THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Biologie Moléculaire et Cellulaire du Développement

Ecole doctorale

COMPLEXITE DU VIVANT

Présentée par

M. François Xavier DUTRIEUX

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet:

Etude du rôle des protéines QkiA et QkiC dans la myofibrillogénèse précoce et la maturation des fibres musculaires lentes chez le Poisson Zèbre.

Soutenue le 17 Janvier 2014

Devant la commission d'examen formée de :

Pr. Claire Fournier-Thibault	**Président de Jury**
Pr. Uwe STRÄHLE	**Rapporteur**
Dr. Jean-Stéphane JOLY	**Rapporteur**
Dr. Estelle HIRSINGER	**Examinatrice**
Dr. Frédéric ROSA	**Directeur de thèse**

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
Bureau d'accueil,
Inscription des doctorants et base de données.
Escalier G, 2ème étage

15 rue de l'école de médecine
75270-PARIS CEDEX 06
Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35
Fax : 01 42 34 68 40
E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

RESUME DE LA THESE

Chez le poisson zèbre, le muscle squelettique axial est composé de deux types de fibres musculaires différentes, les fibres lentes et les fibres rapides, organisées le long de l'axe antéro-postérieur et délimités par des frontières somitiques. Les cellules cuboïdes adaxiales, précurseurs des fibres lentes, sont les premières cellules musculaires à se différencier. En cours de somitogenèse elles s'allongent et migrent à partir de la notochorde radialement vers l'extérieur du somite formant une couche monocellulaire de fibres lentes mononuclées.

Au sein de ces précurseurs en cours de réarrangement, se déroule l'initiation de la myofibrillogénèse. Ces premières étapes de formation des myofibrilles sont peu connues et nous aimerions comprendre les mécanismes sous-jacents liés à cette initiation. La structure et la composition du sarcomère sont conservées au cours de l'évolution, offrant la possibilité d'utiliser le poisson zèbre comme model afin de mieux comprendre les processus de myofibrillogénèse chez les Vertébrés et potentiellement d'expliquer l'origine des Myopathies Myofibrillaires qui affectent le développement des myofibrilles chez l'Homme.

Récemment, nous avons montré que la perte de fonction la protéine Quaking A chez le poisson zèbre perturbait, entre autre, la maturation finale des fibres musculaires lentes. Cette protéine de liaison aux ARN fait partie de la famille des protéines à domaine STAR, elle possède généralement d'autres isoformes chez les Vertébrés.

Au cours de ma thèse, j'ai identifié chez le poisson zèbre, par comparaison de séquence *in silico*, un homologue du gène *qkiA* que nous avons nommé *qkiC.* L'expression des gènes *qkiA* et *qkiC* est recouvrante sur le territoire des cellules adaxiales. Bien que la perte de fonction de QkiC n'ait aucuns effets sur développement des fibres lentes, la perte de fonction conjointe de QkiA et QkiC induit un phénotype cellulaire autonome sévère et ce, dès les stades précoce de myofibrillogénèse. Ensemble nos données suggèrent une interaction fonctionnelle des deux homologues dans les cellules adaxiales que nous avons cherché à comprendre et à décrire. Un phénotype similaire est induit par la perte de fonction des protéines Mef2C/D, Nous avons montré que ces deux voies agissent en parallèle afin d'initier et d'accompagner le programme de myofibrillogénèse.

A 24hpf, une accumulation des protéines de Myosine et une dissection/désolidarisation des filaments épais sont observées dans les fibres lentes, fortement lié à une destruction importante de la bande-Z. Ces phénotypes sont similaires à ceux utilisés par les pathologistes pour décrire les Myopathies Myofibrillaires.

Ainsi, notre étude montre un nouveau type de régulation précoce de la myofibrillogénèse et offre un model potentiel pour étudier chez le poisson zèbre les myopathies myofibrillaire.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENT……5

INTRODUCTION……...7

I- FORMATION ET DEVELOPPEMENT DU MYOTOME : LA MYOGENESE PRECOCE…..8

I.1. SEGMENTATION DU MESODERME PRESOMITIQUE : LA SOMITOGENESE….8

I.1.a Spécification du mésoderme paraxial……...9

I.1.b Segmentation du mésoderme paraxial ……11

I.1.c Formation de la frontière somitique ……13

I.1.d Les précurseurs musculaires……..……14

I.2. MYOGENESE PRECOCE…… 17

I.2.a Les fibres lentes sont d'origine adaxiale……18

- Origines
- Réarrangement
- Migration
- Ancrage à la frontière et formation de la jonction myo-tendineuse
- Voie de signalisation et MRF: induction des fibres lentes
- Les muscles pionniers

I.2.b Les fibres rapides …… 25

- Origine
- Réarrangement
- Voie de signalisation et MRF : induction des fibres rapides

I.2.c Dermomyotome: Les cellules de la bordure antérieure ……27

II- STRUCTURE ET FORMATION DU SARCOMERE ……29

II.1. ELEMENTS DU SARCOMÈRE ……31

II.1.a Filaments fins……32

II.1.b Filaments épais ……33

II.1.c Bande-Z……..34

II.1.d Titine: la protéine géante du sarcomère ……..……40

II.2. MODÈLES D'ASSEMBLAGE……41

II.3 MYOPATHIES MYOFIBRILLAIRES COMPARÉES……45

II.3.a Myopathies Myofibrillaires chez l'Homme ……46

II.3.b Myopathies Myofibrillaire chez la Drosophile……...47

II.3.c Myopathies Myofibrillaire chez le Poisson Zèbre…… 50

III- QUAKING : UNE PROTEINE DE LIAISON AUX ARNm…… 52

III.1. QUAKING : UNE PROTÉINE STAR……52

III.1.a Généralités……52

III.1.b Structure commune des protéines Quaking : le domaine STAR…… 54

- KH-QUA2 : le «maxi-domaine» de liaison aux ARNm
- Domaine QUA1 : dimérisation des protéines Quaking
- Les spécificités des domaines C-terminaux

III.2. FONCTION BIOLOGIQUE DE QUAKING SUR LES ARNm……..58

III.2.a Stabilisation/Destabilisation……...58

III.2.b Localisation/ transport……58

III.2.c Epissage……59

III.3. ROLE DES PROTEINES QUAKING DANS LE DEVELOPPEMENT……..59

III.3.a Un rôle central dans la myélinisation des oligodendrocytes murin……59

III.3.b Rôle dans la maturation des cellules tendineuses chez la Drosophile…...62

III.3.c Rôle de Quaking dans le développement de la schizophrénie Humaine...64

III.3.d Quaking chez le poisson zèbre……66

RESULTATS……69

ARTICLE……69

DISCUSSION DE THESE ……..99

BIBLIOGRAPHIE……123

REMERCIEMENTS

Il est des moments dans la vie où l'on hésite, où l'on cherche à faire des choix et à se construire. Cette thèse fait partie de ces engagements importants qui m'ont permis d'avancer et de m'épanouir. Me faisant passer du jeune étudiant curieux et insouciant à, je l'espère, un jeune adulte plus mature et plus structuré mais toujours aussi curieux…
J'ai passé quatre années à essayer de comprendre comment un précurseur musculaire pouvait naturellement réunir et assembler des protéines élémentaires afin de former une cellule fonctionnelle possédant une structure douée d'une force contractile. Certains pourront voir ici une métaphore de la maturation d'un étudiant en thèse. Ces étapes de maturation ne se font pas aléatoirement, elles nécessitent des phases d'initiation et de régulation. Je dédis donc ce mémoire aux initiateurs et aux régulateurs de mon travail.

Je tiens tout d'abord à remercier Uwe Strähle et Jean Stephane Joly d'avoir, en tant que rapporteurs de ma thèse, consacré une partie de leur temps à la relecture du mémoire. Je remercie également Estelle Hirsinger et Claire Fournier-Thibault, d'avoir accepté d'être membres de ce jury.

Mes remerciements vont ensuite vers Frédéric Rosa qui a cru en ce jeune étudiant aux idées un peu farfelues et éparses. Il a su patiemment structurer ma pensée en m'apprenant à me poser les bonnes questions en temps voulu. Sa rigueur, son esprit critique et son expérience m'ont vraiment permis d'avancer durant ces quatre années. Je le remercie donc d'avoir été présent tant sur un plan professionnel que personnel, une thèse étant avant tout une histoire humaine qui se partage et qui perdure.

Par la suite j'aimerais remercier Riadh Lobbardi qui m'a introduit à ce sujet. Cette thèse repose en grande partie sur son travail préliminaire. Il a su me convaincre à me lancer dans ce projet. Je le remercie aussi pour son apport lors des corrections de ce manuscrit. Je lui souhaite le meilleur dans son avenir scientifique et pour son rôle de futur père. Qu'il soit aussi patient qu'il l'a été avec moi.

J'aimerais aussi remercier Guillaume Lambert, collègue et acolyte, maitre de l'expérience bien faite, glisseur de pipettes, amateur de bonnes blagues et brillant père de famille. L'aventure ne s'arrête pas qu'au laboratoire.

Un grand merci à Benjamin Mathieu, pour son expertise sur les microscopes, pour le temps et l'intérêt qu'il porte à son travail. C'est avant tout un bon ami que je vais recroiser et avec qui je souhaiterais collaborer dans mon futur projet entrepreneurial.

Je tiens tout particulièrement à remercier Philipe Rostaing, qui m'a particulièrement aidé à la réalisation des études microscopie électronique. Je garderai en mémoire sa bonne humeur, son expérience et ses projets de construction lorsque nous passions des heures à scruter nos échantillons.

Je remercie tous les membres, présents et passés, de l'équipe Rosa et Charnay, qui m'ont apporté tant sur le plan scientifique que personnel : Marika, Julien « l'anglais », la belle Marina (qui mène un travail acharné et qui est proche de la fin!), Anna-Lila, Sylvain (pour son aide indéfectible et pour ses coups de gueule très utiles, tant pour moi que pour le reste du groupe), Aline, Nicolas, Brigitte, Florence, Patrick, Pascale, Alexandre mon bon ami des Happy Hours, Carole sans oublier les deux responsables du secrétariat : l'exceptionnelle Solange que j'ai tant « enquiquinée » et Ruben pour sa gentillesse et sa bonne humeur. Je souhaite remercier particulièrement Firas Bouallague, qui s'occupe sans défection et avec passion de l'animalerie Zebrafish, nous permettant de mener à bien nos expériences.
Je tiens également à remercier toutes les personnes qui travaillent dans « l'ombre » à l'Ecole Normale Supérieure, que nous ne voyons pas tous les jours mais qui contribuent à notre bien être, directement ou indirectement.

Mes remerciements vont évidemment à mes amis proches qui ont su m'accompagner durant ces quatre longues années, ils sont beaucoup trop nombreux alors je ne les citerai pas de peur de les oublier.

Enfin et surtout, je dédis directement cette thèse à ma famille : mes parents et ma sœur qui ont su me soutenir en toutes occasions, me laisser faire mes choix et surtout m'aider à les assumer. Je les remercie pour l'éducation qu'ils m'ont apportée, qui m'a permis d'en arriver là où je suis aujourd'hui, et pour l'amour qu'ils m'ont donné. Une dernière pensée monte vers mes grands parents, présent ou absents, je pense fort à eux.

Aux présents, aux absents et aux futurs …

INTRODUCTION

I- FORMATION ET DEVELOPPEMENT DU MYOTOME : LA MYOGENESE PRECOCE.

La myogenèse précoce correspond à toutes les étapes permettant la mise en place de structures musculaires matures et fonctionnelles à partir du feuillet embryonnaire mésodermique qui est peu différencié. Dans cette partie nous aborderons les processus complexes de la myogenèse précoce qui peuvent être résumés en trois étapes majeures : (1) la segmentation du mésoderme paraxial le long de l'axe antéropostérieur grâce à la formation des frontières somitiques. Cette segmentation va donner naissance à des unités répétées et symétriques le long de l'axe antéropostérieur, aussi appelées somites, qui contiennent les précurseurs musculaires. (2) Ces précurseurs musculaires vont se réarranger au sein du somite, s'allonger, s'attacher à la frontière somitique et migrerpour former des fibres musculaires. (3) Enfin ces précurseurs devenus fibres musculaires vont entrer en phase de maturation afin de devenir pleinement fonctionnelles.

Cette thèse porte sur l'étude des phases précoces de la formation du muscle chez le poisson zèbre. Ce modèle est particulièrement adapté à l'étude de la myogenèse. En effet, la relative transparence de ses tissus embryonnaires ainsi que son développement externe, permettent une observation facilitée du développement des muscles. De plus, les fibres musculaires se différencient et deviennent matures rapidement, 24 heures après la fécondation. Enfin de nombreux outils moléculaires permettent une modification aisée et précise de son génome et de son transcriptome.

I.1. SEGMENTATION DU MESODERME PRESOMITIQUE : LA SOMITOGENESE

Chez les métazoaires, la segmentation du tissu mésodermique paraxial, grâce à la mise en place des frontières somitiques, donnera naissance principalement aux structures musculaires du tronc, organisées en somites.

Les processus de segmentation chez les Métazoaires peuvent se faire selon deux modes : soit simultané : tous les somites se forment en même temps, comme pour la drosophile, soit séquentiel : dans ce cas les somites se forment au fur et à mesure en fonction de la spécification du mésoderme paraxial, ce mode est utilisé pour la formation des somites chez la souris, le poulet ou encore le poisson zèbre. La segmentation séquentielle se fait de manière concomitante avec la croissance postérieure de l'embryon et se produit pendant la somitogenèse (Bénazéraf & Pourquié, 2013).

Chez le poisson zèbre, ce processus dit séquentiel commence par une spécification du feuillet mésodermique paraxial, puis par la mise en place d'un patron de segmentation, suivie d'une accumulation de protéines aux frontières somitiques en formation. Ce processus de segmentation se finalise par l'interaction entre les cellules musculaires et la frontière, ce qui va venir renforcer cette frontière somitique. Le nombre de somites néoformés varie selon

les vertébrés, mais au sein d'une espèce il reste relativement constant, entre 30 à 32 somites pour le poisson zèbre (pour revue voir Richardson, Allen, Wright, Raynaud, & Hanken, 1998). Nous décrirons dans cette partie les trois étapes de la segmentation dite « séquentielle ».

I.1.a Spécification du mésoderme paraxial (pour revue voir Holley, 2006).

Durant la phase de gastrulation, les mouvements cellulaires importants dans le blastoderme vont donner naissance à trois feuillets embryonnaires : le feuillet extérieur, ou ectoderme, le feuillet intérieur, ou endoderme et un feuillet intermédiaire appelée mésoderme.

Le tissu mésodermique va être spécifié à partir du stade 50% d'épibolie, durant la phase d'involution. Les cellules à la marge du blastoderme vont subir un mouvement cellulaire d'internalisation et vont converger vers la ligne médiane dorsale pour former le corps de l'embryon (Figure 1 cellules vertes).

Pendant la gastrulation les cellules dorsales et latérales convergent vers la ligne médiane dorsale, pour former le corps de l'embryon. Les cellules ventrales vont former une zone de non-convergence (Holley, 2006; Myers, Sepich, & Solnica-Krezel, 2002).

D'une manière générale, le mésoderme fournira pendant l'embryogenèse les muscles, le squelette et les vaisseaux sanguins (Kimmel, Warga, & Schilling, 1990).

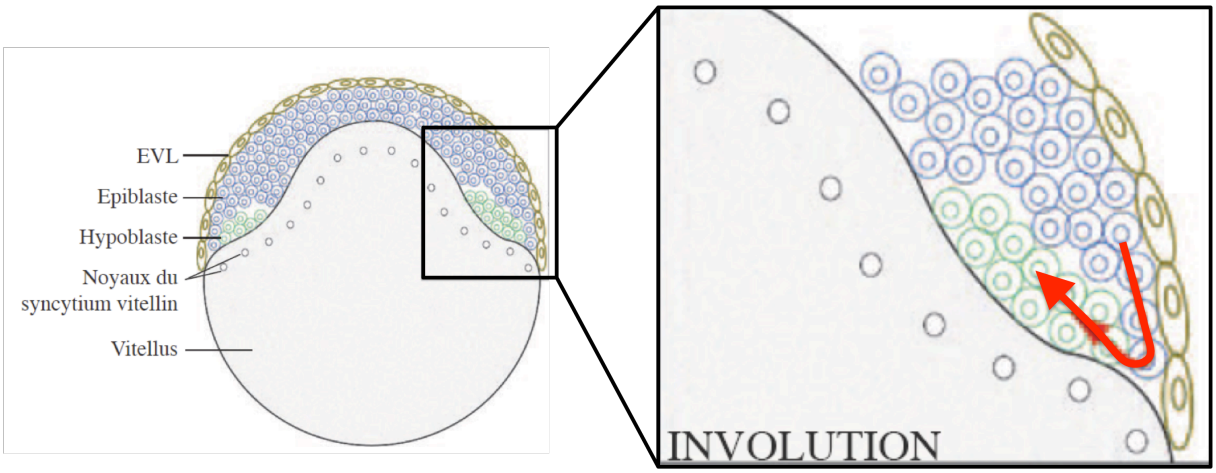


Figure 1 : Induction des cellules mésodermiques durant la gastrulation.
En cours d'épibolie, les cellules à la marge du blastoderme (cellules bleues) vont subir un mouvement cellulaire appelé « involution » (flèche rouge). Ce mouvement amène les cellules à s'internaliser et converger vers la ligne dorsale le long de la membrane vitelline (cellules vertes). Ces cellules se spécialisent alors en cellules mésodermiques.

Différentes approches génétiques et expérimentales (greffes) ont montrées que la localisation des cellules de la partie antérieure du tronc (somites 1 à 9), de la partie

postérieure du tronc (somites 10 à 17) et de la queue (18 à 30-32) est définie avant la gastrulation (Agathon, Thisse, & Thisse, 2003; Kimmel et al., 1990)(Figure 2).
La signalisation dorsale *nodal* est requise pour qu'une cellule soit destinée à la partie antérieure du tronc pendant que la signalisation ventrale *bmp* spécifie les somites de la queue (Szeto & Kimelman, 2006a). La signalisation *fgf* au niveau de la marge, induite par la signalisation *nodal*, participe à la formation de la partie postérieure du tronc en réprimant l'expression de *bmp* (Fürthauer, Van Celst, Thisse, & Thisse, 2004; Szeto & Kimelman, 2006b). Cette signalisation *fgf* est requise pendant la somitogenèse pour maintenir le devevenir de la plupart des précurseurs somitiques. En effet, des observations faites chez les doubles morphants *fgf8;fgf24* montrent l'absence de tous les somites sauf les 2-3 premiers (Draper, Stock, & Kimmel, 2003).
La signalisation *wnt* est également nécessaire au maintien des destins somitiques du tronc postérieur et de la queue. En effet, les embryons dépourvus de *wnt3a* et *wnt8* ne forment seulement que les 10-12 premiers somites (Thorpe, Weidinger, & Moon, 2005).

La régionalisation par les signalisations *nodal, fgf* et *bmp* est largement médiée à travers les gènes à boite T codant pour des facteurs de transcription comme *spadetail* (spt), *no-tail* (ntl) : *spt* spécifie les somites du tronc antérieur et postérieur pendant que *ntl* spécifie les somites de la queue (Amacher & Kimmel, 1998). Il y a donc une subdivision du mésoderme à partir de la gastrulation.
Ainsi, les signalisations *nodal, fgf, bmp, wnt* et les gènes à boite T agissent successivement pour définir précocement la spécification du mésoderme paraxial avant l'enclenchement du programme de segmentation.

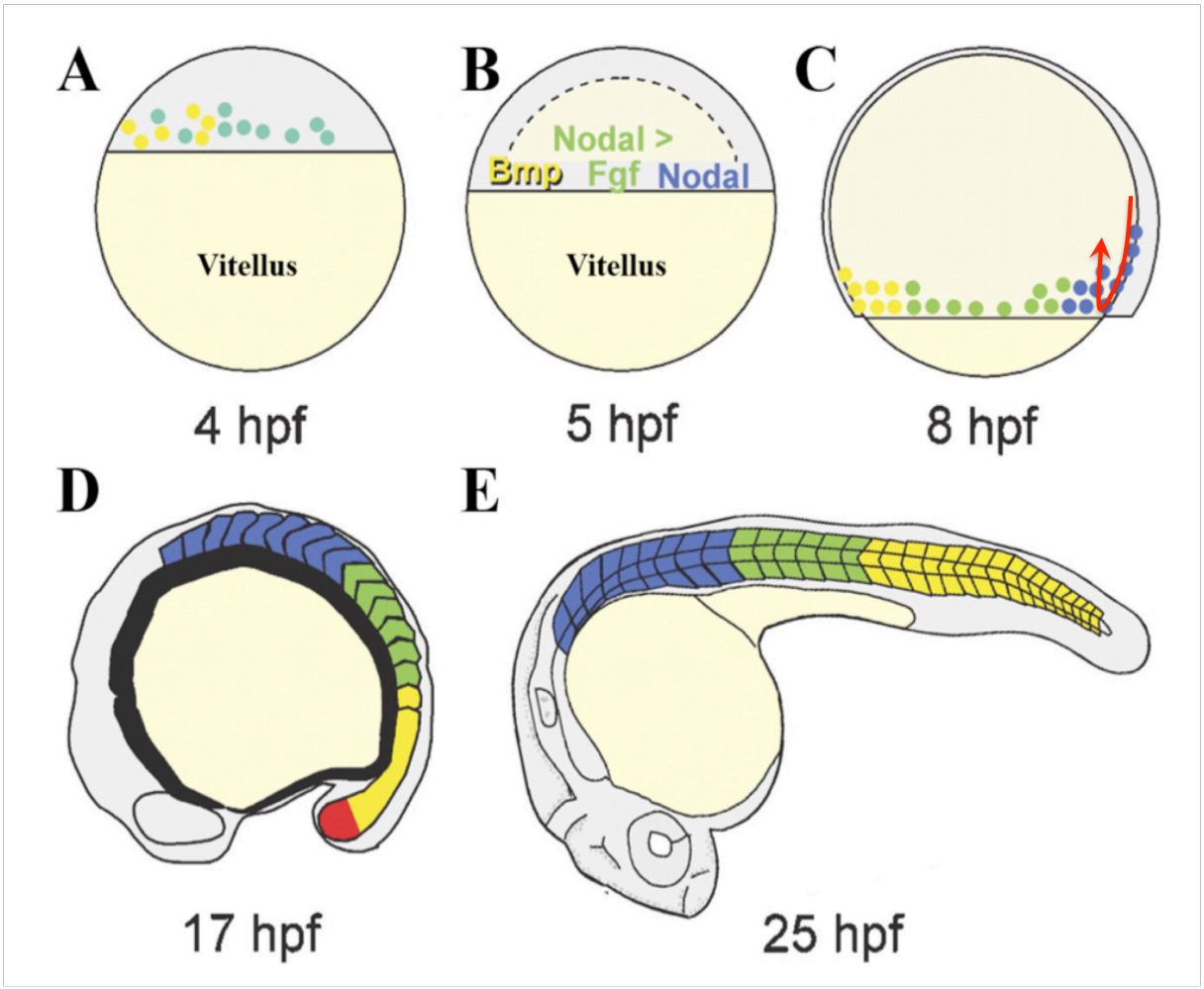


Figure 2 : **Les signalisations nodal, bmp et fgf spécifient les différentes parties du somite (adapte de Holley, 2006).**
A : La carte des territoires présomptifs des progéniteurs de la queue (jaune) et du tronc (vert clair) chez une blastula au stade sphère (4hpf)
B : A 5hpf, les précurseurs de la partie antérieure (bleu) et postérieure (vert) du tronc et ceux de la queue (jaune) sont spécifiés respectivement par la signalisation *nodal, nodal* et *fgf,* et *bmp.*
C : Au milieu de la gastrulation (vers 80% épibolie), les progéniteurs de la partie antérieure du tronc et certains de la partie postérieure convergent vers la ligne médiane dorsale, c'est l'involution (Flèche rouge). Les progéniteurs de la queue et certains de la partie postérieure du tronc restent à leur position.
D et E : Représentation des somites induits par les différentes signalisations au milieu (D) et à la fin (E) de la somitogenèse.

I.1.b Segmentation du mésoderme paraxial (pour revue voir Holley, 2007; Pourquié, 2003)

Une fois le mésoderme présomitique mis en place, un patron de segmentation va venir définir les bases de la segmentation des somites. Il a été montré qu'un système d'oscillations

moléculaires, aussi appelé horloge de segmentation, est à l'origine de ce patron de segmentation, délimitant génétiquement l'appartenance d'une cellule à un somite donné, aucune frontière physique n'ayant encore été développée.

L'embryon de vertébré a la capacité de réguler la somitogenèse afin que le nombre approprié de somites soit généré (30-32 pour le poisson zèbre), même quand le nombre de progéniteurs somitique varie significativement. Par exemple, la blastula d'amphibien, où 1/3 des blastomères ont été supprimés, peut donner naissance à un embryon complet, plus court mais possédant le même nombre de somites que ceux non manipulés, avec moins de cellules par somite. Il n'y a donc pas de contrainte physique au sein du mécanisme de segmentation impliquant qu'un segment doit contenir un nombre spécifique de cellules (Cooke, 1975). Ce sont l'ensemble de ces informations qui ont mené au modèle d'une segmentation basé sur un système oscillant, associée au front de migration pendant la somitogenèse (Cooke, 1981).

Plus récemment, l'existence de l'horloge de segmentation a été démontrée par l'expression rythmée d'un groupe de gènes dans le mésoderme présomitique (O Pourquié & Tam, 2001). Il s'agit d'un groupe de facteurs de transcription de la famille Her (hairy and enhancer of split-related) et DeltaC (ligand du récepteur Notch).

Ces gènes sont exprimés de manière dynamique et régulés spatio-temporellement sous forme d'une vague qui se propage dans du sens postérieur vers l'antérieur. On peut décomposer l'expression de ces gènes en trois phases : elle est initiée dans la partie la plus caudale, la zone des progéniteurs et s'étend dans la moitié postérieure du mésoderme présomitique. Puis la « vague » se propage vers la partie antérieure l'embryon pour être limitée à la moitié du mésoderme présomitique. Enfin l'expression devient restreinte à quelques cellules du mésoderme présomitique, là ou la segmentation va se réaliser, définissant ainsi le somite qui va se former (Figure 3). Je ne rentrerais pas plus loin dans l'explication moléculaire de l'horloge de segmentation, ce phénomène étant complexe, son explication n'est pas utile à la compréhension de cette thèse.

Ce patron de segmentation va permettre la création d'une frontière somitique physique, impliquant une accumulation de protéines caractéristiques de la frontière.

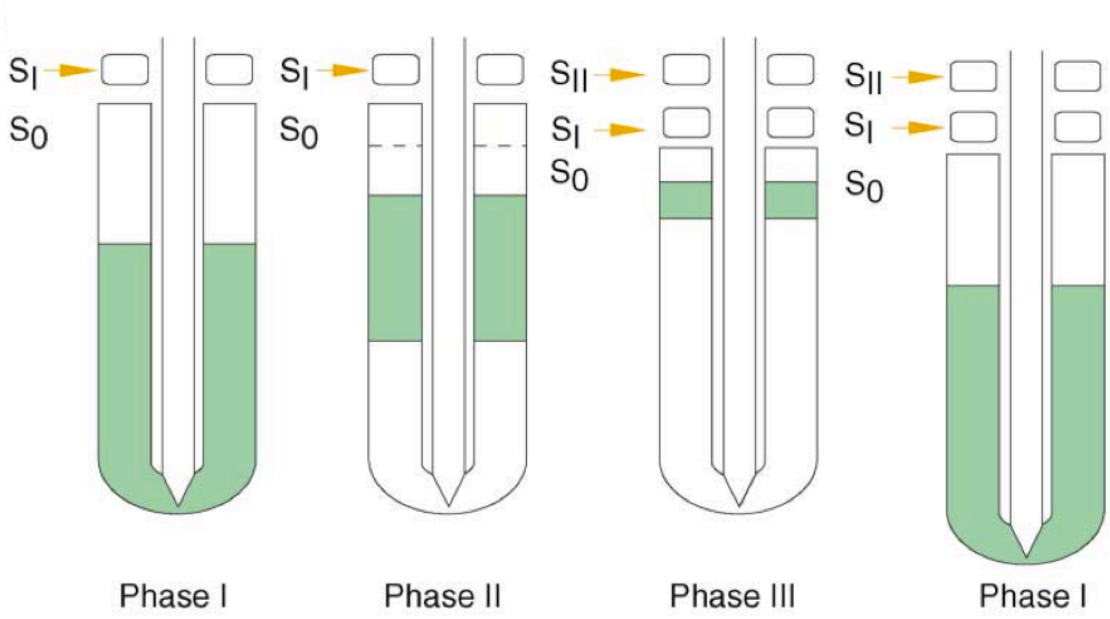


Figure 3 : Horloge de segmentation (d'après O Pourquié & Tam, 2001)
Chez le poisson zèbre, L'expression des gènes de l'horloge segmentation dans le mésoderme présomitique se déroule en trois Phases. Les protéines de la famille Her (*her1* et *her7*) et DeltaC sont exprimées de manière dynamique sous forme de « vague » (zone verte). D'abord exprimé dans la moitié antérieure (phase I) puis se restreint à la moitié du mésoderme présomitique (phase II). Enfin leur expression est restreinte de manière précise sur les quelques cellules qui formeront le nouveau somite (phase III).

I.1.c Formation de la frontière somitique (Clarissa A Henry, McNulty, Durst, Munchel, & Amacher, 2005; Holley, 2007)

L'initiation de la morphogenèse de la frontière est marquée par le « clustering » d'Integrin-α5 du côté basal des cellules de la frontière présomptive et de l'alignement des noyaux (Jülich, Geisler, & Holley, 2005). Peu de temps après, une matrice de Fibronectine commence à se former entre les segments adjacents (Crawford et al., 2003; Julich et al., 2005a). Ensuite, les cellules commencent à adopter une morphologie en colonne avec des noyaux alignés au niveau basal, un processus qui continue pendant la maturation du somite (Henry et al., 2000). L'actine filamenteuse s'accumule au niveau de la frontière (Barrios et al., 2003). La Paxilline et la FAK (focal adhesive kinase) phosphorylée et activée s'accumulent également le long du côté basal des cellules de frontières (Crawford, Henry, Clason, Becker, & Hille, 2003a). Les centrosomes sont localisés au niveau apical et la β-catenine est enrichie le long du cortex apical des cellules de frontières (Barrios et al., 2003) (Figure 4). Plusieurs heures après que le somite se soit initialement formé, une matrice de Laminine est assemblée le long de la frontière somitique (Crawford, Henry, Clason, Becker, & Hille, 2003b).

Entre ces frontières néoformées, il y a les précurseurs musculaires somitiques : ces cellules qui donneront les fibres musculaires chez le poisson zèbre. La partie suivant sera consacrées à l'interaction entre les précurseurs/fibres musculaires et la frontière induisant un renforcement de celle ci, ce qui permettra de créer une véritable zone d'arrimage pour les fibres capable de transmettre les forces de contractions : la jonction myotendineuse (MTJ).

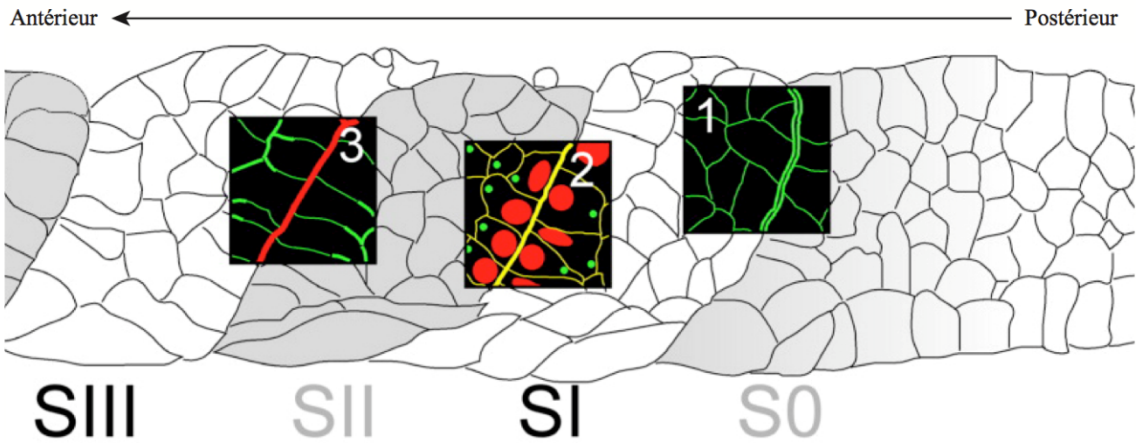


Figure 4 : Transition Mésenchyme-Eptihélium (d'après Holley, 2007)
1- Clustering de l'integrin-a5 du côté basal des cellules de la frontière (vert).
2- La frontière mature; l'actine filamenteuse se concentre le long de la frontière (jaune). Les noyaux sont localisés au niveau basal (rouge).
3- Les protéines associées aux intégrines, FAK et paxiline, sont localisées à la frontière de chaque somite (rouge) pendant que la b-caténine (vert) est enrichie au niveau apical des cellules de frontière.

I.1.d les précurseurs musculaires (Stellabotte & Devoto, 2007)

Dans la partie précédente, nous avons décrit le processus de segmentation du mésoderme pendant la phase de somitogenèse. Ce processus met en place les unités répétées, les somites, le long de l'axe antéro-posterieur.

Au sein des somites néoformés, le mésoderme va donner naissance à trois dérivés somitiques : le myotome, le sclérotome et le dermomyotome qui formeront respectivement les muscles du tronc (composée des fibres musculaires lentes et rapides), les vertèbres et le derme ainsi qu'un réservoir de progéniteurs musculaires (cellules souches).

Ici, nous allons présenter succinctement ces cellules issues du myotome et du dermomyotome.

En début de somitogenèse, trois types de précurseurs musculaires distincts on été identifiés en fonction de leur localisation au sein du somite et de leur organisation : les cellules adaxiales (en rouge), les cellules de la bordure postérieure (en bleu) et les cellules de la bordure antérieure (en vert) (Figure 6A).

→ Les cellules adaxiales sont adjacentes à la notochorde en début de somitogenèse (Figure 5 et 6A rouge). Ces précurseurs ont déjà une organisation caractéristique dans le mésoderme présomitique, remarquables par leurs formes cuboïdales, elles sont alignées en couche monocellulaire le long de la notochorde. Par somite, elles sont organisées en une matrice de cinq cellules de long sur cinq cellules de haut (Figure 5). Ces cellules adaxiales commencent à se différencier très tôt : déjà dans le mésoderme pré-somitique elles commencent à exprimer les MRF (Myogenic Regulatory Factors) tels que MyoD, Myf-5 ou bien la Tropomyosin (Stellabotte & Devoto, 2007).

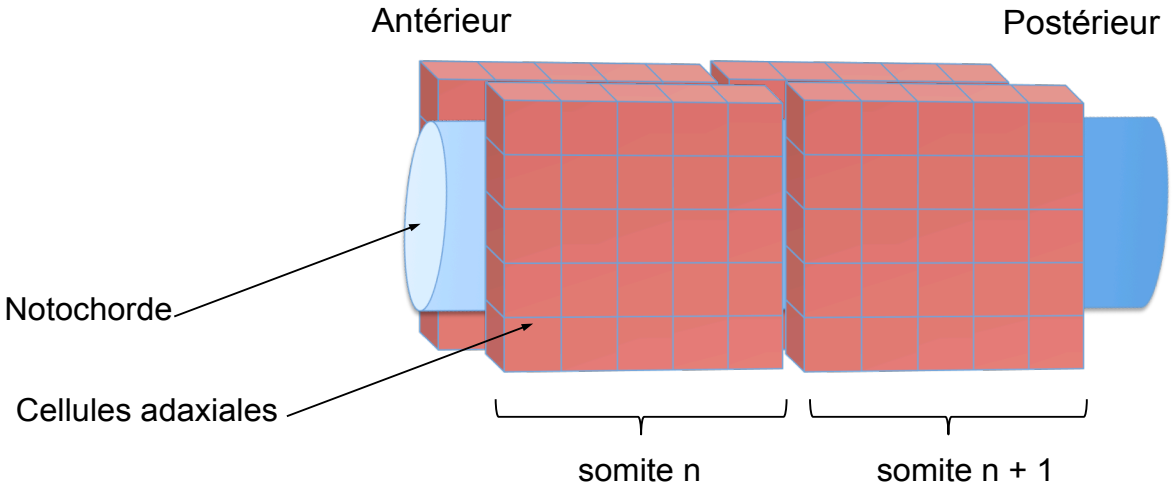


Figure 5 : Cellules adaxiales organisées en « matrice 5x5 ».
Dessin schématique de la plaque segmentale d'un embryon de poisson zèbre en somitogenèse en vue latérale. Dans chaque somite en formation, de part et d'autre de la notochorde, il y a environs 25 cellules adaxiales, dotées d'une forme cuboïdes et organisées en matrice de cinq cellules de long sur cinq cellules de large.

→ Les cellules de la bordure postérieure se trouvent comme leur nom l'indique sur la bordure postérieure du somite (Figure 6A bleu). Ces cellules sont les précurseurs des fibres rapides. Contrairement aux cellules adaxiales, les cellules de la bordure postérieure commencent à exprimer les MRF plus tardivement (Steinbacher et al., 2006, 2007).

→ Les cellules de la bordure antérieure (Figure 6A vertes). Elles ont été récemment identifiées. Ce sont les cellules qui donneront le dermomyotome. Les cellules du dermomyotome des poissons sont facilement identifiables, elles forment une couche épithéliale de cellules prolifératives à la surface du myotome (figure 6D) (Steinbacher et al.,

2006, 2007). Par contre, les cellules du dermomyotome n'expriment pas de MRF pendant la somitogenèse, indiquant que leur différenciation est beaucoup plus tardive.

Comment passer des précurseurs musculaires (Figure 6A) à des fibres spécifiées (Figure 6D)? Ici sera présenté les étapes de spécification des precurseurs musculaires.
En début de somitogenèse, ces précurseurs vont être soumis à différents signaux moléculaires, souvent repartis en gradient de concentration. En fonction de leur localisation dans le somite, cette signalisation va leur permettre de commencer à se réarranger et à se différencier pour donner naissance à différents types de fibres musculaires. C'est ce que nous allons présenter dans le chapitre suivant.

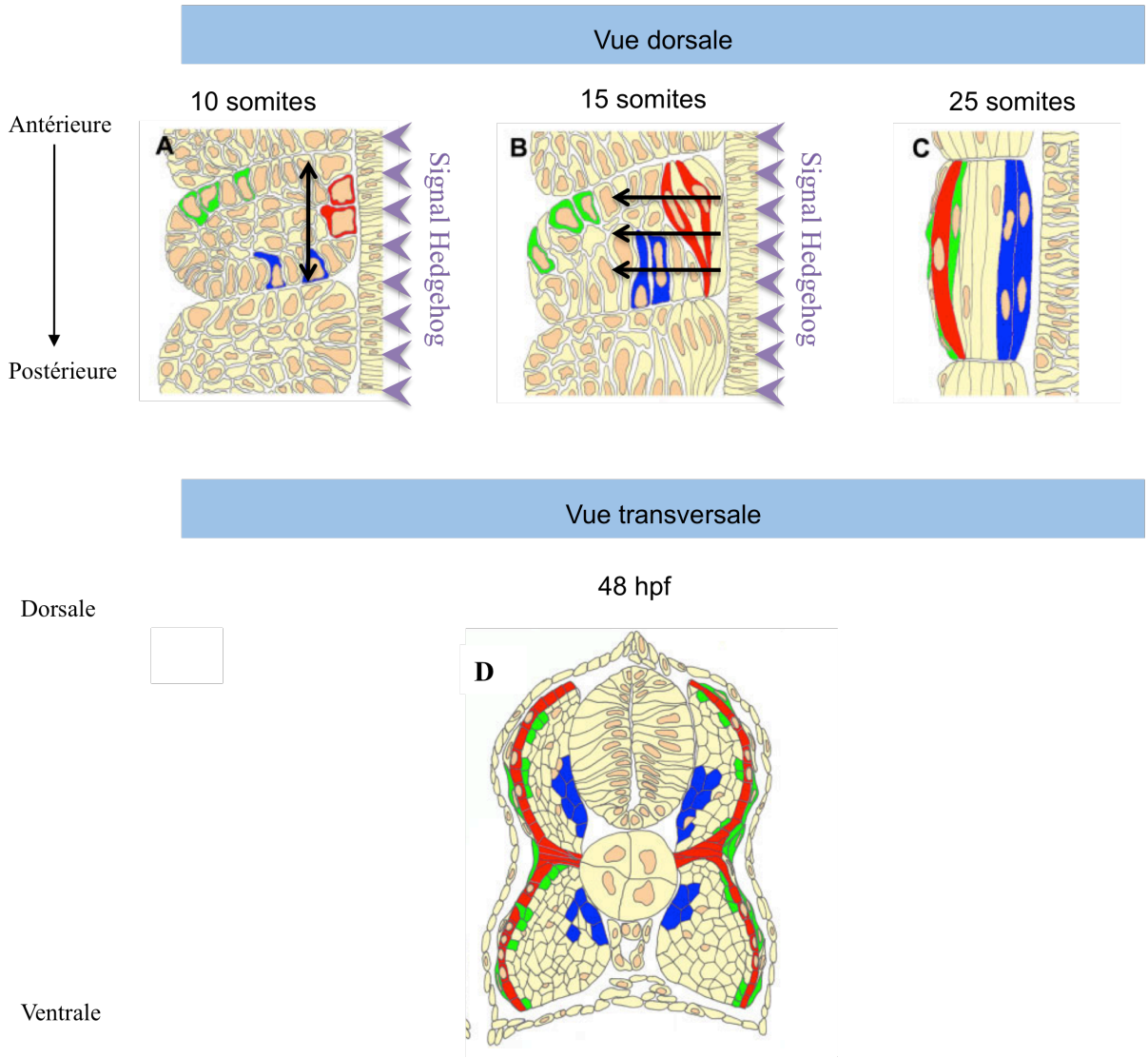


Figure 6 : Différenciations des précurseurs somitiques en fibres musculaires (d'après Stellabotte et Devoto 2007).
Représentation schématique des précurseurs somitiques contribuant au myotome.
En vue dorsales, les cellules adaxiales (rouges) sont en position médiale, adjacentes à la notochorde. Ce sont les premières à s'allonger (10 somites) et à migrer latéralement (15 somites). Cette migration induit la différenciation et l'élongation des précurseurs des fibres rapides (blues) qui dérivent de la partie postérieure du somite. Enfin, les précurseurs myogéniques appartenant au dermomyotome (vert), responsable de la croissance tardive du myotome, dérivent de la partie antérieure des somites.
En vue transversales à 48hpf, les fibres lentes (rouges) issues des cellules adaxiales, on migrées et se situent en périphérie du somite. Elles possèdent cette forme caractéristique « d'aile de papillon ». Les fibres rapides (bleues), dérivent des précurseurs postérieurs, forment un tissu musculaire multicouche sous les fibres rapides. Enfin les cellules du dermomyotome (vertes) sont situées sous le derme, intercalées avec les fibres lentes, prêtent a former des fibres musculaires *de novo.*

I.2. MYOGENESE PRECOCE

Chez les vertébrés, une grande majorité des cellules somitiques donne naissance au muscle. La myogenèse précoce correspond à la formation des fibres musculaires fonctionnelles (Figure 6D) à partir des différents précurseurs présents dans le somite néoformé (Figure 6A).

Chez le poisson zèbre, la myogenèse précoce se divise en quatre étapes majeures : dans un premier temps il y a un réarrangement des précurseurs musculaires au sein du somite, suivi d'une étape d'élongation des précurseurs selon l'axe antéropostérieur. Pendant cette phase d'élongation, les précurseurs migrent au sein du somite selon un modèle bien défini. A la fin du processus de migration les cellules vont s'ancrer fortement à la frontière somitique pour devenir des fibres spécialisées. Ces étapes ne sont pas synchronisées de la même manière en fonction des précurseurs (Devoto et al., 2006; Hammond et al., 2007; Hollway et al., 2007; Morin- Kensicki and Eisen, 1997; Morin-Kensicki et al., 2002; Stellabotte et al., 2007, pour revue voir Stickney et al., 2000).

Chez le poisson zèbre adulte, les muscles squelettiques axiaux contiennent trois types cellulaires distincts (Figure 6D) (Devoto et al., 1996):

- les fibres lentes (en rouge), forment un couche de cellules mononuclées, localisées superficiellement juste sous le derme, elles expriment une myosine dite « lente » spécifique de ces fibres et détectable chez le poisson zèbre grâce à l'anticorps F-59, qui reconnait une chaine lourde de la myosine dite « lente », spécifique à ce type de fibres. Ces fibres sont orientées parallèlement à la notochorde.

- les fibres rapides (en bleu) sont situées plus profondément et occupent une majeure partie du somite. Elles forment un tissu épais de cellules multinuclées dont l'orientation des fibres est légèrement oblique par rapport à la notochorde.
- les cellules du dermomyotome (en vert), elles sont localisées en périphérie du somite, sous forme de cellules indifférenciées.

Chez les téléostéens, les fibres lentes sont utilisées pour se déplacer, à la recherche de nourriture par exemple, elles ont une innervation propre. Les fibres rapides sont utilisées en réponse à un stress pour créer un mouvement rapide de fuite. Ces fibres possèdent des origines cellulaires, des propriétés morphologiques et physiologiques différentes (Devoto et al., 1996; Wolff et al., 2003).
Quelle est l'origine cellulaire de ces fibres et comment sont elle formées ?

I.2.a Les fibres lentes sont d'origine adaxiale.

Origines

Les cellules adaxiales sont les précurseurs des fibres lentes. Pendant la gastrulation, les précurseurs des cellules musculaires lentes sont localisés à la marge du blastoderme. Ils changent aisément de destin quand ils sont transplantés dans un autre domaine indiquant que les cellules ne sont pas encore engagées pour former un sous-type particulier de muscle (Hirsinger et al., 2004). Pendant la gastrulation, les précurseurs sont localisé dans la zone marginale et subissent un mouvement d'involution et des mouvements de convergence-extension. Ces mouvements vont permettre à ces précurseurs de former le tronc de l'embryon. Pendant cette période commence la myogenèse, marquée par la transcription de gènes codant les facteurs de régulation myogénique : *myoD* et *myf5* (Weinberg et al., 1996). A la fin de la gastrulation, les précurseurs musculaires se positionnent eux-mêmes dans la plaque segmentale sur l'un ou l'autre côté de la future notochorde. De plus, pendant la phase de segmentation, les gènes MRF continuent d'être exprimés dans les cellules les plus médianes du PSM, adjacentes à la notochorde. Comme nous l'avons présenté précédemment, elles forment de part et d'autre de la notochorde une matrice de 5x5 cellules par somite (Coutelle et al., 2001; Thisse et al., 1993; Weinberg et al., 1996). Peu de temps après la formation du somite, les cellules adaxiales, exprimant les gènes MRF, commencent à se différencier le long de la notochorde en tant que fibres musculaires lentes (Devoto et al., 1996). Grace à la signalisation Hedgehog, émanant de la notochorde, les cellules adaxiales vont commencer à se différencier en fibres lentes (Coutelle et al., 2001; Hirsinger, Stellabotte, Devoto, & Westerfield, 2004).

Réarrangement

Les cellules adaxiales, cuboïdes, sont organisées de façon pseudo-épithéliales ce qui permet de les différencier des autres cellules du mésoderme présomitique. Une fois incorporées dans les somites nouvellement formés, elles subissent une série remarquable de réarrangements dynamiques, facilement identifiables (Figure 7B). Dans chaque somite les cellules adaxiales, organisées en matrice 5x5 vont perdre leur apparence cuboïde, devenir plus arrondies et s'aplatir pour finalement s'allonger (Figure 7F).

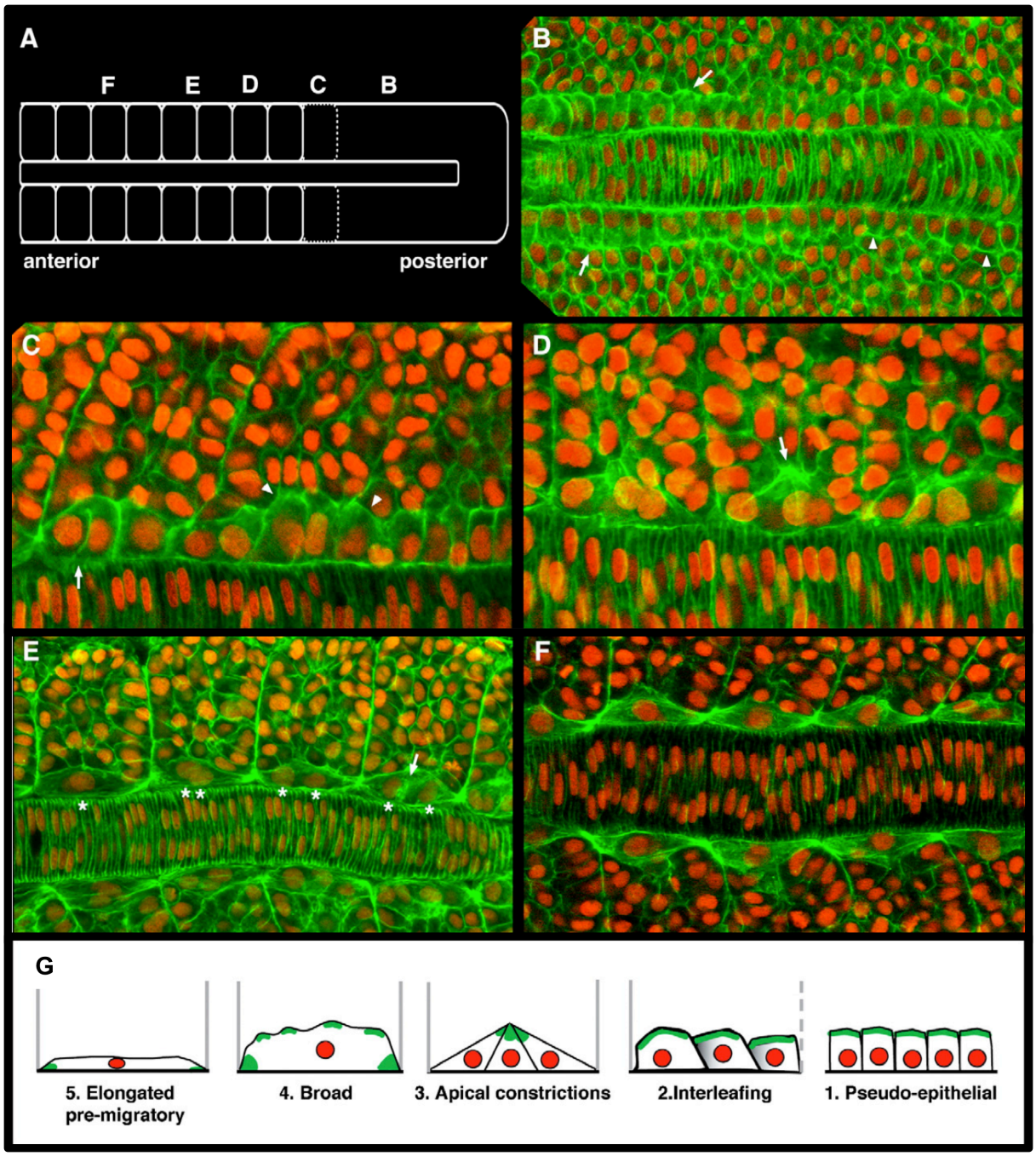


Figure 7 : Réarrangement des cellules adaxiales (d'après Daggett et al., 2007).
Série d'images confocales des cellules adaxiales (marquage membranaire par la phalloïdine (vert) et nucléaire par le DAPI (rouge)) en vue dorsale.
A- Schéma d'un embryon de 8 somites. Observations des cellules adaxiales à différents emplacements de somite (B-F).
B- Dans la partie postérieure du PSM, les cellules adaxiales sont cuboïdes (tête de flèche). Dans la partie antérieure du PSM, elles sont en colonnes et riches en actine à l'apex (flèche).
C- Quand les frontières se forment, les cellules adaxiales perdent leur aspect en colonne, s'arrondissent et se chevauchent.
D- L'intercalation commence. Les cellules adaxiales, adjacentes et latérales, présentent des constrictions apicales avec un enrichissement en actine filamenteuse (flèche).
E- Suite au processus d'intercalation, les cellules sont empilées et s'élargissent afin d'atteindre les bordures somitiques avec un enrichissement en actine filamenteuse.
F- À la fin de ce processus, les cellules adaxiales ont l'aspect de fibres musculaires allongées.
G- Schéma récapitulatif.

Les cellules arrondies commencent à se chevaucher entre elles. Ce chevauchement permet le passage rapide de 4-5 cellules à 2-3 cellules adaxiales entre les frontières somitiques (Figure 7C). A ce moment, les cellules adaxiales prennent une forme triangulaire avec leurs apex riches en actine (Figure 7D). Cette constriction apicale est transitoires, les cellules adaxiales continuent de s'intercaler tout en s'élargissant latéralement et dans le plan AP (Figure 7E). Chaque cellule effectue un dernier attachement riche en actine aux frontières somitiques antérieures et postérieures tout en maintenant les interactions lamellaires avec les cellules adaxiales latérales. Ces comportements mènent à une pile dorso-ventrale de 25 cellules adaxiales élargies (issues de la matrice 5x5), dans la partie médiane du somite (Daggett et al., 2007). Enfin la majorité des fibres lentes médiales subit une translocation, migrant radialement à travers le myotome latéral pour donner naissance à la couche superficielle des muscles lents à 24hpf. Dans les somites les plus antérieurs d'un embryon de 8/10 somites, les cellules adaxiales sont allongées et ressemblent à des fibres et ce, avant l'initiation de la migration quelques heures plus tard (Cortes et al., 2003; Devoto et al., 1996; Henry and Amacher, 2004). Il est intéressant de noter que les extrémités terminales des fibres musculaires s'attachent aux frontières somitiques qui deviendront à la fin de la myogenèse des frontières du myotome. Cet attachement va permettre de renforcer la frontière somitique et donner naissance à la jonction myotendineuse (MTJ), indispensable à la contraction musculaire (Long et al., 2002).

Migration

Après l'élongation, la majorité des fibres lentes médiales subissent une translocation, migrant radialement à travers le myotome latéral pour donner naissance à la couche superficielle des muscles lents de la larve (Cortés et al., 2003) (Figure 8). Les mécanismes morphogénétiques qui conduisent les mouvements cellulaires du myotome ne sont pas bien connus.

Cependant, des études ont expliqué le mécanisme de migration médiolatérale des cellules adaxiales. En effet, ces études ont permis l'identification de molécules d'adhésion cellulaire qui sont exprimées dans le myotome. Les gènes *n-cadhérine* et *m-cadhérine* sont exprimés d'une manière dynamique et réciproque, au niveau de la frontière somitique, cette expression est corrélée avec la migration cellulaire des fibres lentes (Cortés et al., 2003). La *m-cadhérine* est exprimée précocement dans les cellules adaxiales et s'étend à tout le myotome autour du stade 26 somites. La *n-cadhérine* est exprimée dans tout le myotome dès le début de la somitogenèse. La perte d'expression des *cadhérines* dans les cellules du myotome inhibe la migration des fibres lentes. De plus, en altérant l'expression des *cadhérines*, soit dans les cellules des muscles lents en migration soit au sein des autres cellules du myotome, les cellules lentes présentent une migration aberrante. Ainsi, l'adhésion cellulaire différentielle, menée par l'expression dynamique et réciproque des membres de la famille des *cadhérines* dans le myotome est responsable de la coordination de la migration des cellules musculaires lentes.

Il a été montré récemment que le migration des fibres rapides, plus tardive, est dépendante de la bonne migration des fibres lentes, nous aborderons ce sujet plus tard (Clarissa A Henry & Amacher, 2004)

Ancrage à la frontière et formation de la jonction myo-tendineuse

Lors de l'élongation des fibres musculaires lentes, les extrémités des cellules rentrent en contact avec la frontière somitique. A cette instant, deux types d'interaction coexistent : les Cadhérines jouent un rôle central dans la migration mais aussi en tant que premières protéines du complexe d'ancrage à la frontière, et les Intégrines qui permettent la jonction de la matrice extra cellulaire (ECM) au cytosquelette d'actine.

Pendant la migration des fibres lentes, la frontière somitique naissante s'enrichit en matrice extracellulaire, via l'interaction fibres musculaires-frontières. Une accumulation de protéines telle que la Laminine, la Fibronectine, la FAK phosphorylée (Focal Adhesive Kinase), la Paxilline et les composants du complexe Dystroglycan / Dystrophine est observée (Crawford et al., 2003a; C A Henry et al., 2001). Le somite prend sa forme caractéristique en « V ». La frontière devient alors une jonction myo-tendineuse, analogue aux tendons chez les

mammifères ce qui va permettre la transmission de la force de contraction (C. a Henry, McNulty, Durst, Munchel, & Amacher, 2005).

Les cadhérines forment une large famille de protéines transmembranaires qui crée les interactions cellules-cellules, principalement en tant que molécules d'adhésion homophilique, en liant la membrane au cytosquelette par l'intermédiaire des caténines cytoplasmiques (pour revue voir Tepass, Godt, & Winklbauer, 2002).

Les Intégrines sont des protéines transmembranaires hétérodimériques consistant en une sous-unité α et une sous-unité β. Les Intégrines peuvent créer un signal bidirectionnel pour modifier la matrice extracellulaire ou pour altérer la polarité du cytosquelette et affecter l'expression de genes impliqués dans l'attachement des fibres à la frontière . Les effecteurs intracellulaires des Intégrines incluent la protéine adaptatrice Paxilline et la protéine FAK, toutes deux localisées au côté basal des cellules de la frontière somitique (Crawford et al., 2003). Integrin-α5βb1 est le récepteur principal de la Fibronectine et l'integrin-α6βb4 et l'Integrin-α7βb1 sont des récepteurs des Laminines comme l'est la Dystroglycane via son domaine extra-cellulaire (Parsons et al., 2002a; Parsons et al., 2002b; Postel et al., 2008, pour revue voir Hynes, 2002).

Une étape plus tardive est le renforcement de cette frontière, grâce à l'interaction fibre/cellules/matrice
De nombreuses protéines sont recrutées à la jonction myotendineuse, créant un véritable échafaudage de protéines de liaison entre les fibres et la frontière (Sanger, Wang, Fan, White, 2010).

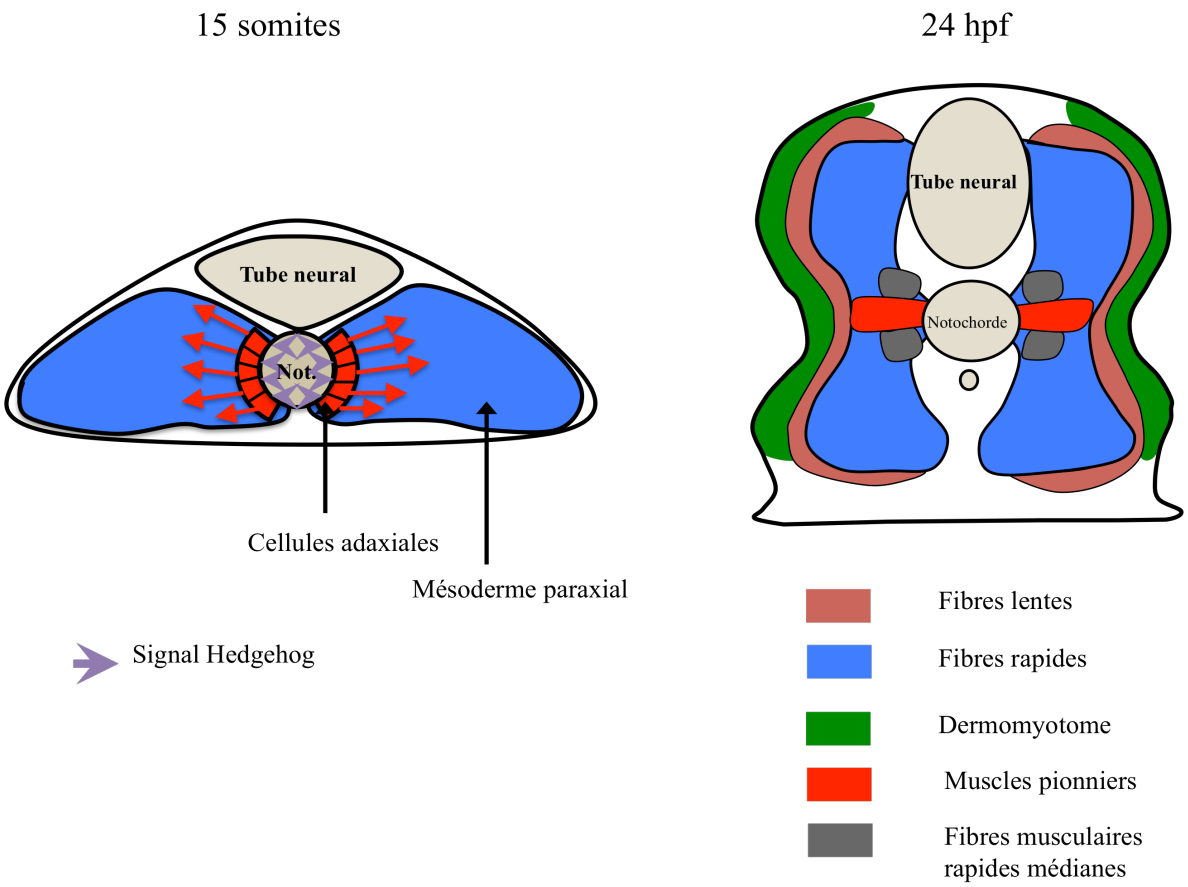


Figure 8 : Migration des cellules adaxiales et présentation des fibres musculaires du somite.
Représentation schématique des précurseurs somitiques contribuant au myotome en vue transversale. En somitogenèse, les cellules adaxiales initialement adjacentes à la notochorde vont migrer radialement a travers le somite. A 24h, cinq types fibres sont différenciables via des marqueurs spécifiques : les fibres lentes (rouges claires anticorps F-59 ou prox1), les fibres rapide (bleues anticorps F-310), les cellules souches du dermomyotome (vertes qui expriment pax7 et pax3), les muscles pionniers (rouges foncées anticorps anti-engrailled et F-59) et enfin les fibres musculaires médianes (grises exprimant engrailled mais n'étant pas reconnues par F-59).

Voie de signalisation et MRF : induction des fibres lentes.

La voie Hedgehog.

Le signal Hedgehog joue un rôle critique dans le développement du poisson zèbre. Les mécanismes primaires biochimiques de cette voie de signalisation sont conservés de la Drosophile aux vertébrés, bien que ces derniers aient de multiples protéines Hh (pour revue voir Ingham and McMahon, 2001). Il existe au moins trois membres de la famille Hedgehog chez le poisson zèbre jouant un rôle dans la myogenèse :

-*shha* (Sonic Hedgehog) exprimé vers 60%- épibolie dans le bouclier et ensuite dans la notochorde et la plaque du plancher (Krauss et al., 1993).

-*shhb* (Tiggywinkle Hedgehog) exprimé dans le bouclier embryonnaire à partir de 50%-épibolie et dans la plaque du plancher et le cerveau ventral.
-*ihhb* (Echidna Hedgehog) exprimé principalement dans la notochorde (Currie and Ingham, 1996; Krauss et al., 1993).
Chez le poisson zèbre, la notochorde est une source primaire Hedgehog pour les muscles, créant un gradient de concentration médiolatéral (Figure 8).
A partir de mutagénèse chimique à l'ENU (Ethyl-Nitro-Urée), de nombreux mutants de la voie Hh ont été identifiés. Ils appartiennent tous à la famille *you* ainsi nommée, suite à la formation en U de leurs somites, causée par une reduction ou une absence des muscles pionniers (van Eeden et al., 1996).
De plus, en cas de perte du signal Hedgehog, les cellules adaxiales ne vont pas donner de fibres lentes mais elles vont se différencier en fibres rapides (Hirsinger et al., 2004).
Chez les mutants *sonic you/shha* (syu) et *you-too/gli2* (yot), l'expression de *myoD* dans les cellules adaxiales est fortement réduite ou absente (Karlstrom et al., 1996; Schauerte et al., 1998). Nous pouvons donc dire que la voie Hh a un rôle particulier sur le myotome et que son activité est nécessaire et suffisante pour induire les fibres lentes, mais aussi d'autres types cellulaires issus des cellules adaxiales, que nous présenterons plus tard (M. J. Barresi, D'Angelo, Hernández, & Devoto, 2001; Hirsinger et al., 2004).

Les facteurs de régulation myogénique (MRF).

Le premier évènement dans la différenciation musculaire est la spécification des précurseurs mésodermiques en précurseur musculaire, régulé par l'expression des facteurs de régulation musculaire aussi appelés MRF. Il existe trois MRF principaux qui sont essentiels au bon développement des fibres musculaires : *myf5, myoD* et la *myogenine* (*myog*).
Chez le poisson zèbre, les MRFs sont essentiels à la myogenèse squelettique mais peuvent partiellement se compenser entre eux. En effet, Myf5 et MyoD agissent ensemble pour mettre en place la myogenèse des fibres lentes. L'expression de *myogenine* dépend de Myf5 et de MyoD et contribue au mode de différenciation des muscles lents et rapides.
La perte de fonction de *myf5* retarde l'expression de *myog* dans les précurseurs des muscles lents et rapides mais elle est restaurée par l'action de MyoD. Cependant, la perte de fonction de *myf5* et *myoD* mené à l'absence de la formation de tous les muscles.
Les MRFs sont une part essentielle du programme des muscles lents. Les pertes de fonction de *myf5* et de *myoD* empêchent le programme de myogenèse précoce des muscles lents, les fibres lentes n'étant plus en place (Hammond et al., 2007; Maves et al., 2007). La perte de fonction de *myoD* ou de *myf5* seule retarde mais n'empêche pas la myogenèse des fibres lentes. *myog* n'est pas essentiel, soutenant l'idée principale que les niveaux d'activité combinés des MRFs conduisent à la formation du muscle

Les muscles pionniers.

Au sein des fibres lentes un groupe de cellules médianes sont les premières à s'allonger et a être striées, il s'agit des muscles pionniers.

Ce sous type de fibres lentes ne participe pas à la migration et reste ancrées à la notochorde (Figure 8 24hpf cellules rouge foncé). Elles se caractérisent par l'expression nucléaire d'Engrailled ainsi que de Prox1.

L'utilisation d'inhibiteur pharmacologique de la voie Hh (Cyclopamine) permet de montrer que la formation différentielle des fibres lentes et des muscles pionniers à partir des cellules adaxiales, se fait donc grâce à la voie Hh de manière dose dépendante (Du et al., 1997; Wolff et al., 2003) .

En effet, lors de l'utilisation de fortes concentrations d'inhibiteurs, la plupart des MPs et d'autres cellules musculaires lentes ne sont plus présentes. Cependant, à des concentrations intermédiaires, les MPs sont absents alors que les fibres lentes ne sont pas affectées. A faible concentration, seuls les MPs sont altérés (Wolff et al., 2003).

Contrairement aux fibres lentes, ces fibres reçoivent pendant plus longtemps une forte concentration du signal Hedgehog. Ainsi, immédiatement adjacents à la notochorde, de hauts niveaux d'activité de Hh engagent les précurseurs musculaires vers les MPs alors que de bas niveaux de Hh promeuvent l'engagement des cellules musculaires lentes.

Le rôle des muscles pionniers chez l'adulte n'est pas encore totalement compris, mais leur attachement médial permet de donner au somite sa forme caractéristique en « V » (van Eeden et al., 1996). Elles sembleraient « accrocher » le myotome à la notochorde afin de stabiliser la structure musculaire. Ces muscles pionniers se différencient des muscles lents car ils expriment la protéine Engrailed, induit par le signal Hedgehog (Ekker et al., 1992; Hatta et al., 1991).

Par des techniques d'ablation cellulaire, des études ont suggérées que les MPs seraient des cibles intermédiaires pour le cône de croissance des axones des motoneurones primaires (Melancon et al., 1997).

A 24hpf, les anticorps dirigés contre la protéine Engrailed marquent non seulement les MPs mais aussi, à un plus faible niveau d'expression, un nuage de noyaux entourant les MPs (Hatta et al., 1991; Wolff et al., 2003). Ces cellules exprimant de bas niveaux d'Engrailed mais pas la chaîne lourde de myosine lente, sont nommées fibres rapides médiales (Figure 8 cellules grises).

I.2.b Les fibres rapides

Origine

Au sein d'un somite, les deux populations de fibres musculaires sont distinctes : les cellules adaxiales à la notochorde donnent les futures fibres lentes incluant les MPs. Le reste des

cellules somitiques, originalement (appelées aussi cellules de la bordure postérieure), appartenant au mésoderme paraxial, forment les fibres musculaires rapides (Figure 6 et 8 cellules bleues).

L'établissement de la carte des territoires présomptifs a permit de montrer que pendant la gastrulation, les précurseurs des futures fibres rapides sont localisés dans la zone marginale ventrale et latérale. Comme pour les précurseurs de fibres lentes, les précurseurs des fibres rapides ne sont pas encore spécifiés pour former un type de muscle particulier. Ceci est particulièrement bien montré par les expériences de transplantations des précurseurs des rapides dans d'autre domaines, réalisées par E. Hirsinger et al., 2004.

Une fois le somite formé et les fibres lentes différenciées, les cellules musculaires non-adaxiales, localisées dans le mésoderme paraxial, se différencient en cellules musculaires rapides et expriment, dans la partie postérieure du somite, les gènes MRF *myoD* et *myf5.*

Réarrangement

La différenciation des fibres rapides se fait après l'induction et la migration des fibres lentes à travers le myotome. Ce phénomène secondaire est dépendant du bon déroulement de la migration des fibres lentes.

Contrairement aux fibres lentes, les fibres rapides forment un tissu de plusieurs couches de fibres, plus fines et multinuclées (entre 4 et 5 noyaux). Les fibres rapides n'effectuent pas vraiment de migration mais il y a une activité protrusive importante lors du réarrangement, afin de passer des précurseurs à une fibre multinuclée. Le réarrangement de ces fibres se fait en deux étapes : élongation et multinucléation.

Initialement, les précurseurs des fibres rapides montrent une activité dynamique protrusive mais ne subissent pas de changement de forme important. La deuxième phase est la phase d'intercalation et d'élongation, associée à une fusion des précurseurs. Cette phase requiert la laminine-$\beta 1$ et la laminine-$\gamma 1$. La dernière phase implique l'ancrage à la frontière. Bien que les myotubes se forment chez les embryons déficients en laminine, ils sont significativement moins organisés que chez des embryons sauvages. La laminine-$\beta 1$ et la laminine-$\gamma 1$ sont requises pour la capture de la frontière et fournissent ainsi les premières informations moléculaires, comme l'arrêt de l'élongation, au niveau de la capture de la frontière à la jonction myotendineuse (MTJ), Lorsqu'il y a une lacune en laminine au niveau de la frontière, les fibres rapides (et lentes) peuvent continuer à croître sur plusieurs somites. Prises ensemble, ces données indiquent que la morphogénèse des fibres lentes se fait en plusieurs

étapes et implique les interactions entre les fibres musculaires et la membrane basale pendant l'élongation et l'attachement à la JMT (Snow et al., 2008).

La multinucléation des fibres rapides suggère un phénomène de fusion des précurseurs, pendant la phase d'intercalation/élongation. Le processus de fusion n'a pas encore été décrit. Seuls des aspects moléculaires conservés chez les autres espèces ont permis de comprendre le phénomène de fusion chez le Poisson zèbre. *Kirrel* (l'orthologue de *Kirre* chez la drosophile Srinivas et al., 2007), est exprimé uniquement dans tous les précurseurs rapides en cours de fusion. La perte de fonction de ce gène montre un phénotype fort : les fibres rapides ne fusionnent pas et se développent en mini muscles mononuclées. Ce phénotype est similaire à la Drosophile chez les mutants *Kirre* dans lesquels les cellules affectées établissent une identité appropriée mais n'ont pas la capacité de fusionner. Un autre acteur de cette fusion est le gène *Rac*, sa perte de fonction induit une baisse significative de la fusion des myoblastes, alors que l'expression de la forme constitutive active de Rac résulte dans un phénotype d'hyperfusion avec la formation d'un syncitium géant comprenant des noyaux en surnombre (Srinivas et al., 2007).

Voie de signalisation et MRF : induction des fibres rapides.

Contrairement à l'implication de la voie Hh dans la formation des fibres lentes, cette voie n'intervient pas dans le processus de spécification des fibres rapides latérales. En effet, chez le mutant *smo,* l'expression de *myoD* est absente des cellules adaxiales et conduit à une absence de fibres lentes. Cependant, l'expression de *myoD* est localisée dans le mésoderme paraxial et les fibres rapides se forment (Barresi et al., 2000; Chen et al., 2001; Varga et al., 2001). Ainsi les cellules musculaires rapides latérales qui dérivent du mésoderme paraxial sont relativement peu affectées par l'altération de la voie Hh (pour revue voir Ochi and Westerfield, 2007). Néanmoins, les fibres musculaires rapides médiales n'expriment la protéine Engrailed qu'avec une haute activité Hh, laissant supposer un rôle de cette signalisation dans la formation des fibres rapides médiales (Wolff et al., 2003)

I.2.c Dermomyotome : Les cellules de la bordure antérieure.

Chez les vertébrés, le dermomyotome produit une variété de types cellulaires qui participent à la formation des muscles, du derme dorsal et des vaisseaux sanguins. Malgré le rôle central du dermomyotome dans le développement des vertébrés, la question de son existence chez les vertébrés inférieurs, et en particulier chez les poissons, est restée longtemps en suspens.

Des expériences récentes de marquage cellulaire par injection de colorants vitaux et l'hybridation moléculaire in situ ont permis récemment d'identifier chez les poissons

téléostéens un sous-domaine du somite, qui présente certains des attributs structuraux et fonctionnels du dermomyotome des amniotes.

Chez le poisson zèbre, le dermomyotome est un feuillet épithélial transitoire, qui se développe à partir de précurseurs présents dans le domaine antérieur – dorsal du somite, ce sont les « cellules de la bordure antérieure » (Figure 6 cellules vertes). A 24hpf, le dermomyotome apparaît sous la forme d'un épithélium situé dans la partie dorso-latérale du somite, en dessous de l'épiderme.
Certaines cellules du dermomyotome ont la propriété d'exprimer Pax3 et Pax7, deux régulateurs transcriptionnels dont dépend le démarrage du programme myogénique, cette propriété font d'elles des cellules souche du myotome de poisson zèbre (Buckingham & Relaix, 2007). L'expression des gènes Pax cesse lorsque démarre celle des gènes codant des régulateurs transcriptionnels myogéniques (MRF) comme MyoD, Myogénine, Myf5 et Mrf4, qui assurent le déclenchement du programme de différenciation musculaire.

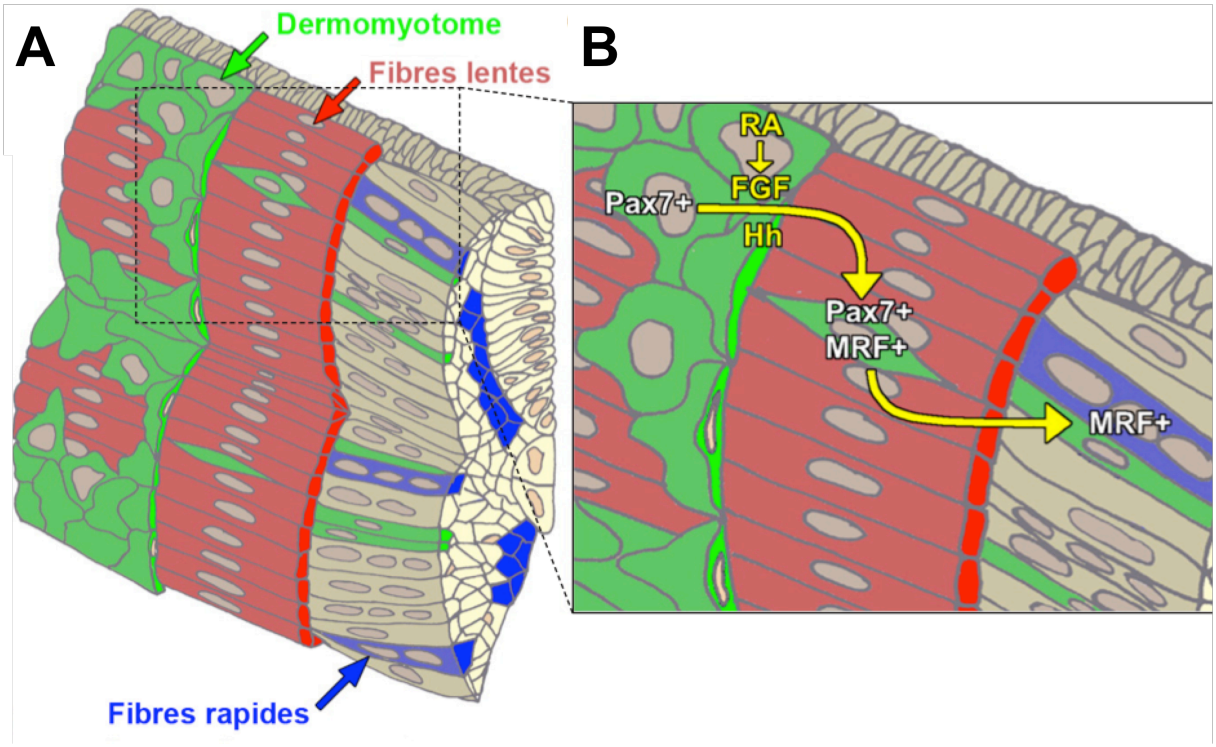


Figure 9 : Différenciation des cellules du dermomyotome (adapté de Stellabotte, 2007)
A- Les cellules du dermomyotome (vert), à la surface externe du somite, expriment Pax7 et sont en position latérale par rapport à la monocouche de fibres musculaires lentes (rouge). Les fibres musculaires rapides (violet) sont multinucléées et sont situées sous les fibres lentes. Quand les cellules du dermomyotome se différencient en muscle, elles passent entre les fibres lentes et s'allongent pour former les fibres rapides latérales.

B- Agrandissement de A montrant la formation des fibres musculaires rapides à partir des cellules du dermomyotome. La signalisation AR promeut l'expression de Fgf8 qui, à son tour promeut la myogenèse. Quand les cellules se différencient, elles régulent négativement Pax7 et expriment les MRFs.

En migrant à travers le myotome déjà formé, ces cellules dites « souches » vont permettre de réaliser une deuxième vague de myogenèse (Figure 9). Cette deuxième vague de myogenèse va participer à la croissance et à la réparation des muscles du tronc mais aussi à la formation des muscles sternohyiodes (homologue au muscle de la langue chez les amniotes), des muscles de la nageoire pectorale et pelvienne (Gros, Manceau, Thomé, & Marcelle, 2005; Relaix, Rocancourt, Mansouri, & Buckingham, 2005).
Il a été montré que la différenciation des précurseurs du dermomyotome en nouvelles fibres musculaires est sous la dépendance non seulement de l'activité des protéines Hedgehog, tout comme l'est la différenciation musculaire des cellules adaxiales du myotome, mais aussi de l'activité du FGF8 (fibroblast growth factor 8) (Hammond et al., 2007). Donc les cellules du dermomyotome exprimant Pax3 et 7, vont répondre au signal Hh et FGF8, se mettre à exprimer des MRF, se différencier et s'allonger pour enfin s'insérer dans le myotome en migrant à travers les cellules lentes et rapides (Figure 9)

Mais le dermomyotome contribue aussi à la formation du derme dorsal et produit des cellules endothéliales. Contrairement aux progéniteurs myogéniques, les cellules du dermomyotome cessent rapidement d'exprimer les gènes *pax*, migrent en direction de l'ectoderme et forment en dessous de ce dernier un mésenchyme qui exprimera le marqueur Dermo-1 (L. Li, Cserjesi, & Olson, 1995). Le dermomyotome produit également deux lignées endothéliales : les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (angioblastes) qui expriment VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2), et les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques (lymphangioblastes) (Wilting & Becker, 2006).

II- STRUCTURE ET FORMATION DU SARCOMERE

Très bien conservée au cours de l'évolution et remarquablement bien organisée, la structure des fibres musculaires est basée sur la répétition de l'unité contractile de base, appelée sarcomère. Cette structure a été particulièrement bien caractérisée (Figure 10). L'apparence striée, caractéristique des fibres musculaires squelettiques et cardiaques mais pas des muscles lisses, est facilement observable en microscopie optique par effet d'alternance de bandes claires et de bandes foncées. Cette striation caractéristique est le résultat de

l'alignement des sarcomères. Du grec « sarx », la chair et « mère» l'unité, la taille de ces sarcomères varie en fonction des tissus et des espèces.

On définit un sarcomère comme étant un segment délimité par deux bandes-Z (de l'allemand *zwischen*, signifiant "le disque entre"). Ces bandes-Z apparaissent sous forme d'une série de lignes foncées, riches en protéine elles sont denses à la lumière. Autour de la bande-Z, on retrouve la bande-I (pour polarisation *isotropique*). Les bandes-I sont très claires et correspondent à la zone où les filaments fins d'Actine sont majoritaires. En position centrale on retrouve une large bande plus sombre, il s'agit de la bande-A (pour polarisation *anisotropique*). Elle correspond à la zone ou les filaments épais de myosine sont interdigités avec les filaments fins d'actine. On retrouve une partie plus pâle dans cette bande A, elle est appelée la zone H (de l'allemand *heller*, plus pâle), elle ne contient de la Créatine Kinase qui est l'enzyme qui catalyse la formation d'ATP à partir d'ADP et de Phosphocréatine. Finalement une mince ligne-M (de l'allemand *mittel*, centre) divise en deux la bande-H. Il s'agit de ponts reliant les filaments épais entre eux. A cet endroit les filaments de myosine se superposent ce qui rend cette bande assez dense.

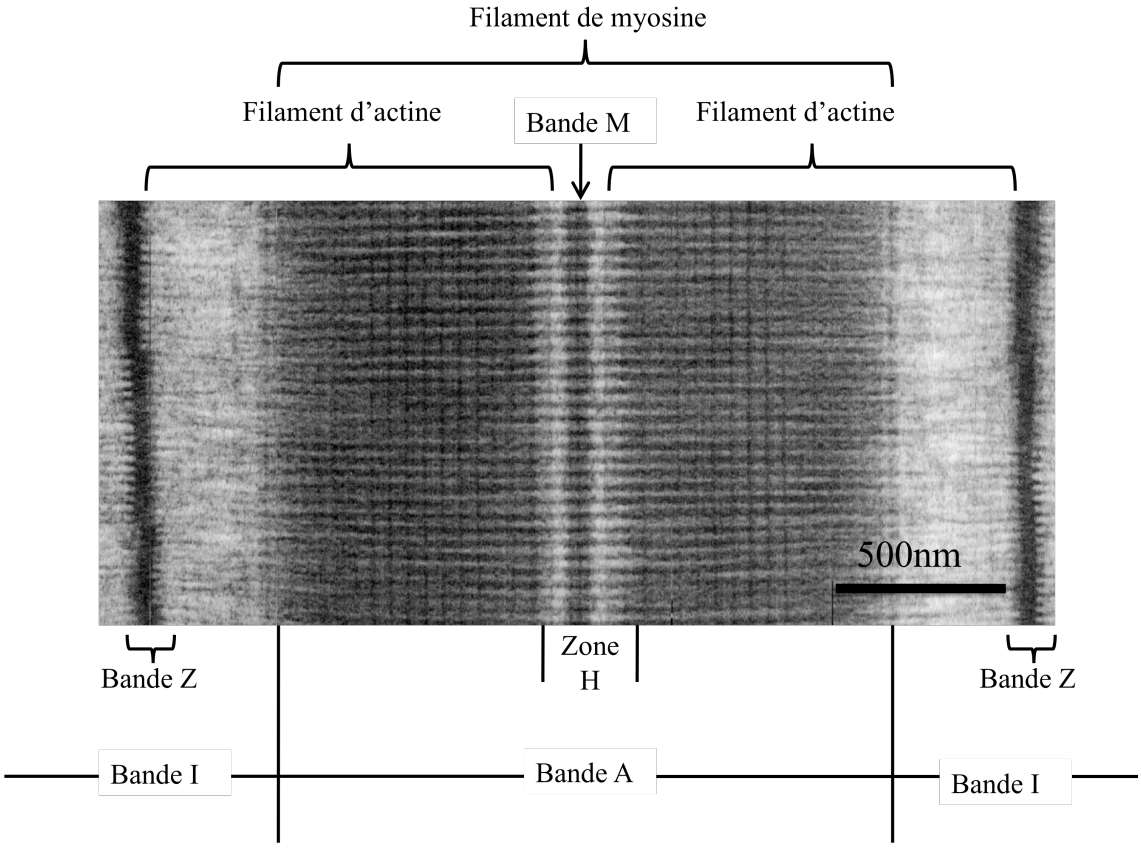


Figure 10 : les éléments du sarcomère.
Sarcomère de poisson zèbre chez l'adulte observé en microscopie électronique. Le sarcomère est défini par les deux bandes-Z, facilement identifiables puisqu'elles sont denses aux électrons. Les filaments fins d'actine partent de la bande-Z, sont visibles dans la partie claire de la bande-I et viennent s'interdigiter avec les filaments épais au milieu du sarcomère dans la bande-A. Les filaments épais, plus denses aux électrons sont au niveau de la bande-

A. La zone H correspond au milieu du filament épais, on y trouve la bande-M où les filaments épais se rejoignent et se superposent.

II.1. ELEMENTS DU SARCOMÈRE

D'un point de vue protéique, le sarcomère est composé d'une interdigitation de filaments fins (comprenant l'Actine, Troponine et Tropomyosine) et de filaments épais (Myosine) encadrée de part et d'autre par une bande-Z principalement composée d'a-Actinine. Les filaments épais de myosine et les protéines de la bande-Z sont reliés entre eux par la Titine, une protéine géante de 3 000 kD (10 % de la masse myofibrillaire) qui stabilise la structure du sarcomère (Figure 11). Le sarcomere est composés de nombreuses protéines. En s'associant, ces protéines jouent des rôles structurels et fonctionnels importants, elles seront présentées dans ce chapitre.

Bien que la plupart des protéines constituant le sarcomère soient connues depuis des années, leur manière d'interagir et de s'assembler pour former cette structure hautement ordonnée reste encore très mal comprise (Rui, Bai, & Perrimon, 2010). De plus, l'intérêt porté aux protéines sarcomériques du muscle squelettique ou cardiaque a été renforcé par l'étude expansive des mutations des gènes codant pour les protéines du sarcomère. Ces mutations sont impliquées dans un grand nombre de myopathies létales chez l'être humain (Frank, Kuhn, Katus, & Frey, 2006; Sparrow et al., 2003; van Eldik & Passier, 2013).

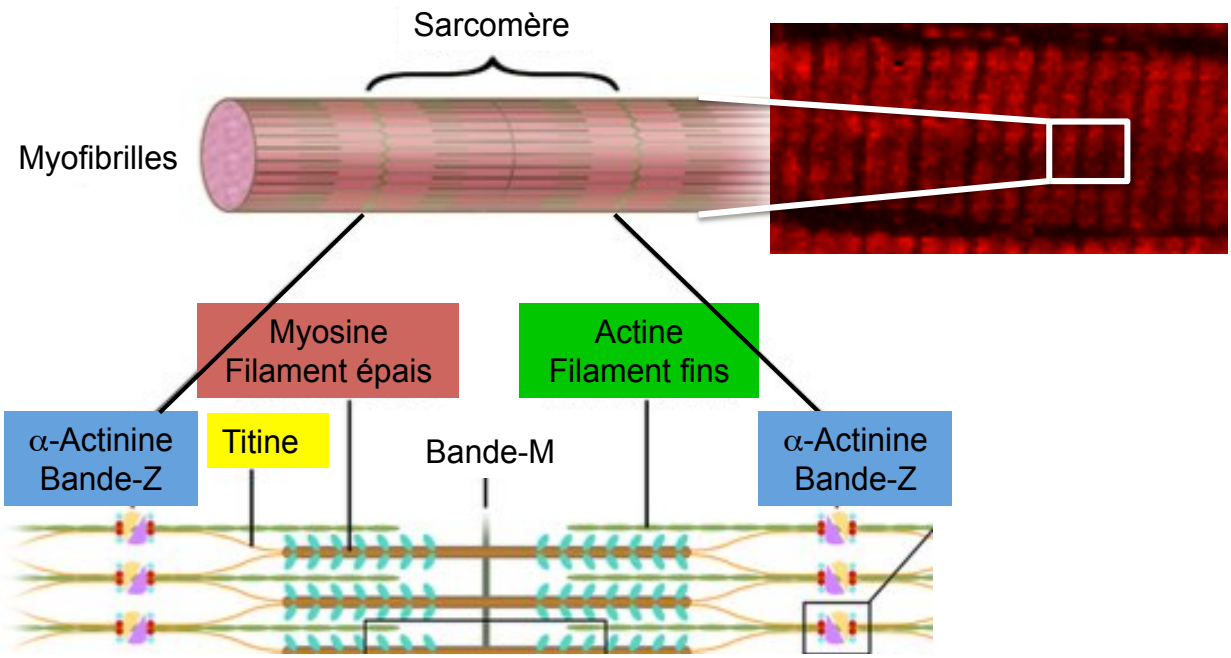


Figure 11 Éléments du sarcomère.
La fibre musculaire représentée par un marquage F-59 (haut à droite) est composée de myofibrilles. La myofibrille correspond à un alignement de sarcomères, défini par quatre composants majoritaires : les bandes-Z (en bleu composés d'α-Actinine). Accrochés aux bandes-Z, les filaments fins (en vert composés en majorité d'Actine filamenteuse). Les

filaments épais (en rouge composés majoritairement de Myosine) sont interdigités avec les filaments fins. Les protéines géantes de Titine (en jaune) servent de lien entre les filaments épais, la bande-Z.

II.1.a Filaments fins.

Les filaments fins sont composés majoritairement d'Actine-F (Filament) sous forme de doubles brins torsadés, d'un diamètre de 7 nm (Figure 11 et 12). Ces filaments se forment à partir de monomères d'Actine-G (globulaire) qui sont polarisés. La polymérisation de ces monomères donne une polarité au filament avec des extrémités « plus» (barbue) et « moins » (pointue). C'est l'extrémité + des filaments fins qui accroche à la bande-Z, alors que l'extrémité - s'étend vers le milieu du sarcomère.

Le moteur moléculaire de cette polymérisation est le passage de l'ADP, liée à l'Actine-G en ATP. En effet, l'actine associée à un filament a tendance à hydrolyser son ATP. Cette propriété est, avec la polarité du filament, à l'origine du phénomène dit de "tapis roulant" (anglais : treadmilling). L'extrémité + va avoir tendance à capter en très grande majorité de l'ATP-actine, favorisant par conséquent la polymérisation à cette extrémité. En revanche, l'extrémité - est majoritairement sous forme d'ADP-Actine. Par conséquent, à l'extrémité - l'équilibre est déplacé vers la dépolymérisation.

La formation des filaments d'actine est donc un phénomène dynamique, qui trouve son équilibre entre la polymérisation de l'Actine-G en Actine-F à l'extrémité + du filament (plus active), et la dépolarisation de l'Actine-F en Actine-G à l'extrémité - du filament (moins active).

Le point de départ de cette polymérisation se fait grâce aux protéines Arp2/3, structuralement proches de l'actine, elle va permettre de lier ensemble les premiers monomères d'Actine-G, l'extrémité - adhère au complexe Arp2/3, permettant la polymérisation du coté +. Enfin ces filaments ont besoin d'une « coiffe » protéique, qui permet la stabilisation et l'interaction des extrémités du filament : la CAP-Z (Capping Actin Protein), se fixe sur l'extrémité + du filament d'actine et empêche donc la polymérisation. Une autre protéine, la Tropomoduline se fixe sur l'extrémité - du filament, elle a pour rôle d'empêcher la dépolymérisation de l'extrémité - du filament.

Trois autres protéines sont caractéristiques du filament fin : la Tropomyosine, la Troponine et la Nébuline. La Tropomyosine est composée de deux polypeptides hélicoïdaux, enlacés l'un autour de l'autre. Ces polypeptides de Tropomyosine entourent le double brin torsadé d'actine, chaque Tropomyosine s'étend sur la longueur de sept monomères d'actine et se fixe au complexe de la Troponine. La Troponine est un complexe de 3 isoformes : les Troponines I, C et T, en fonction de la présence ou non de Ca^{2+} le complexe Troponine autorise ou interdit la fixation des têtes de myosine sur le double brin d'actine.

La nébuline est une protéine associée au double brin d'actine, elle s'insert dans la bande-Z, se lie à 200 monomères d'actine et permet de réguler la longueur du filament d'actine.

II.1.b Filaments épais

Les filaments épais sont constitués principalement de polymères de myosine dont le diamètre moyen est de 15 nm. On retrouve ces filaments dans le bande-A où ils sont intercalés avec les filaments fins, rendant la bande-A plus dense aux électrons (Figure 11 et 12).

La Myosine est formée de deux chaînes lourdes (dimère) de 2 000 acides aminés. Ces chaines lourdes sont caractérisées par deux domaines :

-Une partie C-terminale qui forme une structure hélicoïdale où les deux chaines lourdes sont surenroulées. Une protéine associée, la Myomesine, permet le maintien de cette liaison, ce qui confère à la myosine une structure rigide appelée « tige ».

-En N-terminale on trouve les « têtes » qui contiennent les sites de fixation de la molécule de myosine sur l'actine. Ces « têtes » ont la capacité de changer de conformation (de 90° à 45°) ce qui donne les caractéristiques motrices de la myosine. En effet, les « têtes » exercent une activité ATPase : l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP permet la flexion de la zone charnière faisant de la myosine le facteur actif de la contraction musculaire (voir spécification des fibres musculaires).

Il existe différentes isoformes de chaînes lourdes dans le muscle strié squelettique, certaines associées à une vitesse de contraction rapide (MHC-2a, MHC-2b), d'autres à une vitesse de contraction lente (MHC-1). L'expression de ces isoformes de chaînes lourdes de myosine, dépend du type de fibre (rapide, lente ou cardiaque) mais aussi de l'espèce.

Enfin, la formation des filaments épais de myosine nécessite l'intervention des protéines chaperonnes Unc45b et Hsp90a. Ces protéines « chaperonnes » sont essentielles au contrôle de la traduction protéique, elles aident au repliement et au maintien des protéines nouvellement transcrites et peuvent diriger la dégradation de protéines mal repliées ou déstabilisées (R. Zhao & Houry, 2005).

Dans les filaments épais, l'assemblage des deux chaines héliocoïdales de la myosine se fait de manière autonome mais l'assemblage et le repliement des têtes de myosine nécessitent l'assistance des protéines « chaperonnes ». Ainsi, chez le poisson zèbre, Unc45b et Hsp90a se retrouvent associées aux filaments épais au niveau de la bande-A durant la myofibrillogénèse, et se relocalisent au niveau de la bande-Z dans les fibres matures squelettiques (>72hpf). Cependant, on observe en cas de lésion de la fibre, une relocalisation des deux protéines « chaperonnes » au niveau de la bande-A en association avec les filaments épais. Il a été proposé que les bande-Z servent de réservoir de protéines » chaperonnes » qui peuvent a tout moment être relocalisées en cas de lésion et

revenir se relocaliser dans les bandes-Z une fois la fibre réparée (Etard, Roostalu, & Strähle, 2008).

II.1.c Bande-Z.

La bande-Z est un complexe protéique très important du sarcomère, tant pour son développement que pour sa fonctionnalité. Elle vient délimiter les frontières du sarcomère offrant une véritable structure d'ancrage pour les éléments qui le composent, en particulier les filaments fins. Lors des contractions, le sarcomère est constamment soumis à des contraintes mécaniques importantes. La bonne formation de la bande-Z permet de résister à ce stress mécanique (Figure 11 et 12).

La stabilité de cette structure contractile, suggère que les interactions des protéines du sarcomère (filaments d'Actine et de Titine) avec les protéines de la bande-Z sont très fortes et très stables.

Cette bande-Z crée une liaison des sarcomères entre eux maintenant une stabilité mécanique, et permet la transmission de la force de contraction le long de la fibre. Elle permet aussi de lier les sarcomères à la membrane cellulaire via les structures costamèriques permettant l'intégrité de la cellule musculaire. La plupart des protéines présentes au niveau de la bande-Z sont connues. Ces protéines sont bien conservées au cours de l'évolution, ce qui suggère leurs importances. Cependant, leurs fonctions *in vivo* ne sont pas encore toutes comprises.

De nombreuses myopathies, du muscle cardiaque ou squelettique, sont liées à des protéines de la bande-Z, le phénotype associé à ces myopathies est une distribution anormale des protéines de la bande-Z, une désorganisation structurelle importante des filaments fin et épais ainsi que des agrégats de protéines musculaires, répartis aléatoirement ou au niveau des bandes-Z (A. G. Engel, 2004; Frank et al., 2006; Knöll, Buyandelger, & Lab, 2011; Sparrow et al., 2003; van Eldik & Passier, 2013).

La protéine majoritaire de la bande-Z est l'α-actinine. Décrite pour la première fois dans les années 70, elle est la première protéine identifiée de la bande-Z. De la famille des Spectrines, elle possède un domaine qui lui permet de se lier aux polymères d'actine. Les couches accumulées d'α-Actinine déterminent la hauteur de la bande-Z : courte dans les fibres rapides (30-50nm) et plus grande dans les fibres lentes et cardiaques (100nm)(Takahashi & Hattori, 1989). L'α-actinine est présente chez les vertébrés sous quatre isoformes : ACTN 1, 2, 3, 4. Les isoformes 1 et 4 sont des isoformes non-musculaires qui sont impliquées au niveau des filaments d'actine dans les lamellipodes, au niveau des

adhésions focales ou des zones dites de jonctions intermédiaires entre les cellules (Burridge and Feramisco, 1981). Les isoformes 3 et 4 sont exprimées dans les muscles squelettiques et localisées au niveau de la bande-Z. Seul ACTN 2 est exprimée dans le muscle cardiaque (Geeves and Holmes, 1999).

Chez le poisson zèbre, on trouve cinq gènes d'α-Actinine : ACTN1, 2, 3a, 3b et 4. (Holterhoff, Saunders, Brito, & Wagner, 2010). En somitogénèse et à 24 hpf le profil d'expression des isoformes semble être en accord avec leurs orthologues chez les vertébrés. ACTN1 et 4 sont exprimés d'une manière ubiquitaire dans tous les tissus de l'embryon. ACTN2 est exprimée dans les cellules adaxiales, les cellules de la notochorde et les cellules du primordium optique. ACTN3a et 3b sont exprimées d'une manière spécifique dans les cellules adaxiales. A 24hpf seule ACTN2 est exprimée dans les fibres lentes et dans le cœur, ACTN3a et 3b sont exprimées dans les fibres rapides et lentes. Enfin à 24hpf, une perte de fonction de l'ACTN2 induit une perte de mobilité ainsi qu'une forte désorganisation et un affinement des fibres lentes (Gupta, Discenza, Guyon, Kunkel, & Beggs, 2012).

C'est une protéine « d'échafaudage » dont le rôle principal est de lier les extrémités + des polymères d'actine, les Myomesines et les filaments de Titine (voir II.1.d) à la bande-Z. Les filaments fins d'actine viendront en début de myogenèse s'accrocher sur cette structure, via des complexes protéiques encore mal connus.

En effet, d'autres protéines interagissent, directement ou indirectement, avec l'α-actinine et colocalisent sur la bande-Z pour aider à la formation et au fonctionnement du sarcomère, mais elles ont été peu ou pas étudiées et il reste beaucoup de travail à réaliser sur ce sujet. Enfin ces protéines sont remarquablement bien conservées au cours de l'évolution. Les principales d'entre elles seront présentées ici :

Cypher/Zasp (Rui et al., 2010), CapZ (dos Remedios et al., 2003; Littlefield, Almenar-Queralt, & Fowler, 2001), Télothonine/ T-cap (R. Zhang, Yang, Zhu, & Xu, 2009), FATZ/Myozénine (Faulkner et al., 2000; Takada et al., 2001), Myotiline ou encore FilaminC (Fujita et al., 2012; A. Ruparelia, Vaz, & Bryson-richardson, 2012).

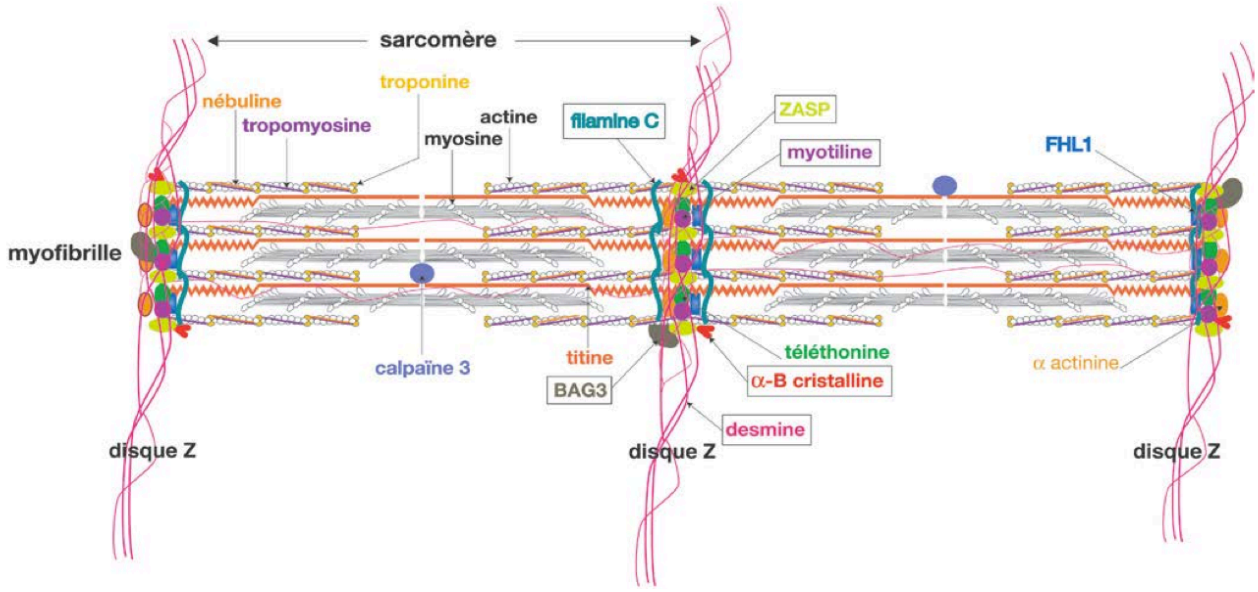


Figure 12 : Assemblage des différentes protéines du sarcomère mature responsables de Myopathies Myofibrillaires (d'après AFM telethon juin 2013).
Plusieurs protéines du sarcomère sont impliquées dans les myopathies myofibrillaires. Les six protéines (desmine, alpha-B cristalline, myotiline, ZASP, filamine C et BAG3) identifiées dans les myopathies myofibrillaires sont impliquées dans la structure, le maintien et le bon fonctionnement des myofibrilles.

- Cypher/ Zasp : cette protéine de la bande-Z appartient à la famille PDZ-LIM, le domaine PDZ est un module de liaison protéine-protéine. Via ce domaine PDZ, elle se lie avec l'Alpha-Actinine et la Myozénine. Chez la souris, elle est présente sur la bande-Z dans les muscles squelettique et cardiaque et semble jouer un rôle dans la formation des sarcomères, une mutation dans le domaine PDZ induit de fortes myopathies (une malformation du sarcomère et myofibrilles disséqués) et est létale au stade embryonnaire. Cependant c'est une protéine très peu décrite chez le poisson zèbre. A ce jour il n'existe pas d'anticorps spécifique. Exprimée dès les premiers somites dans les cellules adaxiales puis dans l'ensemble du myotome à 24 hpf.

- Cap-Z est une protéine présente sous deux isoformes chez le poisson zèbre CapZα et CapZβ pour former une protéine hétérodimérique. Les deux sous unités a et b coiffent les filaments d'actine, elle est fortement liée avec la partie barbue (coté bande-Z), de manière indépendante à la présence du calcium et bloque les échanges de G-actine à cette extrémité du filament. Elle sert donc à stabiliser le processus dynamique de polymérisation d'actine, donc stabilise sa longueur. Elle lie aussi d'une manière très forte les protéines d'α-Actinine (Hall et al., 2013; Pappas, Bhattacharya, Cooper, & Gregorio, 2008).
La sous-unité α est exprimée d'une manière ubiquitaire dans tout l'embryon alors que la sous-unité β est exprimée de manière spécifique dans les cellules adaxiales en tout début de

somitogénèse puis dans le myotome en général à 24hpf (Thisse et al. ; 2001). Le rôle de la sous-unité β dans le développement musculaire sera expliqué en détail dans le chapitre III.2.d.

-Telethonin ou T-Cap (pour Titin Cap) est une protéine importante de la bande-Z, facteur de la régulation et de l'assemblage des Titines elle permet de maintenir la stabilité et l'ancrage des filaments de Titines à la bande-Z, elle a donc un rôle proche de celui de l'α-actinine. Elle a aussi la capacité de se lier à la FATZ (voir ci après). La mutation de cette protéine chez l'homme induit une dystrophie importante (limb-girdle muscular dystrophy 2G) caractérisée par une faiblesse musculaire progressive, dans laquelle les muscles des ceintures scapulaires ou pelviennes sont principalement touchés (Moreira et al., 2000). Chez le poisson zèbre, aucune *in situ* n'a été réalisée mais la perte de fonction de la T-Cap, par utilisation de morpholino, induit une perturbation des cellules musculaires et une perte de mobilité. Cependant, il semblerait que la structure du sarcomère soit peu ou pas affectée mais que l'ancrage des sarcomères à la membrane plasmique, via la bande-Z, ne peut se faire correctement, expliquant ainsi la myopathie détectée chez l'homme (R. Zhang et al., 2009).

- FATZ (Filamin, α-Actinin- and Telethonin-binding protein of the Z-disc) ou Myozénine est une protéine de la bande-Z dont le rôle est encore mal compris. Sa localisation à la bande-Z est confirmée en immuno histochimie classique et en microscopie électronique avec marquage gold (Takada et al., 2001). Elle crée une liaison avec la bande-Z et recrute des partenaires comme l'α-Actinine, la Téléthonine. Cette protéine est surtout connue pour capter la Calcineurine au niveau de la bande-Z. La Calcineurin est une protéine phosphatase qui va activer la croissance du muscle squelettique et cardiaque Ainsi, en captant la Calcineurine au niveau de la bande-Z, la FATZ induit en partie la croissance du muscle en activant la myofribrilogenese. Chez l'homme une mutation de la Calcineurine induit une distrophie importante comme pour la Téléthonine (limb-girdle muscular dystrophy 2G). Chez le poisson zèbre la FATZ est très peu étudiée, un profile d'expression en somitogenèse indique que l'isoforme FATZ 2b est exprimée dans les cellules adaxiales et dans les fibres lentes à 24hpf (Thisse et al.; 2004).

- La Myotiline est une protéine du disque Z qui a été découverte en 1999, elle est impliquée dans l'assemblage des myofibrilles et la stabilité des filaments fins d'actine durant la contraction musculaire. Elle possède des domaines de liaison avec la Titine, mais aussi l'α-actinine, la Filamine C, FATZ et ZASP.

Chez l'Homme son expression est restreinte aux tissus musculaires et aux cellules nerveuses. Les mutations de ce gène ont été associées à de nombreuses myopathies myofibrillaires en particulier la LGMD (Dystrophie musculaire des ceintures).
Chez la souris, la surexpression d'une myotiline tronquée entraine une perturbation dans la formation des myofibrilles précoces et une accumulation de protéines sous forme d'agrégats. D'autre études montrent qu'une mutation dans le gène de la Myotiline induit des dystrophies musculaires (Garvey, Miller, Claflin, Faulkner, & Hauser, 2006). Cependant, une perte de fonction ciblée de la myotiline ne semble pas induire de perturbation dans la formation du muscle squelettique (Sklar et al., 1982). Aucune étude n'a été réalisée sur le rôle de la Myotiline chez le poisson zèbre.

- La Filamine est présente chez les vertébrés sous trois isoformes : La Filamine A, B et C. Ces isoformes possèdent un domaine de liaison à l'actine en N-Terminal. La Filamine C est l'isoforme spécifique des muscles squelettique et cardiaque. Elle se localise à la jonction myotendineuse et plus faiblement au niveau de la bande-Z. Son domaine C-terminal lui permet aussi de lier les protéines de Moytiline et FATZ (Faulkner et al., 2000; van der Ven et al., 2000).
Chez l'homme, les mutations dans le gène de la Filamine C induisent des myopathies sévères du muscle squelettique et cardiaque mais sa fonction in vivo n'est pas encore comprise.
Une souris dite KO pour la *filamine-C* a été créée. Ainsi l'utilisation de la souris déficiente en FLN-C a aidé à démontrer le rôle de cette protéine dans le développement et la maintenance de l'intégrité structurale du muscle. La mutation de la *filamine-C* chez la souris induit des fibres cellulaires rondes au lieu de former des myotubes droits. De plus, dans beaucoup de modèles murins de myopathies myofibrillaires, on observe une distribution anormale de Filamine C qui se retrouve souvent sous forme d'agrégats (Knöll et al., 2011).
Chez le poisson zèbre, une étude très récente montre que ce gène existe sous deux isoformes, FLNCa et FLNCb. Les profils d'expression montrent que ces deux isoformes sont exprimées dès les premiers somites. L'isoforme FLNCa est exprimée de manière restreinte et spécifique aux cellules adaxiales, tandis que FLNCb est exprimée dans toutes les cellules du somite (A. Ruparelia et al., 2012).
La perte de fonction individuelle de FLNCa ou FLNCb induit une désorganisation faible des fibres musculaires à 24hpf. Quelques fibres lentes ne sont pas étendues et forment de petits agrégats de protéines du sarcomère. De plus, la perte de fonction conjointe de FLNC a et b induit une très forte désorganisation des fibres lentes. Les fibres lentes n'arrivent plus à s'étendre sur la longueur du somite, formant ainsi des agrégats importants de myosine aux frontières somitiques et une perte totale de la motilité. Cependant durant les stades précoces

de somitogenèse tous les précurseurs des fibres lentes sont présents. Ces précurseurs migrent correctement tout en exprimant la myosine spécifique des fibres lentes (F59). Les lésions et le détachement des fibres arrivent à des stades plus tardifs, lors des premières contractions musculaires (A. Ruparelia et al., 2012).
De ce fait, les deux isoformes de la Filamine C ne sont pas nécessaires à la spécification des fibres lentes mais elles ont essentielles à la maintenance de l'intégrité des fibres et à leur attachement à la frontière après contraction.

Enfin, des études très récentes tendent à montrer que la bande –Z ne joue pas seulement le rôle de structure physique passive aidant au maintient du sarcomère, mais qu'elle pourrait avoir un rôle de mécano-senseur pouvant transmettre des informations sur l'état de la fibre et son niveau de contraction dans le muscle cardiaque et squelettique (Frank et al., 2006). Il est pensé que des « capteurs de tension » pourraient être présents au niveau de la bande-Z pour induire des voies de signalisation et réguler l'homéostasie musculaire. Certaines protéines de signalisation comme les kinases ou phosphatase (Calcineurine phosphatase ou PKC) sont gardées en « réserve » par certaines protéines de la bande-Z et sont « relâchées » en cas de stress mécanique. Ce qui permet de recruter des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation de la fibre comme les « chaperonnes » Unc45b et HSP90a (voir II.1.b).

Nous pouvons conclure cette partie en disant que la bande-Z joue un rôle très important dans la formation et le maintien de l'intégrité du sarcomère. Cette bande-Z est constituée d'un grand nombre de protéines interconnectées, parmi lesquelles l'α-actinine qui sert de structure et de « liant » à toutes ces protéines. Actuellement, il reste encore beaucoup de zones d'ombre autour de l'assemblage des protéines de la bande-Z et de leurs interactions.
Une grande majorité des mutations dans les gènes codants pour les protéines de la bande-Z induit, tant dans le muscle cardiaque que dans le muscle squelettique, de fortes perturbations des myofibrilles avec des caractéristiques communes : accumulation d'agrégats de protéines musculaires, détachement de la fibre au niveau de la frontière somitique et affinements des myofibrilles.
Il existe de remarquables similarités entre ces dystrophies musculaires induites chez la souris ou le poisson zèbre et certaine myopathies myofibrillaires chez l'homme (voir II.3). Ce qui nous conforte dans l'étude des dystrophies liées aux protéines de la bande-Z, pour mieux comprendre certaines myopathies humaines.

II.1.d Titine : la protéine géante du sarcomere.

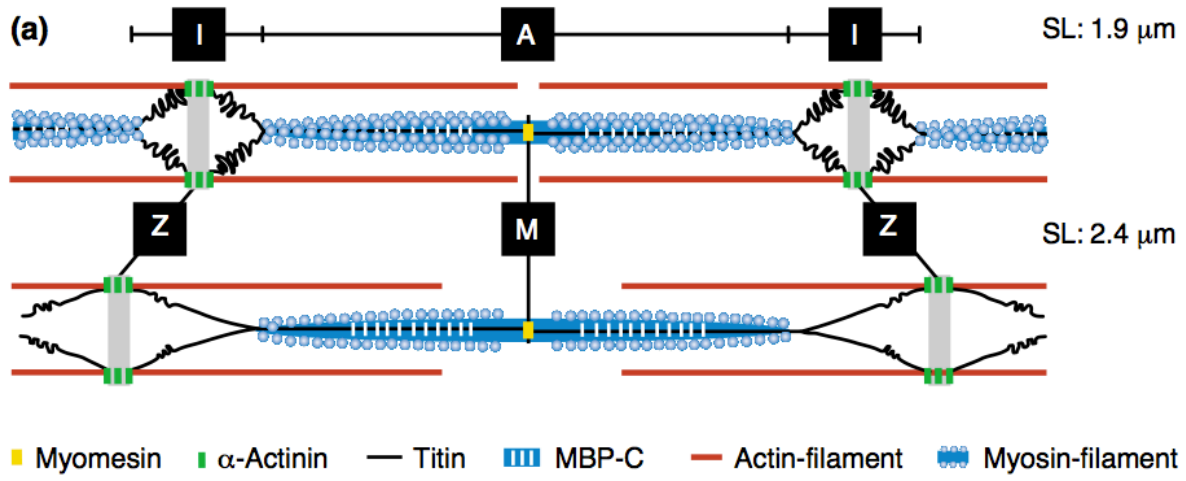


Figure 13 : Rôle de la protéine géante Titine dans la maintient de l'intégrité du sarcomère (Hein & Schaper, 2002).
La Titine possède de multiples propriétés au sein du sarcomère. Elle joue un rôle de stabilisation des filaments épais et d'assemblage du sarcomère en tant que protéine « d'échafaudage ». De plus, via son ancrage à la bande-Z et aux filaments épais, elle maintient l'intégrité du sarcomère lors des mouvements de contraction/décontraction en jouant le rôle de « ressort » au sein du sarcomère. Ainsi sa capacité élastique empêche la rupture du sarcomère lors de la phase de décontraction.

La Titine est considérée comme le troisième filament du sarcomère. Il s'agit d'une immense protéine de 3000 kDa qui a pour fonction principale de maintenir l'intégrité de la fibre musculaire contractile via ses propriétés « élastiques » et de servir de matrice durant la formation précoce du sarcomère.
90% de cette protéine consistent en une répétition de domaines Immunoglobuline-C2 (Ig-C2) en N-Terminal qui permet de lier la l'α-Actinine et la Tcap de la bande-Z. Une autre répétition de domaines Fibronectine-III (Fn-III) en C-terminale permet de lier avec les Myosines et les Myomésines de la bande-M. Les 10% restant de la protéine sont des domaines uniques de phosphotylation et de motifs Ser/ Ter kinase (Yap & Bloch, 2011).
Chaque Titine s'étend de la bande-Z à la bande-M où elles se croisent et se lient grâce à la Myomésine. Les Titines associées ainsi recouvrent l'intégralité du sarcomère allant d'une bande-Z à une autre, elles permettent ainsi de garder les myosines de la bande-A en position centrale (Yap & Bloch, 2011).

La Titine assure la stabilité mécanique du sarcomère. En effet après une contraction musculaire la distance entre deux bandes-Z ne varie pas : lors du relâchement, la Titine se déploie et génère une force passive capable de s'opposer à la tension d'étirement du

sarcomère, on lui donne alors le rôle de « ressort » du sarcomère. Cette protéine permet aussi une adaptation rapide du muscle à son environnement, en effet sa capacité à produire, par épissages alternatifs, de nombreuses isoformes (une centaine chez l'homme) plus ou moins rigides permet au muscle de réguler son élasticité (Granzier & Labeit, 2004).

Enfin, la Titine semble être impliquée dans la myofibrillogénèse. Certaines études proposent que la Titine puisse avoir un rôle de matrice sur la myofibrille néo-formée. Dans ce rôle la Titine, coordonnerait de manière précise l'assemblage des protéines du sarcomère « étage par étage » épaississant ainsi la fibre dans la hauteur, cette hypothèse sera discutée plus tard (voir II.2) (Gregorio, Granzier, Sorimachi, & Labeit, 1999).

Il existe deux gènes *titine* (*ttn*) chez le poisson zèbre : *ttnA* et *ttnB.* Chacun de ces gènes fournit deux types d'isoformes les ttn-N2A exprimées spécifiquement dans les cellules adaxiales en début de somitogenèse et dans tout le myotome à 24hpf. Les autres isoformes sont les ttn-N2B, qui sont exprimées dans le muscle cardiaque (Thisse et al.; 2004).

Dues à la grande taille de son gène, les mutations sont assez fréquentes et induisent des myopathies caractérisées chez l'homme, en particulier une cardiomyopathie dite « dilatée » mais rien n'est avancé sur le muscle squelettique (Itoh-Satoh et al., 2002; Hein & Schaper, 2002;). Chez le poisson zèbre, les mutations dans les gènes Titine induisent des dystrophies du muscle squelettique et cardiaque importantes (Hein & Schaper, 2002; Steffen et al., 2007). Chez le mutant *pik*^{m171}, la mutation induit un défaut d'épissage dans un transcrit spécifique du cœur. Le cœur se développe normalement mais il n'a quasiment aucune contraction. Ce mutant présente des myofibrilles précoces en somitogenèse mais il ne présente pas de sarcomère, venant conforter la thèse de l'implication de la Titine dans la myofibrillogénèse (Xu et al., 2002). Pour ce qui est des mutations des isoformes exprimées dans le muscle squelettique, elles induisent une perte de la motilité chez les embryons à 24hpf et une forte désorganisation des fibres musculaires (rapides et lentes) avec accumulation de protéines sous forme d'agrégats et une localisation anarchique des noyaux (Steffen et al., 2007).

II.2. MODÈLES D'ASSEMBLAGE

La myofibrillogénèse consiste en l'assemblage complexe des protéines du sarcomère (citées au chapitre II.1) en myofibrilles. La myofibrille est une fibre simple, qui en devenant mature va former une fibre musculaire unique et complète, comprise dans une seule cellule musculaire. S'attachant de part et d'autre à la frontière somitique, via un complexe protéique (voir II.1), la myofibrille permet de récupérer la force contractile de chaque sarcomère, afin

de créer une contraction selon l'axe antéro-postérieur. Cette structure est extrêmement bien conservée tant pour les muscles squelettiques que pour les muscles cardiaques au cours de l'évolution suggérant un processus commun (voir chapitre II.1).

Quels sont les mécanismes permettant d'associer les protéines élémentaires du sarcomères et aboutissant à une fibre mature, parfaitement structurée et fonctionnelle ?

Le mécanisme d'assemblage précoce des myofibrilles reste partiellement incompris et plusieurs modèles théoriques ont été proposés. Pour chacun de ces modèles, certaines informations se recoupent, mais d'une manière générale deux modèles théoriques sont en opposition sur une question : l'assemblage des éléments du sarcomère se fait il de manière direct ou indirect ?

Un premier modèle, plus ancien, propose un assemblage direct des éléments du sarcomère (Epstein & Fischman, 1991; Holtzer et al., 1997; Lu et al., 1992; Nigel G. Laing, 2008; Pizon et al., 2002). Basé sur des observations de cardiomyocytes en culture, ce modèle théorique propose que les polymères d'actine, les protéines de la bande-Z et les dimères de Myosine musculaire II, soient traduites simultanément et qu'ils coexistent au sein des cellules en différenciation. Ce modèle présente la Titine comme protéine d'assemblage des filaments fins, des filaments épais et des protéines de la bande-Z. Sans étape intermédiaire ces protéines s'assembleraient simultanément et formeraient des sarcomères dans la longueur. Ce modèle ne prend pas en compte la Myosine non-musculaire IIB, récemment identifiée comme essentielle à la myofibrillogénèse. C'est en cela que ce modèle diffère des autres théories sur la formation des myofibrilles.
D'abord proposé comme modèle pour les cardiomyocytes, il a été récemment étendu au muscle squelettique. Cependant, ce modèle est basé sur peu de données. De nouveaux outils moléculaires ont permis l'observation de structures précoces de la myofibrille qui contredirait ce modèle.

Le second modèle, plus récent, rassemble les partisans de l'assemblage indirect de la myofibrille (J. W. Sanger, Wang, Fan, White, & Sanger, 2010) Ce modèle propose une formation des myofibrilles en deux étapes : dans une première étape, des « pré-myofibrilles » (filaments d'Actine/FATZ/α-actinine intercalés avec de la Myosine non-musculaire II) se forment indépendamment des dimères de Myosine musculaire II. Cette « pré-myofibrille » va en quelque sorte jouer un rôle de « mini-matrice » pour la myosine musculaire. Dans une seconde étape, les dimères de Myosines musculaires II vont venir

remplacer les Myosines non-musculaires et former alors des « myofibrilles naissantes » qui s'aligneront les unes aux autres pour former une myofibrille.

Ces modèles théoriques sont en opposition car ils se basent sur des expériences différentes (tissus / espèces / techniques). En effet, les études ont été faites soit sur des embryons de poisson zèbre soit sur des myocites ou des cardiomyocytes en culture (M L Costa, Escaleira, Manasfi, de Souza, & Mermelstein, 2003; Manoel L Costa, Escaleira, Rodrigues, Manasfi, & Mermelstein, 2002). La fixation étant souvent inadaptée aux expériences (réticulation de certaines protéines avec certains fixateurs). Il existe peu d'anticorps spécifiques contre les protéines de la bande-Z, en particulier pour les embryons de poisson zèbre (J. M. Sanger & Sanger, 2008). Les anticorps sont souvent inadaptés aux isoformes précoces. De ce fait en fonction des modèles, les protéines peuvent devenir indétectables. De plus, les observations de cellules en culture ne tiennent pas compte des interactions cellulaires qui interviennent *in vivo*, des voies de signalisation pouvant passer d'un tissu embryonnaire à un autre.

Ce modèle indirect de formation des myofibrilles a été testé chez l'embryon de poisson zèbre et décrit ci dessous (Figure 14) :

Chez le poisson zèbre, Les différents stades de développement des fibres lentes sont observés *in vivo* dans le même individu à 25 somites. A l'extrémité caudale, les derniers somites (les plus jeunes) sont comparés aux somites de l'extrémité rostrale (les plus vieux). Ainsi la myofibrillogénèse est donc plus facile à comparer que dans des cellules en culture.
La première étape observable est l'assemblage de « corpuscules-Z » au niveau du sarcolemme dans les somites les plus jeunes. Cette structure est formée de très petites quantités d'α-Actinine répétées sous forme de « pointillés ». Entre ces points d'α-Actinine, on retrouve un complexe protéique de Myosine non-musculaire IIB et de filaments fins d'Actine en cours de polymérisation : formant une entité appelée « pré-myofibrille » (J. W. Sanger et al., 2010; Wang et al., 2007). Les « corpuscules-Z » vont s'aligner au fur et à mesure et s'associer pour s'empiler en hauteur et en largeur. A ce moment, la Titine est incorporée à la structure créant un lien physique entre les « pré-myofribrilles » et détermine la longueur du jeune sarcomère (Lange, Ehler, & Gautel, 2006). De plus, les Myosines non-musculaires IIB sont remplacées par de la Myosine musculaire II, cette étape est mal comprise mais la perte de fonction de la Myosine non-musculaire IIB amène à une inhibition de la myofibrillogénèse (Du, Sanger, Linask, & Sanger, 2003). Cette Myosine musculaire est d'abord présente sous forme de petits agrégats (dimères de Myosines) dans les cellules les plus jeunes puis va devenir filamenteuse non striée puis filamenteuse striée dans les cellules plus âgées. Le même phénomène est observé dans les cardiomyocytes et les myocytes de poulet en

culture. Il y a alors évolution de la « pré-myofibrille » en « myofibrille naissante ». D'autres arguments viennent étayer ce modèle : des bandes-A (Myosine) « flottantes » peuvent être observées lors de perte de fonction d'Actine dans des fibres en culture, de plus, des filaments d'Actine striés peuvent être détectés en l'absence de myosine musculaire II (Holtzer et al., 1997).

Ce modèle propose donc que les « pré-myofibrilles » se forment indépendamment de la Myosine musculaire II en attendant son incorporation lors du stade « myofibrille naissante » (J. W. Sanger et al., 2010).

Le même phénomène est observé lors de la croissance musculaire de la larve de poisson zèbre. Pour les nouvelles cellules musculaires lentes qui sont rajoutées de manière distale, aux extrémités dorsales et ventrales. Ces nouvelles fibres lentes ne sont pas directement dérivées des cellules adaxiales et les processus de mise en place sont différents. Les myofibrilles en formation grandissent par un processus similaire : de très fines myofibrilles naissantes, détachées, s'alignent et se superposent au reste de la fibre en formation. Chez les téléostéens ce phénomène est appelé « hyperplasie stratifiée » (M. J. F. Barresi, Angelo, Herna, & Devoto, n.d.; J. W. Sanger, Wang, Holloway, Du, & Sanger, 2009)

Ce modèle d'assemblage des myofibrilles corrobore avec le modèle théorique proposé par l'observation de myocytes et cardiomyocytes de poulet en culture. Il semblerait que ce processus soit conservé aux cours de la croissance et aux cours de l'évolution.

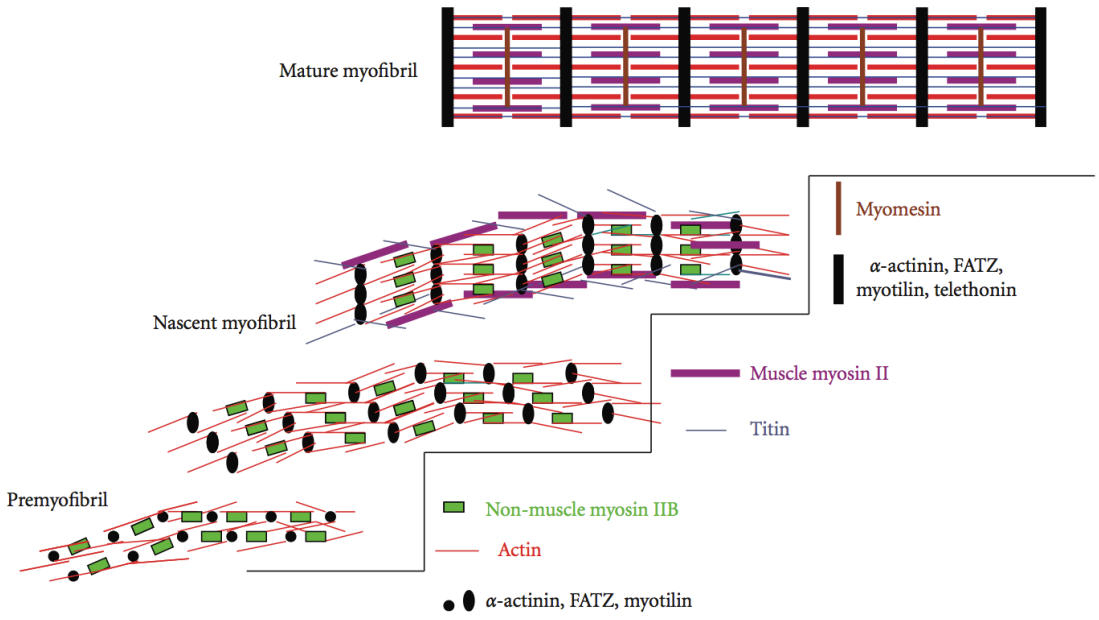


Figure 14 : Modèle théorique de myofibrillogénèse par assemblage de prémyofibrille (d'après (J. W. Sanger et al., 2010)**.**
Selon ce modèle, l'assemblage commence à la bordure des cellules musculaires, grâce à la formation de prémyofibrilles composées de mini-sarcomères, eux même composés de corpuscules d'α-Actinine, alignés sur des filaments d'Actine et alternés avec de la Myosine

non musculaire II. La Myosine musculaire ainsi que la Titine serait incorporés à un stade plus tardif, la Myosine non musculaire commence à disparaître et la prémyofibrille devient linéaire. Les corpuscules d'α-Actinine, commencent alors à s'aligner et former ainsi la myofibrille naissante. Enfin la Myomésine s'incorpore dans la myofibrille pour former la bande-A, la bande-Z se renforce par l'arrivée de Téléthonine, FATZ et Myotiline. Ce qui permet de former une myofibrille mature.

Pour l'instant il n'existe pas de modèle de myofibrillogénèse qui puisse unifier les différentes observations et montrer un processus commun de la myofibrillogénèse pour les différents tissus et les différentes espèces. Il reste encore beaucoup de données à acquérir en passant par de nouveaux outils. Récemment, l'utilisation de plasmides codant pour des protéines de fusion couplés à des fluorochromes, injectés dans des embryons, permet de palier les problèmes d'anticorps sur tissus fixés et d'aller un peu plus loin dans la compréhension de ce processus de myofibrillogénèse précoce *in vivo*.
Nous apporterons une modeste contribution à ce débat grâce aux expériences réalisées durant cette thèse.

II.3 MYOPATHIES MYOFIBRILLAIRES COMPARÉES

Il existe un grand nombre de myopathies génétiques sévères et rares chez l'homme touchant aussi bien le muscle cardiaque que le muscle squelettique. Certaines de ces maladies sont caractérisées par des malformations des myofibrilles, en particulier liées au sarcomère, entrainant dans la plupart des cas une dissection des myofibrilles et des accumulations de protéines du cytosquelette sous forme d'agrégats. Ces maladies ont été regroupées sous le terme médical de « **Myopathies Myofibrillaires** » ou MMF (Kley et al., 2012; Ruparelia, Vaz, & Bryson-richardson, 2012;Claeys & Fardeau, 2013).

Pour environ la moitié des personnes atteintes de myopathie myofibrillaire, aucun des gènes responsable n'a pu être identifiés. Il y a donc d'autres anomalies génétiques mises en cause dans les myopathies myofibrillaires qui restent à découvrir (Vicart, O. Agbulut et P., 2013).
Les mécanismes et les gènes liés au développement de la myofibrille sont très bien conservés au cours de l'évolution. Il est intéressant de voir que les phénotypes associés à ces myopathies myofibrillaires chez l'Homme présentent des similitudes importantes avec les phénotypes de certaines mutation de gènes impliqués dans la myogenèse, entre autre chez la drosophile et le poisson zèbre (Avnika A Ruparelia, 2012).

De plus, de nombreux outils moléculaires (ARN interférents/Morpholino/mutations dirigées) permettent de modifier l'expression des gènes cibles de la drosophile et du poisson zèbre d'une manière facile et efficace.

Ainsi, une étude comparative des altérations de la myofibrillogénèse peut être entreprise (Schnorrer et al., 2010). L'utilisation des modèles drosophile et poisson zèbre permettrait de trouver des mécanismes communs et donc potentiellement de mieux comprendre les myopathies myofibrillaires rares et non caractérisées chez l'homme.

II.3.a Myopathies Myofibrillaires (MMF) chez l'homme (Vicart, O. Agbulut et P., 2013).

Le tissu musculaire strié squelettique ou cardiaque, est souvent sujet à des mutations induisant des myopathies sévères, entrainant chez l'homme une faiblesse musculaire due à une dégénérescence progressive des myofibrilles. Chez l'Homme, les Myopathies Myofibrillaires sont caractérisées par des signes pathologiques communs : désorganisation (voir dissection) de la myofibrille et accumulation de protéines musculaires sous forme d'agrégats plus ou moins filamenteux.

L'accumulation de nombreuses protéines à l'intérieur de la cellule musculaire est l'une des principales caractéristiques des myopathies myofibrillaires. L'étude de modèles cellulaires et animaux a montré que cette accumulation de protéines se fait sous forme d'agrégats insolubles. La présence de ces agrégats semble jouer un rôle important dans la survenue de la maladie.

Ces agrégats renferment non seulement des protéines directement impliquées dans les myopathies myofibrillaires (Myosine, Titine, Myotiline, Desmine, Dystrophine, a-B-Crystaline, Filamine-C, BAG3 ou les protéines ZASP), mais aussi d'autres protéines très diverses: protéines du cytosquelette et des myofibrilles, protéines du noyau, protéines chaperonnes, protéines du stress oxydatif, protéines du système de dégradation protéasome-ubiquitine.

La découverte des différentes protéines piégées dans les agrégats fournit de nombreuses pistes de travail aux chercheurs (Vicart, O. Agbulut et P., 2013).

On observe également dans les tissus musculaires des patients atteints de MMF, des fibroses, des noyaux anormalement localisés, des amas membranaires, de fortes concentrations de mitochondries anormalement localisées et enfin la présence dans les fibres d'autophagosomes (Ferrer & Olivé, 2008; Ornstein & Goldberg, 2004.). Cependant, l'α-actinine, composante majoritaire de la bande-Z et l'actine ne semblent pas présentes sous forme d'agrégats. Ces MMF sont induites par des mutations qui sont en lien direct ou indirect avec les éléments qui composent le sarcomère.

La multiplication des études cliniques a permis de mieux connaître les symptômes caractéristiques de chaque forme de myopathie myofibrillaire. Ces éléments cliniques associés à des données de la biopsie musculaire (histologie, immuno-histochimie,

microscopie électronique) et de l'imagerie médicale (scanner, IRM) guident les médecins dans leurs démarches diagnostiques, les incitant à proposer en premier l'analyse d'un gène plutôt que celle d'un autre et à trouver ainsi plus rapidement le diagnostic génétique des personnes atteintes de myopathies myofibrillaires.

Jusqu'à présent, six protéines différentes ont été identifiées comme responsables de myopathies myofibrillaires : la Desmine, l'alpha-B cristalline, la Myotiline, la protéine ZASP, la Filamine C et la protéine BAG3 (pour plus de détails voir Ruparelia et al., 2012). Ces six protéines sont impliquées dans la structure, le maintien et le bon fonctionnement des sarcomères et sont donc essentielles à la contraction musculaire.

Il existe de nombreuses mutations de ces protéines chez l'Homme. Ces protéines ont toutes un rôle différent au niveau du sarcomère, que ce soit dans la formation précoce, le fonctionnement ou le maintien de la structure contractile. Pourtant l'analyse des tissus musculaires des patients suggère un mécanisme commun : ces six protéines sont toutes au moins localisées sur la bande-Z et leurs mutations induisent des phénotypes très similaires. Dans ces MMF on observe une augmentation de la traduction des protéines mutées, ayant pour effet de créer une réponse de stress dans les cellules, expliquant la présence d'autophagosomes.

La nature progressive de ces maladies ainsi que le rôle de ces protéines suggèrent une accumulation graduelle de défauts dans l'organisation de la bande-Z, conduisant à la destruction de la fibre. A ce jour aucuns traitement éfficaces n'a été proposé, mais des protocols de thérapie génique sous en cours de test chez la souris (communiqué AFM-Téléthon 2013)

Cependant, il reste de nombreuses MMF, plus rares et moins étudiées. Pour la plupart, les gènes impliqués n'ont pas encore été identifiés. Afin de mieux comprendre ces MMF et de pouvoir en identifier d'autres, il faudrait créer des modèles de perturbation de la myofibrillogenèse, pouvant mimer des MMF sur des organismes plus facilement étudiables, comme la drosophile ou le poisson zèbre. Ces modèles permettraient de comprendre, d'une manière plus approfondie, les phases très précoce de la myofibrillogénèse, ainsi que le rôles des protéines du sarcomère dans ce processus.

II.3.b Myopathies Myofibrillaires chez la drosophile (Schnorrer et al., 2010).

Grâce à la librairie d'ARN interférents qui recouvre le génome entier de la drosophile, des études ont permis de faire un crible exhaustif et systématique des gènes potentiellement impliqués dans la myogenèse de la drosophile. Les ARN interférents ont été insérés dans

des vecteurs d'expression, pour être exprimés sous le contrôle d'un promoteur spécifique des muscles de drosophile (Mef2-GAL4 UAS-ARNi)

L'injection de 17 769 constructions a permis de cibler un total de 10 461 gènes, qui peuvent potentiellement jouer un rôle dans la myogenèse, que ce soit dans l'organisation des cellules musculaires elle même ou dans la myofibrillogénèse (Schnorrer et al., 2010).

Des test fonctionnels de locomotion, de posture et de vol ont été entrepris : La perte de fonction de 7 676 (73,4%) gènes induit un phénotype sauvage. D'autre part, la perte de fonction de 2 785 (26,6%) gènes induit des défauts pour les tests fonctionnels. La perte de fonction de seulement 436 gènes n'était pas létales à l'état homozygote et présentaient des défauts de locomotion et/ou de posture et/ou de vol. Ces 436 gènes on été choisis et l'étude de leurs structures musculaires a été observée au stade larvaire grâce à des marqueurs GFP de la bande-Z et à la phalloidine.

Les larves de drosophiles présentent 30 muscles squelettiques striés, parfaitement définis et ayant une très forte similarité de myogenèse avec les vertébrés (Michael V Taylor, 2006).

Sur les 436 gènes sélectionnés, seulement 190 vont être retenus.

L'étude montre que trois types de defaults caractéristiques dans la morphologie des cellules musculaires peuvent être observés : des myofibrilles «disséquées» (53 gènes impliqués) les myofibrilles sont très fines et dissociées. Des cellules musculaires absentes ou qui n'ont pas migrées (8 gènes impliqués). Enfin des cellules «arrondies» (13 gènes impliqués), ces cellules semblent se développer normalement mais n'arrivent pas à s'attacher aux extrémités cellulaires sur les cellules du tendon (Figure 15 A/B/C/D). Les autres gènes soit 362 ne montraient pas de défaut majeur au niveau cellulaire et leurs défauts de locomotion, de posture et de vol peuvent être dus soit à des structures subcellulaires du muscle en particulier la formation des sarcomères, soit à d'autre fonctions différentes du muscle, par exemple développement des axones, exosquelette.

Les phénotypes «cellules musculaires absentes» correspondent à la perte de fonction de facteur d'épissage et de l'His2a.

Les phénotypes « myofibrilles disséquées» correspondent à des pertes de fonction des gènes de type récepteur FGF, α-Actinine et certaines protéines de liaison au ARN (Schnorrer et al., 2010).

Les phénotypes «cellules arrondies» correspondent à des pertes de fonction des facteurs d'attachement tel que les Intégrines, ILK et surtout les orthologues de Talin et Parvin qui permettent de créer une liaison entre l'α-Actinine et les Intégrines.

Muscles larvaires

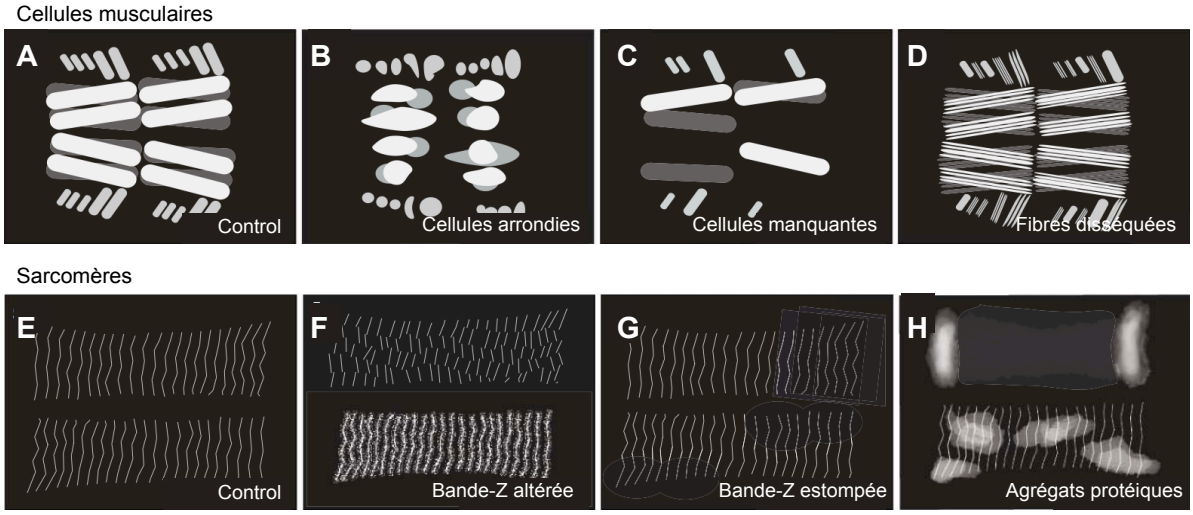


Figure 15 : Schéma des modèles des Myopathie Myofibrillaires chez la drosophile (adapté de Schnorrer et al., 2010)**.**
Au niveau cellulaire, les cellules musculaires contrôles de drosophiles (A) sont comparés avec les cellules musculaires issus d'embryons, qui ont subit une perte de fonction de gènes impliqués dans la myogenèse (par injection ARN interférent). Ces phénotypes cellulaires sont classés en groupe: Cellules arrondies (B), manquantes (C), disséquées (D).
De la même manière, à un niveau plus résolutif, les phénotypes des sarcomères issus d'embryons, qui ont subit une perte de fonction de gènes impliqués dans la myogenèse, sont comparés au sarcomère contrôle (régulièrement strié E) et classés par phénotype : bande-Z altérée (F), bande-Z estompée (G) et d'agrégats protéiques des éléments du sarcomère (H).

Dans la même étude, les sarcomères sont aussi finement caractérisés et classés par phénotypes semblables.

L'organisation du sarcomère peut être : «estompée» ou faible (94 gènes), en «pointillée» (50 gènes) ou «accumulée» (18 gènes) avec une formation d'agrégats irréguliers à l'intérieur de la cellule, dans cette classe de phénotype, les bandes-Z peuvent être soit «absentes» soit en «pointillées» (Figure 15 E/F/G/H).

Dans ce crible, les sarcomères à l'aspect «estompés» sont représentés par des pertes de fonction d'α-Actinine. D'autre part, une grande majorité, 266 gènes soit 61% ne présente pas de malformation du sarcomère, laissant penser à d'autre mécanismes d'action sur les fonctions motrices du muscle (Schnorrer et al., 2010).

De façon remarquable, les sarcomères à l'aspect « en pointillés » sont liés à des pertes de fonctions de la protéine de liaison aux ARN How, l'orthologue de Quaking, mais aussi de la perte de fonction de la majorité des protéines composant le sarcomère (Actine, Tropomyosine, Tropomoduline, troponine et la Myosine). Enfin, les sarcomères au phénotype « agrégats proteiques » correspondent à la perte de fonction de l'orthologue de

AIP1 (Actin Interacting Protein 1) et à celle des protéines nécessaires à l'établissement de la jonction neuro-musculaire (Schnorrer et al., 2010).

On retrouve donc des phénotypes communs avec les MMF humaines : myofibrilles altérées, dissociées, bandes-Z désorganisées et accumulation d'agrégats protéiques au sein des cellules musculaires striées. Ces lignées pourraient être utilisées afin de mieux comprendre la myofibrillogénèse précoce et afin de mieux caractériser les MMF humaines.

Aucune étude aussi exhaustive n'a été faite chez le poisson zèbre, mais certains mutants présentent des phénotypes d'altération des myofibrilles, similaire aux phénotypes retrouvés dans les muscles des patients atteins de MMF. Peut on créer des comparaisons entre les altérations des myofibrilles humaines et des myofibrilles de poisson zèbre? Peut on utiliser les poissons zèbres comme modèle de MMF?

II.3.c Myopathies Myofibrillaires chez le poisson zèbre.

Cette partie sera consacrée à mettre en évidence un modèle potentiel de MMF chez le poisson zèbre. Ce modèle a déjà été proposé comme modèle pour les dystrophies musculaires et de myopathies congénitales (Bassett & Currie, 2003), mais pour l'instant aucune étude ne le présente vraiment comme un modèle de myopathie myofibrillaire, vraisemblablement par ce que l'aspect cellulaire a été de beaucoup privilégié à l'aspect subcellulaire, sachant que les mécanismes de la myofibrillogénèse ne sont pas encore clairement définis.

Une étude récente montre que les isoformes Mef2c et Mef2d sont essentielles à l'assemblage des filaments de myosine musculaire dans les fibres lentes du poisson zèbre (Hinits & Hughes, 2011). La perte de fonction simultanée de ces deux isoformes induit un phénotype particulier avec une formation d'agrégats de myosine musculaire aux extrémités des fibres lentes, mais n'empêche pas la spécification, ni la migration de ces fibres.

Mef2, pour Myocyte Enhancer Factor 2, est un facteur de transcription de la famille MADS qui est très bien conservé de la levure à l'être humain. Une de ses fonctions caractéristiques dans le développement embryonnaire est l'induction des cellules musculaires. Dans des cellules en culture Mef2 en association avec MyoD induit la différenciation de cellules non-musculaires, en cellules musculaires en régulant l'expression de nombreux gènes des cellules du muscle cardiaque ou du muscle squelettique (Spring et al., 2002). Cependant les fonctions précises de Mef2 durant la myofibrillogénèse restent obscures.

Il existe quatre gènes pour Mef2 (A-D) chez le poisson zèbre, parmi lesquels trois (A, C et D) sont exprimés dans le muscle cardiaque et seulement deux (C and D) sont exprimés dans le muscle squelettique (Thisse et al.; 2006). Mef2C et Mef2D sont exprimés dans les cellules adaxiales du poisson zèbre, l'expression de Mef2D s'étendant au reste du somite. Les deux isoformes persistent après 24hpf, Mef2C est localisé au niveau des frontières somitiques, Mef2D est plus diffus mais se concentre au niveau du milieu du somite.

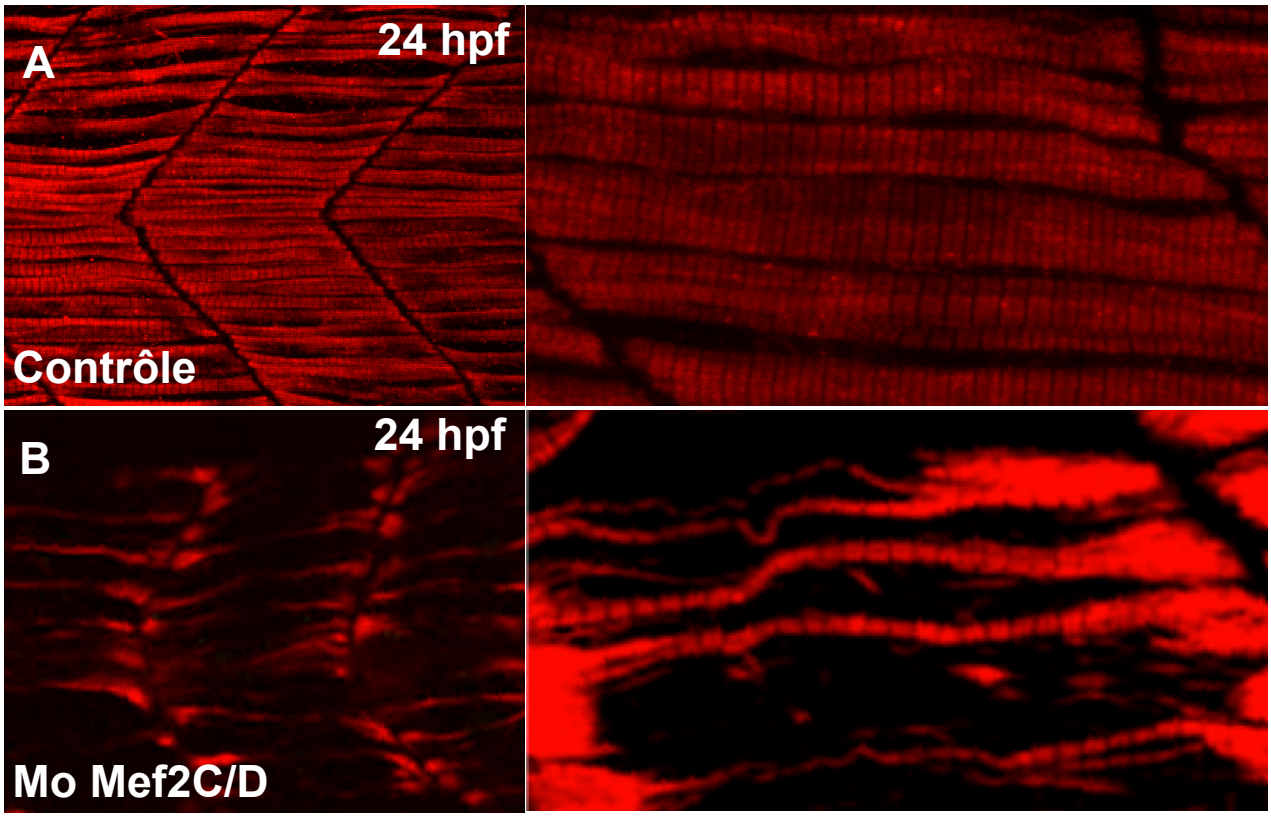


Figure 16 : Altération des fibres lentes lors de la perte de fonction de Mef2 C/D (d'après Hinits & Hughes, 2011**).**
Vues latérales d'embryons de poissons zèbres. Les fibres musculaires lentes sont marquées par F-59, l'anticorps dirigé contre les chaines lourdes de la Myosine lentes.
A. Dans l'embryon contrôle, les fibres lentes sont organisées parallèlement à l'axe de l'embryon. La Myosine est striée et repartie de manière constante dans la fibre.
B. Lors de la perte de fonction de Mef2C et Mef2D par l'utilisation de morpholinos, la myofibrillogénèse perturbée. La Myosine n'est pas répartie de manière uniforme, on observe une accumulation de Myosine aux niveaux des frontières somitiques. De plus les fibres s'amincissent pour former des myofibrilles. Cependant les cellules migrent correctement

La perte de fonctions simples de Mef2C ou Mef2D (morphants ou mutants) n'induit pas de réels phénotypes au niveau musculaire. Cependant, la perte de fonctions conjointes de Mef2C et D induit un phénotype musculaire sévère. On remarque d'abord une perte de mobilité, les embryons sont courbés et le marquage de la myosine musculaire lente (MyHC) par l'anticorps F-59 révèle une accumulation importante de myosine, sous forme d'agrégats, de chaque coté des frontières somitiques. Ces agrégats n'apparaissent pas striés et sont

reliés entre eux par de très fines myofibrilles striées (Figure 16). Le niveau d'expression des protéines myosine musculaire des fibres lentes n'est pas perturbé, mais plutôt leur assemblage, cependant le niveau d'expression des protéines associées aux filaments épais (entre autre la Tropomyosine) est baissé lors de la double perte de fonction de Mef2C et D.
De plus, l'étude montre que ces fibres lentes, bien qu'altérées structurellement au niveau de la myofibrille, sont bien positionnées dans le somite, elles s'allongent et migrent correctement.
L'étude conclue donc que Mef2C et D sont essentiels à la maturation de la myofibrille plus précisément dans l'assemblage des filaments épais, mais pas dans les étapes précoces de la myofibrillogénèse, la spécification des cellules lentes elle n'étant pas affectée du tout.

Les formations d'agrégats de myosine induites par la double perte de fonction, rappellent fortement le phénotype décrit dans le muscle de drosophile lors de la perte de fonction de AIP-1 (voir Figure 15-H).
Peut on trouver dans ces modèles, des origines communes à la formation de ces agrégats protéiques? Peut on associer ces mécanismes à ceux qui induisent des agrégats protéiques dans les tissus des patients atteints de MMF ?
Enfin, tous ces gènes qui ont un rôle prépondérant dans la myogenèse de la drosophile et du poisson zèbre, semblent être bien conservés dans le génome humain. Ces gènes doivent être finement régulés, subir des épissages et des régulations post-transpitionelles. Comment ces régulations se font elles ?

III- QUAKING : UNE PROTEINE DE LIAISON AUX ARNm

III.1. QUAKING : UNE PROTÉINE STAR

III.1.a Généralités

Les protéines de liaison aux ARN jouent un rôle fondamental dans la physiologie cellulaire et participent à la régulation de nombreux évènements lors du développement. Les protéines à domaine STAR (Signal Transduction and Activation of RNA) appartiennent à la famille des protéines de liaison aux ARNm. Les gènes qui codent pour les protéines à domaine STAR sont présents dans le génome de tous les métazoaires et ils ont été récemment trouvés chez les plantes (Figure 17) (Vega-Sánchez, Zeng, Chen, Leung, & Wang, 2008). Toutes les protéines STAR ont en commun un domaine « STAR » d'environ 200 acides aminés qui est particulièrement bien conservé au cours de l'évolution. C'est le domaine fonctionnel qui sert à créer la liaison avec les ARN.

Au sein de la grande famille des protéines STAR, on trouve une sous famille de protéines nommée QUAKING. Chacun des orthologues de la famille QUAKING possède une forte homologie dans leurs séquences protéique, en particulier dans le domaine de liaison aux ARNs. Cette étude porte donc sur les protéines Quaking dont les modèles les plus étudiés sont *GLD-1* (Germ Line Development) pour *Caenorhabditis elegans*, *How* (Held Out of Wing) pour *Drosophilia melanogaster* et enfin l'orthologue chez les vertébrés : *QKI (Quaking)*.

Mammal	Zebra	Drosophila	C. elegans	Yeast	Plant
QUAKING	Qki (A/B/C)	How(M/L/S)	Gld-1		AT1G 09660
Sam68		Sam68			
SF1		SF1	Sfa-1	BBP	SPIN1

Figure 17 : Les différents orthologues des protéines STAR chez différentes espèces. Organisées par homologie de séquence, les protéines STAR peuvent être classées en famille. La famille des protéines Quaking qui sont présentes dans toutes les espèces sauf la levure. La famille des Sam68 qui est aussi une protéine de liaison aux ARN et joue un rôle de régulateur post- transcriptionnel. Enfin SF1 (Splice Factor 1) est aussi une protéine STAR capable de se lier aux ARN, son seul rôle défini pour le moment est l'épissage des ARNm.

Les souris mutantes *quaking viable* (qk^v) ont été étudiées depuis plus de quarante ans (Sidman, 1964). Le phénotype les caractérisant est un tremblement des jeunes souris mutantes juste après la naissance (E15.5). Elles représentent un modèle animal pour l'étude de la démyélinisation (Hogan and Greefield, 1984). Le gène responsable de ces défauts a été cloné et se nomme *quaking* (QKI). La transcription du gène *QKI* est complexe, produisant par épissage alternatif au moins cinq isoformes dont trois majoritaires chez la souris : l'isoforme de 5kb de longueur code une protéine appelée QKI-5; les isoformes de 6kb et 7kb de longueur codent respectivement les protéines QKI-6 et QKI-7.

En se liant aux ARNm cibles, grâce au domaine STAR, les protéines Quaking guident et régulent la traduction de ces ARNm, soit en les stabilisant ou les déstabilisant (Ebersole, Chen, Justice, & Artzt, 1996) soit en régulant leur localisation (Z. Li, Zhang, Li, & Feng, 2000) ou leurs épissages (J. I. Wu, Reed, Grabowski, & Artzt, 2002). Le mode de fonctionnement des protéines à domaine STAR ainsi que leur ARN cible ne sont pas encore parfaitement définis. Cependant les domaines protéiques fonctionnels de liaison aux ARNm sont bien

décrits dans la littérature (T. Chen & Richard, 1998; Hardy et al., 1996). De nombreux efforts restent à faire pour comprendre comment elles reconnaissent, parmi une quantité importante d'acides nucléiques, leur séquence d'ARNm cible. Ainsi nous pourrons définir de nouvelles cibles et mieux comprendre leur rôle dans le métabolisme cellulaire et dans le développement.

III.1.b Structure commune des protéines Quaking : le domaine STAR.

Le domaine STAR est composé principalement d'un domaine KH (ribonucléotides hnRNP-K Homology), flanqué de deux domaines NK (N-term of KH) et CK (C-term of KH) respectivement re-nommés QUA1 et QUA2 pour les protéines Quaking. Le domaine KH aidé du domaine QUA2 permet la liaison aux ARNm cibles, tandis que le domaine QUA1 permet la dimérisation des protéines STAR.

KH-QUA2 : le «maxi-domaine» de liaison aux ARNm.

Contrairement aux autres protéines de liaison aux ARN, les protéines STAR possèdent un site unique de liaison nucléotidique appelé le « maxi-domaine » composé du domaine KH et du domaine QUA2.

Afin de connaître les ARNm reconnus par les protéines Quaking, il a fallu définir une séquence consensus reconnue par le « maxi-domaine », appelée aussi séquence QRE (Quaking Element Responce). Deux méthodes utilisant l'affinité des protéines envers des séquences nucléotidiques ont été utilisées *in vitro*.

Premièrement, des expériences de co-immunoprécipitation des ARNm totaux ont été réalisées avec les protéines Quaking. Les ARNm retenus par les protéines Quaking ont été ensuite séquencés et comparés, les séquences communes aux ARN séquencés sont ensuite analysées. Enfin, des expériences complémentaires de mutagénèses dans les séquences communes permettent de restreindre le motif reconnu par le domaine STAR en quantifiant l'affinité et la stœchiométrie entre les protéines Quaking et les ARNm mutés (Ryder, Frater, Abramovitz, Goodwin, & Williamson, 2004).

Une deuxième méthode a été mise au point à l'aide de la technologie SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) consistant a créer une large banque de courtes séquences oligonucléotidiques aléatoires, qui seront passées sur colonne d'affinité. Le principe de SELEX permet ainsi de sélectionner les petites sequences d'oligonucléotides qui se lient avec une haute affinité aux protéines Quaking (Galarneau & Richard, 2005).

Les deux méthodes donnent des résultats homogènes. Cette séquence consensus, QRE, est définie ainsi: UA(C/U)UAA(C/U)$_{1\text{-}20}$UAA(C/U). Le premier motif 5'-UA(C/U)UAA(C/U)-3' est reconnu par le domaine KH, le deuxième motif 5'-UAA(C/U)-3' est reconnu par une partie

du domaine QUA2. Afin d'être reconnue par les protéines Quaking, les ARN cibles doivent posséder les deux motifs nucléotidiques qui doivent être espacés au maximum de 20 nucléotides. Cependant les ARNm cibles reconnues par le « maxi-domaine » sont nombreuses car beaucoup de combinaisons des deux motifs sont possibles. En effet par analyse bioinformatique, plus de 1400 cibles ont été identifiées et les quelques cibles ont été testées. Cependant ces cibles putatives révélées par bioinformatique ne sont pas toutes régulées par Quaking (Galarneau & Richard, 2005b; Larocque et al., 2002; Ryder & Williamson, 2004; Teplova et al., 2013).

Le domaine KH a été identifié la première fois dans les ribonucléotides hnRNP-K. Seul, il adopte un motif βααββα (Musco et al., 1996) et lorsque le domaine de liaison est étendu au domaine QUA2, le « maxi-domaine » adopte alors un motif β1α1α2β2β3α3α4β4α5 (Figure 18) (Lewis et al., 2000; Liu et al., 2001; Maguire et al., 2005; Teplova et al., 2013)

Le domaine QUA2 possède une affinité beaucoup plus faible que le domaine KH pour les ARNm cibles. Cependant, des mutations ponctuelles induites par l'ethyl-N-nitrosourea (ENU) dans ce domaine QUA2 induisent une létalité embryonnaire, montrant que les deux domaines sont nécessaires à la fonctionnalité des protéines Quaking chez la souris (Chénard & Richard, 2008; M J Justice & Bode, 1988).

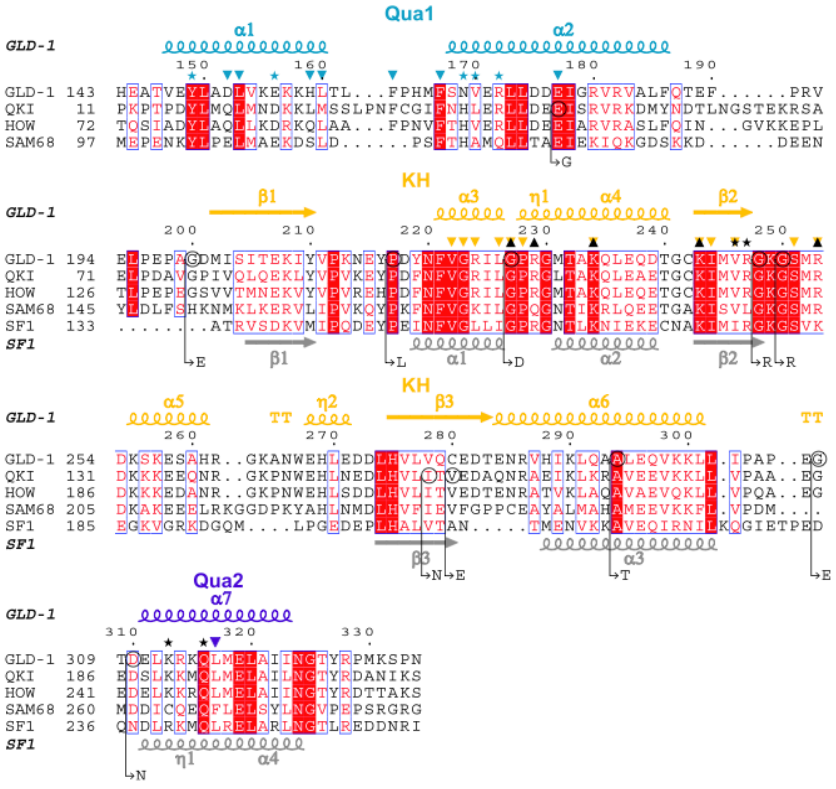


Figure 18 : Alignement des séquences de domaine STAR . GLD-1 de *C. elegans*, QKI, SAM68 et SF1 *d'homo sapiens*, How de *D. melanogaster.* Les structures secondaires sont représentées au dessus de l'alignement, sauf pour SF1 ou la structure secondaire est représentée en bas. Il y a une conservation des structures du domaine STAR sauf pour SF1 qui ne possède pas de domaine QUA1. Les mutations connues sont entourées par un cercle noir et le changement d'acide aminé est indiqué en dessous. Les astérisques et les triangles noirs désignent les résidus qui forment des liaisons hydrogènes avec des bases ARN. Les triangles inversés représentent les interactions hydrophobiques avec les bases ARN. Enfin les astérisques et les triangles cyans dans le domaine QUA1 montrent les liens hydrogènes formés lors des dimérisations.

Domaine QUA1 : dimérisation des protéines Quaking.

Il a été montré chez la souris que le domaine QUA1 correspond à une région permettant la dimérisation entre les protéines QKI, leur conférant ainsi de nouvelles fonctions. En effet, des expériences sur des cellules en culture, ont montrées que les protéines STAR pouvaient s'associer, mais ce domaine reste encore peu documenté. Parmi les protéines STAR, seul SF1 ne possède pas de domaine de dimérisation (Figure 18) (T. Chen, Damaj, Herrera, Lasko, & Richard, 1997; T. Chen & Richard, 1998; Teplova et al., 2013).

Des expériences de mutagénèse ont montrées que le domaine QUA1 était nécessaire à la dimérisation des protéines Quaking. Les souris mutantes $Qk^{kt3/kt4}$, portent une transition d'un A en G, en position 48 induisant un changement de l'acide glutamique (E) en glycine (G) dans la région QUA1 voir Figure 18). Cette mutation faux-sens a pour conséquence d'empêcher l'homodimérisation et l'hétérodimérisation en altérant la région coil-coiled de QUA1 et elle est létale à l'état embryonnaire (Figure 20 et T. Chen & Richard, 1998).

Contrairement aux autres protéines de liaison aux ARNm, les protéines à domaine STAR ne possèdent qu'un seul domaine KH. Cependant, il a été montré que les autres protéines de liaison aux ARN qui possèdent plusieurs domaines KH on une forte capacité à stabiliser les ARN ciblés. Ainsi la capacité d'homo/hétérodimérisation, permettrait aux protéines Quaking de s'assembler afin de multiplier les domaines KH et ainsi d'augmenter leurs affinités aux ARN (Richard, 2010).

Les specificités des domaines C-terminaux.

Les protéines Quaking sont très similaires dans leur séquence protéique, en particulier au niveau du domaine STAR. Les grandes différences se trouvent dans la partie C-terminale, leur conférant une spécificité, une régulation post-traductionnelle, des domaines d'interactions protéiques distincts et surtout définissant la localisation cytoplasmique ou nucléaire.

La localisation nucléaire ou cytoplasmique des protéines dépend de la présence ou non d'un signal de localisation nucléaire (NLS). QKI-5 possède un NLS alors que QKI-6 et QKI-7 n'en possède pas (Hardy et al., 1996). Dans beaucoup d'espèces, Quaking est présente en trois isoformes majoritaires, une seule des isoformes est nucléaire et les deux autres cytoplasmiques (Volk, 2010; J. Wu, Zhou, Tonissen, Tee, & Artzt, 1999). Cependant la capacité des protéines Qki-5 à se dimériser avec les autre isoformes de Quaking, en particulier Qki-6 et Qki-7, pourrait expliquer la présence occasionnelle de Qki6/7 dans le noyau même si ces deux isoformes ne possèdent pas de NLS (Larocque et al., 2002).

Les domaines riches en proline qui peuvent interagir avec les domaines SH3, permettant des interactions protéiques avec, entre autres, des protéines du cytosquelette (Lukong & Richard, 2003). Les domaines riches en tyrosine qui peuvent être phosphorylés par des tyrosines kinases avant d'interagir avec des domaines SH2 (Y. Zhang et al., 2003) et enfin des domaines riches en arginine/glycine qui peuvent être méthylés par des protéines arginine N-methyltransférase (Côté, Boisvert, Boulanger, Bedford, & Richard, 2003). De plus des sites de SUMOylation, acétylation des lysines, phosphorylation des serines/thréonines, permettent une régulation fines des protéines Quaking (pour revue voir Sette, 2010).

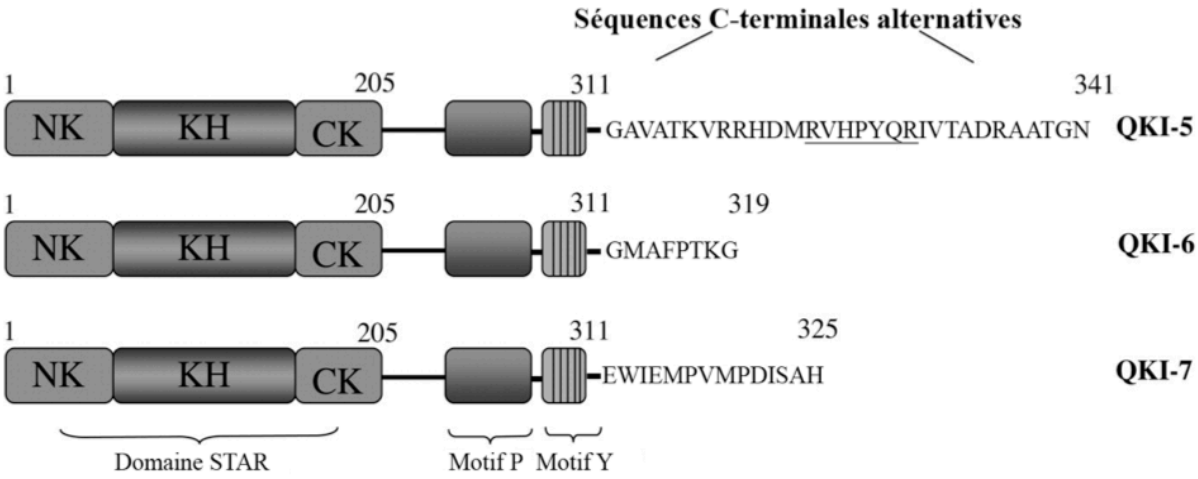


Figure 19: Les trois isoformes majeures de Quaking (d'après Chénard and Richard, 2008).
Toutes les isoformes ont un domaine unique KH flanqué par les domaines NK/QUA1 et CK/QUA2. L'ensemble de cette région est appelé domaine STAR. Des motifs riches en Proline (P) et en Tyrosine (T) sont indiques. Les isoformes diffèrent seulement dans leur séquence carboxy-terminale, due à des épissages alternatifs : Pour l'isoforme QKI-5, la séquence soulignée est la séquence du signal de localisation nucléaire. L'extrémité C-terminale de l'isoforme QKI-7 est identifiée comme un motif d'induction apoptotique. Cependant aucun domaine en C-terminal n'a été trouvé pour l'isoforme QKI-6.

III.2. FONCTION BIOLOGIQUE DE QUAKING SUR LES ARNm.

Les rôles précis des protéines Quaking (QKI) sur leurs ARNm cibles reste très peu connus et semblent changer en fonction des isoformes, du stade de développement, et des tissus étudiés.

Chez la Souris, il semblerait que les protéines QKI-5 soit impliqué dans l'épissage et la rétention dans le noyau des ARN prémessagés pendant l'embryogénèse, tandis que les protéines cytoplasmique QKI-6 et 7 sont exprimées plus tard, dans des processus de maturation et joueraient un rôle dans les processus de stabilisation/déstabilisation et de transport des ARN (Larocque et Richard 2005).

III.2.a Stabilisation/Destabilisation.

Chez la souris, l'ARNm de la protéine AIP-1 (actin-interacting Protein 1) a été identifié comme une cible potentielle des protéines QKI-6 car il possède, dans la partie 3'UTR non traduite, la séquence consensus QRE. Une étude récente a montré qu'en surexprimant quaking-6 dans des cellules gliales en culture (CRL2020) la transcription d'AIP-1 diminuait de manière drastique. Ainsi, QKI-6 aurait un rôle de déstabilisation de l'ARN AIP-1.

In vivo, il à été montré que l'expression de QKI-6 augmente dans les oligodendrocytes en cours de différenciation, ce qui correspond à une chute de l'expression d'AIP-1 dans ces même cellules (Doukhanine, Gavino, Haines, & Almazan, 2010).

A l'inverse, certaines isoformes de Quaking sont impliquées dans la stabilisation des microARN. Il a été montré que Qki-6 est directement régulée par le suppresseur de tumeur P-53. A son tour Qki-6 stabilise les microARNs miR-20a dans les cellules de glioblastome multiforme, ainsi les protéines Qki-6 jouent un rôle dans les mécanisme de suppression de tumeur (A.-J. Chen et al., 2012).

III.2.b Localisation/ transport.

(voir partie III.3a)

III.2.c Epissage.

Une fonction moins connue de Quaking est son rôle dans la régulation des épissages alternatifs lors des processus du développement embryonnaire, en particulier l'isoforme Qki-5.

L'épissage alternatif joue un rôle très important dans le développement du muscle, afin de produire des isoformes spéciales des protéines du cytosquelette, nécessaires à la formation de la myofibrille et au fonctionnement de l'appareil contractile. Ainsi l'inclusion de l'exon SM (smooth muscle) de l'a-Actinine, l'inclusion de l'exon 2 de la Tropomyosine ou encore de l'inclusion de l'exon 5 de la Troponine T cardiaque, jouent un rôle important dans la formation précoce de la fibre (Charlet-B, Logan, Singh, & Cooper, 2002; Gooding et al., 1998; Southby, Gooding, & Smith, 1999). Certains exons sont inclus ou exclus en fonction du stade de développement de la fibre musculaire, mais il existe très peu de données sur ces formes épissées et sur les facteurs d'épissage eux mêmes.

Une étude récente montre que lors de la différenciation de myoblaste murin en myotube, la protéine CapZ-b passe d'une isoforme dépourvue d'exon 9 à une isoforme où l'exon 9 est inclus. Une séquence riche en QRE est présente en amont de l'exon 9 (Exon 8). Dans cette même étude, il est montré que l'inclusion de l'exon 9 est dépendante de la protéine Qki-5 durant les premiers stades de la myogenèse (Hall et al., 2013).

III.3. ROLE DES PROTEINES QUAKING DANS LE DEVELOPPEMENT.

III.3.a Un rôle central dans la myélinisation des oligodendrocytes murins.

Généralités

Chez les souris témoins, il a été montré que l'expression des différentes isoformes de QKI dans les cellules gliales est régulée de manière temporelle en fonction de besoins cellulaires ainsi, les ARNm *qkI-5* sont exprimés, dans les noyaux, à de fortes concentrations pendant le développement embryonnaire puis déclinent graduellement jusqu'à ce qu'ils atteignent leur plus bas niveau à P14 avant le pic de myélinisation. L'expression des ARN QKI-6 / QKI-7 se fait durant le pic de myélinogénèse et représente 70% des Quaking dans le cerveau (entre P14 et P20) (Hardy et al., 1996).

Les souris *quaking viable* (qk^v), ont attirées l'attention des scientifiques à cause de leurs tremblements caractéristiques 10 jours après la naissance et des attaques convulsives chez l'adulte, due à une hypomyélinisation. Ces souris qk^v n'arrivent pas à développer des oligodendrocytes myélinisés matures, entrainant des convulsions de type épileptique chez l'adulte (Galarneau & Richard, 2005b).

Quaking a été identifié comme le gène responsable du phénotype observé chez ces souris qk^v. Cette mutation consiste en une délétion de 1 MB sur le chromosome 17 affectant le promoteur et les régions activatrices du gène QKI ce qui empêche l'expression normale des isoformes épissées de Qki-6 et 7 dans tout les oligodendrocytes du Système Nerveux

Central (SNC) mais aussi les cellules de Schwann du Système Nerveux Périphérique (SNP). Cependant, l'isoforme Qki-5 ne semble pas affectée. Ces données montrent que les Quaking-6/7 sont des régulateurs de myélinisation et/ou de maturation des oligodendrocytes et des cellules de Schwan. (Ebersole et al., 1996, revue Larocque and Richard 2005).

Mécanismes

Les isoformes de Quaking interagissent avec plusieurs ARNm codant pour protéines majeures nécessaires à la myélinisation. La réduction ou l'absence des protéines QKI résulte en l'altération du processus de maturation des oligodendrocytes, ce qui mène à l'hypomyélinisation (Larocque et al., 2002; Z. Li et al., 2000).

La partie 3'UTR de l'ARNm de la Myelin Binding Protein (MBP) a été identifiée comme la première cible des protéines Quaking. En effet, chez les souris mutantes *quaking viable* (qk^v) des études on montrées, que les ARNm de MBP ne sont pas acheminés correctement vers les zones de myélinisation et restent par conséquent dans le noyau ce qui a amené les auteurs à penser que les protéines Qki 6-7 étaient nécessaires au transport des ARN MBP. La perte de fonction de Qki 6-7 chez les souris qk^v empêche la maturation des oligodendrocytes.

Parallèlement, une surexpression de Qki5 (en utilisant un adénovirus sur ces cellules en culture) induit une rétention des ARNm MBP dans le noyaux des oligodendrocytes ce qui provoque une chute de la traduction des MBP, entrainant à son tour le même phénotype d'hypomyélinisation que chez les souris qk^v. Le phénotype peut être sauvé par la surexpression des isoformes Qki-6 et Qki-7 qui vont s'attacher aux ARNm MBP directement ou indirectement via une dimérisation avec Qki-5 et vont ainsi permettre leur exportation nucléaire et leur traduction.

Ces études montrent que la localisation subcellulaire des ARN de MBP dépend de la collaboration et de l'équilibre des isoformes cytoplasmiques et nucléaires des protéines quaking. Ainsi, QKI5 retient les ARNm MPB dans le noyau lors des stades précoces du développement des oligodendrocytes. Lors des phases de maturation, une augmentation de l'expression des isoformes quaking 6/7 permet une extraction du noyau et un acheminement via le cytosquelette en régulant la protéine AIP-1 (Doukhanine et al., 2010). Ainsi, quaking-6/7 et MBP colocalisent dans les régions distales du noyau dans les oligodendrocytes lors des phases de maturation dans les zones actives de myélinisation où MBP est requise.

De plus, dans les zones de myélinisation intensive, Quaking 6 et Quaking 7 pourraient avoir un rôle dans la protection des ARN MBP jusqu'à la zone de myélinisation. En effet, il a été montré que les motifs riches en arginines et en tyrosines peuvent être respectivement

méthylés et phosphorylés. Ainsi, la tyrosine kinase Src a été impliquée dans la phosporylation des protéines quaking, entrainant une diminution de leur capacité à se lier à leurs ARNm cibles. L'expression des Src diminue dans les zones où MBP est requis, ainsi quaking 6 et 7 protègent les ARN MBP contre la dégradation et facilitent leur traduction dans ces zones (Côté et al., 2003; Y. Zhang et al., 2003)

D'autres ARN impliqués dans la myélinisation semblent être régulés par Quaking, en effet de récentes études ont permis l'identification d'une séquence de 53 nucléotides dans la partie intronique du transcrit de MAG (Myelin Associated Glycoproteine). Cette séquence permettrait ainsi à quaking-5 de réguler finement l'épissage alternatif de ce transcrit. De même, l'épissage des transcrits de PLP (Proteolipid Protein) semblerait être régulé par l'isoforme quaking-5 : les dérégulation de l'épissage de PLP causent des phénotypes de démyélinisation chez la souris et chez l'Homme (Ebersole et al., 1996; Griffiths et al., 1998; J. Wu et al., 1999)
D'autres mutations dans le gène Quaking ont été recensées et la plupart d'entre elles sont létales à l'état homozygote, suggérant que Quaking puisse avoir un rôle plus précoce durant l'embryogénèse bien avant le début de la myélinisation (Figure 20).

Allèles	**Phénotype hétérozygote**	**Phénotype homozygote**	**Effet moléculaire**	**Type de mutation**
Qk^{v}	Viable / Pas de phénotypes	Tremblements/ convulsions/ mâles stériles	Pas d'expresion de Qki6 et 7 (mais Qki-5 reste exprimé)	Délétion de 1Mb sur le chromosome 17 dans la région du promoteur et les régions activatrices
Qk^{kt1}	Attaque épileptique chez les hétérozygotes âgés	Létale à l'état embryonnaire (E9.5) et défaut de formation crânien	Non connu	Non connue mais pas dans une séquence codante
Qk^{k2}	Défaut de myélinisation et de rares convulsions	Létale à l'état embryonnaire (E10.0–12.5) avec défauts de vascularisation du sac vitellin et des défauts de formation cardiaque	Perte de la liaison aux ARN	Changement de V en G dans le domaine KH
$Qk^{kt3/kt4}$	Létale à l'état embryonnaire (E9.5) avec défauts de vascularisation et des défauts de formation cardiaque	Létale à l'état embryonnaire (E9.5) avec défauts de vascularisation et des défauts de formation cardiaque et des	Défaut de dimérisation	Changement E en G dans le domaine QUA1

		somites		
Qk $^{l-1}$	Pas de phénotype (les hétérozygotes *Qk* $^{l-1}$*/Qk*^{v} *présentent de rares tremblements)*	Létale à l'état embryonnaire (E8.5–11.5) avec défauts de vascularisation et des défauts de formation cardiaque	Défaut d'épissage qui supprime l'isoforme Qki-5	Changement A en G
Qk ^{tm1Abe}	Viable / Pas de phénotypes	Létale à l'état embryonnaire avec défauts de vascularisation		Délétion de l'exon 1
Qk ^{e5}	Viable / Pas de phénotypes	De très forts tremblements et de très fortes convulsions (35 % de mort après 5 mois)	Baisse d'expression de Qki6 et 7 (mais Qki-5 reste exprimé)	Non connue exactement mappé entre 40 kb et 640 kb en amont du gène

Figure 20 : Mutations de Quaking et leurs phénotypes chez *mus musculus* (Adapté de Chénard & Richard, 2008; Monica J Justice & Hirschi, 2010)***.***
Tableau récapitulatif des différents mutants murins du gènes Quaking, recensés dans différents laboratoire avec les phénotypes associés et leurs effets moléculaires. Chez la souris le gène *quaking* est localisé sur le chromosome 17 (position 10 206 471 – 10 319 361), il engendre par épissage alternatif trois transcrits.

III.3.b Rôle dans la maturation des cellules tendineuses chez la drosophile (Volk, 2010)

Le gène *held-out wings* (how) est l'orthologue de *quaking* chez la drosophile. Son nom vient du fait que les allèles hypomorphes de ce gène produisent des mouches incapables de voler mais qui gardent leurs ailes étendues à l'horizontal, formant un angle de 90° avec l'axe du corps.

Le produit de ce gène est exprimé de manière précoce lors de l'invagination du mésoderme sous le contrôle de *twist*. Après la mise en place des tissus mésodermiques, l'expression de *how* est régulée de manière fine en fonction du stade de développement et devient restreinte aux cellules musculaires, aux précurseurs des tendons, aux cardioblastes et aux cellules gliales (Baehrecke, 1997; Zaffran, Astier, Gratecos, & Sémériva, 1997).

Comme son homologue Quaking, *How* est présent sous trois isoformes majoritaires, qui possèdent toutes un domaine STAR identique et se différencient par l'épissage alternatif de la partie 3'UTR, leur conférant une localisation nucléaire ou cytoplasmique. Ainsi, en fonction la taille des isoformes, HOW-L (large) est nucléaire (comme Qki-5) tandis que HOW-M (medium) et HOW-S (small) sont cytoplasmiques (comme Qki-6 et 7). Similairement aux isoformes de Quaking, HOW(L) est exprimé de manière très précoce durant l'embryogénèse alors que HOW(S) est requis à des stades plus tardifs dans les phases de maturation. HOW (M) est une isoforme découverte récemment, elle n'a pas encore été assez étudiée. Le domaine STAR des protéines HOW reconnaît la même séquence consensus que celui des

protéines Quaking. La connaissance de toutes les cibles reconnue par ces trois isoformes reste un grand challenge permettant de comprendre le rôle des protéines HOW et par analogie le role des protéines STAR chez les vertébrés.

L'étude de l'activité de How sur la liaison muscle-tendon chez la drosophile représente un paradigme intéressant dans la compréhension des mécanismes de maturation et de différenciation, en particulier sur l'interaction des isoformes HOW(L) et HOW(S).

Une des étapes les plus importantes dans la formation de muscles matures et fonctionnels, chez la drosophile (comme chez le poisson zèbre), est la migration des précurseurs musculaires venant du mésoderme et leur ancrage aux structures tendineuses. Les cellules formant les tendons sont des cellules d'origine ectodermique qui, une fois en contact avec des cellules musculaires, vont se différencier en cellules allongées et produire des microtubules polarisés. A la fin de la l'embryogénèse, ces cellules vont sécréter de la cuticule et former l'exosquelette. Cet exosquelette va permettre la transmettre la force des contractions musculaires qui permet de créer le mouvement.

Une étape importante dans la différenciation des cellules du tendon est la transition entre le stade précurseur de tendon et le stade cellule mature myotendineuse. HOW joue un rôle central dans cette transition en régulant le facteur de transcription clef dans la formation du tendon : *Stripe*.

Stripe code deux isoformes engendrées par épissage alternatif, *stripe A* et s*tripe B*. *Stripe B* correspond a l'isoforme précoce qui définit l'identité des précurseurs des cellules tendineuses. *Stripe A* correspond à l'isoforme exprimée dans les cellules tendineuses une fois qu'elle est entrée en contact avec les cellules musculaires, cette isoforme est essentielle pour la maturation finale des cellules tendineuses.

HOW est fortement exprimé dans les cellules tendineuses et régule l'expression des isoformes *Stripe A ou B* en s'accrochant aux séquences consensus en 3' UTR des ARNm (domaine commun aux deux isoformes).

En effet, dans les cellules tendineuses immatures, *stripe B* active l'expression de HOW(L) qui à son tour se lie en 3'UTR aux ARNm de *stripe B* et réduit son expression formant ainsi une boucle de régulation négative maintenant un taux très faible de *stripe B* caractéristique des cellules tendineuses immatures.

Lorsque les cellules musculaires ont fini de migrer et viennent rentrer en contact avec les cellules tendineuses, il y a activation des récepteurs EGF qui va induire l'expression de HOW(S) et une baisse de l'expression de HOW(L). A son tour HOW(S) en se fixant sur les ARN pré-messagers va induire l'épissage de l'isoforme *stripe A* induisant les processus de différenciation et de maturation des cellules tendineuses.

De plus, chez les mutants homozygotes *how,* les muscles cardiaques ne se forment pas correctement, le profil musculaire somatique est anormal, leurs structures musculaires ne

sont plus striées et entièrement désorganisées et les fibres musculaires ne s'attachent plus aux structures d'encrage (voir article Baehrecke, 1997), menant à une létalité embryonnaire à l'état homozygote (Baehrecke, 1997; Zaffran et al., 1997)

Pour résumer, dans les cellules tendineuses, les protéines HOW jouent deux rôles : avant le contact avec la cellule musculaire, HOW(L) réprime l'expression de *stripe B* maintenant ainsi la cellule au stade de précurseur. Lors du contact avec la cellule musculaire, HOW(S) induit l'augmentation de l'expression de s*tripe A* induisant ainsi la maturation des cellules tendineuses.
Existe t-il une analogie avec le rôle de Quaking dans les processus de maturation des oligodendrocytes chez la souris ?
Il semblerait que dans les deux modèles, l'isoforme nucléaire soit exprimée de manière très précoce durant le développement et serve à maintenir les cellules dans un état immature. Les isoformes cytoplasmiques quant à elles, sont exprimées de manière tardive et sont impliquées dans la maturation de ces cellules. Mais des études plus poussées seront nécessaires pour vérifier cette remarque.

III.3.c Rôle de Quaking dans le développement de la schizophrénie chez l'Homme.
Comme dans les autres modèles, les protéines Quaking sont présentes sous trois isoformes majoritaires QKI-5, 6 et 7 chez l'Homme. Sachant que les protéines Quaking sont des régulateurs clé du métabolisme des ARN, qu'elles régulent d'une manière temporelle et spatiale la dynamique d'expression de ces ARN cibles, elles doivent donc avoir un rôle majeur chez l'Homme (Stewart & Davis, 2004). Chez la souris, les protéines Quaking on été impliquées dans des processus de myélinisation et il semblerait que chez l'Homme elles soient aussi responsables de maladies d'ordre psychiatriques (Haroutunian, Katsel, Dracheva, & Davis, 2006; Jiang, Saetre, Radomska, Jazin, & Lindholm Carlström, 2010).

Il a été montré que les défauts de myélinisation et/ou de maturation des oligodendrocytes pouvaient être responsables du développement de la schizophrénie (Figure 21). Les auteurs de ces études ont voulu tester l'expression des gènes liés à la myélinisation chez les patients atteints de schizophrénie. (Haroutunian et al., 2006; Stewart & Davis, 2004).
Douze régions corticales (Aires de Brodmann : 8, 10, 44, 46, 23/31, 24/32, 20, 21, 22, 36/28, 7, et 17) ainsi que trois régions non-corticales (le noyaux caudal, l'hippocampe et le putamen) ont été testées sur des patients atteint de schizophrénie et des patients contrôles. Les souris qk^{v} et les patients atteints de schizophrénie possèdent de grandes similitudes. En effet, les experiences sur puces à ADN ont montré une forte perturbation dans l'expression de 38 gènes impliqués dans la myélinisation, en particulier une chute d'expression et/ou des

problèmes d'épissage de certains ARN, en particulier les ARNm MBP et MAG (Myelin Associated Glycoprotein), qui sont des cibles connues de Quaking (L. Zhao, Mandler, Yi, & Feng, 2010). De plus l'expression des ARNm de Quaking est fortement réduite dans sept zones corticales et dans l'hippocampe des sujets atteints (Aberg et al., 2006). La chute d'expression de Quaking révélée par puce à ADNest confirmée par qRT-PCR dans le cortex cingulaire où chacune des trois isoformes sont profondément affectées chez les malades (tableau). Enfin, il à été montré que les 38 ARN dérégulés chez les patients malades sont sont potentiellement régulés par Quaking (Zearfoss, Clingman, Farley, McCoig, & Ryder, 2011).

Sachant que les protéines Quaking jouent un rôle central dans la maturation des oligodendrocytes et de la myélinisation, ces expériences suggèrent que la chute d'expression des Quaking pourrait être à l'origine de la dérégulation des autres ARNm associés à la myélinisation (mis en exergue par les puces à ADn réalisés chez les malades), induisant une démyélinisation dans certaines zones du cerveau, ainsi Quaking pourrait être un gène candidat à l'origine de la schizophrénie.

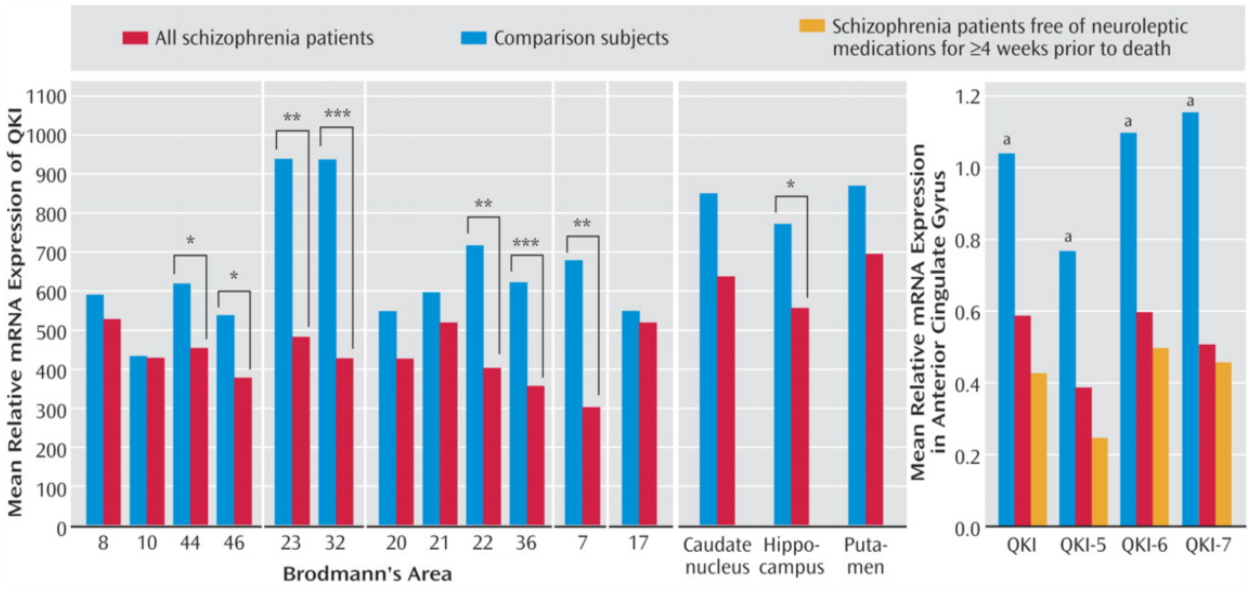


Figure 21 : Niveau d'expression des protéines Quaking chez l'humain sain ou atteint de schizophrénie (adapté de Haroutunian et al., 2006)**.**
Basé sur des donnée de microarray dans les différentes partie du cerveau (Aires de Brodmann, noyaux caudal, hippocampe et putamen), le niveau relatif d'expression des Quaking est indiqué chez les patient sains ou atteints de schizophrénie. L'expression des différentes isoformes Qki5-6-7 est aussi mesurée par PCR quantitative dans le cortex cingulaire chez les patient sains, atteints de schizophrénie avec ou sans traitement (traitement de quatre semaines).*p<0.05. **p<0.01. ***p<0.001.

III.3.d Quaking chez le poisson zèbre

Etant donné que *quaking* joue un rôle crucial dans la formation de la myéline chez la Souris, l'étude d'un orthologue de *quaking* chez le poisson zèbre a été envisagée afin d'approfondir le rôle de ces protéines de liaison aux ARN pendant les phases précoces de l'embryogénèse (Ebersole et al., 1996; Tanaka, Abe, & Kim, 1997).

Quaking a été identifié chez le poisson zèbre grâce à une sonde développée pour reconnaître l'isoforme murine QKI-5, localisé sur le chromosome 17 qui a été nommé *qkA.* Ce gène code une protéine de 382 acides aminés qui présente une forte conservation avec la séquence QKI-5 de souris. De plus, une insertion de 123 nucléotides a été trouvée dans un autre transcrit, présentant ainsi deux isoformes de *qkA* chez le poisson zèbre.

qkA est exprimé maternellement et de façon ubiquitaire pendant les stades blastula pour ensuite devenir restreint au mésoderme dorsal pendant la gastrulation. Il est fortement exprimé pendant le processus de somitogenèse, au niveau du mésoderme paraxial (comprenant les cellules adaxiales et les cellules somitiques latérales) mais aussi au niveau du cerveau présomptif, des cellules des crêtes neurales présomptives et du bourgeon caudal. Entre 24hpf et 48hpf, l'ARNm est exprimé dans le cerveau, dans les somites et dans les bourgeons des nageoires pectorales. Enfin, entre 48hpf et 72hpf, l'expression de *quakingA* est observée uniquement dans le sac cardiaque et les nageoires pectorales (Tanaka et al., 1997).

Très récemment, l'étude fonctionnelle du gène *qkA* chez le poisson zèbre à été amorcée dans notre laboratoire (Lobbardi et al., 2011).

Lors d'un crible génétique, un mutant à motilité réduite a été identifié, nommé SD008. Cette mutation est létale à l'état homozygote et les embryons mutants présentent des défauts motoneuronaux et musculaires, en particulier des altérations légères de la frontière somitique ainsi que des fibres musculaires à contraction lente et rapide. Le profil d'expression de *qkA* dans les cellules adaxiales et dans le reste du mésoderme paraxial, ainsi que la littérature, nous on amené à proposer que ce gène soit requis dans le développement des fibres musculaires lente et rapides

Le développement des muscles au sein d'un somite est un processus complexe (voir chapitre 1 introduction), qui implique la voie de signalisation Hedgehog (Hh). Afin de spécifier le type de fibre, le nombre de cellules musculaires et leur organisation spatio-temporelle, la voie Hh doit être très finement régulée. L'absence de certaine fibres lentes dans le somite ont orienté le laboratoire vers un problème de régulation de la voie Hh.

Le facteur de transcription Gli2a, est un élément clef de la voie de signalisation Hh et permet de transcrire Patch1 (Ptc1) induisant la spécification des cellules musculaires lentes. D'une manière intéressante, il a été montré par approche *in silico* que Gli2a possède en 3'UTR la séquence consensus QRE, reconnue par les protéines Quaking. De plus la perte de fonction de Gli2a (par injection de MO Gli2a) induit des problèmes de migration des fibres lentes, comme pour le mutant *qka-/-.*

En utilisant une GFP déstabilisée comme rapporteur, il a été montré que la séquence 3'UTR de Gli2a est une cible de Quaking A. Dans le modèle proposé par notre laboratoire, le rôle de Quaking A est de stabiliser les ARN pré-messager de gli2a. Gli2a est ensuite exporté vers le cytoplasme où il sera traduit et pourra transmettre le signal Hh en entrant dans le noyau et en traduisant des cibles spécifiques.

Lors de la perte de fonction de *qkA* la stabilisation de gli2a n'est plus assurée, sa traduction est diminuée et donc la concentration protéine Gli2a émanant de la notochorde est diminuée, rendant impossible la régulation de la voie Hh et induisant une altération dans la spécification des fibres lentes

Cette étude montre une nouvelle fonction de ce gène dans la myogenèse chez les vertébrés et apporte une nouvelle dimension des régulateurs post-transcriptionnels dans des processus de myogenèse, Quaking A intervient dans la régulation fine de Hh durant la myogenèse.

(Lobbardi et al., 2011).

Cependant, les phénotypes d'altération des frontières somitiques ainsi que d'altération des fibres rapides présents chez le mutant *qka-/-* ne peut pas être expliqué par une dérégulation de la voie Hh.

Ainsi, l'effet de QkiA sur la voie de signalisation Hh ne peut pas expliquer entièrement les phénotypes observés chez le mutant qkA$^{-/-}$.

Connaissant les nombreuses cibles et les différentes fonctions des protéines Quaking dans les autres espèces, nous pensons que le phénotype observé peut être expliqué de manière plus fine en définissant d'autres cibles régulées par QkiA.

Le poisson zèbre est un organisme connu pour avoir subi au cours de l'évolution une duplication partielle de son génome. En effet, des alignements *in silico* indiquent qu'il existe un homologue de QkiA sur un autre chromosome. Ce nouveau gène nommé *qkC* possède une forte homologie à *qkA* et n'a jamais été étudié. Cette thèse est dédiée à l'étude de du gène *qkC* sur le développement précoce des fibres musculaires.

RESULATS

ARTICLE

Quaking A and C regulate myofibrillogenesis in zebrafish slow muscle fibers independently from Mef2C/D pathway.

François Xavier Dutrieux, Guillaume Lambert, Aline Bonnet, Riadh Lobbardi, Sylvain Ernest and Frederic Rosa1*

Laboratoire de Génétique Moléculaire du Développement, Groupe Danio, Ibens u 1024 inserm,CNRS UMR 8197
Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

* Corresponding author:
rosa@biologie.ens.fr, Tel: +33 1 44 32 39 78 / Fax: +33 1 44 32 39 88

ABSTRACT

In zebrafish, myotomes are organized along the antero-posterior axis within repeated units called somites. Contractile fibers are subdivided into two muscle cell types, the slow muscle fibers and the fast muscle fibers. The slow muscle cells are located on the surface of the embryo body while the fast muscle cells are located deeper in the somite, underneath the slow muscle cells. Myogenesis correspond to transitions from unspecified mesodermal cells to mature and functional muscle fibers. These cellular transitions have been extensively studied. However relatively little is known about early developmental mechanisms that are required to form premyofibrils, neither about maturation processes, during which premyofibrils evolved in contractile myofibers. This process called myofibrillogenesis involved a dynamic assembly of the elementary components of the sarcomere that occurred first in adaxial cells, the muscle precursors of slow muscle fibers. Here we show that QkiA and QkiC, two RNA-binding proteins with STAR domain, are required during the early step of myofibrillogenesis where Moysin proteins are not correctly assembled. This early phenotype leads to a strong and specific alteration in the maturation of thick Myosin filaments at 24hpf. The combined QkiA/QkiC loss of function induced a dissection of thick filaments followed by the accumulation of Myosin proteins at the tip of slow muscle cells in a cell autonomous manner. Interestingly, the loss of function of Mef2C/D, two myogenic enhancers from the same family, induced a similar phenotype. However we have shown that Quaking and Mef2 proteins act in parallel ways to control and regulate myofibrillogenesis. Remarkably, we have seen that the accumulation of Myosin, the dissection of thick filaments and the alteration of the Z-disk, induced by QkiA/C loss of function, are the pathologic phenotypes found in Human Myofibrillar Myopathies (MFM). This subgroup of myopathies has been created recently and very few is known about mechanisms involved in those diseases. We propose that QkiA and QkiC is another regulated system that is required to initiated and maintained myofibrillogenesis.

INTRODUCTION

Skeletal myogenesis involves three steps: (1) commitment of proliferative mesodermal cells as myoblasts, (2) terminal differentiation, accompanied by cell elongation/migration and (3) maturation of the differentiated cell characterized in particular by the assembly of the contractile myofibril, a giant scaffold anchored to the muscle cell membrane and composed of serial sarcomeres of thick myosin filaments alternating with thin actin filaments. Sarcomeres are limited by z-bands where thin filament of Actin anchored (J. W. Sanger et al., 2010; Sparrow & Schöck, 2009). Whereas a lot of information has been gathered both in cell culture and in situ in embryos regarding the first two process, maturation of the muscle cell is still poorly understood but clearly requires proper regulation as well as ordered synthesis and assembly of specific proteins. In mouse and zebrafish somites, for instance, transcripts encoding thin filament proteins are expressed before those for thick filament proteins (Bird, Windner, & Devoto, 2012). Several model for the assembly of the myofibrils have been proposed (J. W. Sanger et al., 2010; Sparrow & Schöck, 2009). Although the issue is still controversial, the prevalent current model of myofibril assembly suggests that myofibrils are initiated on actin stress fibres by formation of z bodies, aggregates containing thin filament proteins found later in mature z lines, which align and anchor the thin filaments. Myosin and other thick filament proteins would then integrate into the thin filament structure, perhaps mediated by the giant molecular ruler titin. How this sequential process is achieved *in vivo* remains unclear. However, one of the founding events leading to periodicity of sarcomeres requires interactions at the membrane level and involvment of integrins (Sparrow & Schöck, 2009).

High throughput studies are revealing the complex temporal succession of gene expression during and following myoblast terminal differentiation in culture (Bird et al., 2012). As terminal differentiation leads on to myofibrilogenesis, distinct combinations of transcription factors are expressed. Recently, analysis of Mef2, a group of MADS domain-containing transcription factors has shown that myofibrillogenesis can be specifically regulated at the transcriptional level (Hinits & Hughes, 2011). Combined loss-of-function for Mef2C and Mef2D does not affect specification nor terminal differentiation but myofibrils appear thin and split/dissected, z-bands fails to develop properly and slow Myosin heavy chain fails to incorporate into sarcomeres but rather forms ectopic condensations.

Understanding proper muscle maturation and myofibrillogenesis is critical for health as a specific group of pathologies, the myofibrillar myopathy (MFM) appears to impact the development of the myofibril (A. Ruparelia, Zhao, Currie, & Bryson-Richardson, 2012; A. Ruparelia, Vaz, & Bryson-richardson, 2012). Quite strikingly, this group of genetically inherited myopathies leads to a cellular phenotype with striking similarities to the Mef2C/D

loss-of-function, including fiber dissolution/dissection, z-band development failure and formation of ectopic condensations of myosin as well as z-band components. Interestingly, mapping of the human MFM mutations has implicated component of the sarcomere and more especially z-band components including α-Actinin, HSP-type chaperones, Desmin, Myotilin, ZASP, Filamin C And Cochaperone BAG3 (A. Ruparelia et al., 2012).

Recent results, including our own work, have shown that other factors are potentially involved in post-transcriptional regulation of muscle cell maturation and myofibril assembly, including RNA binding protein (Lobbardi et al., 2011; Nir, Grossman, Paroush, & Volk, 2012; Schnorrer et al., 2010). During a zebrafish screen for muscle development, we identified a gene, QkiA, expressed in and required for the maturation of muscle cells in addition to acting on their specification (Lobbardi et al., 2011). On the one hand, loss-of-function in the QkiA gene reduces the number of a group of slow muscle cells by fine tuning Hedgehog signaling which is required for specification. But regarding the other group of cells, including both a part of the slow muscle cells and the large majority of fast muscle cells, it also interferes with their maturation, without visibly interfering with their specification nor the early steps of their differentiation, *i.e.* myofibril specific gene expression. In particular, some slow muscle cells exhibit a thinner dissected myofibrils scaffold. QkiA belongs to the large superfamily of STAR domain-containing RNA binding proteins (Galarneau & Richard, 2005a; Volk, Israeli, Nir, & Toledano-Katchalski, 2008). Qki genes are highly conserved throughout evolution and were initially identified in mice where they were shown to control myelin synthesis. They control various processes involved in RNA metabolism including RNA translation, splicing, stability and transport. Interestingly, HOW, a gene highly homologous to QkiA has been recently involved in late aspects of muscle development in drosophila, in which its loss of function leads to improper assembly of the muscle myofibril, suggesting that How/Qki role in muscle maturation/ Myofibril assembly has been conserved throughout evolution (Nir et al., 2012). Molecular analyses have shown that Qki/how genes act via binding to a specific sequence located on RNA, the Quaking Response element (QRE) (Galarneau & Richard, 2005a). Binding is mediated by a central domain, the KH domain and is enhanced by dimerization of the protein, allowed by the presence of an N terminal domain, the Qua1 domain. Qki and How exist in different isoforms which have been shown to heterodimerize and influence their subcellular localization and activity.

Based on the weakness of QkiA loss of function phenotype in slow muscle maturation and the existence of different isoform in other species, we analyzed the function of QkiC, a gene highly related to QkiA. We show here that QkiA and QkiC are expressed in overlapping domains encompassing the slow muscle progenitors. Whereas QkiC does not appear essential to slow muscle maturation, combined loss-of-function for QkiA and C lead to a

severe maturation defect. Further analysis of this phenotype shows that it is highly reminiscent of myofibrillar myopathies, with defect at the Z-band and Myosin condensations. Thus, QkiA and C jointly regulate the process of muscle maturation and are required in a cell autonomous fashion. We further study the potential genetic interaction between QkiA/C and mef2C/D. Our results indicate that those two groups of genes do not exhibit a simple epigenetic relationship and thus may regulate myofibrillogenesis in parallel.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Zebrafish line and maintenance

Adult fish were kept in a 14 hours light cycle in our water system at 27°C according to standard procedures [Westerfield, 1993]. Wild type, *qkA*$^{t31954/t31954}$ (*qkiA*^{t}) and Smhyc-GFP embryos were obtained from natural crosses of either wild type fish, heterozygous *qkiA*^{t} mutant fish (Lobbardi et al.; 2011) or the transgenic line *Tg(smyhc:GFP*) obtained from Philip W. Ingham ((Elworthy, Hargrave, Knight, Mebus, & Ingham, 2008)

Embryos were incubated at 28°C, staged by hours post-fertilization (hpf) and by standard staging criteria (Kimmel et al., 1995)

Genotyping of *qkiA*^{t} mutant embryos

The mutation in *qkA*^{t} embryos leads to a transition T→A in the 4th exon, inducing a loss of BclI cutting site. In order to identify mutants from homozygous, heterozygous or wild-type embryos, we amplified by PCR a fragment of 524pb including the mutation site with :

-the forward primer : 5'- TGAGATAACATGCGGCAGCTAA-3'

-the Exon4_reverse primer : 5'- GCCAGATTCAACAGTGCTGC-3'.

PCR was performed as following: 94°C for 2 min, 50 cycles of 94°C for 30 sec, 64°C for 20 sec, 72°C for 40 sec, followed by 10 min at 72°C. Then PCR products were incubated at 50°C with BclI restriction enzyme (New England Biolabs) during an hour and finally the mix were runned on a 2% agarose gel.

QkiA and QkiC Morpholinos

To target the maternal and zygotic contribution of Quaking A, Quaking C, specific Morpholinos (MO) have been designed and obtained from Gene Tools (Philomath, Oregon, United States). 5 nl of each Mo has been injected at the one cell stage.

The QkiA$_{ATG}$ MO (CCTTCACCTCCATCTCCCCGACCAT) target the ATG sequence of *qkiA* mRNA and was used at 0,3mM.

The QkiC$_{5'UTR}$ MO (GGGTTTTAATGTGTTTCCCCGTATT) target the 5'UTR sequence of *qkiC* mRNA (both forms) and was used at 0,15mM.

The Mef2c/d MO (GAATCTGGATCTTTTTCCTCCCCAT from Hinits & Hughes, 2011) was used at 0,2mM.

cDNA mutagenesis, mRNA synthesis and injections

RNA was extracted from zebrafish WT embryos (24hpf) using TRIzol® reagent (Invitrogen) and treated with DNAse (Promega) to remove genomic DNA. The superscript III first strand synthesis kit (Invitrogen) was used to synthesize cDNA. From this cDNA, full-length double stranded DNA of both *qkiA* and *qkiC* have been produced using Taq DNA polymerase from Thermo Scientific. Because of the use of ATG morpholino for *qkiA,* we have designed a specific forward oligonucleotide with 5 mismatches for QkiA ATG sequence. A normal full-length QKiB mRNA was produced.

QkiA 5MM primers: forward oligo is 5'-GATCCATGATGGTAGGTGAAATGGAAGTA-3'
and reverse 5'-TAGAGGCTCGAGTTAGTTGCCGGTG-3' for a 1170 bp product.
QkiC primers forward 5'-CTTTGGCAGAGAACAGCACTGAAC-3'
and reverse 5'-CCCAAGGCAGCTGTAAAGCAAAGC-3' for a 1565 bp product.

Apmlified fragment were cloned into PCS2+ expression vector. Each mRNA as been produced by linearization of PCS2+ plasmid with Not1 (after the poly-A tail), then SP6 mMessage mMachine Kit (Ambion) has been used and mRNA has been purified with Amicon® ultra-0.5 centrifugal filter (from Millipore). QkiA and QkiC mRNA were injected at 50 ng/μL.

***In situ* mRNA hybridisation**

Probe synthesis and in situ hybridization were performed following standard protocols previously described (Hauptmann and Gerster, 1994). PCS2+ plasmids with the full-length sequence of QkA and QkC have been used. After linearization in the 5'UTR with BamH1, probes were synthesized from the T7 mix and purified with SigmaSpin® sequencing reaction clean-up columns.

Whole mount antibody labeling and observation

Embryos were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS and stored in methanol at -20°C. After progressive rehydration, 24/48hpf embryos were incubated in Proteinase-K (10µg/mL) for 15 /60 minutes respectively, washed 3 times with PBS-0.1% Tween and post- fixed with 4% PFA (20 minutes; room-temperature). After 4 washes, blocking with 1% DMSO, 1% BSA, 10% Normal Goat Serum in PBS-Triton1% for an hour was followed by incubation with primary antibodies overnight, at 4°C, then incubation with secondary antibodies at room

temperature (2.5hrs) with the same blocking. Immunohistochemistry was performed with these following antibodies directed against:

qkA (antibodies incorporated 73-232), qkC (antibodies incorporated 73-190, 1/100), F-59 (DSHB supernatent, 1/10), GFP (Nicalai GF090R, 1/1000), engrailed (DSHB 4D9-C, 1/50), prox1 (Reliatech,102-PABi32 1/200), α-actinin (Sigma A7811, 1/500) and Mef2 (Santa Cruz Biotech C-21, 1/200).

Secondary antibodies included Alexa 488 or Alexa 594 anti-mouse IgG1 or anti-mouse IgG2b and Alexa 488 or 568-conjugated anti-rabbit (Invitrogen) were used at 1/1000).

The visualisation of Actin was performed by a short incubation (30 min) with phaloidin (Alexa Fluor® 594 life technologies) at 1/50 during the end of secondary staining.

Specimens were visualized with the confocal SP5 microscope from Leica.

Electron microscopy

Embryos were fixed in 4% paraformaldehyde, 0,1% glutaraldehyde in PBS. They were then post-fixed in 4% PFA overnight at 4°C, incubated in 2% (w/v) osmium tetraoxide in PBS and finally flat-embedded in epoxy resin (Araldite 502, Agar Scientific). Ultrathin sections (70 nm), counterstained with 2 % uranyl acetate solution and 0,2 % Reynold's lead citrate were examined using a Philips Tecnai12 electron microscope (FEI Eindhoven).

Transplantations experiments

We transplanted cells essentially as described by Ho and Kane (1990). For shield stage transplants, micropipettes (VWR, 53508-400; Flaming Brown puller) were broken at an angle to an outer diameter of approximately 40 μm and then tooled into a sharp spear-tipT with a microforge.

To target muscle cells, cells were removed from either WT or double morphants donors labeled with membrane-GFP (0,75ng/mL mRNA) close to the embryonic shield and transplanted respectively to the vicinity embryonic shield of unlabeled double morphants or WT hosts (according to Hirsinger et al., 2004).

Western Blot

Each embryo sample was incubated with RIPA solution containing protease inhibitors and Laemmli 2X containing β-mercapto-ethanol. WT and morphants were separately pooled and resolved on a 10% SDS-Polyacrylamide gel, blotted onto a Hybond ECL membrane (GE Healthcare) and blocked with 5% non-fat dry milk in TBS-0.1%Tween. Immunodetection was carried out using quaking A (Millipore AB9904, 1/3000) and quaking C (antibodies incorporated 73-190, 1/20) antibody as primary antibodies and HRP-conjugated anti-rabbit antibody for QkiA (GE Healthcare, 1/5000) HRP-conjugated anti-mousse antibody for QkiC

(GE Healthcare, 1/4000). Detection was carried out using the SuperSignal West Femto substrate (from ThermoScientific) and Chemicapt apparatus. The intensities of all bands were normalized with γ-Tubulin Antodody.

Results

***qkiC*, a *qkiA*-related gene.**

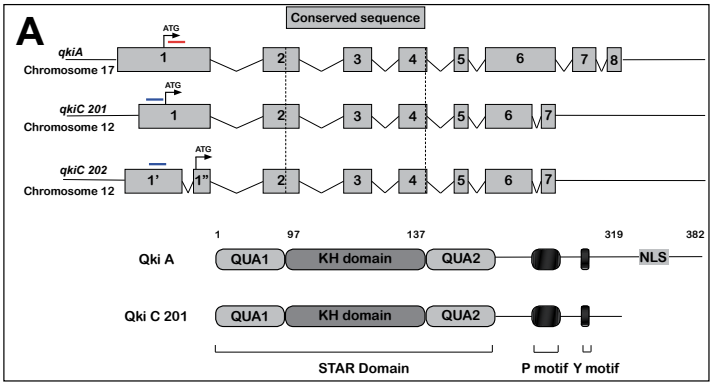
QkiA is required for fast muscle maturation and slow muscle specification (Lobbardi et. al 2011). However, the phenotypes observed for *qkiA* loss-of-function appeared to be only partial, suggesting that other genes could compensate for QkiA activity. In addition, in other species, several Qki isoforms have been described, able to interact with each other. We therefore searched for *qkiA*-related genes in zebrafish by *in silico* analysis. In mouse, all QKI isoforms have a KH-type RNA-binding domain embedded in a larger GSG/STAR domain (Galarneau Richard 2005). Blasting of mouse *qki5* GSG/STAR domain against the zebrafish genome, allowed to identify two genes exhibiting extensive conservation with *qkiA* (>90% for the KH domain), respectively called *qkiC,* located on chromosome 12 and *qkiB* located on chromosome 13. *qkiB* is not expressed in skeletal muscle precursor regions during early development and will not be discussed further. However, *qkiC* is expressed under two major splicing isoforms QkiC 201 and 202, which are identical for their STAR domain and C-terminus sequence, except at the N terminus, where ATG start sequences are located on two different exons (fig.1A). At 24hpf QkiC 201 transcript is more expressed in the embryo than it'siQkiC 202 isorform (data not shown).

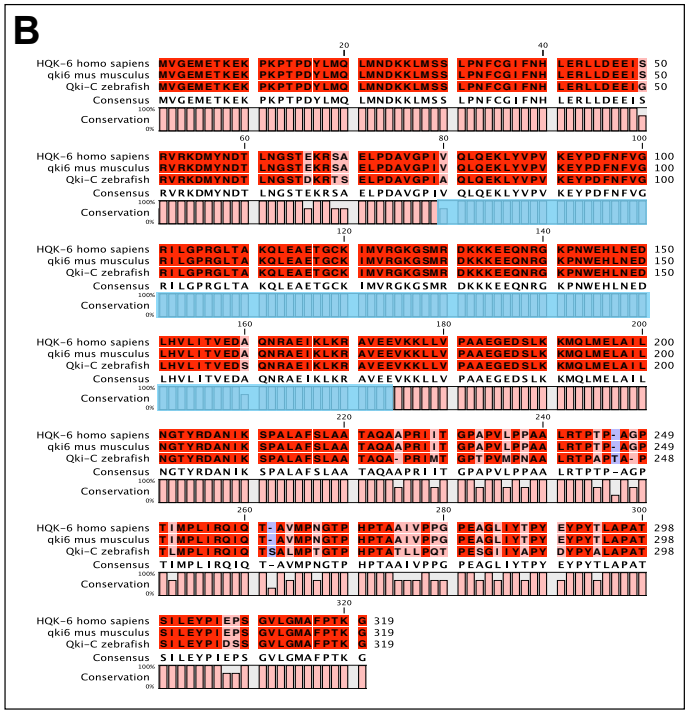
The KH domain is conserved at 91% between QkiA and QkiC. However, differences occur at the protein C-terminus: unlike QkiA, QkiC does not include a Nuclear Localization Sequence (NLS) (figure 1A). Protein sequences blast, allowed us to propose that zebrafish QkiC is conserved during evolutions, human HQK-6 and mouse QKI6 are QkiC orthologs (fig. 1.B).

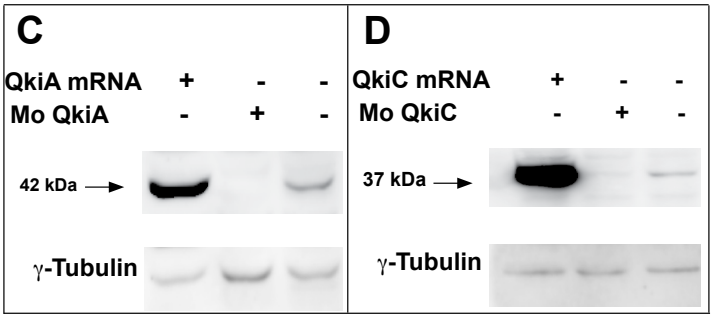
Both Quaking A and Quaking C are expressed in adaxial cells during somitogenesis.

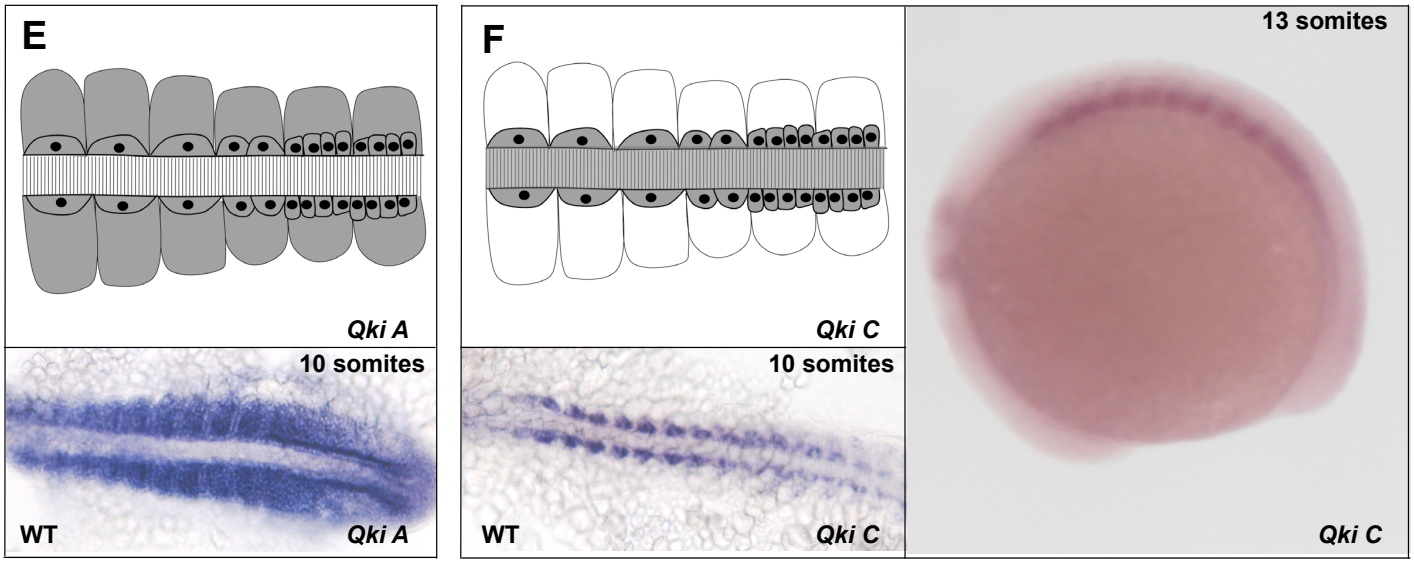
Strong QkiC expression was first observed during early stages (Since 2-3 somites stage) by in situ hybridization and revealed a predominant expression, during somitogenesis, in an array of cells abutting the notochord, thus encompassing the adaxial domain (fig.1F). Faint variable expression was also detected in the notochord. At the same stage, QkiA is expressed in a larger trunk region encompassing the entire somite and the notochord (fig.1E). Thus QkiA and QkiC are expressed in overlapping adaxial domains during somitogenesis. In addition, QkiC expression was detected in two stripes within the head region, at the level of the hindbrain, corresponding to rhombomeres 3 and 5. To further define QkiA and QkiC expression, it was necessary to detect the corresponding proteins. Antibodies against mouse QKI5 and mouse QKI6 were used to probe, respectively QkiA and

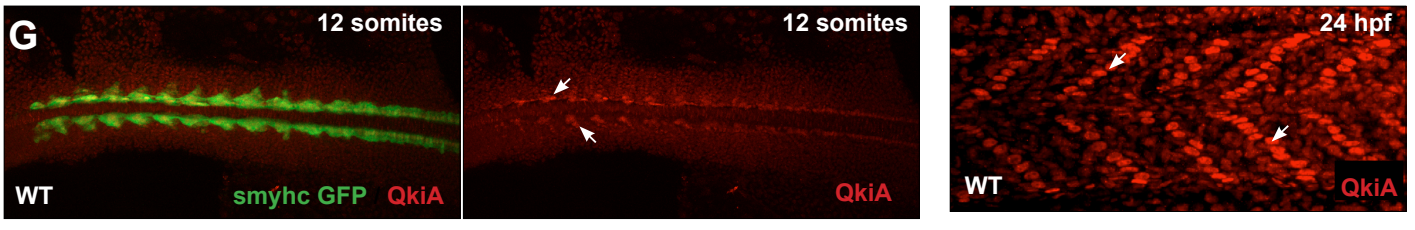
QkiC from 13 somite stages zebrafish protein extracts by Western blotting (fig.1C). In contrast, consistent with the predicted size of QkiA and QkiC proteins, antibodies against qki5 and qki6 allowed to detect a single protein band in extracts of embryos overpressing QkiA or QkiC respectively, following RNA-mediated injections (fig.1C). Probing of uninjected somite-stage embryos with the same antibodies revealed a unique band, demonstrating the capacity of these antibodies to detect either zebrafish QkiA or QkiC proteins. Antibodies were then used to probe zebrafish embryos by immunohistochemistry.


A
Conserved sequence
qkiA
Chromosome 17
qkiC 201
Chromosome 12
qkiC 202
Chromosome 12
ATG
1
2
3
4
5
6
7
8
1'
1"
Qki A
Qki C 201
QUA1
KH domain
QUA2
NLS
1
97
137
319
382
STAR Domain
P motif
Y motif


B
HQK-6 homo sapiens
qki6 mus musculus
Qki-C zebrafish
Consensus
Conservation


C
QkiA mRNA + - -
Mo QkiA - + -
42 kDa
γ-Tubulin
D
QkiC mRNA + - -
Mo QkiC - + -
37 kDa
γ-Tubulin


E
Qki A
10 somites
WT
Qki A
F
Qki C
10 somites
WT
Qki C
13 somites
Qki C


G
12 somites
WT
smyhc GFP QkiA
12 somites
QkiA
24 hpf
WT
QkiA

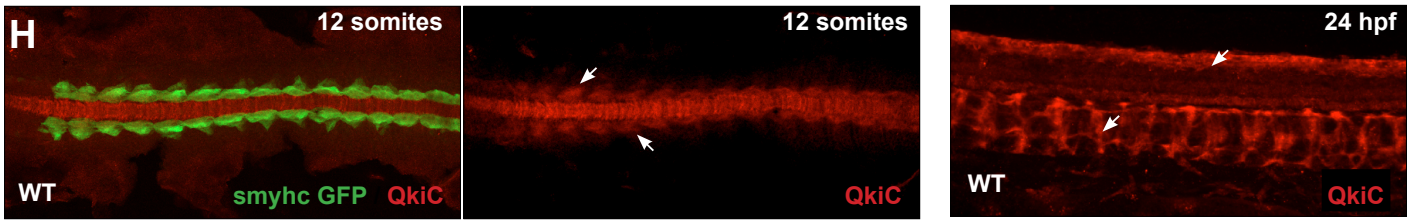

H
12 somites
WT
smyhc GFP QkiC
12 somites
QkiC
24 hpf
WT
QkiC

Figure 1: Quaking C expression overlaps with Quaking A expression in adaxial cells during somitogenesis. A- Alignment of QkiC/QkiA nucleotides (top of the panel) and protein sequences (bottom of the panel) shows a high degree of conservation for the KH domain (91% between KH domain in protein sequences), while their C-term sequence differs with the presence of an NLS (QkiA) or not (QkiC). $QkiA_{ATG}$ and $QkiC_{UTR}$ morpholino's binding site are represented respectively with a red and a blue dash. **B-** Proteins alignment reveal that QkiC protein is conserved from Human (HQK-6) and Mouse (qki6) orthologs (98% of homology in their KH domain). **C/D-** Western blot analysis of QkiA and QkiC at 13 somites stage embryos. Specific loss of the endogenous protein is induced by the injection of their respective morpholinos. Specificity of QkiA and QkiC antibody is verified by injection of their QkiA and QkiC mRNA. γ-tubulin staining is used as a loading control. **E/F**-QkiA and QkiC *in situ* profiles at 10 somites stages. QkiA and QkiC expression overlaps in adaxial cells territory. **G/H-** QkiA and QkiC staining are performed in a Smyhc-GFP line at 12 somites stage (left panels) or in WT embryos at 24hpf (right panels). **G-** QkiA nuclear staining is emphasized in adaxial cells (12 somites stage) and slow muscle fibers (24hpf). **H-** QkiC proteins are stained in adaxial cells (whites arrows) and in the notochord during somitogenesis. This staining remained only in the notochord and the neural tube at 24hpf (right panel, white arrows).

Consistent with *in situ* expression analyses, immunohistochemistry revealed predominant trunk expression of QkiC in the adaxial cells and notochord domains during somitogenesis. These results confirm the QkC expression phenotype observed by ish indicating a reliable way to assess the expression of your protein of interest. At 24h, trunk expression became restricted to the notochord and the neural tube (fig.1H white arrows). QkiA expression is stronger in the adaxial domain during somitogenesis and in slow muscle cells at 24hpf, a faint expression remain in the rest of the trunk (fig.1G). High magnification analysis further showed that, consistent with protein structure and the presence of the NLS in QkiA, this latter protein was predominantly localized in the nuclei of expressing cells, whereas QkiC did not appear to exhibit specific localization within expressing cells (fig.1G and H). Similar localization results were obtained with embryo overexpressing either QkiA or QkiC by RNA-mediated injections.

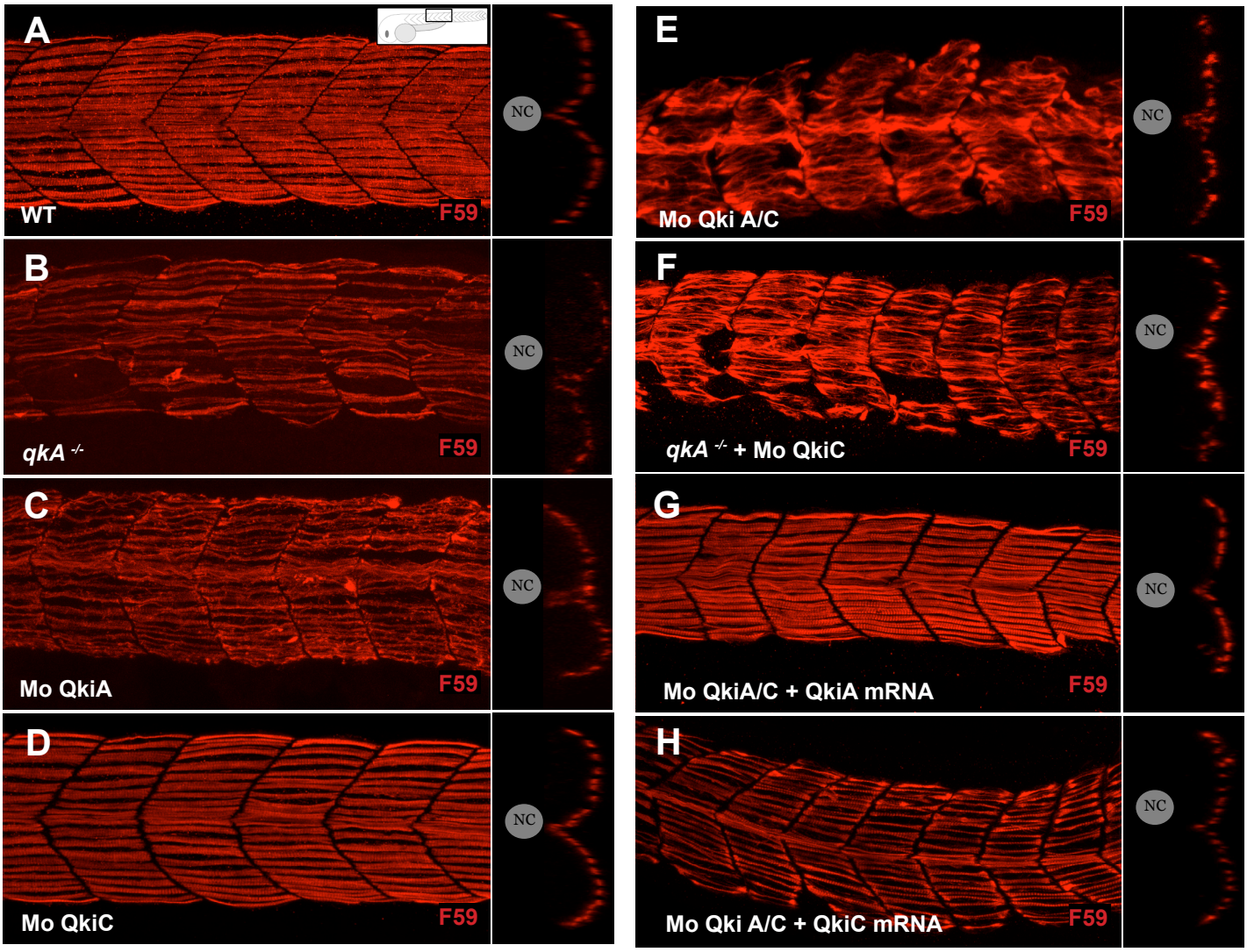


Figure 2: Double loss of function of QkiA and QkiC induces a strong alteration of Myosin filaments in slow muscle fibers.
Slow muscle fibers are stained using F-59 antibody at 24hpf. All pictures are taken at the same location above the end of the extension yolk. Longitudinal optical slices are stacked on the left panel. Transversal sections are reconstructed on the right panel. **A-** In WT non-injected embryos, Slow Myosin fibers are straight and parallel to the notochord and show a regular striated pattern. The right panel shows the classical slow muscle cells "butterfly wing" shape. **B/C-** Loss of function of QkiA, induced by q*kiA*$^{-/-}$ mutation (**B**) or by QkiA$_{ATG}$ morpholino injection (**C**), revealed similar alterations of Myosin slow myofibers. Slow muscle cells correctly migrate to the external part of myotome. **D-** Loss of function of QkiC induced by injection of QkiC$_{UTR}$ Mo has no specific effect on slow muscle fibers formation. **E/F-** Double loss of function is induced by a co-injection of QkiA and QkiC morpholinos (**E**) or by injection of QkiC morpholinos in QkiA$^{-/-}$ mutant embryos (**F**). In both cases, slow muscle myofibers are strongly altered, thick Myosin filaments are dissected and accumulations of Myosin protein are observed. Slow muscle myofibers do migrate correctly. **G/H-** Injection of either QkiA (**G**) or QkiC (**H**) mRNA in double morphans embryos partially rescues the QkiA/C loss of function phenotype in slow muscle cells.

QkiA and QkiC are required for trunk muscle maturation.

Since QkiC is expressed in adaxial cells, we tested its potential function on muscle development by injecting Morpholinos to down regulate QkiC expression. A Morpholino targeting the 5'UTR of endogenous QkiC mRNA has been designed. When $QkiC_{5'UTR}$ Morpholino is injected into zebrafish embryos, the endougenous band completely disappears as shown by Western blot analysis proving the specificity of this Morpholino and the QkiC antibody (fig.1D). Similar results have been shown for QkA_{ATG} Morpholino (fig.1C).

We then analysed the requirement for QkiC in slow muscle development. At 24hpf, slow muscle cells can be specifically detected with the F59 monoclonal antibody, which binds to slow muscle Myosin. Slow muscle cells are arranged into arrays, parallel to the axis of wild-type embryos, organized into chevron-shaped somites and adopt a butterfly disposition along the dorsoventral axis following their distal migration during somitogenesis (fig.2A). Attenuation of QkiA function by MO injection or in homozygous mutants *qkiA*^{t31954} (*qkiA*$^{-/-}$) has been shown to lead to a reduction in the number of slow muscle cells, altered distal migration and partial and variable thinning of the muscle myofibrils (fig. 2 B and C). In contrast, injections of $QkiC_{5'UTR}$ MO, up to 5 pmol, did not noticeably interfere with slow muscle development (fig.2D) except, maybe, for a slight alteration of somites V-shape. We have shown that both QkiA and QkiC are expressed in adaxial cells and since QkiA is required for slow muscle cells development, but its loss of function leads to a weak phenotype, so we have tested the effect of a combined loss of function for both genes. Double loss-of-function was carried out either by combined injections of $QkiA_{ATG}$ and $QkiC_{5'UTR}$ MOs in wild-type embryos or a single injection of $QkiC_{5'UTR}$ into the progeny of *qkiA*$^{-/+}$ heterozygotes, leading to similar results, except that in the double morphants every slow muscles cells have migrated, contrary to *qkiA*$^{-/-}$ embryos injected with $QkiC_{5'UTR}$ MO were some slow muscle cells are absent, reminding *qkiA*$^{-/-}$ homozygote embryos (fig.2E and F). Coinjection of QkiC and QkiA MOs lead to severe disruption of slow muscle cells development. Although these slow fibers appear to be specified properly and to differentiate, by expressing slow muscle specific markers like Prox1 (fig.3B) and slow Myosin (fig.3A). These slow muscle cells do migrate distally, the shape of the somites appeared irregular and the arrangement of myosin was severely perturbed. This phenotype could be fully rescued by RNA-mediated overexpression of QkiA RNA (Fig.2G). Injection of QkiC RNA, in contrast, led only to partially rescued embryos, reminiscent of QkiA-deficient phenotype (Fig.2D). These latter results show that the phenotype induced by the QkiC/QkiA MOs is specific to Quaking action and is not induced by toxicity of the MO.

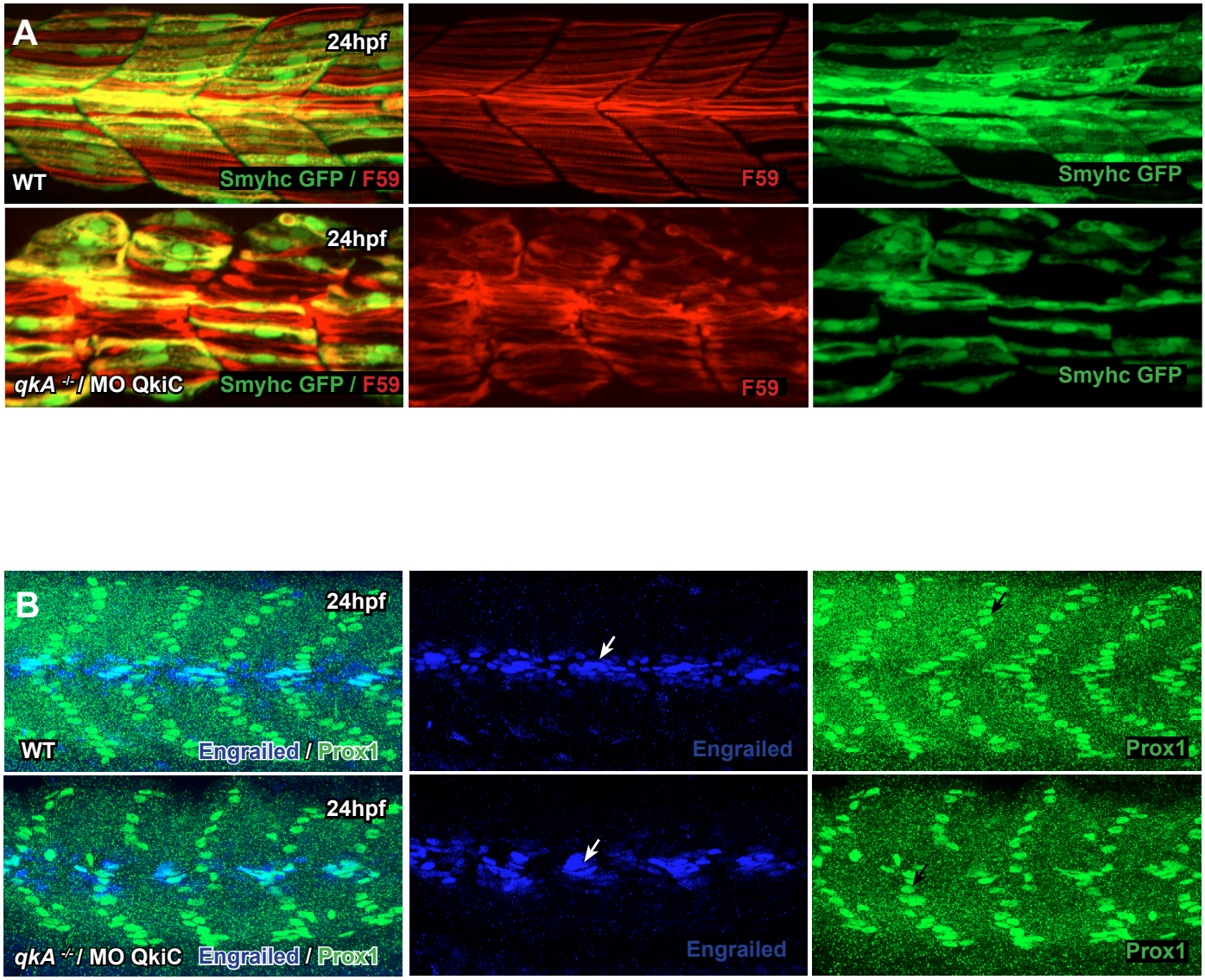


Figure 3: QkiA/C loss of function does not alter slow muscles and pioneer muscle cells commitment at 24hpf.
A- Control embryos (top panels) and QkiA$^{-/-}$ mutants injected with QkiC$_{UTR}$ morpholino (bottom panels), are injected with Smyhc-GFP plasmid revealing slow muscle cells with a mosaic expression. Slow Myosin is stained with F-59 antibody (red). In both conditions thick myofibers are well encompassed in slow muscle fibers. **B-** WT embryos (top panels) and QkiA$^{-/-}$ mutants injected with QkiC$_{UTR}$ morpholino (bottom panel) are stained with Prox1 (green), antibody labeling slow muscle cells nucleus (black arrows). No significant reduction in number of slow muscle cells has been detected, neither in the number of pioneer muscles (white arrows) detected with the double labeling Prox1 and Engrailed (blue).

In wild-type embryos, adaxial cells adopt a complex series of movement during somitogenesis and in particular, elongate along the AP axis to generate the characteristic parallel array. This elongation can be monitored by mosaic expression of GFP under the control of the slow muscle specific promoter smyhc1, because the GFP is expressed throughout the cytoplasm. When such an expression is carried out in *qkiA*$^{-/-}$ homozygotes

injected with QkiC MO, GFP slow muscle expressing cells are clearly elongated at 24hpf (fig.3A). Thus the perturbed myosin staining is not the result of improper elongation but more likely an alteration in cytoarchitecture.

Embryos start to show motility around the end of somitogenesis. At 24hpf, they exhibit spontaneous flicking movements of the tail. Those flicking movements are slightly altered in QkiA loss of function. Interestingly, in QkiC loss of function embryos, flicking movements are totally normal compared to wild-type embryos. In contrast and consistent with the alteration in muscle cell structure, double loss of QKiA and QkiC functions lead to embryos which have very weak flicking activity (data not shown).

Both QkiA and QkiC are required in slow muscle cytoskeletal formation and sarcomere organisation.

To better understand the defects induced by combined attenuation of QkiA and QkiC activity, we analysed several component of the slow muscle myofibril at 24hpf, namely the thick filaments, thin filaments and the z-disk.

Thick filaments are predominantly composed of Myosin. Slow myosin heavy chain, detected by the F59 mAb, is commonly used as a marker for slow muscle fibers. In wild-type embryos, slow muscle cell cytoskeleton then appears as myosin rods, which are segmented at regular intervals, reflecting the existence of the sarcomeres. At 24hpf, the combined loss-of-function for *qkiA* and *qkiC* induced a disorganization of slow myosin localization, with accumulation of myosin at cell tips, and splitting of rods into very thin myosin filaments which are weakly segmented (fig.4A).

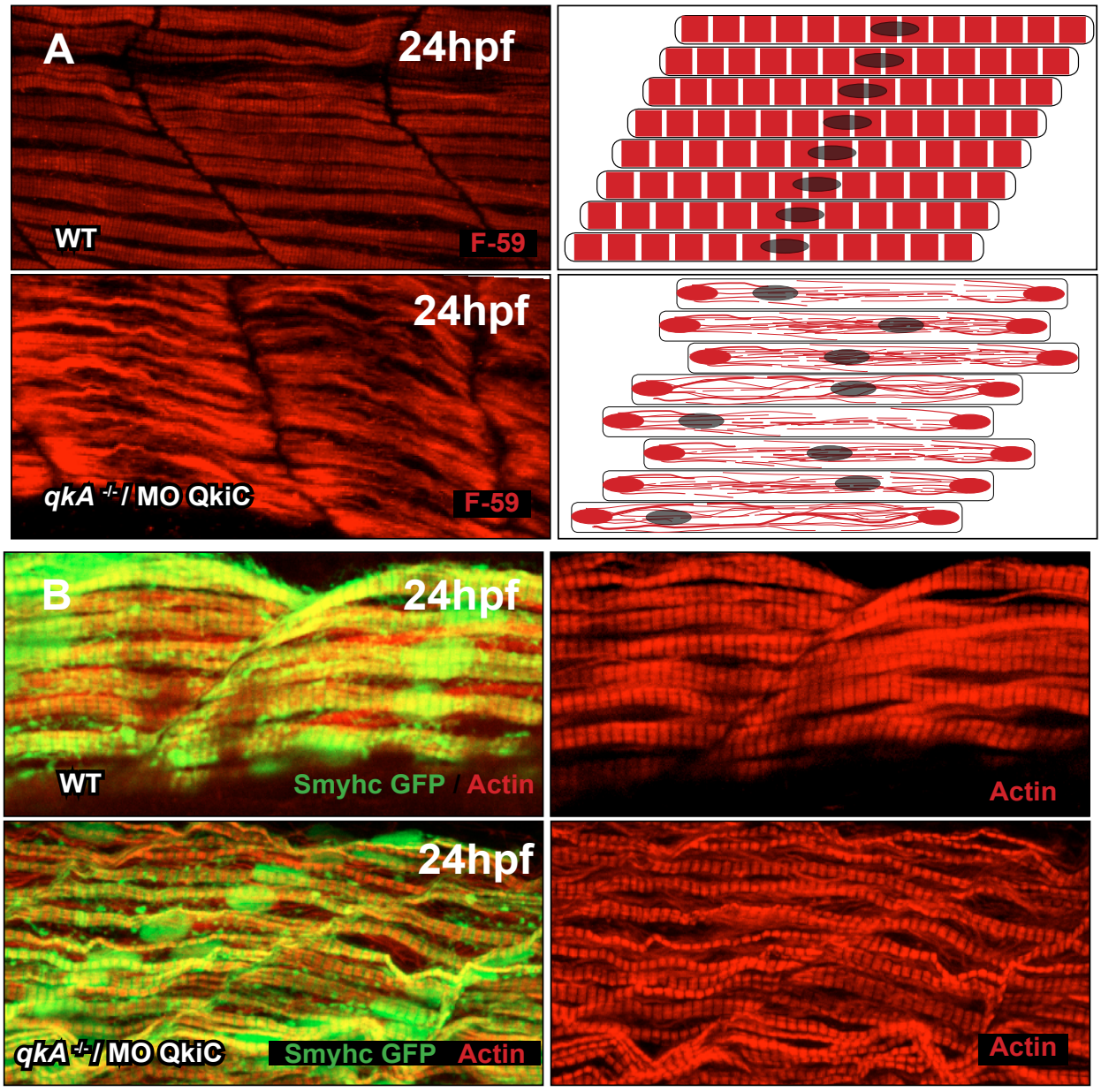
Thin filaments include Actin as a major component and can be visualized by phalloidin staining. In double loss-of function for QkiA and QkiC at 24hpf, Actin filaments appears less affected than myosin, were still striated and did not accumulate at the tips of slow muscles cells, but similar to what happen with thick filaments, thin filaments were also thinner when compared to control embryos (fig.4B).

α−Actinin is the major component of the Z-disk. At 24hpf, the regular striated pattern of this protein, in control embryos, is not observed in QkiA/QkiC double morphants embryos. α−Actinin is still expressed and present in slow muscle cells, but instead of a regular, thick and straight striated pattern, double loss-of-function embryos exhibit a dotted and faded pattern for this protein (fig.4C).

In addition, electron microscopy analysis experiments have been performed to further define, at the ultra-structural level, the alteration in the organization of the cytoskeleton at 24hpf. In comparison to controls, toward the center of the slow muscle cells, sarcomeres structure was markedly altered in QkiA/QkiC double loss of functions embryos. Instead of the regular

stacking of alternating thick and thin filaments, sarcomeres exhibited regions appearing thinner and predominantly composed of thin filaments. In addition, a severe disruption of Z-disks is observed, compare to wild-type embryos, the dense line is reduced in the dorso-ventral axe (black arrows, fig.4D) or completely absent (white stars, fig.4D). Consistent with it, some thin/thick filaments appeared continuous between two different sarcomeres (black arrow head, fig.4D). Other sections showed that in contrast to wild-type tissue, the remaining Z-disk elements from thin and split myofibrils were misaligned within the same slow muscle cell (fig.4D, black stars).

At the tips of control slow muscle cells, myofibrils are normally striated along their entire length. In contrast, in QkiA/QkiC loss-of-function embryos, Myosin condensations regions appeared composed of unstriated myofibrils, stacked together with a chaotic organisation (fig.4D, white arrow)


A
24hpf
WT
F-59
24hpf
qkA -/- / MO QkiC
F-59
B
24hpf
WT
Smyhc GFP / Actin
Actin
24hpf
qkA -/- / MO QkiC
Smyhc GFP Actin
Actin

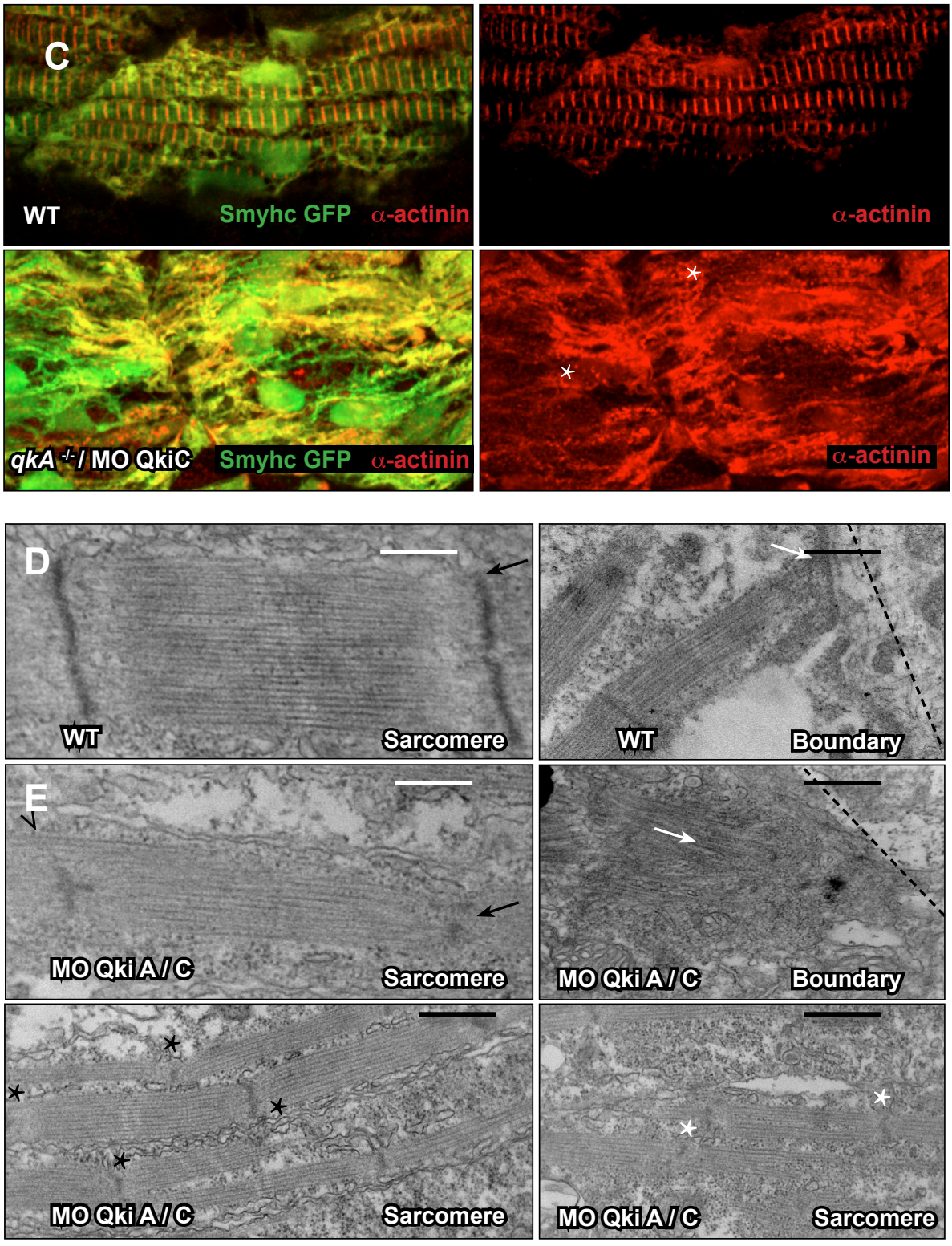


Figure 4: At 24hpf, contrary to thin Actin filaments, thick filaments and Z-disk are specifically altered in QkiA/C loss of function conditions. Magnification (63X)
A- Control embryos (top panel) and QkiA$^{-/-}$ /QkiC$_{UTR}$ MO (bottom panel) are observed using F-59 antibody. On the right panel, drawings represent the phenotype of Myosin protein in both conditions. In double loss of function embryos the striated pattern of Myosin filaments is altered, "accumulation" of Myosin proteins at the tip of slow muscle cells and "dissected/split" filaments of Myosin are observed. **B/C-** Magnification of control Smyhc-GFP embryos (top panel) and Smyhc-GFP/QkiA$^{-/-}$/QkiC$_{UTR}$ MO embryos (bottom panel) are stained with

Phalloïdin in order to observr Actin filaments in slow muscle cells (**B**) or with α-Actinin2 antibody to visualize Z-disk (**C**). Contrary to Z-disk, Actin thin filaments are not strongly altered. α-Actinin striation is lost and some aligned dots are visualized at the tip of the cell (white stars) **D/E-** High magnification (0,6μm white scale / 1μm black scale) using electron microscopy has been used to visualize sarcomere and myotendinous junction ultrastruture in WT embryos (**D**) or double morphants embryos (**E**). The Z-disk thickness is strongly altered in double loss of function embryos (black arrows). The Myotendinous junctions have been visualized at the tip of slow muscle cells. Protein complex that attach myofibrils to the membrane in WT embryos seems to be disorganized in QkiA/C morphants (white arrows). Myosin filaments are strongly disorganized in double loss of function embryos. Z-disk appears non-aligned (black stars) or seems to disappear (white stars).

These results strongly suggest that, QkiA and QkiC are not required for the presence of sarcomere mains elements but rather for the assembly of those elements. In double morphants, formation of thin filaments appears to be conserved but the formation of thick filaments and Z-disk is clearly altered. The process of myofibrils scaffolding seems to be affected. The organisation of the whole sarcomere is altered consistent with the loss of flick movements. Thin myofibrils observed with myosin, actin and also with α-Actinin may represent the minimal and immature premyofibrils which are thought to align and stack together to become thicker myofibrils.

QkiA/QkiC are required during early somitogenesis

We then determined when QkiA and QkiC were first required to control slow muscle cytoskeletal assembly. Actin and Myosin can already be detected in early somitogenesis (10-somite stage) embryos. At this stage in wild type embryos, Actin exhibits both a condensation at one of the extremities of the elongating slow muscle cell, and also a network of extending filaments with variable length and orientations. Similarly, Myosin exhibits condensations at both extremities of the elongating slow muscle cell and a network of extending filaments (Fig.5A). Whereas the loss of QkiA and QkiC function does not appear to affect Actin localisation, the situation is different for Myosin: Myosin staining appears as a cloud of small condensations which are not clearly localised at the extremities of the elongating slow muscle cells and nascent myofibrils are no longer detectable (fig.5B). Consistent with these results, myofilaments could be detected in uninjected 10 somites stage embryos using electron microscopy (Fig.5C white arrows), while similar filaments are not detected in QkiA/C morphants at the same stage (Fig.5D). Thus, QkiA and QkiC are required for slow muscle cell maturation and cytoskeletal assembly already during somitogenesis. In addition, the difference of behaviour between Actin and Myosin is also already detectable at this stage.

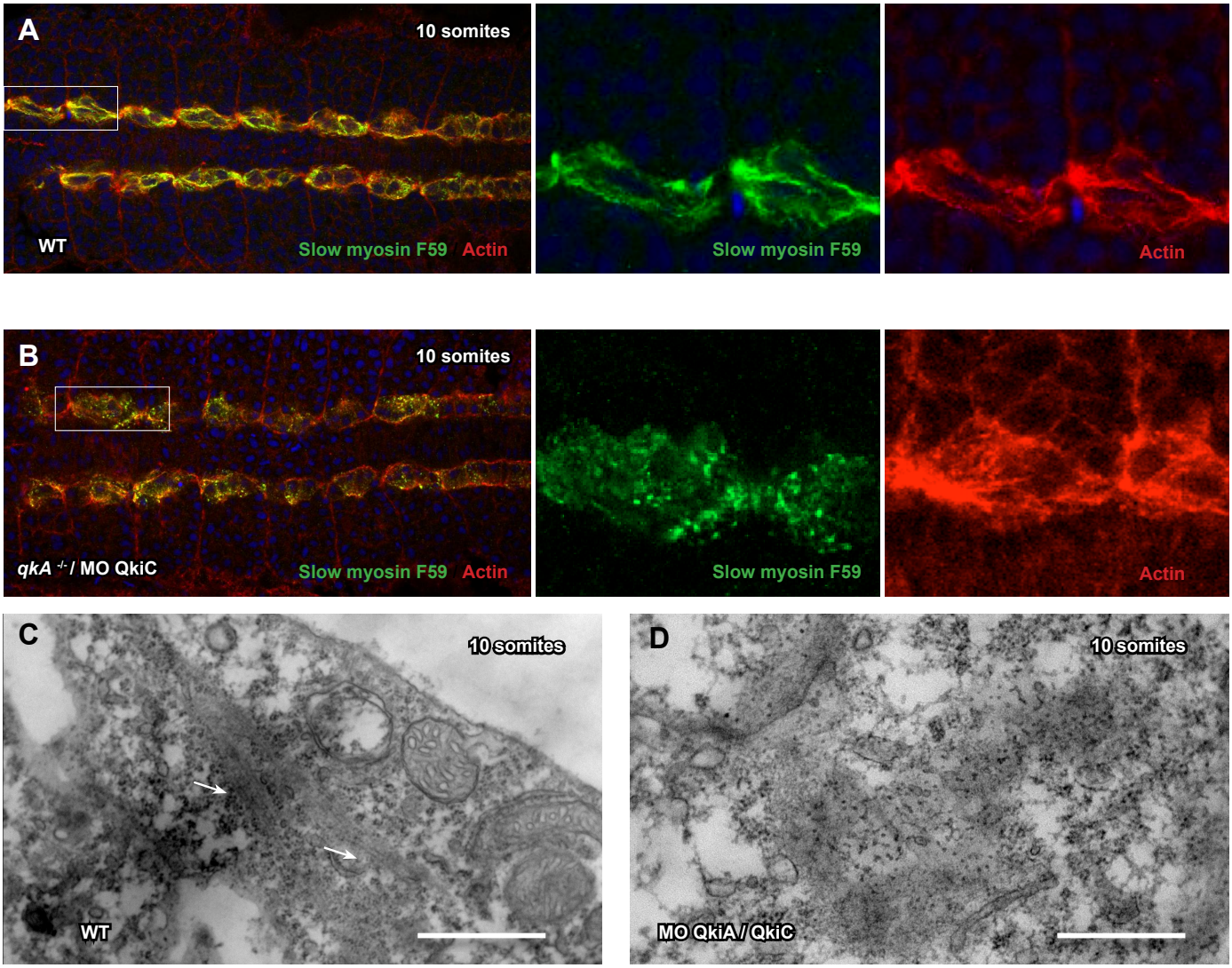


Figure 5 : QkiA and QkiC are required for Myosin protein scaffold and organization in adaxial cells during early somitogenesis.
A/B- 10 somites stage embryos are stained with Phalloidin (red) and F-59 (green) to observe respectively Actin and Myosin in WT (**A**) or double loss of function (**B**) conditions.
A- In WT embryos both Actin and Myosin accumulated at the tip of adaxial cells. Myosin and Actin colocalise and form elongated thin myofilament. **B-** In QkiA/C loss of function embryos, Actin proteins are still accumulated at the tip of adaxial cells and keep forming thin filament. However, Myosin proteins staining shows disorganized "dots" sprayed in adaxial cell cytoplasm. **C/D-** Electronic microscopy performed in adaxial cells shows few myofilaments in WT (white arrow) that have not been detected in double morphants embryos (0,5 mm white scale).

QkiA and QkiC are required in a cell autonomous manner for slow muscle cells maturation.

Both QkiA and QkiC are expressed in adaxial cells and in their environment, thus could be required for slow muscle cytoskeleton formation within adaxial cells or within their environment. To address this issue, transplantation experiments were carried out. Cells embryos injected with mRNA encoding a membrane-targeted GFP as a tracer, alone or together with QkiA/C MO, were transplanted at early gastrulation into the prospective slow muscle territory of double morphants or uninjected embryos respectively. While control grafted cells exhibited a normal cytoskeleton and extended to the entire length of the somite (fig. 6C), cells grafted from double morphant donors exhibited severely disrupted myofibrils with myosin condensation at the tips of the cells in wild type environment (fig.6A white arrow). Thus the presence of a normal environment is not sufficient for cells depleted in QkiA and QkiC proteins to correctly achieve a correct myogenic program.

Complementary experiment have shown that slow muscle fibers coming for a wild-type embryo graft into a double morphant embryo, give rise to elongated and striated pathat ttern, while slow muscle cells around have the typical accumulation of Myosin phenotype (fig. 6.B)

These results indicate that QkiA/C functions are required cell autonomously in slow muscle cells myofibril assembly and maturation.

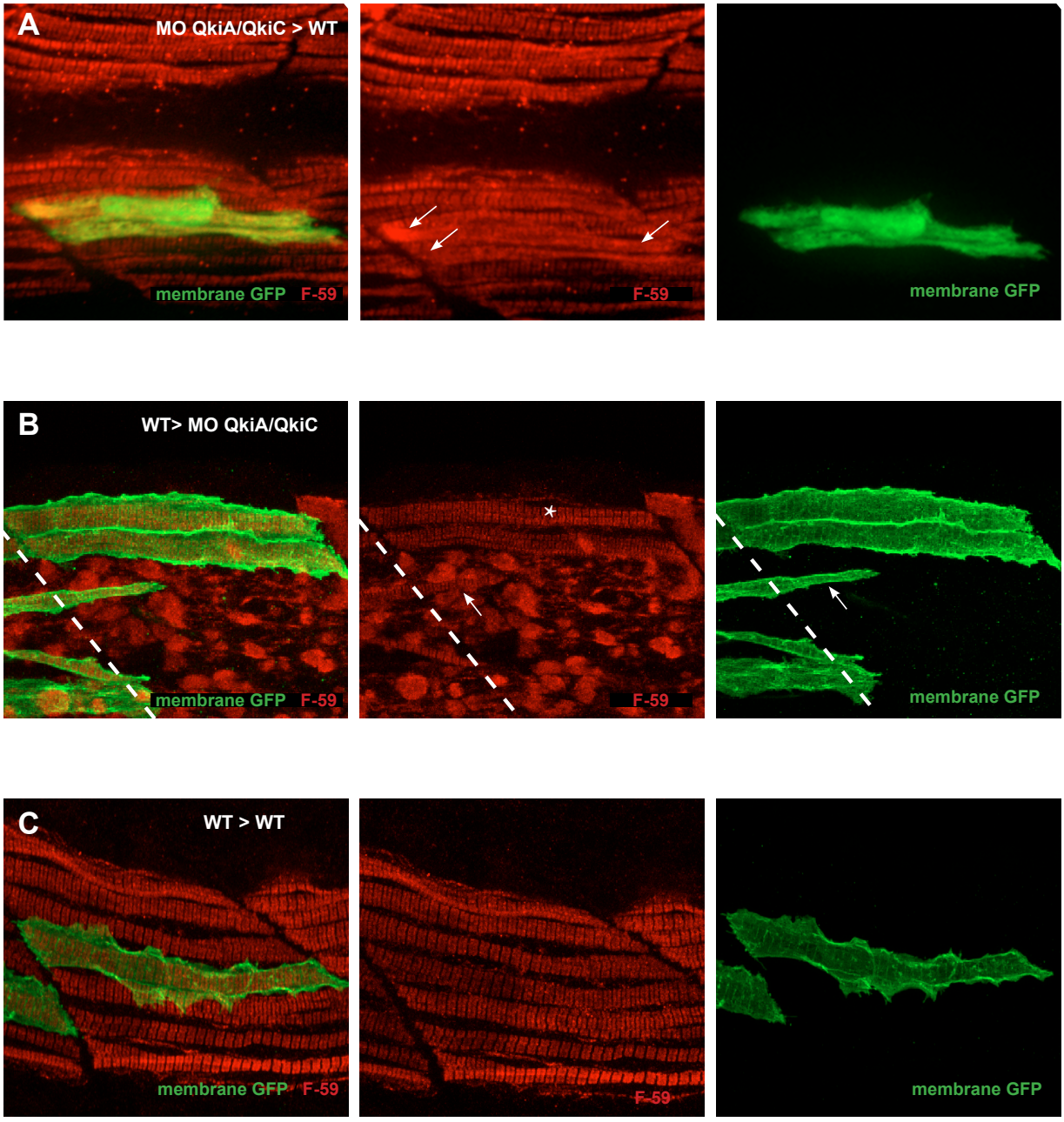


Figure 6: QkiA and QkiC act in a cell autonomous manner in order to form structured Myosin filament.
Graft experiments have been performed at sphere stage and observed at 24hpf. Membrane-GFP RNA has been used as a cell tracer.
A- Slow muscle cells depleted in QkiA/C grafted in WT embryos show an alteration of Myosin thick filaments, with split fibers and accumulation of Myosin at the tip of grafted cells, similar to the double morphants phenotype. **B-** WT slow muscle cells grafted in an embryo depleted in QkiA/C show a classical striated pattern (white stars). Some grafted fibers cross the boundary (white arrow) **C-** Control experiment, which consists to graft WT cells in a WT environment to ensure that the grafting process will not disturb slow muscle myogenesis. WT cells show a classical striated pattern in a WT environment.

Mef2 C/D and Quaking A/C act in a parallel way

Other regulators of slow muscle cells maturation and myofibril assembly have been described and include the transcription factors Mef2c and Mef2d (Hinits & Hughes, 2011). In particular, similar to the combined attenuation of QkiA and QkiC, attenuation of Mef2C and Mef2D by MO injection does not interfere with slow muscle differentiation and migration but prevents proper maturation and cytoskeletal assembly with Myosin condensation at the tips of the elongated cells in 24hpf embryos (Fig.7B). Interestingly, Mef2C RNA possesses Qki response elements. These results prompted us to test the potential epistatic relationship between the Mef2c/d and the QkiA/C pathways. We first tested the potential requirement of Mef2c and/or D for QkiA/C expression. Neither QkiA nor QkiC expression, at the RNA or protein expression appeared affected by Mef2C/D double loss of function. Conversely, Mef2C or D RNA expression (not shown), or Mef2C/D nuclear immunoreactivity appeared unchanged upon QkiA/C loss-of-function (Fig.7E-G). Thus these two pathways do not cross regulate, at least at the transcriptional or translational level. Similarly, we tested the capacity of QkiA or QkiC mRNA to rescue the Mef2C/D loss-of-function phenotype by injection of either RNA into Mef2C/D morphants. No rescue was observed (Fig.7C,D). Thus, although QkiA/C and Mef2c/d appear to be both required, in a cell autonomous fashion, for slow muscle maturation and myofibril build-up, the potential epistatic relationship between those two pathways does not rely on cross-regulation suggesting that they might act in parallel to control muscle maturation, by acting on identical or different targets.

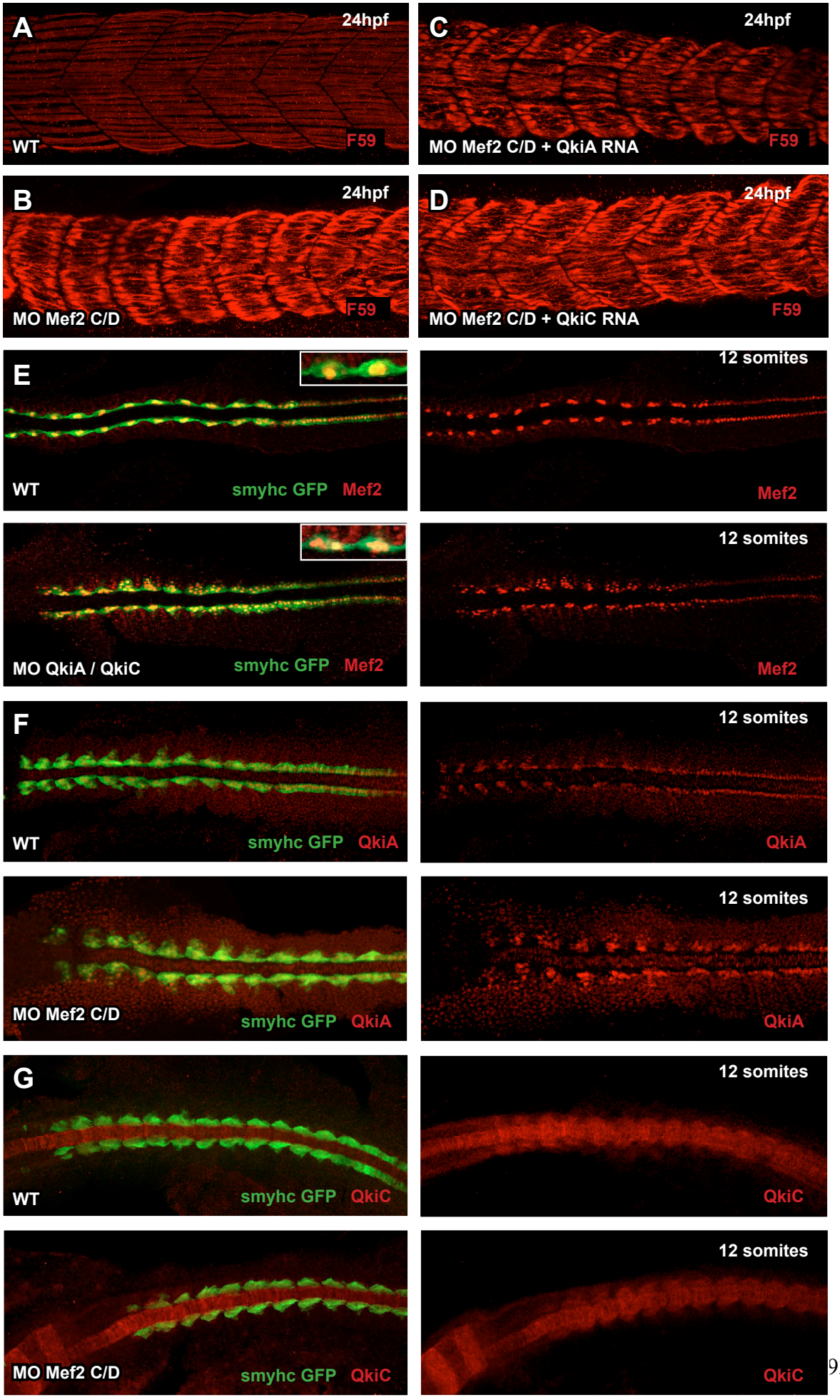

A
24hpf
WT
F59
C
24hpf
MO Mef2 C/D + QkiA RNA
F59
B
24hpf
MO Mef2 C/D
F59
D
24hpf
MO Mef2 C/D + QkiC RNA
F59
E
WT
smyhc GFP Mef2
12 somites
Mef2
MO QkiA / QkiC
smyhc GFP Mef2
12 somites
Mef2
F
WT
smyhc GFP QkiA
12 somites
QkiA
MO Mef2 C/D
smyhc GFP QkiA
12 somites
QkiA
G
WT
smyhc GFP QkiC
12 somites
QkiC
MO Mef2 C/D
smyhc GFP QkiC
12 somites
QkiC

Figure 7: Mef2C/D and QkiA/C regulate independently Myosin thick filaments formation in slow muscle cells.
A/B/C/D- Myosin is observed in slow muscle fibers at 24hpf. Compared to WT embryos (**A**), injection of Mef2C/D morpholinos induces an accumulation of Myosin protein at the tip of slow muscle cells, thick filaments are thinner and split (**B**). Injection of QkiA mRNA (**C**) or QkiC mRNA (**D**) has been performed in Mef2C/D morphants. Any modifcations of Mef2C/D morphants phenotype have been observed **E-** Mef2C/D expression has been observed in Smyhc-GFP control embryos (top panel) and in Smyhc-GFP embryos injected with QkiA/C Morpholino (bottom panel) at 12 somites stage. Loss of function of QkiA/C does not affect Mef2C/D nuclear staining in adaxial cells. **F-** QkiA expression has been tested in Smyhc-GFP control embryos (top panel) and in Smyhc-GFP embryos injected with Mef2C/D Moprpholino (bottom panel) at 12 somites stage. Loss of function of MefC/D does not affect QkiA nuclear staining in adaxial cells. **G-** QkiC expression has been tested in Smyhc-GFP control embryos (top panel) and in Smyhc-GFP embryos injected with Mef2C/D Mo (bottom panel) at 12 somites stage. Loss of function of Mef2C/D does not affect QkiC staining in adaxial cells.

Discussion

Myogenesis correspond to transitions from unspecified mesodermal cells to mature and functional muscle fibers. These cellular transitions have been extensively studied (Daggett, Domingo, Currie, & Amacher, 2007; Holley, 2006; Stellabotte & Devoto, 2007). However relatively little is known about the last step of muscle fiber formation, the maturation process, during which myofibrils form, and its regulation. We identify a function of *quaking* genes in the regulation of slow muscle cells maturation and myofibril formation.

1) QkiA and QkiC interact.

Here we identify and characterize a paralog of QkiA, QkiC. Sequence comparison with Quaking genes from other species strongly suggests that whereas QkiA is closest to Mouse QKI5, QkiC is closest to mouse QKI6. Consistent with the presence of a NLS signal in QkiA and its absence in QkiC, we show that QkiA is predominantly expressed in the nucleus, whereas QkiC appears to have a predominant cytoplasmic localization. These localization results are strikingly reminiscent of the respective localization of mouse QKI5 and QKI6 in the nucleus and the cytoplasm, thus the high degree of conservation of both sequence and subcellular localization strongly suggests, similar to the role of QKI5 and QKI6 during oligodendrocyte development, that QkiA and QkiC achieve important functions in which the respective subcellular localization is essential (Doukhanine et al., 2010; Y. Wang, Vogel, Yu, & Richard, 2013).

Our previous work has shown that QkiA controls slow muscle specification. Although QkiC is highly related to QkiA and is also expressed in adaxial cells during somitogenesis, it does not appear to be required alone in their development. In contrast, combined QkiA/C loss-of-function leads to a severe alteration of slow muscle development, and a novel phenotype affecting thick myofibril formation that differs from the effect of single QkiA loss of function,

indicating that QkiA and C interact in the control of slow muscle development. Interestingly, QkiC is not able to fully rescue the QkiA/C loss-of-function to a wild-type phenotype. Similarly, QkiC is unable to rescue QkiA loss of function (unpublished results) showing that, although exhibiting a high degree of conservation, QkiC cannot functionally substitute for QkiA in muscle development. Thus, structural differences between the two proteins should explain this difference in function. Together with the fact that, QkiA and QkiC proteins are expressed in non-fully overlapping cellular compartments, this raises the possibility that subcellular localization is important for their action on muscle development. Structure-function analysis, involving domain-swapping experiments should further define which parts of the proteins are responsible for specificity of action.

We further show, by transplantation experiments, that QkiA/C function is required in a cell autonomous fashion within adaxial cells for their maturation. Thus, the interaction between QkiA and QkiC takes place within the same cell to control Myofibril formation and muscle maturation. Interaction could be indirect/rely, as demonstrated for Qki-related proteins, or direct interaction based on the capacity of star-domain proteins to heterodimerize, via the Qua1 domain. Physical interactions assays between QkiA and QkiC should thus be undertaken to answer this issue. It still remains to explain why if QkiA function requires QkiC activity, simple removal of QkiC activity has no effect. One likely possibility is that other genes compensate for the reduction in QkiC activity. This could stem from an upregulation of QkiA activity upon reduction of QkiC Function. However, immunochemistry and *in situ* analyses fails to reveal an increase in QkiA protein/RNA expression in this situation. Thus, either post translational regulation of QkiA, such as for instance phosphorylation (Nir et al., 2012; Sette, 2010) or compensation by regulation of another gene could be involved.

2) QkiA and QkiC control slow muscle cells maturation but not their specification.

QkiA is required for slow muscle specification by tuning Hh signaling. However, in contrast to the effect of the inhibition of Hh signaling, only a portion of the slow muscle cell population is missing when QkiA is attenuated. In addition, QkiC and QkiA are expressed in overlapping domains encompassing the adaxial population, suggesting a potential redundancy between the two genes. We tested this hypothesis by combined loss of function for QkiA and QkiC. Surprisingly, interference with QkiC function does not appear to aggravate the specification phenotype. Indeed, the number of Prox1 or Engrailed positive nuclei is not further decreased. Interestingly, loss-of QkiC function attenuates the QkiA requirement for slow muscle specification, as shown by the presence of an apparently normal number of slow muscle cells (visualized by Prox1 expression and an absence of effect of QkiA/C loss on function on medio-distal migration). This is reminiscent of the negative interactions existing between the

two antagonistic Quaking-related How^{L} and How^{H} isoforms indicating that QkiA and QkiC can interact negatively during muscle development.

Further analysis shows that initial differentiation is not affected in QkiA/C combined loss-of-functions, since slow myosin is expressed, the smyc promoter is active and typical muscle specific markers like α-Actinin2 are also expressed. Last, F59 and Prox 1 positive cells do migrate distally and adopt the characteristic “butterfly wing” shape within the somite. Therefore, slow muscle cell specification and early differentiation can occur when the activity of both QkiA and QkiC is attenuated. In contrast, in the same conditions, the later part of differentiation is affected: the major constituent of the slow muscle cell, the myofibril, does not assemble properly. Thus QkiA and QkiC are jointly required to control the process of maturation and myofibril assembly, once myofibril specific-components have started accumulating. How is myofibril formation affected? Analysis of the three major sarcomere components has been carried out and shows that Actin thin filaments do form and exhibit striation, as demonstrated by Phalloidin staining. In contrast, Myosin does not appear to incorporate into thick filaments but rather forms aggregates that tend to accumulate at the tips of the cells. Last, the Z-disk component α-Actinin, which normally adopts a striated pattern, appear to accumulate in the cytoplasm without clear pattern, with the exception of some occasional string of pearl arrangements. Consistent with these results, electron microscopy analysis reveals that thick filaments are no longer recognizable and filaments stacking are thinner. They appear to exhibit some level of striation but electron dense material at the level of the Z-disk is missing or severely altered. Thus, QkiA and QkiC are jointly required to control sarcomere formation and particularly the formation of the Z-disk and the incorporation of myosin into thick filaments. In this aspect, this could be a late requirement acting on the maintenance of the myofibril, which is well under way at 24hpf. However, analysis of myofibril formation during early somitogenesis contradict this idea since, in contrast to controls, myosin fails to accumulate in filamentous structures but rather forms early aggregates. This suggest that the initial incorporation of myosin into myofibril is prevented soon, before myofibril extend through the entire length of the muscle cell, before striation is observed and α–Actinin exhibits a striated pattern. Yet consistent with the late phenotype, Actin appears to be incorporated into filament even when QkiA/C function is attenuated. Thus QkiA/C disconnects thin filament from thick filament formation. How this is achieved is not clear and requires the identification of downstream direct or indirect QkiA/C targets. In Drosophila, *how* has been also implicated in myofibril assembly regulation. Whereas this suggests that Qki-related genes are generally involved in the regulation of myofibril assembly, it is not clear that QkiA/C and How act throught the same mechanisms or targets. Titin is a target of How in Drosophila muscle. Titin expression is down-regulated by *how* and its gain-of-function is compatible with the *how* myofibril phenotype. However,

immunohistochemistry fails to detect Titin expression before 36hpf in zebrafish and zebrzafish Titin loss of function does not clearly lead to myosin aggregates formation. Thus identification of QkiA/C targets is critical to further understand the way QkiA/C activity controls muscle maturation and myofibril assembly.

In vertebrate, another non sarcomeric regulator of muscle maturation and myofibril assembly is represented by the transcription factors Mef2c/d. Quite strikingly, combined loss of function for mef2c and mef2d lead to myofibril phenotypes highly similar to QkiA/C loss-of-function and their function is also required cell autonomously. This could be suggestive of an action within the same pathway. We have thus tested a possible epistatic relationship between Mef2c/d and QkiA/C. However, those two groups of proteins appear to be regulated independently of each other, and neither QkiA nor QkiC overexpression is able to rescue Mef2c/d loss of function. Thus, epistatic relationship cannot be established. It is still surprising that two unrelated activities lead to similar phenotypes. However, myofibrillar myopathies in this respect may represent a paradigm in this context. Indeed, all the human mutations responsible for the MFM phenotype, in particular the formation of aggregates, affect Z-disk proteins, which are not necessarily regulated by the same pathway. Thus it is possible that mef2c/d and QKiA/C common grounds lies in the control of Z-component activities, an hypothesis which should be tested by analyzing Z-disk component expression and localization in embryos with reduced QkiA/C or Mef2c/d activity. At any rate, we identify here the second non sarcomeric regulator of muscle maturation and myofibril formation, which should open the way to a better understanding of this process and the build up of the remarkably complex scaffold structure represented by the myofibril.

DISCUSSION DE THESE

Chez le poisson zèbre, le muscle squelettique axial est composé de deux types de fibres musculaires, les fibres lentes et les fibres rapides, organisées le long de l'axe antéro-postérieur à l'intérieur de segments délimités par des frontières somitiques. Ces deux types de fibres diffèrent par leurs fonctions, leurs morphologies, leurs développements, leurs précurseurs et leurs profils d'expression (Stellabotte & Devoto, 2007).

La myogenèse correspond à la transition des cellules indifférenciées du mésoderme en fibres musculaires matures et fonctionnelles au sein des somites. Après avoir exprimé des gènes de différenciation, les précurseurs musculaires entament des mouvements de réarrangements cellulaire et de migrations bien décrits dans la littérature (Daggett et al., 2007; Holley, 2006; Stellabotte & Devoto, 2007).

Parallèlement à ces mouvements cellulaires, la structure contractile interne des précurseurs musculaires va se former. Les mécanismes moléculaires permettant la formation des myofibrilles sont peu connus (J. W. Sanger et al., 2010). Ce processus, aussi appelée myofibrillogénèse, correspond à l'assemblage ordonné de protéines musculaires, conduisant à la formation des unités contractiles répétées : les sarcomères. Des modèles théoriques ont été proposés pour expliquer les mécanismes précoces de la myofibrillogénèse, reposant en grande partie sur des observations *in vitro,* à partir de myoblastes de souris et de poulet en cultures. Très peu d'expériences on été réalisées *in vivo* pour des raisons d'accessibilité du tissu pendant le développement.

Il a été montré que la structure et la composition du sarcomère sont très fortement conservées au cours de l'évolution offrant la possibilité d'utiliser le poisson zèbre comme modèle. Son développement externe rapide ainsi que sa clarté optique en font un modèle particulièrement adéquat pour l'étude de la myofibrillogénèse.

La thématique principale du laboratoire est de comprendre de manière approfondie les mécanismes moléculaires permettant la mise en place et la maturation des fibres musculaires fonctionnelles, en étudiant les étapes précoces de la myofibrillogénèse. Pour cela le laboratoire est à la recherche de gènes permettant de réguler ce processus complexe.

Une famille de protéines de liaison aux ARN messagers nommée Quaking est impliquée dans la régulation des processus de développement précoces chez de nombreuses espèces (cf. introduction). Grâce à un domaine protéique fonctionnel (le domaine KH), les protéines Quaking se lient à un motif ribonucléique spécifique: le QRE (Quaking Response Element). Les protéines Quaking viennent réguler ces ARNm auxquelles elles sont liées via des

processus de stabilisation, déstabilisation, épissage ou transport (Galarneau & Richard, 2005b).

Un mutant de motilité à récemment été identifié dans notre laboratoire (Lobbardi et al., 2011). La cartographie de ce mutant et le clonage positionnel ont mis en lumière le gène *qkiA,* paralogue du gène *quaking* chez la Souris, codant pour des protéines de liaison aux ARNm. La caractérisation de la mutation *qkiA*$^{t/t}$ chez le poisson zèbre a permis de découvrir des altérations phénotypiques musculaires:

→ Certaines fibres lentes sont altérées (myofibrilles affinées et ondulées) voire absentes.

→ Les précurseurs musculaires rapides présentent des défauts de fusion.

→ Les frontières somitiques présentent des lacunes (matérialisées par un marquage Laminine).

Une dérégulation de la voie Hedgehog a été mise à jour en absence de *qkiA*. Cependant, comparées aux mutants de la voie Hh où toutes les cellules lentes sont absentes, les altérations du mutant qkiA$^{t/t}$ semblent sont faibles (peu de fibres lentes absentes/ Altération faible des myofibrilles lentes).

Ces données nous indiquent que la perte de fonction de QkiA induit un phénotype hypomorphe au niveau des fibres lentes suggérant un phénomène de compensation par d'autres gènes.

Chez la Souris le gène *Quaking* produit trois isoformes majoritaires : une forme nucléaire (QKI-5) et deux formes cytoplasmiques (QKI-6/7) (Galarneau & Richard, 2005b). Nous avons isolé *in silico*, deux homologues de QkiA: QkiB et QkiC. Par comparaison de séquences, Qki A, B et C correspondent respectivement aux isoformes QKI5, 7 et 6 chez la souris.

Ces homologues de QkiB et QkiC jouent-ils un rôle dans le développement musculaire chez le poisson zèbre?

Le travail que j'ai effectué est focalisé sur le développement des fibres lentes du poisson zèbre car comparées aux autres fibres, elles sont plus faciles à étudier et observer. En effet durant la somitogenèse ce soit les premières cellules musculaires à se différencier. A 24hpf, ces fibres mononucléées sont localisées en périphérie du somite et parallèle à l'axe antéro-posterieur. A ce stade de développement elles présentent un aspect strié caractéristique et sont déjà fonctionnelles (Stellabotte & Devoto, 2007).

Au cours de mon travail de thèse, je me suis attaché à comprendre les mécanismes de mise en place des structures musculaires en étudiant le rôle des protéines Quaking lors de la de la maturation et de la myofibrillogénèse des fibres lentes chez le poisson zèbre.

I Caractérisation de l'homologue Quaking C.

De façon remarquable, le domaine KH, permettant la liaison aux ARNm, présente une conservation importante entre les homologues Qki A, B et C (92%) tout comme le reste du domaine STAR (QUA1-QUA2) suggérant que ces homologues pourraient avoir des cibles communes.
Contrairement aux gènes *qkiA* et *qkiC* qui sont exprimés, entre autres, en début de somitogenèse dans les précurseurs musculaires des fibres lentes, nous avons montré que l'isoforme *qkiB* n'est exprimé dans aucun précurseur musculaire et qu'elle s'exprime de manière faible et diffuse dans la notochorde (données non publiées). Nous avons donc privilégié l'étude du gène *qkiC* durant la somitogenèse.
Deux isoformes de QkiC sont répertoriées *in silico* (QkiC-201 et QkiC-202). Elles diffèrent par un épissage alternatif dans le premier exon, le reste de la séquence étant identique. L'expression des protéines QkiC visualisées par RT-PCR, nous indique que une seule isoforme de QkiC est exprimée majoritairement en somitogenèse et à 24hpf (données non publiées). Une étude complémentaire de séquençage permet d'affirmer que isoforme majoritaire correspond à QkiC-201 (données non publiées). Il semblerait que l'isoforme QkiC-202 est absente, ou trop faiblement exprimée en somitogenèse et à 24hpf pour être détectée. De plus, nos expériences ont montrées que l'isoforme QkiC-201 était suffisante pour induire le sauvetage spécifique du double morphants (fig 2H). Cependant, les outils moléculaires utilisés pour inhiber l'expression de QkiC (Morpholino) ont été développés spécifiquement afin de cibler à la fois QkiC-201 et QkiC-202 (fig. 1A).

L'analyse de l'expression de la protéine QkiC en immunofluorescence et l'hybridation *in situ* aboutissent au même résultat. En effet, une expression très localisée de QkiC est décelée dans les cellules adaxiales dès la formation des premiers somites, le marquage disparaît progressivement lors de leurs migrations radiales, suggérant un rôle précoce et temporellement défini de QkiC au sein des cellules adaxiales dans la notocorde et dans les rhombomères (fig. 1F/H). De plus, la localisation subcellulaire de QkiC dans les cellules adaxiales n'est pas restreinte aux noyaux (elle est cytoplasmique et nucléaire), contrairement a celle de QkiA qui est exclusivement nucléaire, en accord avec leurs séquences protéiques (données non publiées). Ces informations renforcent l'idée que QkiA

corresponde à l'isoforme murine Qki5 (exclusivement nucléaire) et QkiC à l'isoforme Qki6 (à la fois nucléaire et cytoplasmique).

Contrairement à QkiA, la perte de fonction de QkiC par l'injection de MO n'induit aucun phénotype visible du début de la somitogenèse jusqu'à 24hpf. Les fibres musculaires lentes ne sont pas altérées, leur migration radiale est conservée (fig. 2D). De même, les marqueurs classiques du somite (fibres rapides, Laminine) ne semblent pas être affectés et la forme caractéristique en « V» du somite est conservée (données non publiées).
La possibilité de l'inefficacité du MO peut être exclue. En effet, le marquage de la protéine endogène par Western Blot montre que l'injection du MO $QkiC_{5'UTR}$ inhibe totalement l'expression de QkiC en somitogenèse. Ces données sont confirmées par immunohistochimie sur embryons fixés en somitogenèse et à 24hpf, le marquage dans les cellules adaxiales, les rhombomères et sans la notochorde disparaît totalement après injection du MO (données non publiées).

De plus, nous avons récemment développé une mutation pour le gène QkiC grâce à la technique des Nucléases à doigts de Zinc (Foley et al., 2009). L'insertion de 4 pb dans l'exon 4 induit un codon stop au milieu du domaine KH, produisant une protéine tronquée qui contient le domaine QUA1 et 2/3 de son domaine KH (fig. supplémentaire 1 A/B/C). L'anticorps utilisé pour visualiser QkiC est dirigé contre la partie C-terminale de la protéine, le marquage de QkiC disparaît totalement chez les mutants homozygote $QkiC^{-/-}$ en accord avec les prédictions de la mutation (figure supplémentaire 1 D/E).
La perte d'une partie de son domaine fonctionnel suggère que la protéine devrait être non fonctionnelle, cependant cette protéine tronquée possède la partie QUA1, le domaine d'interaction avec les autres protéines Quaking (cf introduction). Les résultats préliminaires recueillis sur ce mutant confirment l'effet du $MO_{5'UTR}$: aucune altération visible de la motilité n'est observée et les fibres lentes sont normalement distribuées et formées (fig. supplémentaire 1 D/E). De plus, les homozygotes $QkiC^{-/-}$ sont viables et atteignent le stade adulte. Une caractérisation plus approfondie de ce mutant permettra de valider son utilisation pour des expériences ultérieures, substituant l'utilisation de Morpholino.

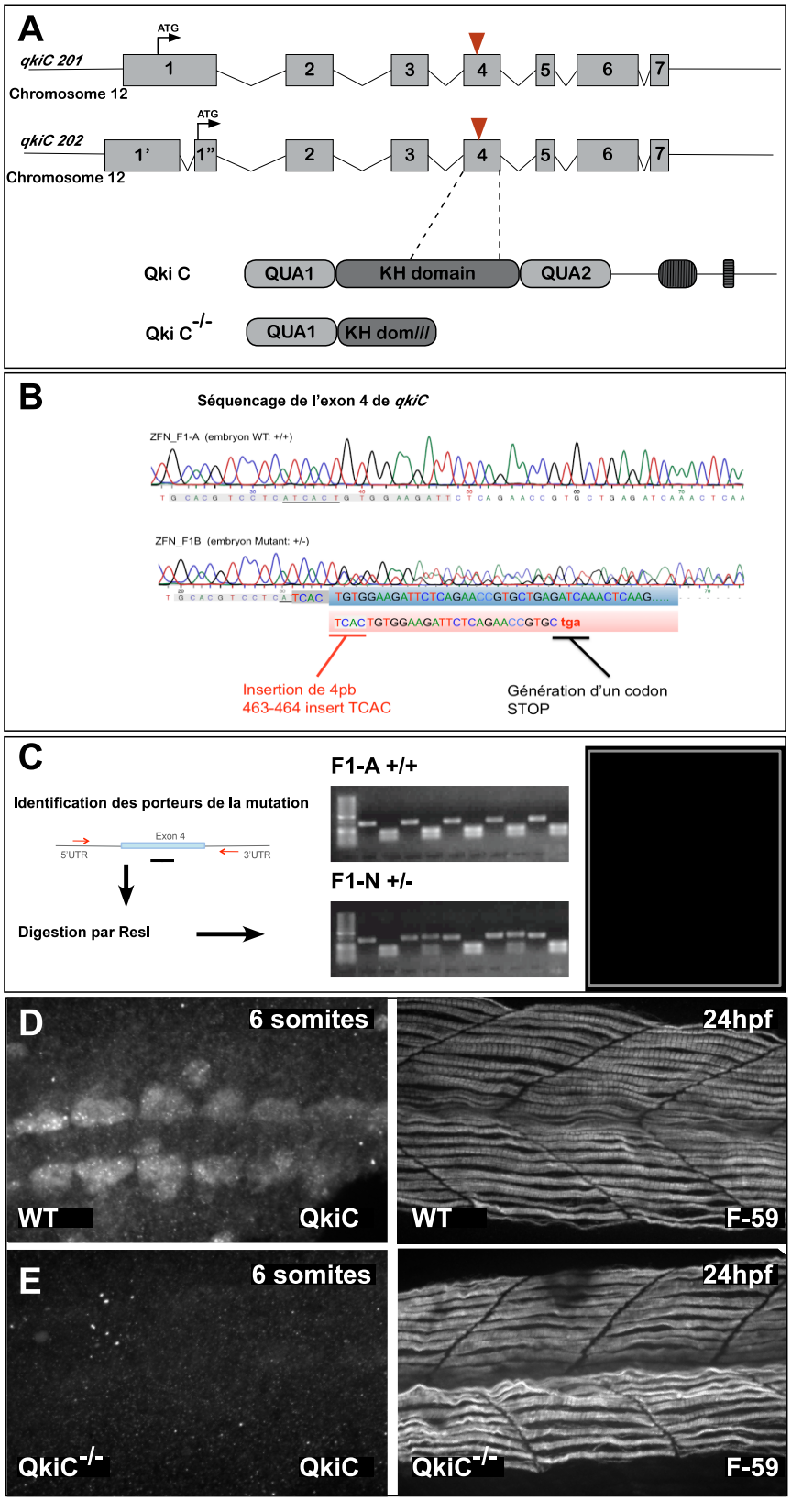

A
ATG
qkiC 201
1
2
3
4
5
6
7
Chromosome 12
ATG
qkiC 202
1'
1"
2
3
4
5
6
7
Chromosome 12
Qki C
QUA1
KH domain
QUA2
Qki C-/-
QUA1
KH dom///
B
Séquencage de l'exon 4 de qkiC
ZFN_F1-A (embryon WT: +/+)
ZFN_F1B (embryon Mutant: +/-)
TCAC TGTGGAAGATTCTCAGAACCGTGCTGAGATCAAACTCAAG.....
TCACTGTGGAAGATTCTCAGAACCGTGC tga
Insertion de 4pb
463-464 insert TCAC
Génération d'un codon
STOP
C
Identification des porteurs de la mutation
Exon 4
5'UTR
3'UTR
Digestion par ResI
F1-A +/+
F1-N +/-
D
6 somites
WT
QkiC
24hpf
WT
F-59
E
6 somites
QkiC-/-
QkiC
24hpf
QkiC-/-
F-59

Figure supplémentaire 1 : Génération du mutant QkiC grâce à la technique de Nucléases à Doigts de Zinc.
A- Les Doigts de Zinc élaboré par le laboratoire de Keith Joung sur le logiciel OPEN (Oligomerized pool engineering JK Joung 2011) ciblent une séquence précise de l'exon 4 de du gène QkiC. Les deux isoformes sont affectées par la mutation. B- L'insertion de 4 bases supplémentaire induit un décalage dans le cadre de lecture générant un codon STOP. C- Cette mutation est identifiée par le blocage de la digestion de l'exon 4 par RsaI. D/E- Les embryons homozygotes pour la mutation perdent leur marquage spécifique QkiC dans les cellules adaxiales. Ni la structure des fibres lentes les filaments épais de myosine ne sont altérés chez les mutants homozygotes.

Contrairement à son expression transitoire dans les cellules adaxiales, une expression continue de QkiC a été relevée au niveau de la notochorde et des rhombomères R3 et R5 (co-localisation avec Krox20, fig. supplémentaire 2) au moins jusqu'à 24hpf. Cette expression pourrait indiquer un rôle de QkiC dans le développement ou la fonction de ces structures :

→ Les protéines Quaking ont été découvertes chez les souris mutantes *quaking viable* (qk^V). Ces souris qk^V présentent des tremblements caractéristiques 10 jours après la naissance et des attaques convulsives chez l'adulte, dues à une hypomyélinisation. Ces souris qk^v ne développe pas d'oligodendrocytes myélinisés matures, entrainant des convulsions de type épileptique chez l'adulte (Galarneau & Richard, 2005b). De plus, des études récentes montrent que Qki-6 (paralogue de QkiC) joue un rôle important dans la maturation des oligodendrocytes murins via la stabilisation de AiP1 (cf. introduction et Doukhanine, Gavino, Haines, & Almazan, 2010). Un rôle potentiel de QkiC dans la maturation des oligodendrocytes au niveau des rhombomères peut être envisagé mais il n'aurait pas de rapport avec les phases précoces de la myofibrillogénèse, de plus ces expériences ont déjà été réalisées dans d'autres modèles.

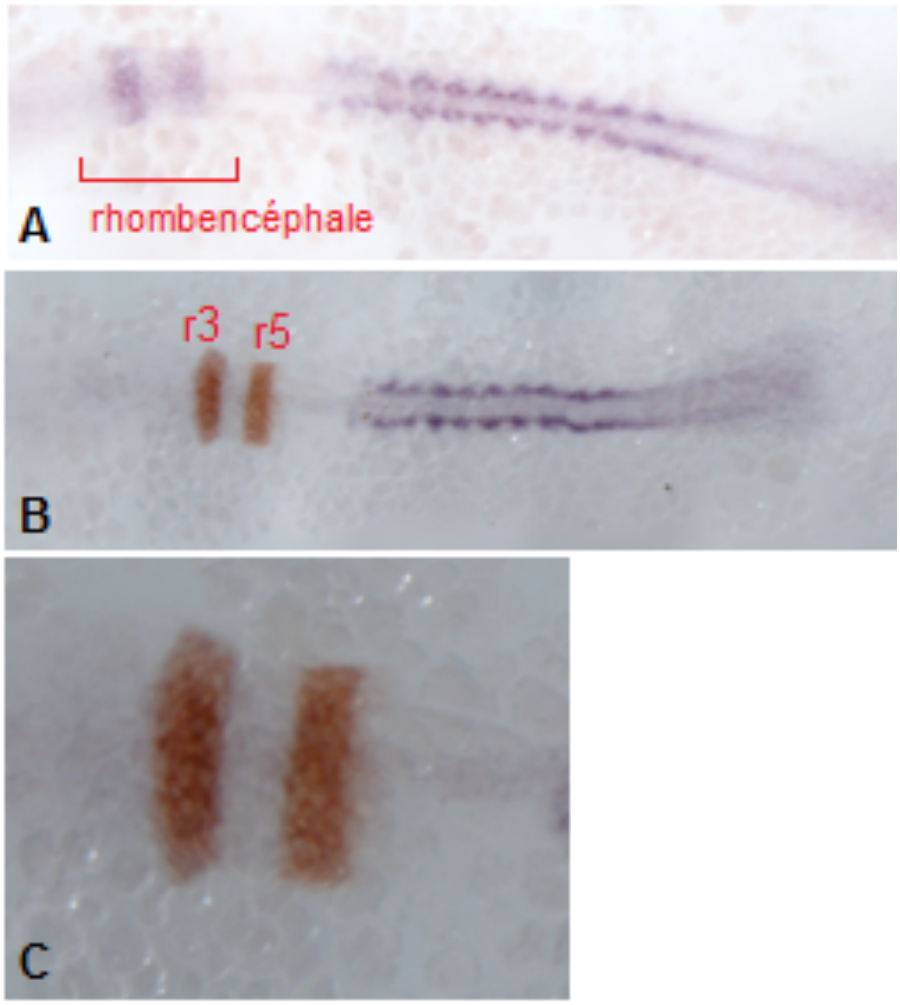


Figure suplementaire 2: Co-expression de krox20 et qkiC dans le rhombencéphale Marion Lancien et Pascale Gilardi-Hebenstreit (communication personnelle) Hybridations *in situ* sur des d'embryons sauvages de 9 somites avec la sonde qkiC seule (A en violet) ou avec qkiC et Krox20 (qkiC en violet et krox20 en orange) (B/C).

→ L'expression précoce et persistante de QkiC dans la notochorde, suggère qu'elle pourrait avoir un rôle potentiel dans le développement de cette structure. Le paralogue de QkiC est exprimé de manière spécifique dans la notochorde du Xénope (Zorn & Krieg, 1997). Tout comme son paralogue Amphibien pXqua[357], QkiC est exprimé à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. La perte de fonction de pXqua[357] empêche la différenciation et la maturation de la notochorde. Cependant nous n'observons pas d'altération évidentes dans la formation de la notochorde lorsque QkiC est inhibé mais nous n'avons pas testé de marqueurs spécifiques de la maturation/formation de la notochorde. De plus, l'autre homologue des Quaking, QkiB est exprimé uniquement dans la notochorde. QkiC et QkiB ont peut être un rôle conjoint dan son développement.

A à ce jours aucun éléments ne nous permet d'impliquer QkiC dans le développement des structures musculaire chez le poisson zèbre. L'expression chevauchante de QkiA

et de QkiC dans le domaine des cellules adaxiales et la conservation remarquable de leurs domaines fonctionnels nous ont amenées à tester la possibilité que ces deux gènes agissent de manière complémentaire et à tester leur interaction fonctionnelle potentielle durant les étapes de myogenèse.

II Une interaction fonctionnelle cellulaire dépendante de QkiA / QkiC spécifique au fibres lentes.

Bien que la perte de fonction simple de QkiA ou QkiC n'induise peu (QkiA) ou pas d'altérations des fibres lentes (QkiC), nous avons montré que la perte de fonction conjointe de QkiA et de QkiC par injection des deux morpholinos (ou du mopholino QkiC dans le mutant QkiA) induisait une perte de motilité totale et une altération intracellulaire des fibres lentes. La structure des filaments épais de Myosine est sévèrement altérée, de même l'α-Actinine, l'un des composant de la bande-Z, ne présente plus un aspect strié. Au contraire, les filaments fins d'Actine semblent moins touchés, les myofibres sont affinées mais gardent un aspect strié, elles sont continues d'une extrémité cellulaire à l'autre et ne présentent pas d'accumulation ou d'agrégats.
De façon remarquable, les altérations des fibres rapides ainsi que de la frontière somitique induites lors de la perte de fonction de QkiA (Lobbardi et al., 2011), ne semblent pas être aggravées par la perte additionnelle de QkiC (données non publiées). Ces observations sont en accord avec le patron d'expression restreint de QkiC dans les cellules adaxiales. Il semblerait que QkiC n'interagisse pas de façon notable avec QkiA pour le développement de ces structures.

Chez les morphants QkiA/QkiC l'altération des filaments épais peut varier en intensité en fonction de la quantité de MO injectée (données non publiées). Cet effet dose-dépendant est aussi retrouvé lors de l'injection du MO QkiC dans le mutant $QkiA^{t/t}$ ce qui confirme la spécificité de cet effet. Trois phénotypes graduels peuvent être définis en fonction de la quantité de MO injecté :

- Un phénotype faible est associé à l'injection de petite quantité de MO (< 1,5pmol MO QkiC et 0,75pmol MO QkiA): l'embryon présente une faible motilité, des fibres lentes plus fines et pas d'accumulation notable de Myosine aux extrémités cellulaires.

- Un phénotype moyen ou l'accumulation de Myosine est associée à une dissection et à une désolidarisation des filaments épais entre eux. L'embryon est

courbé et présente une perte total de la motilité (= 1,5pmol MO QkiC et 0,75pmol MO QkiA).

- Un phénotype fort, induit par de l'injection de forte quantité de MO (> 1,5pmol MO QkiC et 0,75pmol MO QkiA). Dans ces embryons la Myosine est présente uniquement sous forme d'agrégats, aucun filament épais n'est observé, la perte de motilité est aussi totale. A fortes doses, certaines nécroses sont observées au niveau de la tête de l'embryon indiquant un effet toxique des MO.

Il est important de noter qu'en l'état actuel de nos recherches, seul la Myosine présente un phénotype d'accumulation aux extrémités distales des fibres lentes. D'autre protéines reliées aux filaments épais sont en cours d'analyse mais les résultats préliminaires ne montrent pas d'agrégats d'autres protéines.
Afin de pouvoir comparer les expériences entre elles, nous avons défini une concentration minimale de morpholino à injecter pour atteindre le phénotype « perte totale de motilité ». Nous utiliserons ce phénotype comme un marqueur définissant la perte de fonction de QkiA et QkiC pouvant être sauvé par l'injection des ARN (voir discussion suivante).

Des résultats similaires ont été recueillis récemment grâce au croisement des mutants $QkiA^{t/+}QkiC^{-/+}$. Les embryons mutant homozygotes pour les deux gènes présentent un phénotype fort : une perte totale de motilité et une Myosine présente uniquement sous forme d'agrégats sans nécroses apparentes (données non publiées). Ces résultats préliminaires récents suggèrent donc que le phénotype que nous observons par injection de MO est légèrement hypomorphe comparé à la perte de fonction induite par mutations. Comme pour le mutant $QkiA^{t/t}$, la possibilité d'avoir créé un mutant dominant négatif est envisageable. En effet la protéine QkiC tronquée possède toujours le domaine QUA1, qui permet la hétéro/homodimérisation de QkiC avec d'autre protéines (les autre protéines Quaking entre autre). Le rôle du domaine QUA1 dans les protéines QkiA et QkiC sera discuté dans un chapitre suivant. Les mutants QkiC issue de la technique des Nucléases à doigts de zinc devront faire l'objet d'études plus approfondies, en l'occurrence l'injection d'un ARN contenant uniquement le domaine QUA1, afin d'affiner l'effet de la mutation.
D'autre mutant induisant une perte totale des protéines QkiA et QkiC sont en cours de développement dans le laboratoire.

Hormis les nécroses non spécifiques, présentes dans le phénotype « fort », les phénotypes musculaires peuvent être sauvés par l'injection soit des ARNm QkiA soit des ARNm QkiC dans les doubles Morphants (fig. 2GH). Ce sauvetage se retrouve aussi dans la motilité de

l'embryon à 24hpf. Le sauvetage de la double perte de fonction par l'ARN QkiC reste cependant partiel (fig. 2H). En effet, les doubles morphants récupèrent un phénotype moins aggravé, mais de faibles perturbations au niveau des myofibres lentes sont persistantes, similaires au phénotype observé chez les Morphants QkiA. Ces observations sont cohérentes avec le maintien de la perte de fonction de QkiA, malgré le sauvetage de QkiC. Le sauvetage de qkiC ne compense donc pas la perte de fonction de QkiA.

Un sauvetage total par l'injection conjointe des deux ARNm, n'a pas pu être effectuée car l'injection combiné de produit exogène perturbe la gastrulation (de manière analogue à la surexpression de Facteur de Transcription), menant à une létalité de tout les embryons injectés. Pour pallier entre autre ces limites expérimentales, des lignées transgéniques exprimant QkiA et QkiC sous le promoteur de choc thermique ont été récemment développées dans le laboratoire. L'expression ubiquitaire des Quaking pourra donc être contrôlée temporellement et elles pourront être utilisées ultérieurement afin de générer un sauvetage total.
Il est important de savoir à partir de quand Quaking est requis dans la maturation de la fibre musculaire lente sachant que QkiA est exprimée de manière maternelle dès le stade blastula alors que QkiC est exprimé à partir de la somitogénèse. L'injection d'ARN en somitogenèse étant impossible, l'utilisation des lignées exprimant Quaking sous le promoteur de choc thermique est alternative qui nous permettrait de savoir précisément à quels stades sont requis chacune des protéines Quaking dans la maturation de la fibre musculaire lente.

Le rôle de l'environnement, en particulier des frontières somitiques et de la notochorde, est souvent évoqué dans la myogenèse.
Sachant que *qkiA* et *qkiC* sont exprimés dans différents territoires, en l'occurrence les cellules adaxiales, la notochorde pour *qkiC* et l'ensemble des précurseurs musculaire pour *qkiA.* Ces homologues sont ils requis dans les cellules adaxiales ou dans leur environnement au cours des processus de myofibrillogénèse des fibres lentes ?

Nous cherchons d'une manière générale à tester l'endroit où l'expression des protéines QkiA et QkiC est requise. Au niveau de la frontière somitique il existe un complexe protéique transmembranaire (composé entre autre des protéines Sarcoglycan, Dystroglycan et des Intégrines) qui permet d'accrocher les myofibrilles à la membrane plasmique, qui elle même va s'accrocher à la matrice extracellulaire. Ce complexe est connu pour stabiliser les myofibrilles et transmettre la force contractile aux somites suivants. (J. W. Sanger et al., 2010). D'un autre coté, QkiA et C sont exprimés au niveau de la notochorde, son rôle

organisateur de la myogenèse pourrait nécessité l'activité de QkiA/C pour activer un programme de myofibrillogénèse correct.
Nous avons testé l'effet de QkiA/C dans l'environnement général des fibres lentes par des expériences de greffes (fig. 6). Dans un environnement déplété de QkiA et QkiC une fibre sauvage greffée à un stade précoce, entretient un programme de myogenèse complet. Les protéines Quaking ne sont donc pas requises dans l'environnement des cellules lentes pour la formation des filaments épais. Cependant, le complexe d'ancrage à la frontière s'étend au niveau intracellulaire, les protéines Quaking pourraient être nécessaire à ce niveau. De même la perte de fonction des Quaking dans la notochorde n'induit pas d'altération de la myofibrillogénèse (fig.6B).

L'expérience inverse consistant à greffer une cellule ayant perdu l'activité QkiA/C dans un environnement sauvage nous indique que les protéines Quaking sont requises de manière autonome cellulaire pour entretenir le programme efficace de formation des filaments épais de Myosine et que l'activité normale de QkiA/C dans l'environnement n'est pas suffisante. (fig.6A). QkiA/C contrôlent donc des cibles exprimées par la cellule lente. Il ne s'agit pas forcément de composants intracellulaires. On peut parfaitement envisager qu'ils régulent les protéines d'adhésion impliquées dans la myofibrillogénèse, mais les cibles doivent être exprimées au minimum par les fibres lentes.

QkiA et C ne sont pas requis dans l'environnement des fibres musculaires lentes mais elles sont nécessaires à un niveau intracellulaire pour entrainer un programme de myofibrillogénèse complet. Ainsi, QkiA et QkiC sont requis dans la structuration des filaments épais des fibres lentes d'une manière cellulaire autonome.

A 24hpf, l'effet dose dépendant de l'injection des MO Quaking permet de découpler deux phénotypes « accumulation » de Myosine et « dissection » des filaments épais. Ces deux phénotypes pourraient être le résultat de la régulation d'une même cible mais en se rapportant à la littérature, les protéines Quaking ont potentiellement de nombreuses cibles impliquées dans des processus de maturation. Comment expliquer ces deux phénotypes ? Est ce que ces deux phénotypes sont indépendant ou existe t-il une hiérarchie fonctionnelle/temporelle entre eux ? En étudiant les phénotypes induits par la perte de fonction des Quaking nous cherchons à comprendre le processus « normal » de la myofibrillogénèse.

Le phénotype de dissection des filaments de épais sera discuté en premier puis nous nous intéresserons au phénotype d'accumulation de Myosine.

II-A Dissection / désolidarisation des filaments de Myosine à 24hpf.

A 24hpf, les fibres lentes sauvages présentent des sarcomères structurés. En coupe, les protéines de Myosine semblent superposées les unes sur les autres. Elles sont solidaires et ne forment qu'une seule myofibre au sein de la cellule musculaire lente. Les bandes-Z définissent les limites du sarcomère, elles sont droites et continues dans la hauteur de la fibre lente. Dans la littérature, la bande-Z est décrite comme la structure essentielle au maintien de la structure du sarcomère (cf. introduction et Frank, Kuhn, Katus, & Frey, 2006; Luther, 2009; J. M. Sanger & Sanger, 2008; Takahashi & Hattori, 1989). De plus il a été montré que les altérations des protéines liées directement ou indirectement à la bande-Z étaient responsables chez l'Homme de myopathies myofibrillaires présentant des caractéristiques semblables à celles des morphants QkiA/C. Comment expliquer structurellement le phénotype spécifique de dissection et de désolidarisation des filaments épais de Myosine induit par la double perte de QkiA/C à 24hpf? Nous proposons deux explications potentielles impliquant deux protéines liées directement à la bande-Z : l'α-Actinine 2 et la Titine.

La perte combinée de QkiA/C induit une altération sévère de la structure des sarcomères. En immunofluorescence, les filaments de Myosine semblent ne plus être liés dans l'épaisseur car les myofilaments sont disséqués et désolidarisés. De plus la matérialisation de la bande-Z par un marquage de l'α-Actinine 2, nous indique que la structure de la bande-Z est perturbée. L' α-Actinine 2 est exprimée de façon non localisée dans tout le cytoplasme à l'exception de quelques foci organisé en collier de perles. Ce marquage diffus pourrait représenter les protéines d'α-Actinine libres mais ne nous permet pas d'estimer le niveau d'expression de la protéine. Des expériences préliminaires ont été amorcées pour quantifier les protéines d'α-Actinine 2 sur western blot, elles seront terminées par le laboratoire. La microscopie électronique nous indique qu'au sein d'une même fibre lente, les bande-Z ne forme plus de bandes continues comme dans les embryons sauvages mais des bandes partielles, sous forme de petits cluster, moins dense aux électrons. Ces bandes-Z partielles sont incluses dans des myofibrilles très fines composés de 5 à 10 filaments superposés contre une cinquantaine dans les fibres sauvage à 24hpf. Au lieu de former une seule myofibre épaisse, ces fines myofibrilles sont désolidarisées les unes des autres. Les « mini-sarcomères » sont donc disséqués dans la hauteur et décalés dans la longueur (fig. 4E).
Très peu d'études ont été réalisées sur le rôle de l'α-Actinine dans la myofibrillogénèse. Seule l'isoforme d'α-Actinine 2 à été testée, sa perte de fonction indique une altération du

muscle squelettique et cardiaque ainsi qu'une réduction de mobilité dans embryons à 24hpf. Mais cette étude succincte ne montre pas l'état des fibres lentes en particulier (Gupta et al., 2012). Cependant les autres isoformes α-Actinine 3a et 3b sont exprimées de manière spécifiques dans les cellules adaxiales durant les débuts de myofibrillogénèse mais aucuns anticorps spécifiques de ces isoformes n'est disponible chez le poison zèbre à ces stades.
L'étude des autres protéines de la bande-Z permettrait de mieux caractériser le phénotype lié à la perte de QkiA/C. Ces autres protéines sont connues pour leurs implications dans des myopathies myofibrillaires, plus particulièrement α-Cristaline, la Myotiline, ZASP, la Desmine, BAG3 et la Téléthonine (Cf. introduction). Ces protéines sont en cours d'études dans le laboratoire, mais de la même manière aucuns d'anticorps dirigés contre ces protéines sont utilisables (à part la Desmine) à ce stade chez le poisson zèbre pour le moment.

Le phénotype de dissection des fibres lentes est associé à une altération de la bande-Z, ainsi nous proposons que les protéines Quaking puissent être impliquées dans la régulation de l'une des protéines constituant cette structure.

Nous proposons une explication alternative à ce phénotype de dissection en impliquant la protéine d'échafaudage du sarcomère : la Titine. C'est une protéine géante qui permet de relier directement les filaments de Myosine à la bande Z en s'accrochant à l'α-actinine, elle est décrite comme ayant un rôle essentiel dans le maintient de la structure du sarcomère.
L'altération de cette protéine géante pourrait expliquer la déstructuration des filaments de Myosine sans perturber la structure des filaments d'Actine (Yap & Bloch, 2011). De plus, il a été montré qu'un paralogue de la Titine chez la Drosophile (D-titin) serait régulé négativement par HOW (paralogue de Quaking) en fonction de la phosphorylation de ce dernier (Nir et al., 2012). De façon remarquable, les différentes isoformes de la Titine spécifiques au muscle squelettique (TtnA N2A et TtnB N2B) sont exprimées précocement au niveau des cellules adaxiales et du mésoderme présomitique comme QkiC en accord avec le rôle précoce de la Titine (figure supplémentaire 3A).

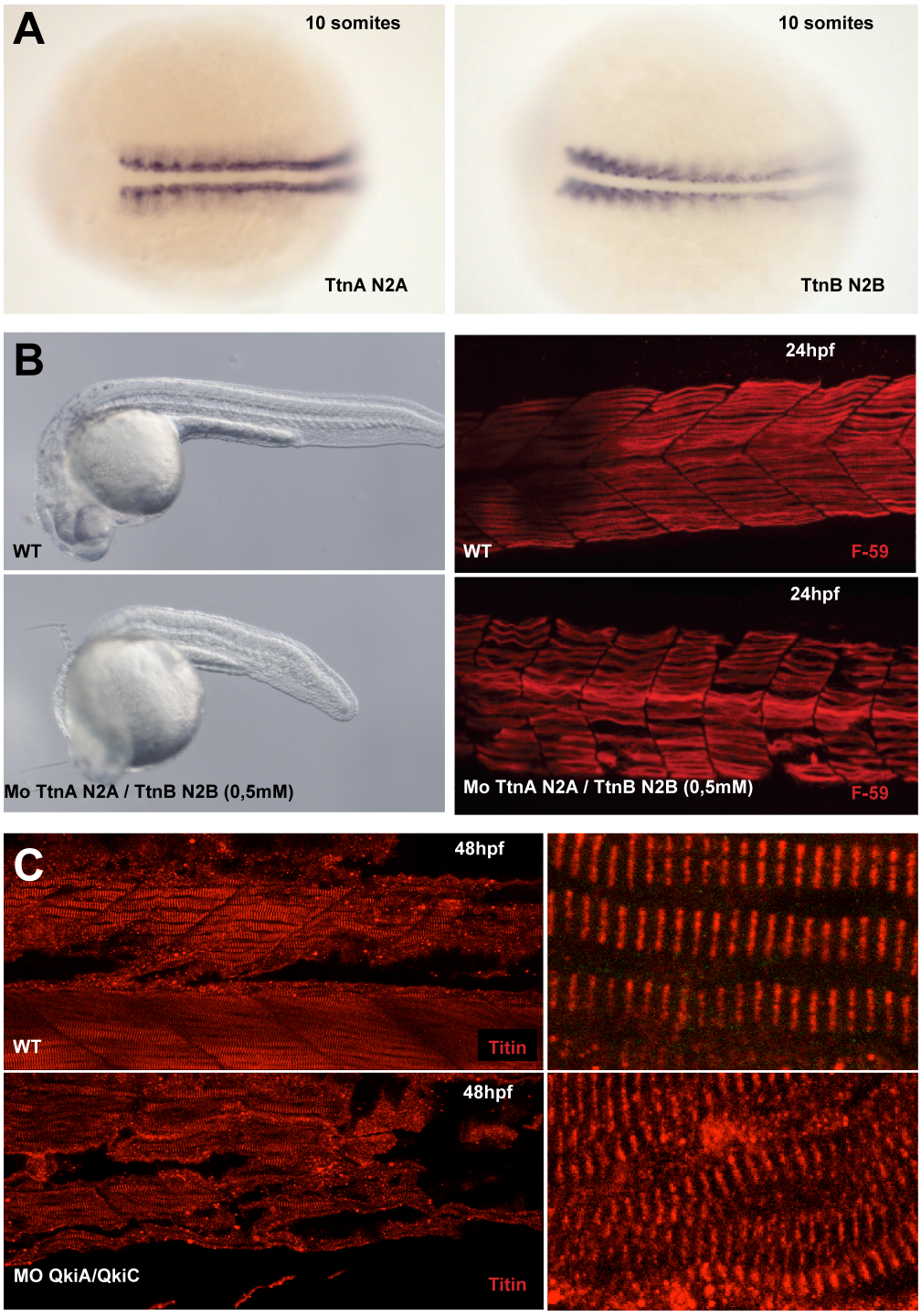


Figure supplémentaire 3 : la protéine géante Titine dans les fibres lentes.
A- L'expression *in situ* des isoformes spécifique au muscle lent de la Titine (TtnA N2A/ TtnB N2B) à 10 somites est restreinte au cellules adaxiales et au mésoderme présomitique. B- la perte de fonction des isoformes TtnA N2A/ TtnB N2B induit une désolidarisation des

filaments épais de Myosine dans les fibres lentes. Quelques fibres sont absentes et les somites perdent la forme caractéristique en « V » de leurs chevrons. La perte de fonction de QkiA et C induit une altération du marquage strié de la Titine dans les fibres lentes.

La perte de fonction conjointe des isoformes de Titine propres aux muscles squelettiques (MO TtnA N2A et MO TtnB N2B), induit des embryons présentant un phénotype de dissection des filaments de Myosine similaire à l'effet de la perte de fonction QkiA/C, sans aboutir à de véritables accumulations de Myosine aux extrémités de la fibre, ce qui offre la possibilité que la Titine soit régulée, directement ou indirectement par les protéines Quaking dans les fibres lentes (figure supplémentaire 3B). De plus, la perte de fonction de QkiA/C altère légèrement la structure de la Titine au niveau des fibres lentes à 48hpf mais nous n'observons pas, par immunohistochimie, d'augmentation significative de la Titine comme cela est prédît pour la Drosophile (figure supplémentaire 3C), ce qui est confirmé par des expériences de biochimie, la Titine étant reconnaissable par sa très haute taille sur gel d'agarose (donnée non publiées). Cependant, l'anticorps utilisé reconnaît un domaine commun à toute les isoformes de la Titine, il ne permet pas de visualiser spécifiquement les variations d'épissage. Cet anticorps révèle la Titine sur des stades tardif (48hpf), mais pas à 24hpf donc il se pourrait qu'une des isoformes de Titine soit dépendante de l'activité QKiA/C. En ce qui concerne un rôle potentiel des protéines Quaking sur l'épissage alternatif des transcrits de Titine, nous sommes limités par des contraintes techniques. En effet une étude des transcrits alternatifs de Titine semble difficilement envisageable au vue de la taille des ARN produits. Nos études préliminaires ne permettent pas de lier directement les protéines Quaking à une régulation de la Titine, mais cette protéine géante est difficilement étudiable à ces stades précoces et des études plus approfondies permettraient de statuer sur cette hypothèse.
Cependant, comme nous l'avons montré dans l'introduction, pour être effective la Titine nécessite un ancrage d'un coté à la bande-Z (via l'α-Actinine) et de l'autre coté aux filaments épais de Myosine (via la Myomésine). Une hypothèse indirecte impliquant une altération des structures d'ancrages de la Titine pourrait expliquer le phénotype de dissection des filaments de Myosine chez les double morphants QkiA/C :

→ L'altération des structures striées de la bande Z, en particulier de la bande-Z pourrait expliquer que la Titine ne trouve pas d'ancrage aux extrémités du sarcomère. Là encore les protéines impliquées myopathies myofibrillaires (la Téléthonine, BAG3, la Myotiline ou encore la α-Cristaline) doivent être testées.

→ Nous pouvons aussi mettre en cause la Myomésine, cette protéines très peu étudiée joue un double rôles au niveau des filaments épais (cf. introduction) En étant liée à la Myosine elle sert de point d'ancrage pour la Titine. De plus elle sert à lier les filaments de Myosine en épaisseur au niveau de la bande-M. Sans Myomésine les filaments de Myosine sont censés se désolidariser les uns aux autres. Une seule étude, chez le poisson zèbre, réalisée sur l'une des isoformes de la Myomésine (Myom3) ne montre pas de phénotype apparent, cependant de nombreuse isoformes de la Myomésine existent et elles n'ont jamais été testée . Une étude en cours au laboratoire va permettre de suivre l'expression des protéines Myomésine en fonction de l'activité de QkiA/C.

Les expériences préliminaires que nous avons menées chez le poisson zèbre ne nous permettent pas de savoir si le phénotype de dissection des fibres est dû à une dérégulation, directe ou indirecte, des isoformes de Titine par les protéines Quaking. Cependant, nous avons mis en lumière d'autres cibles potentielles directement liées aux Titines et connues pour être impliquées dans des myopathies myofibrillaires.

A 24hpf, en dehors du phénotype de dissection, on observe la formation de larges agrégats de Myosine aux extrémités des fibres lentes. Pour expliquer le phénotype d'accumulation de Myosine à 24hpf, nous avons souhaité savoir à partir de quand il était observable et analysé le rôle de QkiA/C durant les phases précoces de myofibrillogénèse.

II-B Accumulation de Myosine: retard d'initiation de la myofibrillogénèse ou conséquence de l'altération de la myofibrillogénèse ?

Les modèles théoriques expliquant les phases précoces de la myofibrillogénèse s'accordent sur le fait que l'Actine et la Myosine sont exprimées tôt dans les cellules cuboïdes du mésoderme présomitique. En fonction des modèles, l'assemblage des deux protéines serait direct (Epstein & Fischman, 1991; Holtzer et al., 1997; Lu et al., 1992; Nigel G. Laing, 2008; Pizon et al., 2002) ou indirect via la formation d'une prémyofibrilles d'Actine qui sert de matrice à l'incorporation de Myosine musculaire plus tardivement (J. W. Sanger et al., 2010). Cependant, dans l'état actuel de la recherche, l'incorporation directe ou indirecte des Myosines avec les filaments fins d'Actine n'a pas pu être décrite dans les embryons sauvages en somitogenèse (10somites). Des problèmes de résolution optique et le manque d'études de traçage des protéines *in vivo*, ne nous permet pas de favoriser l'un ou l'autre des modèles.

Lors de la perte conjointe de QkiA et QkiC, on observe dès les stades précoces de somitogenèse un problème de répartition des protéines de Myosine. Cependant, le profile d'expression des marqueurs précoces de la myogenèse (les MRF cf. introduction) ne semble pas altérés chez les doubles morphants (données non publiées), suggérant que les protéines Quaking agissent après l'engagement des cellules indifférenciée du mésoderme vers une voie myogénique.

Au stade 10 somites, les cellules adaxiales sauvages forment des structures filamenteuses de Myosine et d'Actine qui semble colocaliser. Contrairement aux embryons sauvages, les morphants QkiA/C expriment des protéines de Myosine qui restent dispersées sous forme de très fins agrégats dans le cytoplasme des cellules adaxiales alors que les filaments de d'Actine ne semblent pas affectés (fig. 5A/B). De plus, le marquage des Myosines musculaires ne semble plus « colocaliser » avec les filaments fins d'Actine en cours d'élongation, comme c'est le cas dans les embryons sauvages.

Pour confirmer cette analyse, nous avons procédé à des études de microscopie électronique. Dans des embryons sauvages à des stades précoces (stade 10 somites), on commence à observer des structures filamenteuses, par cette technique, dans les somites médians (5ème somite fig. 5C). A ce stade on ne peut cependant pas différencier les filaments épais des filaments fins . De plus, des expériences d' immunomarquages par billes d'or ont échouées, les traitements de marquage détériorant les tissus fragiles des jeunes embryons (données non publiées).
Quand l'activité de QkiA/C est réduite, les structures filamenteuses ne sont plus visibles. Les filaments d'Actine, seuls et isolés, sont beaucoup plus difficiles à détecter que les filaments épais de Myosine. Nous supposons donc que notre incapacité à observer des filaments est dûe à l'absence des filaments épais de Myosine qui créent le contraste (denses aux électrons) ou à leur incapacité à s'incorporer aux filaments fins d'Actine (fig. 5D).
De plus, nous n'avons pas réussi à observer les mini-agrégats de Myosine. Ces structures visibles en immunofluorescence sous forme de points dispersés dans les cellules adaxiales des doubles morphants à 10 somites, n'ont pas été détectées par microscopie électronique. Leur petite taille et leurs dispersions en font des structures difficilement identifiables.

Ainsi nous avons montré que QkiA et QkiC sont requis dès les premières phases de myofibrillogénèse dans les cellules adaxiales. Les protéines Quaking empêchent la formation des structures filamenteuses de Myosine tout en préservant celle d'Actine. A la lumière des modèles de myofibrillogénèse nous souhaitons donner deux

hypothèses alternatives permettant d'expliquer défauts de myofibrillogénèse précoces induit par la perte de fonction de QkiA et QkiC.

1 – Retard/ blocage de l'élongation des myofibrilles.

En conditions sauvages, nous pouvons observer que la Myosine et l'Actine forment des foyers d'accumulation durant les étapes précoces de somitogenèse aux extrémités des cellules adaxiales en cours d'élongation (fig. 5A). Ce phénotype sauvage est conservé vers 20hpf dans les fibres lentes des derniers somites en formation, ces fibres dont décrites par S. Hugues comme des fibres lentes immatures (Hinits & Hughes, 2011). Cette phase d'initiation proposée dans les modèles de myofibrillogénèse, serait essentielle à une croissance en longueur des myofibrilles (Epstein & Fischman, 1991; Holtzer et al., 1997; Lu et al., 1992; Nigel G. Laing, 2008; Pizon et al., 2002). Dans ce model, l'assemblage direct des éléments du sarcomère se ferait à partir de ce centre « organisateur » proche de la membrane plasmique. Cependant, très peu d'études n'expliquent la formation de ce centre organisateur.

L'accumulation d'Actine est conservée aux extrémités des cellules adaxiales chez les embryons morphants QkiA/C, de plus les filaments d'Actine commencent à polymériser. Cependant, les protéines de Myosine, reparties sous forme de petits agrégats dispersés à travers le cytoplasme ne se rejoignent pas encore aux extrémités des cellules adaxiales (Fig. 5B).

De façon remarquable, on retrouve des mini-agrégats de Myosine dans les cellules adaxiales cuboïdes (les plus postérieures) chez les embryons sauvages. Il semblerait que cette organisation dispersée des protéines de Myosine représente une forme initiale de répartition de la Myosine lors de la myofibrillogénèse (fig.5A). Dans cette hypothèse, il semblerait que les mini-agrégats de Myosine ne soient pas rapatriés vers les extrémités de la cellule adaxiale lorsque celle ci s'allonge et commence à créer des myofibrilles. La formation du centre « initiateur » serait alors bloquée/ ralentie lors de la double perte de fonction QkiA/C. Nous proposons donc que ce processus normal d'accumulation à la frontière dans les stades précoces de la myofibrillogénèse, soit bloqué/retardé en absence de QkiA/C et que l'accumulation des protéines de Myosine se fasse trop tard alors que le processus de polymérisation de l'Actine est déjà avancé. Ce qui permettrait d'expliquer qu'à 24hpf les filaments fins d'Actine soient en place, étendus de part et d'autre de la fibre lente et que la Myosine soit restée bloquée au stade de l'initiation sous forme d'agrégats. L'accumulation de Myosine serait alors un reliquat du centre « initiateur » de la myofibrillogénèse. Cette explication propose que les protéines Quaking soient impliquées

dans la mise en place d'un centre d'initiation aux extrémités de la cellule adaxiale permettant l'incorporation directe des Myosines aux filaments fins d'Actine.
Cependant pour consolider cette explication, certaines données nous manquent. Pour cela une méthode relativement simple consisterait à suivre, *in vivo* dans des conditions sauvages ou morphantes, les mouvement des mini-agrégats de Myosine afin d'imager l'accumulation précoce de la Myosine grâce à construction Myosine-GFP avec une meilleure résolution optique.

2- La myosine non incorporée à la prémyofibrille collapse secondairement sous forme d'agrégats

Si l'on se réfère au modèle théorique proposé par Sanger (J. W. Sanger et al., 2010), les prémyofibrilles (matrice composée de filaments d'Actine, de Myosine non musculaire et d'α-Actinine) se forment parallèlement aux protéines de Myosines au sein des cellules adaxiales. Un assemblage dynamique et indirect permettrait l'incorporation des Myosines dans la matrice d'Actine en remplaçant les Myosines non musculaire. Dans le modèle proposé par Sanger, l'intégration des Myosines se ferait à l'aide de la Titine, protéine géante de sarcomère qui joue un rôle structurant.
Chez les morphants QkiA/C, on observe des structures filamenteuses d'Actine, semblables aux prémyofibrilles proposées par Sanger, théoriquement composées d'Actine, de Myosine non musculaire et d'α-Actinine (fig. 5B). La double perte de fonction empêcherait la Myosine de s'intégrer, pour deux raisons possibles : soit la Myosine elle même est altérée et ne peut pas intégrer la matrice, soit la matrice est affectée, et empêche l'incorporation de la Myosine (Titine voir discussion II-A). Dans les deux cas, les protéines de Myosine seraient incapables d'intégrer la matrice et collapseraient sous forme d'agrégats aux extrémités cellulaires.
Pour tester cette hypothèse de non intégration des protéines de Myosine aux seins de la myofibrille, il serait intéressant de vérifier la capacité de la Myosine à intégrer les filaments d'Actine en utilisant encore une fois une construction Myosine-GFP, car la l'observation de la Titine n'est pas possible à l'heure actuelle à ce stade de développement.
Enfin, le rôle de la Myosine non musculaire n'a pas encore été approfondi *in vivo,* l'étude de sa substitution au profit de l'intégration de la Myosine musculaire viendrait enrichir nos hypothèses.

Pour conclure, nous avons observé une cohérence dans le comportement des Myosines et des filaments d'Actine entre les phénotypes précoces de myofibrillogénèse et les phénotypes « tardif » à 24hpf lié à la perte de fonction de QkiA/C. Cette perte de fonction ne semble pas

affecter la formation précoce des filaments d'Actine, tandis que les protéines de Myosine sont produites mais ne semblent pas être incorporée aux filaments fins (ou prémyofibrilles).
Nous proposons que l'accumulation de Myosine à 24hpf, soit due à un retard dans l'initiation de la myofibrillogénèse ou à une altération de l'incorporation de la Myosine musculaire.
Cependant, en l'état actuel de nos recherches, le manque de connaissance lié à l'initiation de la myofibrillogénèse ainsi que certaines limites expérimentales (comme le suivi *in vivo* des éléments du sarcomère) nous empêchent de suivre l'évolution du phénotype précoce. Nous ne pouvons donc pas affirmer que les phénotypes précoces et tardifs soient liés.

L'une des clefs permettant de statuer sur l'effet des protéines Quaking en début de myofibrillogénèse est l'observation *in vivo* des protéines élémentaires du sarcomère, en exprimant ces protéines avec un marqueur fluorescent sous un promoteur propre aux fibres lentes (le promoteur Smyhc par exemple), afin de suivre leurs assemblages précoces. Nous cherchons toujours à comprendre le rôle de Quaking dans les processus d'incorporation de la Myosine aux filaments d'Actine. La perte de fonction de Quaking A et C représente un véritable outil pour comprendre ces mécanismes précoces.

Le phénotype général de la double perte de fonction n'est pas forcement dû à la régulation d'une seule cible. Nous savons que les protéines Quaking peuvent cibler plusieurs ARNm et les réguler de différentes manières. Ces deux phénotypes peuvent être le résultat d'une combinaison de la régulation de plusieurs cibles, rendant le phénotype extrêmement complexe à étudier
Nous avons montré qu'il existe une interaction fonctionnelle entre les homologues QkiA et QkiC induisant à un phénotype nouveau dès les phases précoce de la myofibrillogénèse au niveau des cellules adaxiales. Comment expliquer cette interaction fonctionnelle chez le poisson zèbre?

III Interactions moléculaire entre QkiA et QkiC.

Chez la Souris et la Drosophile, les protéines Quaking sont présentes sous trois isoformes majoritaires dont une est nucléaire (Qki5/ HOW-L) et les deux autres sont à la fois cytoplasmiques et nucléaires (Qki6-7/ HOW-M-S). Cette localisation spécifique est conservée chez le poisson zèbre avec une protéine QkiA nucléaire et une protéine QkiC à la fois nucléaire et cytoplasmique (expériences de co-localisation avec un marquage nucléaire, données non publiées). En accord avec la littérature en fonction de leur localisation, les isoformes nucléaires et cytoplasmiques jouent des rôles différents. La localisation subcellulaire semble être déterminante dans les processus de développement et de

maturation des oligodendrocytes murins (Hardy et al., 1996 ; Larocque and Richard 2005 ; Larocque et al., 2002; Z. Li et al., 2000) ou au niveau de la maturation des jonctions myotendineuse (Volk, 2010).
De plus, QkiA et QkiC possèdent un domaine de liaison aux ARN similaire, en témoigne le motif ARN commun reconnue par les protéines Quaking (QRE), suggérant que ces deux homologues ont des cibles communes.
Enfin, les protéines Quaking ont une capacité à interagir avec leurs homologues via leurs domaines d'homo/hétéro-dimérisation : QUA1 (cf. introduction et Teplova et al., 2013). Peu d'études ont été réalisées sur le rôle de l'hétérodimérisation des isoformes Quaking. L'altération du domaine QUA1 (mutant Qkk $^{t3/t4}$) empêche la dimérisation de protéines Quaking et induit un phénotype de malformation cardiaque qui est létal pour l'embryon (Chénard & Richard, 2008).

A partir de la littérature, trois hypothèses permettraient d'expliquer l'interaction fonctionnelle entre QkiA et QkiC :
- QkiA et QkiC agissent ensemble faiblement sur la même cible.
- QkiA et QkiC agissent de manière parallèle sur des cibles différentes.
- QkiA et QkiC interagissent pour former des hétérodimères.

→Des expériences de sauvetage croisés on été réalisées pour tester l'action redondante des homologue. Si QkiA et QkiC agissent faiblement sur les mêmes cibles, la perte de fonction de l'un devrait être sauvé par la surexpression de l'autre. L'injection de l'ARN qkiC dans un morphants QkiA ne permet pas de sauver le phénotype de ce mutant. L'expérience inverse n'est pas informative, car la perte de fonction de QkiC n'a pas de phénotype (données non publiées). Sachant que QkiC ne peut pas se substituer à QkiA, nous pouvons éliminer la le fait que QkiA et QkiC agissent de la même manière sur la même cible.
Cependant, il se peut que les deux isoformes aient une action différente sur la même cible en fonction de leur localisation subcellulaire : ainsi QkiA pourrait créer une rétention nucléaire de la cible avant la myofibrillogénèse (expression de QkiA plus précoces que celles de QkiC) puis l'isoforme cytoplasmique QkiC viendrait stabiliser (ou transporter) cette cible nécessaire à la myofibrillogénèse. La perte de l'une ou de l'autre des régulations n'empêcherait pas totalement la myofibrillogénèse de se dérouler mais la perte des deux régulations rendrait impossible l'expression de la cible durant l'étape d'amorce de la myofibrillogénèse.
Cette hypothèse offre un approche très similaire à ce qui à été montré pour l'ARN de MBP dans la maturation des oligodendrocytes Murins (rétention de la cible dans le noyau par Qki-5 et stabilisation/transport cytoplasmique par Qki-6 pendant les stades de maturations (cf.

introduction et Doukhanine et al.,2010) et dans ce cas l'interaction est beaucoup plus difficile à montrer.

→La seconde hypothèse est basée sur le fait que les deux homologues puissent réguler des cibles différentes liées à la myofibrillogénèse, la dérégulation d'une seule cible aurait peu ou pas d'effet mais si ces deux cibles différente sont dérégulées en même temps le processus de myofibrillogénèse serait altéré/bloqué.

→ Enfin la dernière proposition repose sur le fait que les protéines Quaking sont capables de s'hétérodimériser grâce à leurs domaines QUA1. Selon la littérature, les protéines Quaking peuvent avoir des cibles spécifiques propres aux dimères qui pourraient expliquer le phénotype spécifique de double morphants (Pilotte, Larocque, & Richard, 2001; Zorn & Krieg, 1997). De plus, il a été montré que l'hétérodimérisation de l'isoforme Qki7 (majoritairement cytoplasmique comme Qki6) permettait sa translocation dans le noyau ce qui pourrait expliqué la régulation de nouvelles cibles impliquées dans la myofibrillogénèse (Pilotte, Larocque, & Richard, 2001).
Afin de montrer une potentielle interaction physique entre les deux homologues, des expériences de co-immunoprécipitation sont en cours de développement.
D'autre part, une série de mutation ciblée dans le domaine QUA1 pourrait mettre en valeur la nécessité de l'hétérodimérisation dans la régulation les processus de myofibrillogénèse. Mais la fonctionnalité de l' hétérodimérisation ne peut être étudiée que par rapport aux cibles directs impliquées dans la myofribrillogenèse. Dans une perspective future, il faut donc se focaliser directement sur les cibles des protéines Quaking. Pour cela trois techniques ont été envisagées :
- Analyse du niveau de régulation des ARN totaux par RNA sequencing. En comparant le niveau l'expression des ARN du double morphants aux embryons sauvages (ou injectés avec un morpholino contrôle) mais ce type d'experience rique de générer trop d'information, difficilement exploiable.
- Afin d'avoir une approche plus directe, la technique de CLIP-sequencing (cross-linking immunoprecipitation-high-throughput sequencing) pourrait être utilisée pour trouver les ARN cibles avec lesquelles les protéines Quaking se lient.
- Une dernière technique consisterait à rechercher *in silico* des cibles potentielles des protéines Quaking. Le motif ARN reconnu par les Quaking (QRE) à été identifié à travers différentes études. Il semble que ce motif soit conservé au cours de l'évolution (cf. introduction). Cependant, la séquence du QRE et l'agencement des deux motifs reconnus permettent de nombreuses combinaisons possibles. Pour avoir été testée, Cette technique

est risquée car elle engendre beaucoup de cible potentielles, sans que ce soit des cibles effective.

IV Ouverture vers ulegenden model de myopathie myofibrillaire.

A ce jour, seule la perte de fonction des isoformes Mef2 C/D semble induire un phénotype cellulaire autonome, similaire à celui lié à la perte de fonction combinée de QkiA/C, caractérisé par une accumulation des protéines de Myosine ainsi qu'un affinement des filaments épais accompagné d'une perte de motilité (Hinits & Hughes, 2011). De plus, des études préliminaires montrent une perturbation précoce de la myofibrillogénèse chez les morphants Mef2C/D, similaire à celle induite par la perte de fonction de QkiA/C. Ces données suggéraient fortement un mécanisme commun de régulation de la myofibrillogénèse. Cependant, nous avons montré que les deux groupes de protéines agissaient de manière indépendante : la perte de fonction de Mef2C/D ne semble pas altérer l'expression des protéines QkiA et QkiC. De la même manière, chez les morphants QkiA/C, l'expression des protéines Mef2 ne semble pas être affectées. Cependant nous devons noter que, faute d'anticorps spécifiques pour les isoformes Mef2 C et D nous avons utilisé un anticorps reconnaissant toutes les isoformes Mef2 (fig. 7). Enfin des expériences préliminaires montrent une absence de sauvetage du morphants Mef2C/D par les ARN QkiA/C, cohérent avec les expériences précédentes de perte de fonction (données non publiées).

Malgré la similarité de leurs phénotypes, aucunes relations épistatiques n'ont été révélées. Cependant un travail plus approfondi sur le phénotype précoce des morphants Mef2CD serait nécessaire pour affiner le degré de similitude entre les deux mécanismes ainsi que la comparaison des cibles transcriptomes des deux types de morphants.

Ces résultats indiquent qu'au moins deux mécanismes parallèles sont impliqués dans la mise en place de la myofibrillogénèse précoce après l'engagement des précurseurs musculaires lents dans leur voie myogénique. La myofibrillogénèse semble être un processus hautement complexe, régulée par de nombreux mécanismes encore mal connus. Autant de mécanismes qui peuvent potentiellement être sujets à des mutations affectant la myofibrillogénèse.

De manière remarquable, la désorganisation du réseau de myofibrille et l'accumulation de nombreuses protéines à l'intérieur de la cellule musculaire associé à un affaiblissement leurs contractions sont les principales caractéristiques des myopathies myofibrillaires chez

l'Homme (Claeys & Fardeau, 2013; Ferrer & Olivé, 2008; A. Ruparelia et al., 2012; Vicart, O. Agbulut et P., 2013).
Le concept de Myopathies Myofibrillaire (MMF) est récent (1996), Il recouvre actuellement 6 types de déficits moléculaires distincts connus : déficit primaire en Desmine, déficit en alpha-B-Cristalline, déficit en Myotiline, déficit en protéines ZASP, déficit en Filamine C et le déficit en protéines BAG 3 (cf. introduction). Pour environs la moitié des personnes atteintes de MMF aucune anomalie génétique n'a encore été mise en évidence, il reste donc d'autre anomalies en jeu qui restent à découvrir (communiqué AFM – Téléthon 2012).
L'altération de bande-Z et la présence d'agrégats semblent être deux phénotypes communs à toutes ces maladies.

Selon les études pathologiques menées ces deux dernières années, il est nécessaire de développer des modèles de MMF et de préciser le rôle pathologique de ces agrégats.

L'étude de modèles cellulaires et animaux a montré que cette accumulation de protéines se fait sous forme d'agrégats insolubles. La présence de ces agrégats semble jouer un rôle important dans la survenue de la maladie. Chez l'Homme, ces agrégats renferment non seulement des protéines directement impliquées dans les myopathies myofibrillaires (Desmine, alpha-B- Cristalline...), mais aussi d'autres protéines très diverses: protéines du cytosquelette et des myofibrilles, protéines du noyau, protéines chaperonnes, protéines du stress oxydatif, protéines du système de dégradation protéasome-ubiquitine.

Différents modèles cellulaires et animaux, notamment des modèles cellulaires et/ou des souris déficitaires dans chacune des protéines impliquées dans les myopathies myofibrillaires, ont été développés pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces pathologies et plus particulièrement leur rôle dans la structure et la stabilisation de la bande-Z (communiqué AFM – Téléthon 2012). Cependant d'autres modèles sont nécessaires afin de trouver d'autres gènes impliqués dans ces maladies et de comprendre les mécanismes impliqués dans la myofibrillogénèse précoces.

Avec son développement externe et précoce le poisson zèbre fait un excellent model pour étudier ces MMF (Richard, 2010). De plus les mécanismes impliqués dans la myogenèse ainsi que les protéines sont largement conservé au cours de l'évolution. Enfin, les phénotypes décris chez les patients atteint de MMF sont similaires à ceux étudier dans cette étude. Ainsi, nous pourrions proposer la double perte de fonction de QkiA et QkiC comme model potentiel afin d'étudier les Myopathies Myofibrillaires, créant un paradigme dans lequel de nouveaux acteurs impliqués dans les MMF pourraient être mis en lumière.

A. G. Engel, C. F.-A. (2004). In myology. *K. North*.

Aberg, K., Saetre, P., Lindholm, E., Ekholm, B., Pettersson, U., Adolfsson, R., & Jazin, E. (2006). Human QKI, a new candidate gene for schizophrenia involved in myelination. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, *141B*(1), 84–90. doi:10.1002/ajmg.b.30243

Agathon, A., Thisse, C., & Thisse, B. (2003). The molecular nature of the zebrafish tail organizer. *Nature*, *424*(6947), 448–52. doi:10.1038/nature01822

Amacher, S. L., & Kimmel, C. B. (1998). Promoting notochord fate and repressing muscle development in zebrafish axial mesoderm. *Development (Cambridge, England)*, *125*(8), 1397–406. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9502721

Avnika A Ruparelia, R. J. B.-R. (2012). Characterization and Investigation of zebrafish models of Filamin related myofibrillar myopathy. *HMG Advance Access*.

Baehrecke, E. H. (1997). who encodes a KH RNA binding protein that functions in muscle development. *Development (Cambridge, England)*, *124*(7), 1323–32. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9118803

Barresi, M. J., D'Angelo, J. A., Hernández, L. P., & Devoto, S. H. (2001). Distinct mechanisms regulate slow-muscle development. *Curr Biol*, *11*(18), 1432–1438.

Barresi, M. J. F., Angelo, J. A. D., Herna, L. P., & Devoto, S. H. (n.d.). Distinct mechanisms regulate slow-muscle development ´ ndez, 1432–1438.

Barrios, A., Poole, R. J., Durbin, L., Brennan, C., Holder, N., & Wilson, S. W. (2003). Eph/Ephrin signaling regulates the mesenchymal-to-epithelial transition of the paraxial mesoderm during somite morphogenesis. *Current biology : CB*, *13*(18), 1571–82. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13678588

Bassett, D. I., & Currie, P. D. (2003). The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Human molecular genetics*, *12 Spec No*(2), R265–70. doi:10.1093/hmg/ddg279

Bénazéraf, B., & Pourquié, O. (2013). Formation and segmentation of the vertebrate body axis. *Annual review of cell and developmental biology*, *29*, 1–26. doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155703

Bird, N. C., Windner, S. E., & Devoto, S. H. (2012). Myogenesis. (J. X. DiMario, Ed.), *798*. doi:10.1007/978-1-61779-343-1

Buckingham, M., & Relaix, F. (2007). The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annual review of cell and developmental biology*, *23*, 645–73. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123438

Charlet-B, N., Logan, P., Singh, G., & Cooper, T. a. (2002). Dynamic antagonism between ETR-3 and PTB regulates cell type-specific alternative splicing. *Molecular cell*, *9*(3), 649–58. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11931771

Chen, A.-J., Paik, J.-H., Zhang, H., Shukla, S. a, Mortensen, R., Hu, J., … Depinho, R. a. (2012). STAR RNA-binding protein Quaking suppresses cancer via stabilization of specific miRNA. *Genes & development*, *26*(13), 1459–72. doi:10.1101/gad.189001.112

Chen, T., Damaj, B. B., Herrera, C., Lasko, P., & Richard, S. (1997). Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain. *Molecular and cellular biology*, *17*(10), 5707–18. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232419&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Chen, T., & Richard, S. (1998). Structure-function analysis of Qk1: a lethal point mutation in mouse quaking prevents homodimerization. *Molecular and cellular biology*, *18*(8), 4863–71. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109071&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Chénard, C. A., & Richard, S. (2008). New implications for the QUAKING RNA binding protein in human disease. *J Neurosci Res*, *86*(2), 233–242. doi:10.1002/jnr.21485

Claeys, K. G., & Fardeau, M. (2013). Myofibrillar myopathies. *Handbook of clinical neurology*, *113*, 1337–42. doi:10.1016/B978-0-444-59565-2.00005-8

Cooke, J. (1975). Control of somite number during morphogenesis of a vertebrate, Xenopus laevis. *Nature*, *254*(5497), 196–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1113883

Cooke, J. (1981). The problem of periodic patterns in embryos. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *295*(1078), 509–24. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6117908

Cortés, F., Daggett, D., Bryson-Richardson, R. J., Neyt, C., Maule, J., Gautier, P., … Currie, P. D. (2003). Cadherin-mediated differential cell adhesion controls slow muscle cell migration in the developing zebrafish myotome. *Developmental cell*, *5*(6), 865–76. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14667409

Côté, J., Boisvert, F.-M., Boulanger, M.-C., Bedford, M. T., & Richard, S. (2003). Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Molecular biology of the cell*, *14*(1), 274–87. doi:10.1091/mbc.E02-08-0484

Coutelle, O., Blagden, C. S., Hampson, R., Halai, C., Rigby, P. W., & Hughes, S. M. (2001). Hedgehog signalling is required for maintenance of myf5 and myoD expression and timely terminal differentiation in zebrafish adaxial myogenesis. *Developmental biology*, *236*(1), 136–50. doi:10.1006/dbio.2001.0193

Crawford, B. D., Henry, C. A., Clason, T. A., Becker, A. L., & Hille, M. B. (2003a). Activity and Distribution of Paxillin , Focal Adhesion Kinase , and Cadherin Indicate Cooperative Roles during Zebrafish Morphogenesis, *14*(August), 3065–3081. doi:10.1091/mbc.E02

Crawford, B. D., Henry, C. A., Clason, T. A., Becker, A. L., & Hille, M. B. (2003b). Activity and distribution of paxillin, focal adhesion kinase, and cadherin indicate cooperative roles during zebrafish morphogenesis. *Molecular biology of the cell*, *14*(8), 3065–81. doi:10.1091/mbc.E02-08-0537

Daggett, D. F., Domingo, C. R., Currie, P. D., & Amacher, S. L. (2007). Control of morphogenetic cell movements in the early zebrafish myotome. *Developmental biology*, *309*(2), 169–79. doi:10.1016/j.ydbio.2007.06.008

Dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V, Tsubakihara, M., Berry, D. A., & Nosworthy, N. J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological reviews*, *83*(2), 433–73. doi:10.1152/physrev.00026.2002

Doukhanine, E., Gavino, C., Haines, J. D., & Almazan, G. (2010). The QKI-6 RNA Binding Protein Regulates Actin-interacting Protein-1 mRNA Stability during Oligodendrocyte Differentiation, *21*, 3029–3040. doi:10.1091/mbc.E10

Draper, B. W., Stock, D. W., & Kimmel, C. B. (2003). Zebrafish fgf24 functions with fgf8 to promote posterior mesodermal development. *Development (Cambridge, England)*, *130*(19), 4639–54. doi:10.1242/dev.00671

Du, A., Sanger, J. M., Linask, K. K., & Sanger, J. W. (2003). Myofibrillogenesis in the first cardiomyocytes formed from isolated quail precardiac mesoderm. *Developmental biology*, *257*(2), 382–94. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12729566

Ebersole, T. A., Chen, Q., Justice, M. J., & Artzt, K. (1996). The quaking gene product necessary in embryogenesis and myelination combines features of RNA binding and signal transduction proteins. *Nature genetics*, *12*(3), 260–5. doi:10.1038/ng0396-260

Elworthy, S., Hargrave, M., Knight, R., Mebus, K., & Ingham, P. W. (2008). Expression of multiple slow myosin heavy chain genes reveals a diversity of zebrafish slow twitch muscle fibres with differing requirements for Hedgehog and Prdm1 activity. *Development*, *135*(12), 2115–2126. doi:10.1242/dev.015719

Epstein, H. F., & Fischman, D. A. (1991). Molecular analysis of protein assembly in muscle development. *Science (New York, N.Y.)*, *251*(4997), 1039–44. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1998120

Etard, C., Roostalu, U., & Strähle, U. (2008). Shuttling of the chaperones Unc45b and Hsp90a between the A band and the Z line of the myofibril. *The Journal of cell biology*, *180*(6), 1163–75. doi:10.1083/jcb.200709128

Faulkner, G., Pallavicini, a, Comelli, a, Salamon, M., Bortoletto, G., Ievolella, C., … Lanfranchi, G. (2000). FATZ, a filamin-, actinin-, and telethonin-binding protein of the Z-disc of skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*, *275*(52), 41234–42. doi:10.1074/jbc.M007493200

Ferrer, I., & Olivé, M. (2008). Molecular pathology of myofibrillar myopathies. *Expert reviews in molecular medicine*, *10*, e25. doi:10.1017/S1462399408000793

Foley, J. E., Maeder, M. L., Pearlberg, J., Joung, J. K., Peterson, R. T., & Yeh, J.-R. J. (2009). Targeted mutagenesis in zebrafish using customized zinc-finger nucleases. *Nature protocols*, *4*(12), 1855–67. doi:10.1038/nprot.2009.209

Frank, D., Kuhn, C., Katus, H. a, & Frey, N. (2006). The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, *84*(6), 446–68. doi:10.1007/s00109-005-0033-1

Fujita, M., Mitsuhashi, H., Isogai, S., Nakata, T., Kawakami, A., Nonaka, I., … Kudo, A. (2012). Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant zacro. *Developmental biology*, *361*(1), 79–89. doi:10.1016/j.ydbio.2011.10.008

Fürthauer, M., Van Celst, J., Thisse, C., & Thisse, B. (2004). Fgf signalling controls the dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development (Cambridge, England)*, *131*(12), 2853–64. doi:10.1242/dev.01156

Galarneau, A., & Richard, S. (2005a). Target RNA motif and target mRNAs of the Quaking STAR protein. *Nature structural & molecular biology*, *12*(8), 691–8. doi:10.1038/nsmb963

Galarneau, A., & Richard, S. (2005b). Target RNA motif and target mRNAs of the Quaking STAR protein. *Nature structural & molecular biology*, *12*(8), 691–8. doi:10.1038/nsmb963

Garvey, S. M., Miller, S. E., Claflin, D. R., Faulkner, J. A., & Hauser, M. A. (2006). Transgenic mice expressing the myotilin T57I mutation unite the pathology associated with LGMD1A and MFM. *Human molecular genetics*, *15*(15), 2348–62. doi:10.1093/hmg/ddl160

Gooding, C., Roberts, G. C., Smith, C. W., Gooding, C., Roberts, G. C., & Smith, C. W. J. (1998). Role of an inhibitory pyrimidine element and polypyrimidine tract binding protein in repression of a regulated alpha-tropomyosin exon . Role of an inhibitory pyrimidine element and polypyrimidine tract binding protein in repression of a regulated a -tropo, 85–100.

Gregorio, C. C., Granzier, H., Sorimachi, H., & Labeit, S. (1999). Muscle assembly: a titanic achievement? *Current opinion in cell biology*, *11*(1), 18–25. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10047523

Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Thomson, C., Vouyiouklis, D., & Nave, K. A. (1998). Current concepts of PLP and its role in the nervous system. *Microscopy research and technique*, *41*(5), 344–58. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19980601)41:5<344::AID-JEMT2>3.0.CO;2-Q

Gros, J., Manceau, M., Thomé, V., & Marcelle, C. (2005). A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature*, *435*(7044), 954–8. doi:10.1038/nature03572

Gupta, V., Discenza, M., Guyon, J. R., Kunkel, L. M., & Beggs, A. H. (2012). α-Actinin-2 deficiency results in sarcomeric defects in zebrafish that cannot be rescued by α-actinin-3 revealing functional differences between sarcomeric isoforms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *26*(5), 1892–908. doi:10.1096/fj.11-194548

Hall, M. P., Nagel, R. J., Fagg, W. S., Shiue, L., Cline, M. S., Perriman, R. J., … Ares, M. (2013). Quaking and PTB control overlapping splicing regulatory networks during muscle cell differentiation. *RNA (New York, N.Y.)*, *19*(5), 627–38. doi:10.1261/rna.038422.113

Hammond, C. L., Hinits, Y., Osborn, D. P. S., Minchin, J. E. N., Tettamanti, G., & Hughes, S. M. (2007). Signals and myogenic regulatory factors restrict pax3 and pax7 expression to dermomyotome-like tissue in zebrafish. *Dev Biol*, *302*(2), 504–521. doi:10.1016/j.ydbio.2006.10.009

Hardy, R. J., Loushin, C. L., Friedrich, V. L., Chen, Q., Ebersole, T. A., Lazzarini, R. A., & Artzt, K. (1996). Neural cell type-specific expression of QKI proteins is altered in quakingviable mutant mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *16*(24), 7941–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8987822

Haroutunian, V., Katsel, P., Dracheva, S., & Davis, K. L. (2006). The human homolog of the QKI gene affected in the severe dysmyelination “quaking” mouse phenotype: downregulated in multiple brain regions in schizophrenia. *The American journal of psychiatry*, *163*(10), 1834–7. doi:10.1176/appi.ajp.163.10.1834

Hein, S., & Schaper, J. (2002). Weakness of a giant: mutations of the sarcomeric protein titin. *Trends in molecular medicine*, *8*(7), 311–3. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12114104

Henry, C A, Crawford, B. D., Yan, Y. L., Postlethwait, J., Cooper, M. S., & Hille, M. B. (2001). Roles for zebrafish focal adhesion kinase in notochord and somite morphogenesis. *Developmental biology*, *240*(2), 474–87. doi:10.1006/dbio.2001.0467

Henry, C. a, McNulty, I. M., Durst, W. a, Munchel, S. E., & Amacher, S. L. (2005). Interactions between muscle fibers and segment boundaries in zebrafish. *Developmental biology*, *287*(2), 346–60. doi:10.1016/j.ydbio.2005.08.049

Henry, Clarissa A, & Amacher, S. L. (2004). Zebrafish slow muscle cell migration induces a wave of fast muscle morphogenesis. *Developmental cell*, *7*(6), 917–23. doi:10.1016/j.devcel.2004.09.017

Henry, Clarissa A, McNulty, I. M., Durst, W. A., Munchel, S. E., & Amacher, S. L. (2005). Interactions between muscle fibers and segment boundaries in zebrafish. *Dev Biol*, *287*(2), 346–360. doi:10.1016/j.ydbio.2005.08.049

Hinits, Y., & Hughes, S. M. (2011). Mef2s are required for thick filament formation in nascent muscle fibres, *134*(13), 2511–2519. doi:10.1242/dev.007088.Mef2s

Hirsinger, E., Stellabotte, F., Devoto, S. H., & Westerfield, M. (2004). Hedgehog signaling is required for commitment but not initial induction of slow muscle precursors. *Dev Biol*, *275*(1), 143–157. doi:10.1016/j.ydbio.2004.07.030

Holley, S. A. (2006). Anterior-posterior differences in vertebrate segments: specification of trunk and tail somites in the zebrafish blastula. *Genes & development*, *20*(14), 1831–7. doi:10.1101/gad.1453706

Holley, S. A. (2007). The genetics and embryology of zebrafish metamerism. *Dev Dyn*, *236*(6), 1422–1449. doi:10.1002/dvdy.21162

Holterhoff, C. K., Saunders, R. H., Brito, E. E., & Wagner, D. S. (2010). family reveals conservation and diversification among vertebrates, *238*(11), 2936–2947. doi:10.1002/dvdy.22123.Sequence

Holtzer, H., Hijikata, T., Lin, Z. X., Zhang, Z. Q., Holtzer, S., Protasi, F., … Sweeney, H. L. (1997). Independent assembly of 1.6 microns long bipolar MHC filaments and I-Z-I bodies. *Cell structure and function*, *22*(1), 83–93. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9113394

Itoh-Satoh, M., Hayashi, T., Nishi, H., Koga, Y., Arimura, T., Koyanagi, T., … Kimura, A. (2002). Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochemical and biophysical research communications*, *291*(2), 385–93. doi:10.1006/bbrc.2002.6448

Jiang, L., Saetre, P., Radomska, K. J., Jazin, E., & Lindholm Carlström, E. (2010). QKI-7 regulates expression of interferon-related genes in human astrocyte glioma cells. *PloS one*, *5*(9). doi:10.1371/journal.pone.0013079

Jülich, D., Geisler, R., & Holley, S. A. (2005). Integrinalpha5 and delta/notch signaling have complementary spatiotemporal requirements during zebrafish somitogenesis. *Developmental cell*, *8*(4), 575–86. doi:10.1016/j.devcel.2005.01.016

Justice, M J, & Bode, V. C. (1988). Three ENU-induced alleles of the murine quaking locus are recessive embryonic lethal mutations. *Genetical research*, *51*(2), 95–102. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3410318

Justice, Monica J, & Hirschi, K. K. (2010). The role of quaking in mammalian embryonic development. *Advances in experimental medicine and biology*, *693*, 82–92. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21189687

Kimmel, C. B., Warga, R. M., & Schilling, T. F. (1990). Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development (Cambridge, England)*, *108*(4), 581–94. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2387237

Knöll, R., Buyandelger, B., & Lab, M. (2011). The sarcomeric Z-disc and Z-discopathies. *Journal of biomedicine & biotechnology*, *2011*(iii), 569628. doi:10.1155/2011/569628

Lange, S., Ehler, E., & Gautel, M. (2006). From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends in cell biology*, *16*(1), 11–8. doi:10.1016/j.tcb.2005.11.007

Larocque, D., Pilotte, J., Chen, T., Cloutier, F., Massie, B., Pedraza, L., … Richard, S. (2002). Nuclear retention of MBP mRNAs in the quaking viable mice. *Neuron*, *36*(5), 815–29. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12467586

Lewis, H. a, Musunuru, K., Jensen, K. B., Edo, C., Chen, H., Darnell, R. B., & Burley, S. K. (2000). Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome. *Cell*, *100*(3), 323–32. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676814

Li, L., Cserjesi, P., & Olson, E. N. (1995). Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis. *Developmental biology*, *172*(1), 280–92. doi:10.1006/dbio.1995.0023

Li, Z., Zhang, Y., Li, D., & Feng, Y. (2000). Destabilization and mislocalization of myelin basic protein mRNAs in quaking dysmyelination lacking the QKI RNA-binding proteins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *20*(13), 4944–53. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10864952

Littlefield, R., Almenar-Queralt, A., & Fowler, V. M. (2001). Actin dynamics at pointed ends regulates thin filament length in striated muscle. *Nature cell biology*, *3*(6), 544–51. doi:10.1038/35078517

Liu, Z., Luyten, I., Bottomley, M. J., Messias, a C., Houngninou-Molango, S., Sprangers, R., … Sattler, M. (2001). Structural basis for recognition of the intron branch site RNA by splicing factor 1. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5544), 1098–102. doi:10.1126/science.1064719

Lobbardi, R., Lambert, G., Zhao, J., Geisler, R., Kim, H. R., & Rosa, F. M. (2011). Fine-tuning of Hh signaling by the RNA-binding protein Quaking to control muscle development. *Development (Cambridge, England)*, *138*(9), 1783–94. doi:10.1242/dev.059121

Lu, M. H., DiLullo, C., Schultheiss, T., Holtzer, S., Murray, J. M., Choi, J., … Holtzer, H. (1992). The vinculin/sarcomeric-alpha-actinin/alpha-actin nexus in cultured cardiac myocytes. *The Journal of cell biology*, *117*(5), 1007–22. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2289484&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Lukong, K. E., & Richard, S. (2003). Sam68, the KH domain-containing superSTAR. *Biochimica et biophysica acta*, *1653*(2), 73–86. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643926

Luther, P. K. (2009). The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *Journal of muscle research and cell motility*, *30*(5-6), 171–85. doi:10.1007/s10974-009-9189-6

Maguire, M. L., Guler-Gane, G., Nietlispach, D., Raine, A. R. C., Zorn, A. M., Standart, N., & Broadhurst, R. W. (2005). Solution structure and backbone dynamics of the KH-QUA2 region of the Xenopus STAR/GSG quaking protein. *Journal of molecular biology*, *348*(2), 265–79. doi:10.1016/j.jmb.2005.02.058

Moreira, E. S., Wiltshire, T. J., Faulkner, G., Nilforoushan, A., Vainzof, M., Suzuki, O. T., … Jenne, D. E. (2000). Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nature genetics*, *24*(2), 163–6. doi:10.1038/72822

Musco, G., Stier, G., Joseph, C., Castiglione Morelli, M. a, Nilges, M., Gibson, T. J., & Pastore, a. (1996). Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell*, *85*(2), 237–45. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8612276

Myers, D. C., Sepich, D. S., & Solnica-Krezel, L. (2002). Convergence and extension in vertebrate gastrulae: cell movements according to or in search of identity? *Trends in genetics : TIG*, *18*(9), 447–55. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12175805

Nigel G. Laing, P. (2008). The Sarcomere and Skeletal Muscle Disease.

Nir, R., Grossman, R., Paroush, Z., & Volk, T. (2012). Phosphorylation of the Drosophila melanogaster RNA-binding protein HOW by MAPK/ERK enhances its dimerization and activity. *PLoS genetics*, *8*(3), e1002632. doi:10.1371/journal.pgen.1002632

Ornstein, P. H., & Goldberg, A. (200AD). Psychoanalysis and medicine. I. Contributions to psychiatry, psychosomatic medicine and medical psychology. *Diseases of the nervous system*, *34*(4), 143–7. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4711882

Pappas, C. T., Bhattacharya, N., Cooper, J. A., & Gregorio, C. C. (2008). Nebulin Interacts with CapZ and Regulates Thin Filament Architecture within the Z-Disc, *19*(May), 1837–1847. doi:10.1091/mbc.E07

Pilotte, J., Larocque, D., & Richard, S. (2001). Nuclear translocation controlled by alternatively spliced isoforms inactivates the QUAKING apoptotic inducer, 845–858. doi:10.1101/gad.860301.after

Pizon, V., Iakovenko, A., Van Der Ven, P. F. M., Kelly, R., Fatu, C., Fürst, D. O., … Gautel, M. (2002). Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein. *Journal of cell science*, *115*(Pt 23), 4469–82. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414993

Pourquié, O, & Tam, P. P. (2001). A nomenclature for prospective somites and phases of cyclic gene expression in the presomitic mesoderm. *Developmental cell*, *1*(5), 619–20. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709182

Pourquié, Olivier. (2003). The segmentation clock: converting embryonic time into spatial pattern. *Science (New York, N.Y.)*, *301*(5631), 328–30. doi:10.1126/science.1085887

Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., & Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*, *435*(7044), 948–53. doi:10.1038/nature03594

Richard, S. (2010). Reaching for the stars: Linking RNA binding proteins to diseases. *Advances in experimental medicine and biology*, *693*, 142–57. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21189691

Richardson, M. K., Allen, S. P., Wright, G. M., Raynaud, A., & Hanken, J. (1998). Somite number and vertebrate evolution. *Development (Cambridge, England)*, *125*(2), 151–60. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486789

Rui, Y., Bai, J., & Perrimon, N. (2010). Sarcomere formation occurs by the assembly of multiple latent protein complexes. *PLoS genetics*, *6*(11), e1001208. doi:10.1371/journal.pgen.1001208

Ruparelia, A. a, Zhao, M., Currie, P. D., & Bryson-Richardson, R. J. (2012). Characterization and investigation of zebrafish models of filamin-related myofibrillar myopathy. *Human molecular genetics*, *21*(18), 4073–83. doi:10.1093/hmg/dds231

Ruparelia, A., Vaz, R., & Bryson-richardson, R. (2012). Myofibrillar Myopathies and the Z-Disk Associated Proteins.

Ryder, S. P., Frater, L. a, Abramovitz, D. L., Goodwin, E. B., & Williamson, J. R. (2004). RNA target specificity of the STAR/GSG domain post-transcriptional regulatory protein GLD-1. *Nature structural & molecular biology*, *11*(1), 20–8. doi:10.1038/nsmb706

Ryder, S. P., & Williamson, J. R. (2004). Specificity of the STAR/GSG domain protein Qk1: implications for the regulation of myelination. *RNA (New York, N.Y.)*, *10*(9), 1449–58. doi:10.1261/rna.7780504

Sanger, J. M., & Sanger, J. W. (2008). The dynamic Z bands of striated muscle cells. *Science signaling*, *1*(32), pe37. doi:10.1126/scisignal.132pe37

Sanger, J. W., Wang, J., Fan, Y., White, J., & Sanger, J. M. (2010). Assembly and dynamics of myofibrils. *Journal of biomedicine & biotechnology*, *2010*(Figure 2), 858606. doi:10.1155/2010/858606

Sanger, J. W., Wang, J., Holloway, B., Du, A., & Sanger, J. M. (2009). Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells in zebrafish. *Cell motility and the cytoskeleton*, *66*(8), 556–66. doi:10.1002/cm.20365

Schnorrer, F., Schönbauer, C., Langer, C. C. H., Dietzl, G., Novatchkova, M., Schernhuber, K., … Dickson, B. J. (2010). Systematic genetic analysis of muscle morphogenesis and function in Drosophila. *Nature*, *464*(7286), 287–91. doi:10.1038/nature08799

Sette, C. (2010). Post-translational regulation of star proteins and effects on their biological functions. *Advances in experimental medicine and biology*, *693*, 54–66. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21189685

SIDMAN, R. L., DICKIE, M. M., & APPEL, S. H. (1964). MUTANT MICE (QUAKING AND JIMPY) WITH DEFICIENT MYELINATION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Science (New York, N.Y.)*, *144*(3616), 309–11. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14169723

Sklar, J., Kirch, D., Johnson, T., Hasegawa, B., Peck, S., & Steele, P. (1982). Slow late myocardial clearance of thallium: a characteristic phenomenon in coronary artery disease. *Circulation*, *65*(7), 1504–10. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7074808

Southby, J., Gooding, C., & Smith, C. W. (1999). Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutally exclusive exons. *Molecular and cellular biology*, *19*(4), 2699–711. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Sparrow, J. C., Nowak, K. J., Durling, H. J., Beggs, A. H., Wallgren-Pettersson, C., Romero, N., … Laing, N. G. (2003). Muscle disease caused by mutations in the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1). *Neuromuscular Disorders*, *13*(7-8), 519–531. doi:10.1016/S0960-8966(03)00101-9

Sparrow, J. C., & Schöck, F. (2009). The initial steps of myofibril assembly: integrins pave the way. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *10*(4), 293–8. doi:10.1038/nrm2634

Spring, J., Yanze, N., Jösch, C., Middel, A. M., Winninger, B., & Schmid, V. (2002). Conservation of Brachyury, Mef2, and Snail in the myogenic lineage of jellyfish: a connection to the mesoderm of bilateria. *Developmental biology*, *244*(2), 372–84. doi:10.1006/dbio.2002.0616

Steffen, L. S., Guyon, J. R., Vogel, E. D., Howell, M. H., Zhou, Y., Weber, G. J., … Kunkel, L. M. (2007). The zebrafish runzel muscular dystrophy is linked to the titin gene. *Developmental biology*, *309*(2), 180–92. doi:10.1016/j.ydbio.2007.06.015

Stellabotte, F., & Devoto, S. H. (2007). The teleost dermomyotome. *Dev Dyn*, *236*(9), 2432–2443. doi:10.1002/dvdy.21253

Stewart, D. G., & Davis, K. L. (2004). Possible contributions of myelin and oligodendrocyte dysfunction to schizophrenia. *International review of neurobiology*, *59*, 381–424. doi:10.1016/S0074-7742(04)59015-3

Szeto, D. P., & Kimelman, D. (2006a). The regulation of mesodermal progenitor cell commitment to somitogenesis subdivides the zebrafish body musculature into distinct domains. *Genes Dev*, *20*(14), 1923–1932. doi:10.1101/gad.1435306

Szeto, D. P., & Kimelman, D. (2006b). The regulation of mesodermal progenitor cell commitment to somitogenesis subdivides the zebrafish body musculature into distinct domains. *Genes & development*, *20*(14), 1923–32. doi:10.1101/gad.1435306

Takada, F., Vander Woude, D. L., Tong, H. Q., Thompson, T. G., Watkins, S. C., Kunkel, L. M., & Beggs, a H. (2001). Myozenin: an alpha-actinin- and gamma-filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(4), 1595–600. doi:10.1073/pnas.041609698

Takahashi, K., & Hattori, A. (1989). Alpha-actinin is a component of the Z-filament, a structural backbone of skeletal muscle Z-disks. *Journal of biochemistry*, *105*(4), 529–36. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2668262

Tanaka, H., Abe, K., & Kim, C. H. (1997). Cloning and expression of the quaking gene in the zebrafish embryo. *Mechanisms of development*, *69*(1-2), 209–13. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486543

Tepass, U., Godt, D., & Winklbauer, R. (2002). Cell sorting in animal development: signalling and adhesive mechanisms in the formation of tissue boundaries. *Current opinion in genetics & development*, *12*(5), 572–82. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200163

Teplova, M., Hafner, M., Teplov, D., Essig, K., Tuschl, T., & Patel, D. J. (2013). Structure-function studies of STAR family Quaking proteins bound to their in vivo RNA target sites. *Genes & development*, *27*(8), 928–40. doi:10.1101/gad.216531.113

Thorpe, C. J., Weidinger, G., & Moon, R. T. (2005). Wnt/beta-catenin regulation of the Sp1-related transcription factor sp5l promotes tail development in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, *132*(8), 1763–72. doi:10.1242/dev.01733

Van der Ven, P. F., Wiesner, S., Salmikangas, P., Auerbach, D., Himmel, M., Kempa, S., … Fürst, D. O. (2000). Indications for a novel muscular dystrophy pathway. gamma-filamin, the muscle-specific filamin isoform, interacts with myotilin. *The Journal of cell biology*, *151*(2), 235–48. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192634&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Van Eldik, W., & Passier, R. (2013). Signalling in sarcomeres in development and disease. *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation*, *21*(7-8), 367–71. doi:10.1007/s12471-013-0435-6

Vega-Sánchez, M. E., Zeng, L., Chen, S., Leung, H., & Wang, G.-L. (2008). SPIN1, a K homology domain protein negatively regulated and ubiquitinated by the E3 ubiquitin ligase SPL11, is involved in flowering time control in rice. *The Plant cell*, *20*(6), 1456–69. doi:10.1105/tpc.108.058610

Vicart, O. Agbulut et P., T. (2013). Avancées dans les myopathies myofibrillaires.

Volk, T. (2010). Drosophila star proteins: what can be learned from flies? *Advances in experimental medicine and biology*, *693*, 93–105. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21189688

Volk, T., Israeli, D., Nir, R., & Toledano-Katchalski, H. (2008). Tissue development and RNA control: “HOW” is it coordinated? *Trends in genetics : TIG*, *24*(2), 94–101. doi:10.1016/j.tig.2007.11.009

Wang, J., Sanger, J. M., Kang, S., Thurston, H., Abbott, L. Z., Dube, D. K., & Sanger, J. W. (2007). Ectopic expression and dynamics of TPM1alpha and TPM1kappa in myofibrils of avian myotubes. *Cell motility and the cytoskeleton*, *64*(10), 767–76. doi:10.1002/cm.20221

Wang, Y., Lacroix, G., Haines, J., Doukhanine, E., Almazan, G., & Richard, S. (2010). The QKI-6 RNA binding protein localizes with the MBP mRNAs in stress granules of glial cells. *PloS one*, *5*(9). doi:10.1371/journal.pone.0012824

Wang, Y., Vogel, G., Yu, Z., & Richard, S. (2013). The QKI-5 and QKI-6 RNA binding proteins regulate the expression of microRNA 7 in glial cells. *Molecular and cellular biology*, *33*(6), 1233–43. doi:10.1128/MCB.01604-12

Wilting, J., & Becker, J. (2006). Two endothelial cell lines derived from the somite. *Anatomy and embryology*, *211 Suppl*, 57–63. doi:10.1007/s00429-006-0120-2

Wu, H. Y., Dawson, M. R., Reynolds, R., & Hardy, R. J. (2001). Expression of QKI proteins and MAP1B identifies actively myelinating oligodendrocytes in adult rat brain. *Molecular and cellular neurosciences*, *17*(2), 292–302. doi:10.1006/mcne.2000.0941

Wu, J. I., Reed, R. B., Grabowski, P. J., & Artzt, K. (2002). Function of quaking in myelination: regulation of alternative splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(7), 4233–8. doi:10.1073/pnas.072090399

Wu, J., Zhou, L., Tonissen, K., Tee, R., & Artzt, K. (1999). The quaking I-5 protein (QKI-5) has a novel nuclear localization signal and shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *The Journal of biological chemistry*, *274*(41), 29202–10. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10506177

Xu, X., Meiler, S. E., Zhong, T. P., Mohideen, M., Crossley, D. a, Burggren, W. W., & Fishman, M. C. (2002). Cardiomyopathy in zebrafish due to mutation in an alternatively spliced exon of titin. *Nature genetics*, *30*(2), 205–9. doi:10.1038/ng816

Yap, S. V, & Bloch, R. J. (2011). Muscle giants: molecular scaffolds in Sarcomerogenesis, *89*(4), 1217–1267. doi:10.1152/physrev.00017.2009.Muscle

Zaffran, S., Astier, M., Gratecos, D., & Sémériva, M. (1997). The held out wings (how) Drosophila gene encodes a putative RNA-binding protein involved in the control of muscular and cardiac activity. *Development (Cambridge, England)*, *124*(10), 2087–98. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9169854

Zearfoss, N. R., Clingman, C. C., Farley, B. M., McCoig, L. M., & Ryder, S. P. (2011). Quaking regulates Hnrnpa1 expression through its 3' UTR in oligodendrocyte precursor cells. *PLoS genetics*, *7*(1), e1001269. doi:10.1371/journal.pgen.1001269

Zhang, R., Yang, J., Zhu, J., & Xu, X. (2009). Depletion of zebrafish Tcap leads to muscular dystrophy via disrupting sarcomere-membrane interaction, not sarcomere assembly. *Human molecular genetics*, *18*(21), 4130–40. doi:10.1093/hmg/ddp362

Zhang, Y., Lu, Z., Ku, L., Chen, Y., Wang, H., & Feng, Y. (2003). Tyrosine phosphorylation of QKI mediates developmental signals to regulate mRNA metabolism. *The EMBO journal*, *22*(8), 1801–10. doi:10.1093/emboj/cdg171

Zhao, L., Mandler, M. D., Yi, H., & Feng, Y. (2010). Quaking I controls a unique cytoplasmic pathway that regulates alternative splicing of myelin-associated glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(44), 19061–6. doi:10.1073/pnas.1007487107

Zhao, R., & Houry, W. A. (2005). Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, *83*(6), 703–10. doi:10.1139/o05-158

Zorn, A. M., & Krieg, P. A. (1997). The KH domain protein encoded by quaking functions as a dimer and is essential for notochord development in Xenopus embryos. *Genes & development*, *11*(17), 2176–90. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=275400&tool=pmcentrez&rendertype=abstract