 hpf using a sense probe as a control. Bar: 50 μ m. (C) LOXL2 and actin were immunodetected in protein extracts of 24 and 48 hpf embryos. Proteins were sequentially extracted in an NP40/Deoxycholate-soluble fraction (S) and in an SDS-soluble fraction (IS). (D) Zebrafish embryos (48 hpf) injected with mismatch (ms-MO) or *loxl2a* morpholinos (*loxl2a*-MO1) morpholinos were sorted according to the presence (+) or the absence (-) of ISV blood circulation. SDS-soluble proteins were subjected to immunoblotting for actin and LOXL2 detection. (E) Confocal images of Tg(*fli1:egfp*)y1 zebrafish embryos at 24 and 48 hpf, injected with either mismatch (ms-MO) or *loxl2a* morpholinos (*loxl2a*-MO1). Bar: 100 μ m. (F) Brightfield images of 48 hpf embryos untreated (control) or treated with β -APN at 3 hpf and 23 hpf. Bar: 250 μ m. (G) Quantification of the number of perfused ISV in 48 hpf embryos untreated or treated with β -APN at 3 hpf or 23 hpf (n = 30-32 embryos per condition). (H) Confocal images of Tg(*fli1:egfp*)y1 zebrafish embryos at 48 hpf, untreated or treated with β -APN at 3 hpf or 23 hpf. Bar: 100 μ m. See also supplemental Figure 5 and supplemental Videos 1-3.

supplemental Figure 6E) using Cytodex beads, silencing LOXL2 inhibited the 3D tubular organization inside the gel, whereas it only slightly decreased the total network density (Figure 5H). Altogether, these data demonstrated that LOXL2 knockdown induced a dramatic decrease of endothelial tube formation in 3D, while inhibiting catalytic activity only slightly affected capillary formation.

LOXL2 modulates EC migration and proliferation

Considering that LOXL2 regulates angiogenesis in vivo and capillary formation in vitro, we investigated the processes that could mediate this effect: cell migration and proliferation, and ECM assembly. Slightly reduced migration was observed when endogenous LOXL2 expression was knocked down compared with ECs transfected with control siRNA (-24.2%; Figure 6A). Transient overexpression of LOXL2 increased EC motility to 156.7% (Figure 6B). β -APN partially inhibited migration

induced by LOXL2 overexpression (42%), suggesting that LOXL2 regulates cell-ECM interactions both independently of and through its catalytic activity. As cell migration depends in vivo on ECM stiffness and on interactions with the microenvironment that are absent from 2D cell culture, migration was further assayed in a 3D setting. In the absence of fibroblasts, HUVECs seeded on Cytodex beads migrate in the fibrin gel without 3D tubulogenesis (Figure 6C left panel). HUVECs infected with a lentivirus encoding human *loxl2* for sustained overexpression displayed increased 3D migration (Figure 6C). Cell proliferation in LOX- and LOXL2-depleted EC was assayed in the presence of FBS (Figure 6D). EC proliferation was decreased to the same extent in both cases. These results suggested that even though LOXL2 modulation of migration and proliferation could alter tube formation, additional mechanisms might mediate the regulation of capillary formation by this enzyme in zebrafish embryos and fibrin gels (Figures 4E and 5F, respectively).

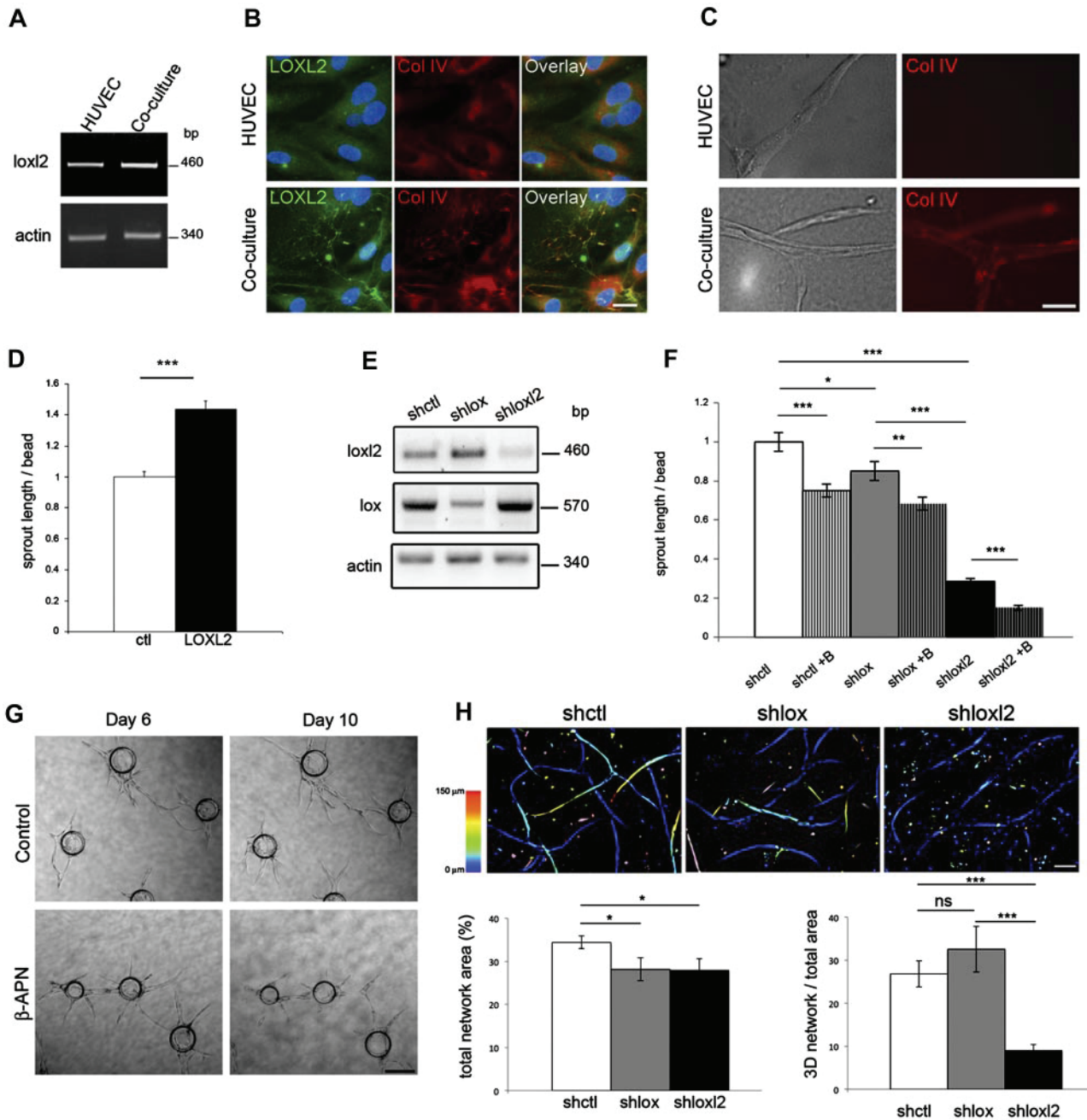


Figure 5. LOXL2 increases tubulogenesis in 3D fibrin gel. (A-C) Culture of HUVECs in absence (HUVEC) or presence (Coculture) of fibroblasts. HUVECs were seeded in 6 well plates and fibroblasts in culture inserts above HUVECs (A-B). Cells were maintained in complete medium for 2 days (A) or 4 days (B). (A) Expression of *lox12* mRNA was measured by semiquantitative RT-PCR. *Actin* was used as control. A representative gel of 3 independent experiments is shown. (B) Distribution of LOXL2 and collagen IV was analyzed by immunofluorescence. Nuclei were stained with DAPI. Bar: 20 μ m. (C) Single HUVEC suspension was embedded in fibrin gels and maintained in the presence (coculture) or absence (HUVEC) of fibroblasts on top of the gel. Immunofluorescence staining of collagen IV was performed. Bar: 50 μ m. (D, F) HUVEC-coated Cytodex beads were embedded in fibrin gels and maintained in the presence of fibroblasts. Images were acquired at day 6 for sprout length measurement. For each experiment ($n = 3$), mean total length of sprouts per bead was normalized to the mean of control cells. Graph represents the mean of normalized values \pm SEM. * $P < .05$, ** $P < .005$, and *** $P < .001$. (D) HUVECs were infected with a control (ctl) or a *lox12* coding lentivirus (LOXL2). (E-F) HUVEC were treated (+β) or not with β-APN. (G) Cocultures were treated with β-APN from day 6 to day 10 to follow sprout evolution. Bar: 200 μ m. (H) Single cell suspensions of HUVEC infected with lentiviruses coding for either control (shctl), or *lox* (shlox), or *lox12* (shlox12) shRNA were embedded in fibrin gel at 100×10^3 cells per well under low cross-linking conditions. Cells were maintained in the presence of fibroblasts on top of the gel and stained with CMTMR CellTracker. Epifluorescence z-stacks (150 μ m thick and 10 μ m step) were acquired and treated with ImageJ Version 1.43. Projections are represented with a 0-150 μ m color-code for depth in the z dimension. Bars: 100 μ m (H). Graphs represent measurements from one experiment (duplicate wells and 4 fields per well). SEM * $P < .05$ and *** $P < .001$. See also supplemental Figure 6 and supplemental Videos 4-5.

LOXL2 is involved in collagen IV network assembly

Considering that lysyl oxidases are primary candidates for modulating microenvironment rigidity,³⁰ the role of LOXL2 in endothelial ECM assembly was investigated. Strikingly, collagen IV network

assembly was strongly decreased when LOXL2 expression was knocked down, whereas LOX depletion had no effect (Figure 7A). The involvement of LOXL2 in collagen IV assembly was further supported by: (–1) absence of modification of *col4a1* mRNA

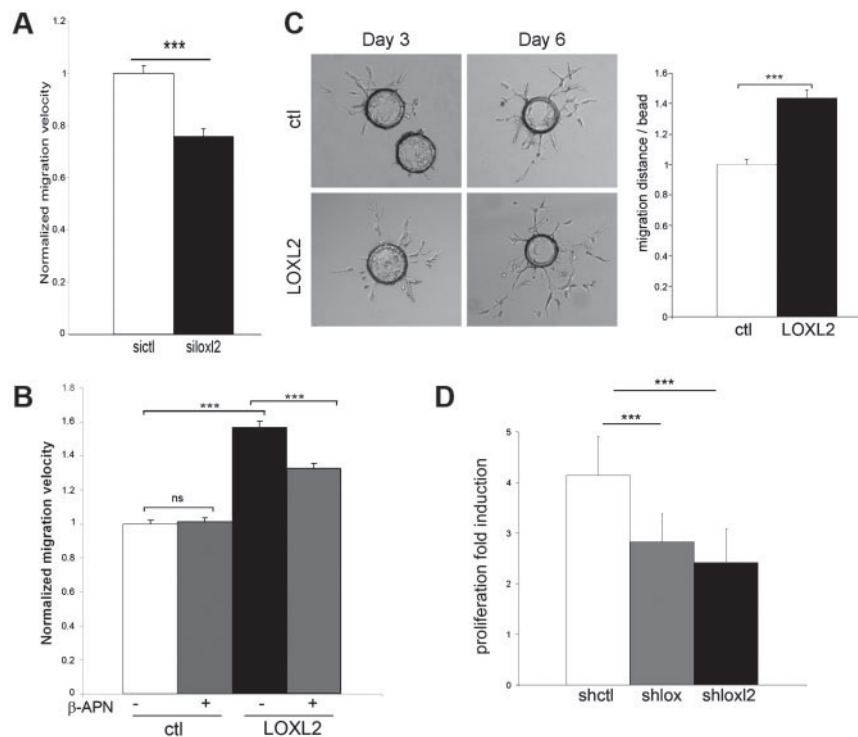


Figure 6. LOXL2 is involved in endothelial migration and proliferation. (A–B) HUVEC motility on fibronectin in serum-free medium containing 10 ng/mL VEGF and 10 ng/mL bFGF was measured by time-lapse microscopy. Images were acquired every 5 minutes over the next 12 hours for cell tracking. For each experiment (A: $n = 4$; B: $n = 3$), velocity was normalized to the mean of control cell velocity. Graph represents the mean of normalized values \pm SEM. (A) HUVECs were transfected with either control (sic1l) or *lox12* (silox12) siRNA. (B) HUVECs were transfected with a plasmid either empty (ctl) or coding for LOXL2 and incubated in the presence or absence of β -APN. (C) HUVEC migration in 3D fibrin gel was assessed using cells infected with control (ctl) or LOXL2 coding lentivirus. HUVEC-coated Cytodex beads were embedded in a fibrin gel and maintained in complete medium supplemented with 10 ng/mL bFGF. Bright-field images were acquired (left panel) for migration measurement (right panel). Mean distance per bead was normalized to the mean of controls. Bar: 200 μ m. (D) FBS-induced proliferation of HUVECs infected with lentiviruses coding for either control (shctl) or *lox* (shlox) or *lox12* (shlox12) shRNA. Graph represents the mean of normalized values \pm SD. *** $P < .001$.

expression (Figure 7B); (–2) increased amount of soluble collagen IV in the secretion medium (Figure 7C). Together, these data suggested that collagen IV was secreted but not incorporated in the ECM. LOXL2 was then reexpressed in shRNA silenced HUVECs (Figure 7D). Rescuing LOXL2 expression increased collagen IV network assembly in hypoxic ECM (Figure 7E), confirming LOXL2 involvement in this process. To determine whether collagen IV was cross-linked, confluent HUVECs were treated with β -APN in hypoxia for 5 days. Inhibiting lysyl oxidase activity increased the amount of collagen IV solubilized from the ECM (Figure 7F), but did not alter collagen IV network assembly (Figure 7G). To further investigate the role of collagen IV assembly in tubulogenesis, *col4a1* was down-regulated using shRNA (Figure 7H–I). Loss of *col4a1* inhibited tubulogenesis to a similar extent as LOXL2 depletion (Figure 7J). These data suggest that LOXL2 is involved in collagen IV assembly in the vascular basement membrane which in turn could mediate the modulation of capillary formation.

Discussion

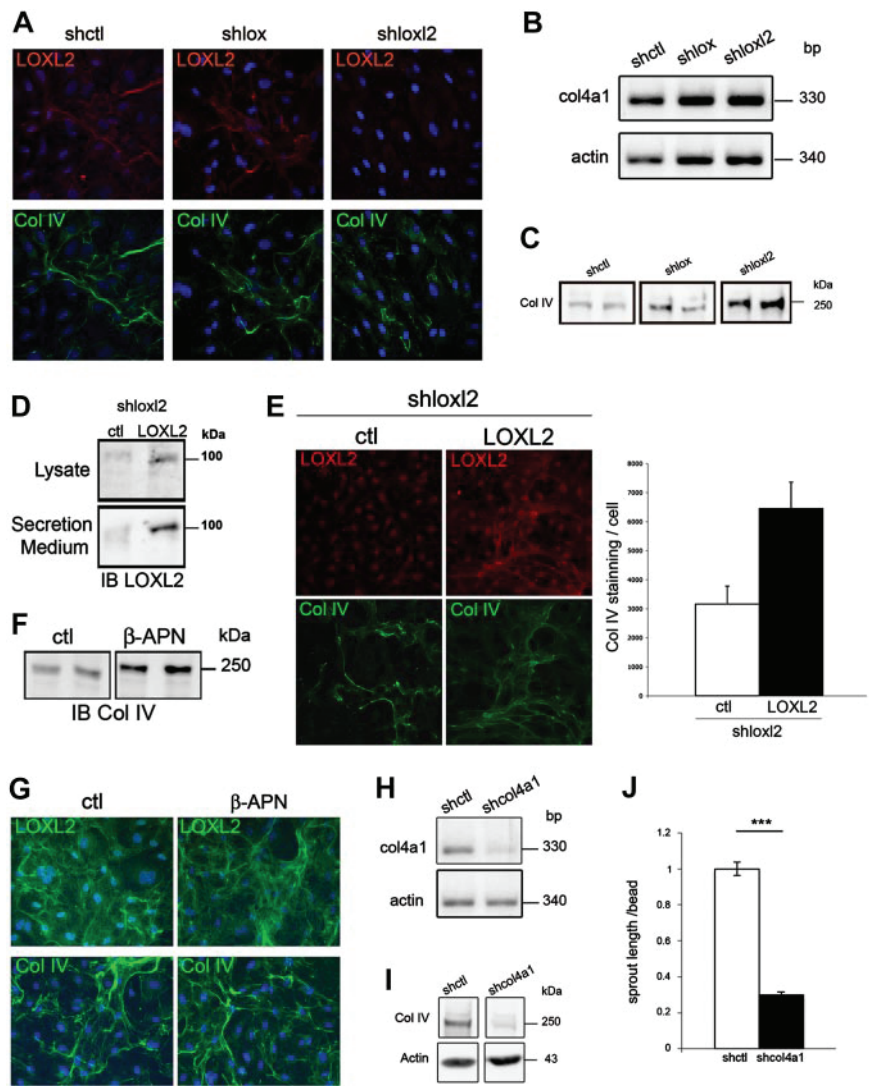
ECM remodeling plays a major role in the development of a functional vascular system.^{5,31} Whereas ECM degradation has been the subject of many studies, the mechanisms of ECM assembly and their impact on the early steps of capillary formation, before perivascular cell recruitment, remain elusive. Here we report the first demonstration of the regulation of angiogenesis by LOXL2, a secreted protein involved in remodeling the extracellular microenvironment. LOXL2 is expressed in angiogenic EC and accumulates in the vascular basement membrane of developing vessels. This expression pattern is associated with the functional involvement of LOXL2 in capillary formation mediated primarily by collagen IV network assembly and by EC proliferation and migration.

We and others had already reported that *lox12* is up-regulated in ECs after short-term exposure to low O_2 concentrations.^{24,32} This effect is mediated by HIF1 α in EC as in tubular epithelial cells.^{12,25} In this study, we show that the sustained induction of *lox12* mRNA results in the accumulation of the protein in the endothelial ECM during long-term exposure to hypoxia, as this is the case for tip cells invading avascular territories. Indeed, the up-regulation of *lox12* mRNA in tip cells was recently reported during vascularization of the retina.¹⁸ A former study analyzing the whole proteome of HUVECs in hypoxia failed to detect LOXL2, even though its mRNA was highly up-regulated.³² Whereas analysis of whole cell lysate is limited by the low amount of secreted proteins compared with abundant cytoplasmic proteins, a subproteomic approach, as we performed here for ECM-associated proteins, is a more powerful tool. The induction of angiogenesis regulators such as VEGF, thrombospondin-1 and angiopoietin-like 4, occurs with similar kinetics as LOXL2 in mouse postischemic revascularization,^{17,20,26} suggesting that this enzyme is part of the EC angiogenic response. Indeed, we show that activation of capillary formation in vitro increases LOXL2 expression and deposition in the ECM. These data also demonstrated that additional angiogenic factors regulate LOXL2 expression.

Our study provides the first evidence for the expression of LOXL2 in the vascular wall of neovessels, where it is colocalized with collagen IV. LOXL2 expression had already been reported in other cells that deposit basement membrane.^{12,33,34} LOXL2 could thus be the member of the lysyl oxidase family more specifically targeted to basement membranes and dedicated to cross-linking the nonfibrillar collagen IV. Lysyl oxidase-mediated crosslinks are located in the 7S domain of collagen IV, but the lysyl oxidase responsible is not identified yet.³⁵ The 7S domain contains the potential cross-linking site Gly-Thr-Hyl-Gly-Glu-Arg, which differs from that of the fibrillar collagens that are LOX substrates

Figure 7. LOXL2 is functionally involved in the hypoxia-induced network assembly of collagen IV.

(A-C) HUVECs transfected with control (shctl), *lox* (shlox), or *lox2* (shlox2) shRNA were cultured in hypoxia. (A) Immunofluorescence detection of LOXL2 and collagen IV (Col IV) was performed. Nuclei were stained with DAPI (blue). (B) Semiquantitative RT-PCR of *col4a1* and *actin* from HUVEC transfected with control, *lox* or *lox2* shRNA. (C) Overnight media were collected and subjected to immunoblotting for collagen IV (Col IV). (D-E) *Loxl2*-depleted HUVEC (shlox2) were infected with control (ctl) or LOXL2 coding lentivirus (LOXL2). (D) Cell lysates and secretion media were subjected to immunoblotting for LOXL2 detection (IB LOXL2). (E) Immunofluorescence of LOXL2 and collagen IV (Col IV) in the ECM of EC incubated in hypoxia. Collagen IV assembly was analyzed by confocal microscopy (left panel) and quantified using ImageJ (right panel). (F-G) HUVEC were cultured in hypoxia in absence (ctl) or presence of β -APN for 5 days. (F) Duplicate ECM extracts were subjected to immunoblotting of collagen IV. (G) Immunofluorescence detection of LOXL2 and collagen IV (Col IV). (H-J) HUVECs transfected with control (shctl) or *col4a1* (shcol4a1) shRNA. (H) Semiquantitative RT-PCR of *lox2*, *col4a1*, and *actin*. (I) Collagen IV (Col IV) expression in HUVECs was detected by immunoblot in total lysate (cell and extracellular matrix). (J) HUVECs were coated on Cytodex beads, embedded in fibrin gels and maintained in the presence of fibroblasts. Images were acquired at day 6 for sprout length measurement. For each experiment (n = 3), total length of sprouts per bead was normalized to the mean of control cells. Graph represents the mean of normalized values \pm SEM. ****P* < .001.



(Gly-X-Hyl-Gly-His-Arg). This sequence could thus specify collagen IV as a substrate for LOXL2 rather than LOX. More importantly, we demonstrate that LOXL2 expression is functionally required for proper assembly of collagen IV in the basement membrane. In contrast, knocking-down LOX does not affect collagen IV assembly. Indeed, several lines of evidence support that LOXL2, rather than LOX, is responsible for collagen IV assembly and cross-linking: (–1) Unlike LOXL2, LOX is not colocalized with collagen IV in hypoxic HUVECs (data not shown); (–2) the complementary distribution of LOX and LOXL2 in cells that generate the interstitial ECM or that deposit basement membrane, respectively, was reported in the epidermis and placenta^{33,34}; (–3) collagen IV up-regulates LOXL2 expression and exerts opposite effects on LOX³³; (–4) there is no modification of collagen IV deposition nor of basement membrane organization in LOX knockout mice, whereas fibrillar collagen organization is altered³⁶; in contrast, LOXL2 knockdown does not affect deposition of collagen I.¹⁰ We found that inhibiting LOXL2 cross-linking activity did not affect collagen IV assembly. Assembly could thus be mediated by LOXL2 N-terminal domain that consists in 4 SRCR domains absent in LOX. An interesting hypothesis is thus that interaction of LOXL2 with collagen IV would first mediate its homotetramerization and the formation of the basement membrane

network, and would then allow cross-linking and stabilization of this network.

Knocking down LOXL2 expression decreased capillary formation both in vivo and in a 3D tubulogenesis model in vitro. In zebrafish embryos, LOXL2 knockdown impaired formation of ISV and of branchial arch vessels. Sprout guidance was not affected, as EC migrated along the intersomitic septae without vascular patterning defect, but EC protrusive activity was impaired. Proliferation of ECs, including tip cells, is required during ISV formation and in vitro tubulogenesis.³⁷ Whereas LOXL2 depletion dramatically affects tubulogenesis, it decreases cell proliferation to the same level as LOX depletion, suggesting that LOXL2 regulates capillary formation through additional mechanisms. EC migration is inhibited by LOXL2 depletion in vitro and could also participate to tubulogenesis down-regulation. Several studies described the regulation of cell migration by lysyl oxidases,^{12,38} and LOXL2 was recently proposed to act as a regulator of tumor cell migration.³⁹ The mechanisms involved however remain unresolved. LOX-mediated migration is correlated with Src and FAK phosphorylation because of hydrogen peroxide generation³⁸ or of oxidation of cell surface receptors.⁴⁰

Multiple levels of cell-ECM interactions are potentially involved in capillary formation. Here, we demonstrate that *col4a1*

depletion inhibits tubulogenesis to a similar extent as *lox12* depletion. Down-regulating collagen IV network in the ECM, and subsequently both the integrin-mediated and the mechanotransductive signaling might constitute an important mediator of decreased capillary formation.¹⁵ Collagen IV is not required for proper organization of the basement membrane, but it is essential for its structural integrity.⁴¹ Whereas the overall development of large vessels is not affected in mice invalidated for *col4a1/2*, reduced capillary density and irregular protrusion of capillaries were described.⁴¹ In a similar manner, LOXL2a depletion in zebrafish affects ISV formation but does not alter aorta development and perfusion. It is thus tempting to propose that LOXL2 regulates productive capillary sprouting through network assembly of collagen IV. Collagen IV network assembly could provide the structural features and stiffness required for the tunnel formation involved in capillary morphogenesis.⁴²⁻⁴⁵ Quite remarkably, we found that it is indeed the 3D organization of endothelial cells inside the gel that is affected by loss of LOXL2 expression, whereas tubulogenesis is not affected when cells are seeded on the rigid culture dish and only covered by the gel.

The molecular mechanisms of action of LOXL2 remain to be characterized. Nevertheless, we report that cell migration and tubulogenesis, both in vivo and in vitro, were more affected by LOXL2 loss of expression than by its pharmacologic inhibition by β -APN. Similarly, collagen IV assembly in the ECM was dramatically reduced by loss of LOXL2 expression, but was not inhibited by β -APN, even though LOXL2 is the main source of β -APN-sensitive lysyl oxidase activity. Altogether, these data suggest that LOXL2 regulated these processes through mechanisms that are partially independent of lysyl oxidase activity. In agreement with these observations, an antibody directed against the SRCR domains of LOXL2 and blocking its enzyme activity could inhibit tumor growth more efficiently than β -APN.¹⁰ This antibody is however not as efficient as β -APN for inhibiting the catalytic activity in vitro.⁷ These data suggest that blocking LOXL2 interactions with the microenvironment outperforms catalytic inhibition alone.

Altogether, our study provides the first evidence for the regulation of angiogenesis by LOXL2, suggesting the following model. The induction of LOXL2 expression by angiogenic stimulators like hypoxia participates to cell proliferation and migration and initiates the proper deposition of collagen IV in the basement

membrane by tip cells. The resulting vascular microenvironment is required for optimal formation of patent capillaries.

Acknowledgments

The authors are grateful to Sylvie Ricard-Blum for helpful discussion along the development of this study. They thank Laure Bernard (PRECI, IFR 128 Biosciences Gerland, Lyon) and Sophie Vriz and Christine Rampon (CIRB, CNRS UMR 7241, Collège de France, Paris) for zebrafish facilities. Confocal and time-lapse microscopy was performed at both the PLATIM core facility (IFR 128 Biosciences-Gerland, Lyon) and the Ibis ImaChem facility (ENS-Collège de France, Paris).

M.B., C.P.-T., and N.B. were supported by grants from the Société Française d'Hypertension Artérielle (SFHTA), the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR), and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), respectively. This work was supported in part by ANR-06-JCJC-0160 and by La Ligue Nationale contre le Cancer.

Authorship

Contribution: M.B. and C.P.T. designed and performed research and analyzed data; J.H., M.M., N.B., L.N., A.B., J.T., E.G., and E.E. performed experiments; M.C., R.J.C., and F.R. provided expertise and contributed to the design and analysis of the study; and L.M., C.M., and S.G. supervised the study and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

The current affiliation for J.H. is Université de Rouen, Laboratoire "Polymères, Biopolymères, Surfaces," FRE CNRS 3101, Plate-forme protéomique de l'IFRMP 23, Mont-Saint-Aignan, France. The current affiliation for L.N. is Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária-Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence: Laurent Muller, College de France, Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), 11 place Marcelin Berthelot, Paris, F-75005, France; e-mail: laurent.muller@college-de-france.fr.

References

- Germain S, Monnot C, Muller L, Eichmann A. Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(3):245-251.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 2003;161(6):1163-1177.
- West H, Richardson WD, Fruttiger M. Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes. *Development*. 2005;132(8):1855-1862.
- Iruela-Arispe ML, Davis GE. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev Cell*. 2009;16(2):222-231.
- Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res*. 2005;97(11):1093-1107.
- Maki JM. Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions. *Histol Histopathol*. 2009;24(5):651-660.
- Rodriguez HM, Vaysberg M, Mikels A, et al. Modulation of lysyl oxidase-like 2 enzymatic activity by an allosteric antibody inhibitor. *J Biol Chem*. 2010;285(27):20964-20974.
- Maki JM, Rasanen J, Tikkanen H, et al. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation*. 2002;106(19):2503-2509.
- Liu X, Zhao Y, Gao J, et al. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet*. 2004;36(2):178-182.
- Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, et al. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med*. 2010;16(9):1009-1017.
- Brekhan V, Lugassie J, Zaffryar-Ellot S, et al. Receptor activity modifying protein-3 mediates the protumorigenic activity of lysyl oxidase-like protein-2. *Faseb J*. 2011;25(1):55-65.
- Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2007;117(12):3810-3820.
- Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, et al. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J*. 2005;24(19):3446-3458.
- Lelievre E, Hinek A, Lupu F, Buquet C, Soncin F, Mattot V. VE-statin/egfl7 regulates vascular elastogenesis by interacting with lysyl oxidases. *EMBO J*. 2008;27(12):1658-1670.
- Kumar S, Weaver VM. Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(1-2):113-127.
- Chomel C, Cazes A, Faye C, et al. Interaction of the coiled-coil domain with glycosaminoglycans protects angiopoietin-like 4 from proteolysis and regulates its antiangiogenic activity. *Faseb J*. 2009;23(3):940-949.
- Brechot N, Gomez E, Bignon M, et al. Modulation of macrophage activation state protects tissue from necrosis during critical limb ischemia in thrombospondin-1-deficient mice. *PLoS ONE*. 2008;3(12):e3950.

18. del Toro R, Prahst C, Mathivet T, et al. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood*. 2010;116(19):4025-33.
19. Le Jan S, Amy C, Cazes A, et al. Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2003;162(5):1521-1528.
20. Cazes A, Galaup A, Chomel C, et al. Extracellular matrix-bound angiopoietin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton. *Circ Res*. 2006;99(11):1207-1215.
21. Palamakumbura AH, Trackman PC. A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples. *Anal Biochem*. 2002;300(2):245-251.
22. Nakatsu MN, Sainson RC, Aoto JN, et al. Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUV-EC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and angiopoietin-1. *Microvasc Res*. 2003;66(2):102-112.
23. Faye C, Inforzato A, Bignon M, et al. Transglutaminase-2: a new endostatin partner in the extracellular matrix of endothelial cells. *Biochem J*. 2010;427(3):467-475.
24. Le Jan S, Le Meur N, Cazes A, et al. Characterization of the expression of the hypoxia-induced genes neurtin, TXNIP and IGFBP3 in cancer. *FEBS Lett*. 2006;580(14):3395-3400.
25. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005;105(2):659-669.
26. Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzensbichler B, Isner JM. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol*. 1998;152(6):1667-1679.
27. Gansner JM, Mendelsohn BA, Hultman KA, Johnson SL, Gitlin JD. Essential role of lysyl oxidases in notochord development. *Dev Biol*. 2007;307(2):202-213.
28. Isogai S, Lawson ND, Torrealdaly S, Horiguchi M, Weinstein BM. Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development*. 2003;130(21):5281-5290.
29. Reynaud C, Baas D, Gleyzal C, Le Guellec D, Sommer P. Morpholino knockdown of lysyl oxidase impairs zebrafish development, and reflects some aspects of copper metabolism disorders. *Matrix Biol*. 2008;27(6):547-560.
30. Levental KR, Yu H, Kass L, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009;139(5):891-906.
31. Rhodes JM, Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med*. 2007;11(2):176-205.
32. Scheurer SB, Rybak JN, Rosli C, Neri D, Elia G. Modulation of gene expression by hypoxia in human umbilical cord vein endothelial cells: a transcriptomic and proteomic study. *Proteomics*. 2004;4(6):1737-1760.
33. Fujimoto E, Tajima S. Reciprocal regulation of LOX and LOXL2 expression during cell adhesion and terminal differentiation in epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2009;55(2):91-98.
34. Hein S, Yamamoto SY, Okazaki K, Jourdan-LeSaux C, Csiszar K, Bryant-Greenwood GD. Lysyl oxidases: expression in the fetal membranes and placenta. *Placenta*. 2001;22(1):49-57.
35. Reiser K, McCormick RJ, Rucker RB. Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *Faseb J*. 1992;6(7):2439-2449.
36. Maki JM, Sormunen R, Lippo S, Kaarteenaho-Wiik R, Soininen R, Myllyharju J. Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues. *Am J Pathol*. 2005;167(4):927-936.
37. Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling and the regulation of angiogenesis. *Cell Adh Migr*. 2007;1(2):104-106.
38. Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, et al. Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res*. 2005;65(24):11429-11436.
39. Hollosi P, Yakushiji JK, Fong KS, Csiszar K, Fong SF. Lysyl oxidase-like 2 promotes migration in noninvasive breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *Int J Cancer*. 2009;125(2):318-327.
40. Lucero HA, Ravid K, Grimsby JL, et al. Lysyl oxidase oxidizes cell membrane proteins and enhances the chemotactic response of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2008;283(35):24103-24117.
41. Poschl E, Schlotzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development*. 2004;131(7):1619-1628.
42. Kucera T, Strlic B, Regener K, Schubert M, Laudet V, Lammert E. Ancestral vascular lumen formation via basal cell surfaces. *PLoS One*. 2009;4(1):e4132.
43. Sacharidou A, Koh W, Stratman AN, Mayo AM, Fisher KE, Davis GE. Endothelial lumen signaling complexes control 3D matrix-specific tubulogenesis through interdependent Cdc42- and MT1-MMP-mediated events. *Blood*. 2010;115(25):5259-5269.
44. Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood*. 2009;114(24):5091-5101.
45. Zovein AC, Luque A, Turlo KA, et al. Beta1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. *Dev Cell*. 2010;18(1):39-51.



blood[®]

2011 118: 3979-3989
doi:10.1182/blood-2010-10-313296 originally published
online August 11, 2011

Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane

Marine Bignon, Cathy Pichol-Thievend, Julie Hardouin, Marilyne Malbouyres, Nicolas Bréchet, Luiz Nasciutti, Alain Barret, Jérémie Teillon, Emilie Guillon, Eric Etienne, Michel Caron, Raymonde Joubert-Caron, Catherine Monnot, Florence Ruggiero, Laurent Muller and Stéphane Germain

Updated information and services can be found at:
<http://www.bloodjournal.org/content/118/14/3979.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections
[Vascular Biology](#) (517 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://www.bloodjournal.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Annexe 4

Centres de ressources et aides en ligne

La communauté du modèle poisson zèbre étant de plus en plus importante, de nombreux centres de ressources documentaires et biologiques mais aussi de nombreux sites internet notamment de génomiques ont été développés et sont autant d'aides précieuses qu'il m'a semblé important de faire figurer dans une thèse.

- Ressources documentaires:

-ZIRC (Zebrafish International Resource Center) est le centre international de référence.

<https://zebrafish.org/>

-Zebrafish book (4ème édition en ligne: https://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html) répertorie notamment un ensemble de protocoles standards (élevage, biologie moléculaire,...)

-Zebrafish wiki est également un site de partage d'information avec la communauté poisson zèbre et permet notamment un accès à la 5ème édition du « zebrafish book » et un accès aux ressources communautaires sur les anticorps (pour les immunomarquages)

<https://wiki.zfin.org/>

-Zfin : <http://zfin.org/> regroupe de nombreuses informations telles que les annuaires des laboratoires, chercheurs, fournisseurs ; offre de poste, documentation sur l'utilisation du modèle en enseignement (TP, animations,...) et répertorie également des bases de données biologiques (génome, HIS, mutants, transgéniques,...)

- Sites de génomiques:

-GBrowse permet une visualisation des données d'expression (HIS,...):

<https://zfin.org/action/gbrowse/>

-UCSC Genome Browser permet notamment de réaliser des alignements multi-espèces

<https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>

-Genomicus permet l'analyse de synténie (paralogues, orthologues,...):

<http://www.genomicus.biologie.ens.fr/genomicus-92.01/cgi-bin/search.pl>

-CrispOR permet de sélectionner des ARNsg pour l'édition de génome. Le site compile plusieurs méthodes et intègre les principaux génomes poissons-modèles.

<http://crispor-beta.tefor.net/>

•Ressources biologiques du ZIRC:

- <http://zebrafish.org/fish/lineAll.php> permet l'accès aux différentes lignées de poisson zèbre (sauvage, mutants, transgéniques).

- <http://zebrafish.org/est/estAll.php> et <http://zebrafish.org/abs/absAll.php> permet l'accès aux cDNA, EST, anticorps...

-<http://zebrafish.org/health/index.php> est un service de diagnostic et d'analyses sanitaires.

Attention toutefois aux frais d'envoi et aux frais/procédures de douane.

•Autres centres de ressources biologiques:

-EZRC : présente essentiellement les mêmes prestations que le ZIRC :
<http://www.ezrc.kit.edu/>

-RIKEN National Bioresource project : propose notamment des mutants et lignées

« enhancer traps » https://shigen.nig.ac.jp/zebra/index_en.html

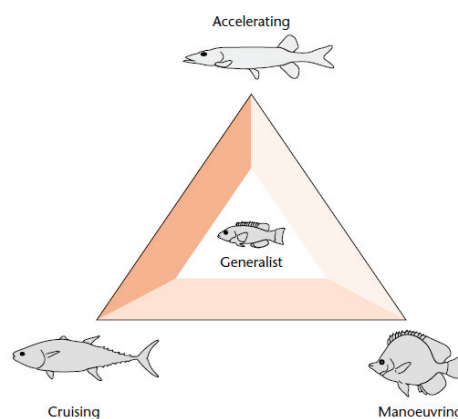
-AMAGEN propose des lignées sauvages ainsi que la production de lignées à façon:

amagen@inaf.cnrs-gif.fr

Annexe 5

Evaluation des performances de nage

La capacité d'un poisson à manœuvrer (changer de direction, s'arrêter, repartir...) dépend de la flexibilité de son corps, de la mobilité et de la position des nageoires (Fish, 2001; Webb, 1984). Ainsi, les thons sont spécialisés pour la nage rapide et continue mais sont peu performant comparé au brochet, un spécialiste de l'accélération et au poisson papillon, un spécialiste des rotations (Figure ci-dessous). Le long corps du brochet est composé de 55 à 60 % de muscle. La position des nageoires dorsales et anales près de la nageoire caudale contribuent à la production d'une grande poussée utilisée pour capturer des proies par exemple. Un petit corps et le profil général du poisson papillon constituent des caractéristiques idéales pour effectuer des virages à faible vitesse. La plupart des poissons sont généralistes (c'est le cas du poisson zèbre) est présente une morphologie qui est une sorte de compromis entre les trois formes spécialisée (Fish, 2001).



Spécialisation morphologique associée à la performance de nage. Le thon est spécialisé pour la nage stable ou de « croisière », le brochet pour la nage instable de type « accélération », les poissons papillons pour les manœuvres. Un poisson dit « généraliste » comme le bar est un compromis morphologique entre les diverses formes spécialisées. D'après Fish, 2001.

▪ Notion d'allométrie

Le terme allométrie (« allo » vient du grec allos = « autres », donc dans ce cas « autre que métrique », c'est-à-dire non-linéaire) a été créé en 1936 par Julian Huxley et Georges Teissier en tant que désignation conventionnelle, en biologie, des phénomènes de croissance différentielle d'organes, dans la mesure où ils tombent sous une loi de forme mathématique spécifiée (relations exponentielles dans beaucoup de cas). L'allométrie est l'étude des échelles de relations entre une partie du corps et le corps dans son ensemble. Plus récemment, la signification de l'allométrie s'est élargie pour faire référence aux relations biologiques en général : traits morphologiques (taille du cerveau / taille du corps), traits physiolo-

giques (taux métabolique/masse), traits écologiques (taille des ailes / performance de vol). Les relations allométriques peuvent être décrites pour presque toutes les mesures biologiques qui co-évoluent. Le thème principal en allométrie décrit comment des traits et des processus évoluent l'un par rapport à l'autre, il s'agit souvent de rapporter cela à la masse ou la taille de l'animal. La vitesse de nage absolue (en cm. s⁻¹ par exemple) d'un poisson augmente avec sa taille mais la vitesse de nage relative (exprimée en LC.s⁻¹ ou longueur corporelle par seconde), elle, diminue lorsque la taille du poisson augmente. (Brett, 1964). L'étude de l'allométrie concerne les mécanismes fonctionnels qui génèrent ces relations, leur impact écologique et leur réaction à l'influence de l'évolution. Une relation allométrique existe entre la consommation d'oxygène et la masse corporelle. Elle a été mise en évidence chez de nombreuses espèces. Ainsi, la consommation d'oxygène spécifique, c'est-à-dire exprimée en fonction de la masse de l'organisme, est plus élevée chez les petits individus et ce, au sein d'une même espèce ou inter-spécifiquement. Pour tenir compte de cet effet allométrique la consommation d'oxygène mesurée chez un individu peut être corrigée selon la formule suivante:

$$MO_{2cor} = MO_{2meas} \cdot (MO_{2meas} \cdot M_{cor}^{-1})^{1-b}$$

où MO_{2cor} (en mg O₂ g⁻¹ h⁻¹) est la consommation d'oxygène d'un poisson standard de 1 g (M_{cor}), MO_{2meas} (en mg O₂ g⁻¹ h⁻¹) est la consommation d'oxygène mesurée pour le poisson au cours de l'expérience de test de nage dont le poids est M_{meas} (en g) et b est le facteur allométrique décrivant la relation entre consommation d'oxygène et la masse corporelle. En effet, le taux métabolique d'un organisme augmente avec sa masse corporelle selon l'équation $Y = aM^b$ où Y est le taux métabolique standard ou actif, a est une constante spécifique à l'espèce, M est la masse corporelle et b est un taux exponentiel (b_b et b_m , respectivement pour le taux métabolique standard ou actif). Un dogme largement reconnu en biologie, sous le nom de « loi de Kleiber », implique que le taux métabolique standard d'un organisme correspond aux trois quart de sa masse corporelle ($b_b=0.75$). Cependant, après plus d'un siècle de recherche, de nombreuses questions restent en suspens concernant l'effet de la taille d'un individu sur son taux métabolique. Par exemple, il y a toujours controverse concernant la valeur de b_b (Bokma, 2004; Killen et al., 2007) et sa constance au sein d'une espèce. Les études actuelles ont tendance à converger vers l'invalidation du dogme de la loi de Kleiber (Bokma, 2004) et b_{SMR} et b_{AMR} sont donc à définir pour l'espèce étudiée. L'équation suivante est ainsi utilisée par de nombreux auteurs. Elle permet de décrire pour chaque niveau d'activité les besoins en oxygène associés.

Le taux métabolique standard correspond spécifiquement à une activité natatoire nulle:

$MO_2 = SMRbu$ où MO_2 est la consommation d'oxygène (en $mg\ d'O_2\ g^{-1}\ h^{-1}$), $SMR = MO_2$ lorsque la vitesse est de $0\ LC.s^{-1}$, b est une constante à définir pour la population étudiée et U est la vitesse de nage en $LC.s^{-1}$. AMR est mesurée comme la consommation d'oxygène maximale mesurée au cours du test de nage. AMS est la différence entre AMR et SMR. U_{crit} , SMR, AMR and AMS sont mesurés pour chaque poisson.

Il a également été montré que d'autres variables intrinsèques telle que l'ontogénie peuvent influencer le métabolisme indépendamment d'autres facteurs tels que les conditions environnementales par exemple (Bokma, 2004; Killen et al., 2007, 2010; Moran and Wells, 2007). Malgré un intérêt croissant pour le modèle *D. rerio*, seules les études de Barrionuevo et Burggren (1999) et Burggren et Monticino (2005) abordent la question de l'influence de la masse corporelle sur le métabolisme, bien qu'ils n'établissent toujours pas la régression décrivant cette relation. Il faudra attendre 2014 pour que Lucas *et al* établissent cette relation allométrique chez le poisson zèbre *D. rerio* et définissent la constante exponentielle spécifique à cette espèce. Dans cette étude, Lucas *et al*, mesurent les valeurs AMR et SMR à trois stades de développement différents (5 jpf, 2 mpf et 6 mpf) car de précédentes études réalisées chez le poisson (Killen et al., 2007; Moran and Wells, 2007) proposent que le taux métabolique des larves diffère des stades juvéniles et adultes du fait d'un développement incomplet. Finalement, Lucas *et al*, montrent que dans le cas du poisson zèbre *D. rerio*, ces constantes ne diffèrent pas de manière significative selon le stade étudié. Lucas et al., 2014, estiment b chez le poisson zèbre *D. rerio* comme la relation liant AMR ou SMR et masse corporelle (respectivement b_{AMR} et b_{SMR}). Au cours de notre étude nous utilisons donc $b_{AMR} = 0.926$ pour corriger l'AMR et $b_{SMR} = 0.965$ pour corriger la SMR comme établi dans cette étude.

Annexe 6 Le cycle de vie du poisson zèbre.

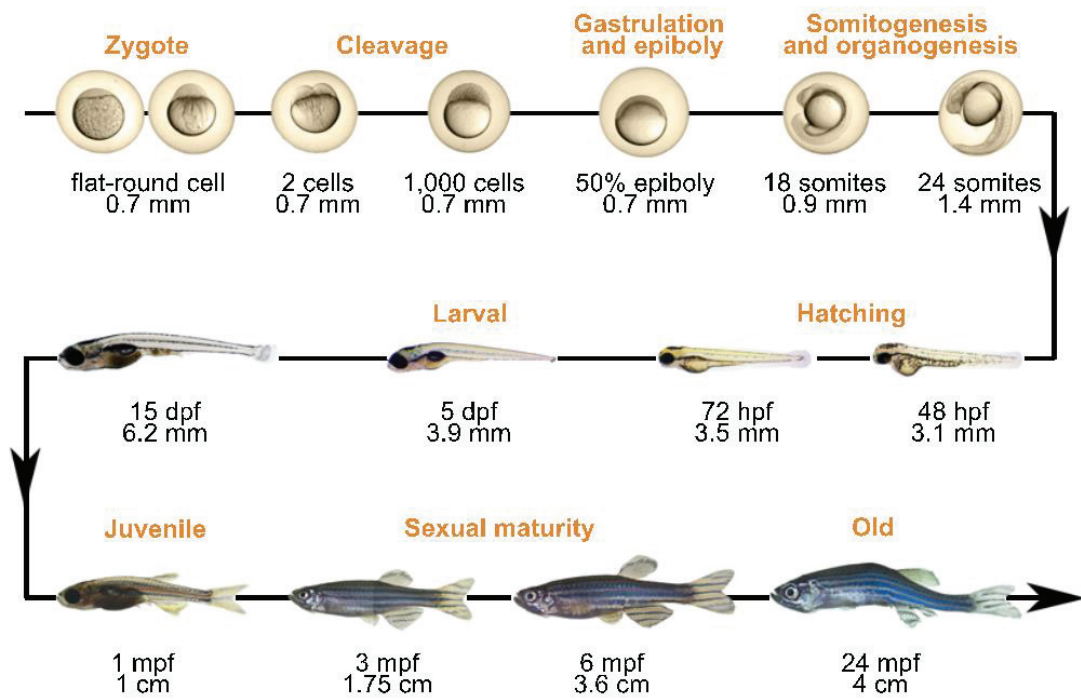


Illustration de M. Malbouyres et P. Nauroy

Résumé

Le collagène XXII (COLXXII) a été décrit, en 2004, comme un marqueur des jonctions tissulaires chez la souris. En particulier, la jonction myotendineuse (JMT) est une matrice extracellulaire spécialisée qui assure une liaison structurale entre le muscle squelettique et le tendon et permet la transmission des forces de contraction au squelette. Mon projet de thèse a visé à caractériser le rôle de COLXXII *in vivo*; le modèle du poisson zèbre a été choisi.

Chez le poisson zèbre, *col22a1* code pour COLXXII dont l'expression débute dans tout le somite, puis, se restreint progressivement aux extrémités des fibres musculaires au niveau de la JMT, où est déposée la protéine. Utilisant la technique de morpholino-knockdown, nous avons montré que les morphants développent un phénotype dystrophique et que le COLXXII fait très probablement partie du complexe d'ancrage intégrine $\alpha7\beta1$. Cependant, compte-tenu de la durée d'efficacité réduite des morpholinos, notre étude était limitée. Utilisant la technologie CRISPR-Cas9, nous avons donc généré deux lignées invalidées pour *col22a1*. L'analyse ultra-structurale des poissons *col22a1*^{-/-}, de la jeune larve à l'adulte, montre que les interdigitations du sarcolemme, caractéristiques de la JMT, sont pratiquement absentes chez les mutants (comme chez les morphants), pouvant impacter la transmission des forces et/ou l'attachement du muscle aux myoseptes (tendons).

De façon intéressante, pour les deux lignées, la même proportion de larves présente un phénotype très sévère entraînant la mort vers 2 semaines post-fécondation (spf). Les autres larves, elles, survivent et ne montrent pas de phénotype global particulier. En revanche, une forte réduction des interdigitations de la JMT est constatée et dans de rares cas, après challenge des poissons, une rupture musculaire est observée. Une première approche de q-PCR par gène candidat a été réalisée et il semble possible que les différences phénotypiques soient liées à des événements conjoints d'expressivité variable et de compensation génique.

Enfin, utilisant un système original de test de nage à contre-courant par palier, j'ai montré que les poissons *col22a1*^{-/-} âgés de 6 mois ont une capacité de nage très diminuée et consomment d'avantage d'O₂ pendant l'effort comparés aux animaux sauvages. L'efficacité du système musculo-squelettique semble donc moindre en l'absence de collagène XXII.

Nos résultats devraient permettre de considérer *COL22A1* comme un gène candidat pour les cas de dystrophies musculaires dont la cause génétique est non élucidée.

Mots clés: poisson zèbre, collagène XXII, jonction myotendineuse, morpholinos, CRISPR-Cas9, dystrophie musculaire, performance de nage.