► Dans le but de mieux comprendre la complexité des dystrophies musculaires congénitales (DMC) et de développer des stratégies pour les traiter, il est important d'établir de nouveaux modèles de ces maladies. En raison de ses nombreuses caractéristiques, le poisson zèbre est récemment devenu un modèle de choix dans l'étude des DMC. La modélisation de certaines de ces dystrophies dans ce modèle vertébré permet en effet d'obtenir un phénotype plus proche de la maladie humaine que le modèle murin. Ces dernières années, grâce à des moyens techniques innovants, il est devenu possible de cribler rapidement et à grande échelle les pathologies musculaires dans ce modèle. Par ailleurs, les nouvelles techniques de modification du génome du poisson ouvrent la voie vers la création de nouveaux modèles pour analyser les DMC. Cette revue discute des qualités majeures du poisson zèbre pour l'étude des DMC et présente les principaux modèles de dystrophies obtenus dans ce modèle. ◀

Les dystrophies musculaires congénitales (DMC) sont un groupe hétérogène de maladies neuromusculaires. L'incidence des DMC, toutes formes confondues, est estimée à 1 naissance sur 21 500 [1]. Elles affectent spécifiquement les muscles squelettiques et se caractérisent par une dégénérescence et un affaiblissement progressif de ces muscles [2].

Les découvertes concernant les DMC se sont largement développées cette dernière décennie. Elles ont permis l'identification de nouveaux gènes impliqués dans ces maladies dégénératives, ouvrant la voie vers de nouvelles perspectives thérapeutiques. Cependant, malgré des progrès constants permettant d'améliorer la qualité de vie des patients, aucun traitement curatif n'a pu, pour le moment, être développé avec succès. Il est donc important de mieux comprendre les bases moléculaires de ces pathologies et de développer des modèles animaux mimant la pathogenèse de la maladie

Le poisson zèbre

Un modèle d'étude des dystrophies musculaires congénitales

Lucile Ryckebüsch

Division of biological sciences,
University of California, San
Diego, 9500 Gilman Drive,
La Jolla, CA 92093-0380, La Jolla,
États-Unis.
lryckebusch@ucsd.edu

chez l'homme, afin de caractériser de nouveaux gènes d'intérêt, de comprendre l'évolution de la maladie et de développer de nouvelles thérapies. Le modèle vertébré du poisson zèbre (*Danio rerio*) a montré son intérêt dans ces avancées [51]¹.

Dans cette revue, nous décrivons les différents aspects des DMC. Nous énumérerons ensuite les moyens mis en œuvre pour analyser ces pathologies dans le modèle de choix que représente le poisson zèbre. Nous discuterons enfin de la pertinence de certaines études réalisées avec ce modèle, offrant un intérêt particulier pour la compréhension des DMC.

Les dystrophies musculaires congénitales

L'hétérogénéité des DMC est illustrée par la variabilité de leurs signes cliniques, mais également par l'âge d'apparition des premiers symptômes. L'étiologie de ces maladies est diverse et complexe. Des mutations différentes d'un même gène peuvent entraîner des manifestations cliniques très variées, et cela au sein d'une même famille ; à l'inverse, des symptômes similaires peuvent résulter d'altérations génomiques distinctes [3]. Outre la classification clinique, les DMC sont aussi classées selon les déficits moléculaires qui les caractérisent (dystroglycanopathies, laminopathies, etc.). À ce jour, les défauts génétiques de plus de vingt-cinq types de DMC ont été identifiés [4]. Au niveau du myosepte vertical du poisson zèbre (*voir Glossaire*), qui est l'analogue anatomique du tendon des mammifères, se situent la membrane basale, constituée de laminine et de collagène, et les complexes d'adhésion, formés de dystroglycanes et d'intégrines,

¹ Voir dans m/s un autre exemple de pathologie pour laquelle le *danio* a permis des progrès importants [51].

Figure 1. Schéma d'un embryon de poisson zèbre deux jours après fécondation.

Lorsqu'un processus dystrophique apparaît, la stabilité structurale de l'ancrage des myofibres est affectée et les fibres se détachent du myosepte vertical.

sur lesquels sont ancrées les fibres musculaires (Figures 1 et 2). Les sous-types de DMC ont pour origine des mutations touchant des gènes codant les protéines se liant à la lame basale, comme l'intégrine $\alpha 7$, ou ceux codant des protéines du complexe de glycoprotéines associé à la dystrophine (Figure 2). D'autres mutations touchent des protéines constituant la lame basale, comme le collagène VI ou la laminine $\alpha 2$ (mérosine).

Un groupe particulier de DMC, les dystroglycanopathies, a récemment été mis en évidence. Il regroupe des défauts touchant des protéines qui sont impliquées dans la glycosylation de l' α -dystroglycane [5]. D'autres DMC impliquent un déficit en sélénoprotéine N, codée par le gène *sepn1*, ou un déficit en lamine A/C, codée par le gène *Imna*.

Le poisson zèbre, un modèle d'étude des dystrophies musculaires congénitales

Depuis le début des années 1990, le poisson zèbre est devenu un modèle incroyablement utile dans l'étude des DMC. Un des avantages de ce modèle est qu'il est possible, lors des croisements, d'engendrer un grand nombre d'individus *ex utero*. En effet, une ponte produit de 50 à 200 embryons. D'autres avantages du poisson zèbre incluent son développement rapide, sa facilité de manipulation et sa transparence. Ces propriétés uniques en font un puissant modèle vertébré pour le traçage génétique et les analyses *in vivo* à l'échelle de la cellule [6]. La possibilité d'utiliser des morpholinos (voir Glossaire) pour manipuler génétiquement le *danio* représente également un outil important pour identifier rapidement des gènes potentiellement impliqués dans la pathologie. L'embryon du poisson ayant la capacité d'absorber des médicaments, les criblages à grande échelle de molécules pharmacologiques, permettant de définir des gènes cibles importants, sont possibles. Outre ces caractéristiques générales, le poisson zèbre présente d'autres potentialités qui sont essentielles pour l'étude des DMC humaines. Ainsi, les modèles génétiques réalisés chez ce poisson présentent des similitudes importantes avec la pathogenèse des dystrophies musculaires de l'homme [7]. Les phénotypes observés sont plus proches en effet de ceux observés chez l'homme, notamment la sévérité des signes cliniques, que dans certains modèles murins [8,

9]. Ainsi, contrairement au phénotype musculaire du modèle murin *mdx*, invalidé pour le gène de la dystrophine, qui est modéré et ne compromet pas la survie, le phénotype moteur résultant de l'inactivation du même gène chez le poisson est sévère à quatre jours de développement, et le poisson meurt à deux semaines de développement [10, 11]. Le corps du poisson est composé en majorité de muscles. Les fibres musculaires lentes et rapides s'étendent le long de l'axe antéro-postérieur des somites (voir Glossaire) [12]. La séparation entre deux somites, où les fibres musculaires s'attachent, est appelée myosepte vertical (Figure 1). Beaucoup de caractéristiques moléculaires et histologiques, notamment ultrastructurales, sont partagées par les muscles squelettiques humains et ceux du poisson zèbre. Par exemple, on retrouve chez les deux espèces le complexe moléculaire d'excitation-contraction et l'appareil contractile, ainsi que les composants du complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine. L'existence de ces deux complexes chez le poisson est donc essentielle pour étudier la pathogenèse des myopathies [13-15]. Les gènes importants pour le développement des muscles et leur intégrité ultérieure sont également conservés entre les mammifères et le poisson zèbre. Différents anticorps utilisés lors de l'établissement des diagnostics cliniques chez l'homme, ont une réactivité croisée avec des antigènes présents chez le poisson zèbre et peuvent donc être utilisés [16]. Les embryons de un jour exercent un mouvement d'enroulement qui permet d'étudier de façon aisée la fonction musculaire dépendante des fibres lentes [15]. Le comportement locomoteur, qui commence à un jour de vie, est quantifiable et facilement mesurable de manière non invasive et reproductible [17] à deux et trois jours de vie, l'embryon ayant dès lors développé la capacité de réponse d'échappement à un stimulus mécanique². À deux jours de développement, les muscles des embryons de poisson zèbre sont complètement différenciés. Par la suite, la vitesse et la fréquence du patron de nage peuvent être quantifiées. L'organisation des fibres musculaires est, quant à elle, facilement observable et peut être quantifiée en utilisant leur propriété de biréfringence (voir Glossaire). En effet, lorsqu'elles sont examinées sous une lumière polarisée, les fibres qui se détachent - témoins de la dégénérescence - apparaissent plus sombres [18]. L'embryon étant transparent, il est possible d'étudier les muscles squelettiques par immunohistochimie.

² Le comportement locomoteur des poissons zèbres peut être quantifié en utilisant le test de *touch escape*. Le poisson est « touché » (stimulus mécanique) et sa réponse ou son patron d'échappement de nage est enregistré et quantifié.

GLOSSAIRE

Biréfringence : propriété d'un matériau dans lequel la lumière se propage de manière anisotrope ; cette propriété s'illustre au sein de l'échantillon observé par une coloration différentielle des tissus et permet de mesurer le niveau de l'atteinte musculaire chez le poisson en microscopie à lumière polarisée.

Criblage génétique direct : approche visant à identifier les gènes responsables d'un phénotype particulier.

Criblage génétique indirect ou inverse : approche permettant de créer des mutations dans un gène donné, dont les phénotypes sont ensuite analysés.

Épistasie : interaction entre deux ou plusieurs gènes contrôlant un même phénotype particulier.

Jonction myotendineuse : site de transfert de la force générée par la contraction du muscle squelettique vers le tendon (*Figure 2*).

Morpholino : molécule synthétique antisens d'environ 25 bases qui se fixe aux séquences complémentaires d'ARN par appariement de bases. Il peut être utilisé pour bloquer la traduction ou modifier l'épissage du préARNm et ainsi diminuer ou invalider l'expression d'un gène. Un organisme traité par morpholino est appelé un morphant.

Mutation nulle : une mutation nulle élimine complètement la fonction d'un gène.

Myosepte : lame conjonctive séparant les masses musculaires latérales, les myotomes.

Sarcolemme : membrane plasmique des fibres musculaires striées.

Somites : structures embryonnaires situées de part et d'autre du tube neural et de la corde et qui sont à l'origine, entre autres, des muscles striés.

Fibres musculaires lentes (fibres rouges, type 1) : ces fibres possèdent une forte densité capillaire, une section de petit diamètre, une faible puissance et une forte endurance. Elles utilisent le métabolisme oxydatif et sont donc adaptées aux efforts aérobie. Elles possèdent une vitesse de conduction lente, un seuil d'activation bas (elles sont donc mobilisées pour de faibles contractions), et sont très résistantes à la fatigue (et donc impliquées dans les exercices prolongés).

Fibres musculaires rapides (fibres blanches, type 2) : ces fibres possèdent une faible densité capillaire, une section de grand diamètre, une forte puissance et une faible endurance. Elles utilisent le métabolisme oxydatif et le métabolisme glycolytique, et sont donc adaptées aux efforts anaérobie. Elles possèdent une faible résistance à la fatigue et une force de contraction élevée.

On peut également utiliser des poissons génétiquement modifiés, exprimant des protéines fluorescentes dont les séquences codantes sont placées sous le contrôle d'un promoteur spécifique des muscles, permettant une étude optique aisée de la structure, mais aussi de la fonction des muscles [19].

Les modèles d'étude générés chez le poisson zèbre

Différentes méthodes permettent de manipuler, chez les poissons zèbres, des gènes d'intérêt afin de reproduire des défauts génétiques observés chez les patients. Les morpholinos représentent une stratégie rapide et transitoire. Ils ont cependant montré leurs limites récemment [20]. Certains projets ambitieux qui reposent sur une technique de criblage génétique direct (*voir Glossaire*) ont montré l'intérêt de cette méthode pour la création de mutations germinales héréditaires et récessives, et pour l'identification des phénotypes qui y sont associés. Le criblage génétique inverse ou indirect (*voir Glossaire*) peut également être utilisé.

Dans les années 1990, un effort conséquent a été réalisé par C. Nüsslein-Volhard et ses collègues afin de caractériser, par criblage génétique, une collection de poissons mutants obtenus par mutagenèse chimique grâce à l'administration d'ENU (N-Nitroso-N-éthylurée) [21]. Parmi les milliers de lignées ainsi produites, certaines présentaient les caractéristiques de maladies neuromusculaires : réduction de la mobilité voire immobilité, peu ou pas de striation des fibres musculaires, dégénérescence musculaire, mais également défauts cardiaques [21]. Dans les protocoles de criblage génétique direct, deux types d'observations visuelles ont été utilisés pour sélectionner rapi-

dement un grand nombre de poissons : le phénomène optique de la biréfringence et les défauts de mobilité [22]. Ces criblages visuels simples peuvent être associés à d'autres mesures de l'intégrité musculaire comme la coloration par le bleu Evans. Injecté dans la larve de poisson, le colorant pénètre uniquement dans les fibres musculaires endommagées, permettant ainsi d'évaluer l'intégrité du sarcolemme (*voir Glossaire*). Il est également possible d'enregistrer le détachement des myofibres en temps réel [23], permettant l'identification dans les lignées d'un grand nombre de mutations affectant des gènes impliqués dans les myopathies congénitales, mais aussi les dystrophies musculaires et les DMC.

Les techniques de modifications du génome (*genome editing*), permettant de modifier un gène d'intérêt, ont été plus récemment décrites et sont dénommées criblage génétique indirect [24]. Ce sont des techniques utilisant le système des TALE nucléases [52] (→) et Crispr/Cas9 [24, 53] (→) dont l'efficacité pour générer des mutations est maintenant démontrée. Certaines limitations de ces techniques existent cependant, comme la difficulté de créer des mutations ponctuelles spécifiques ou la génération d'effets hors cibles.

(→) Voir la Synthèse de B. Dupret et P.O. Angrand, *m/s* n° 2, février 2014, page 186

(→) Voir la Nouvelle de H. Gilgenkrantz, *m/s* n° 12, décembre 2014, page 1066

Les différentes techniques de criblage ont montré leur intérêt pour l'identification et la création, de manière aisée, de poissons zèbres présentant des mutations ciblées sur des gènes d'intérêt, générant ainsi de nouveaux modèles de DMC.

Les principaux modèles de dystrophies musculaires congénitales chez le poisson

Atteinte des isoformes de laminine : les poissons *candyfloss* (barbe à papa) et *softy* (doudou)

On trouve différentes isoformes de la laminine (lam) dans le myotome du poisson zèbre. Ces isoformes sont composées pour la majeure partie des chaînes $\alpha 2$ (lama2) ou $\alpha 4$ (lama4), $\beta 2$ (lamb2) et $\gamma 1$ (lamc1) [25]. Le rôle respectif de ces formes de laminine a été établi récemment par l'équipe de P.D. Currie, en utilisant des tests d'épistasie (voir *Glossaire*) génétiques [26]. L'étude du mutant *lama2* du poisson zèbre, appelé *candyfloss* (*caf*), révèle un phénotype dystrophique sévère. Chez ce mutant, les fibres musculaires se détachent progressivement de la lame basale sans rupture du sarcolemme. Ce mutant *candyfloss* présente les principales caractéristiques de la DMC, notamment avec un déficit primaire en mérosine (retrouvé dans la DMC de type 1A, DMC1A) [23] (*Tableau I*). L'étude réalisée par Hall et ses collègues consistait en l'observation en temps réel du détachement des fibres musculaires de la larve de poisson, élevée dans des conditions anesthésiantes. Après élimination de l'anesthésiant, l'activité motrice des larves mutées traitées, évaluée dans un milieu visqueux (constitué de méthylcellulose) utilisé afin d'augmenter la charge mécanique, reprend et entraîne un processus dystrophique rapide. Cette élégante étude démontre, chez le mutant *caf*, un détachement de l'extrémité des fibres musculaires au niveau de la jonction myotendineuse (voir *Glossaire*). La sévérité du détachement est proportionnelle à la charge mécanique appliquée à la larve. Cependant, chez ce mutant, la myogenèse et la fusion des myoblastes sont normales et les motoneurons ne semblent pas affectés. Une autre mutation du gène codant *lama2*, au niveau d'un site d'épissage, a récemment été mise en évidence par criblage des mutations induites par l'exposition à l'ENU [27] (*Tableau I*). Ce mutant *lama2*^{cl501/cl501} présente une altération de la matrice extracellulaire et un détachement des myofibres de la membrane basale. Chez l'homme, le déficit en *lama2* s'accompagne d'anomalies cérébrales comme une hypodensité et une hypomyélinisation de la substance blanche, ainsi que, parfois, des changements structuraux. Chez le poisson mutant *lama2*^{cl501/cl501}, la taille du cerveau est anormale, suggérant l'existence d'altérations de processus développementaux semblables chez le poisson zèbre et chez les patients présentant une DMC1A [27, 28].

Un mutant comportant une altération faux sens du gène *lamb2* a également été mis en évidence [27] (*Tableau I*), le mutant *softy*. Chez ce mutant, la myogenèse est normale, mais un détachement des fibres musculaires se produit chez la larve au niveau du myosept vertical. Contrairement à ce qui est observé chez le mutant *caf*, les myofibres détachées ne deviennent pas nécrotiques et forment des myoseptes ectopiques au sein du myotome.

Ces modèles reproduisent les signes pathologiques et les défauts musculaires observés chez les patients. Ce sont donc potentiellement des modèles de choix pour développer des thérapies visant à améliorer la fonction musculaire des patients atteints de DMC [27].

Atteinte des collagènes VI et XXII

Deux DMC se caractérisent par un déficit en collagène VI : la DMC d'Ullrich, qui représente 20 à 30 % des DMC, et la myopathie de Bethlem. Le modèle murin mutant pour le gène *col6a1* (*collagen, type VI, alpha 1*) présente un phénotype de dystrophie de type myopathie de Bethlem de forme légère, mais aucun modèle murin ne permet d'étudier le type Ullrich, une forme plus sévère de la maladie, induite par la délétion du collagène VI [29]. Dans l'étude de Telfer et ses collègues, l'inactivation transitoire de *col6a1* chez le poisson zèbre, via des morpholinos antisens, permet de simuler les deux phénotypes de myopathies [21] (*Tableau I*). Le premier modèle reproduit la forme humaine la plus sévère, la dystrophie musculaire de type Ullrich. Elle s'accompagne d'apoptose et d'une altération de la membrane du sarcolemme avec une anomalie structurale des mitochondries. Le deuxième mime une forme moins sévère de myopathie. Les auteurs ont examiné l'effet d'un inhibiteur de la pompe à protons, la cyclosporine A, sur les conséquences phénotypiques de la mutation. La cyclosporine améliore le comportement locomoteur et l'ultrastructure des organites chez la larve de poisson zèbre mutée. Ceci confirme l'intérêt du modèle dans une perspective thérapeutique de la myopathie d'Ullrich [21]. Des travaux semblables ont été publiés chez la souris et l'homme [30, 31].

D'autres formes de collagène sont importantes pour le maintien de l'attachement des myofibres à la jonction myotendineuse. Un défaut de collagène XXII - créé grâce à un morpholino antisens spécifique du gène *col22a1* (*collagen, type XXII, alpha 1*) - a été récemment étudié chez le poisson. Dans ce modèle, une altération du comportement locomoteur et un phénotype dystrophique ont été observés [32] (*Tableau I*), faisant de ce gène un nouveau candidat atteint dans certaines DMC chez l'homme. Au cours de cette étude, les auteurs ont montré l'implication de l'intégrine $\alpha 7/\beta 1$, et un rôle pour le collagène XXII dans le renforcement de l'attachement des fibres musculaires à la jonction myotendineuse [32].

Loss contact (perte de contact) et *patchytail* (queue fragmentée) : atteinte des complexes d'adhésion de la jonction myotendineuse

Les principaux récepteurs de la laminine des muscles squelettiques se situent au niveau de la membrane plasmique [26]. Il s'agit de protéines transmembranaires, le

Figure 2. Schéma simplifié des complexes d'adhésion de la jonction myotendineuse. Les complexes d'adhésion permettent de relier le cytosquelette d'actine des myofibres à la lame basale. Ces différents complexes se compensent l'un l'autre. Cav3 : caveolin-3 ; ILK : integrin-linked kinase.

dystroglycane et l'intégrine $\alpha 7/\beta 1$ (Figure 3). Pour maintenir l'intégrité musculaire, l'intégrine $\alpha 7/\beta 1$ et le dystroglycane ont des rôles redondants et complémentaires [33, 34]. L'intégrine $\alpha 7/\beta 1$ est présente notamment au niveau de la jonction myotendineuse. Elle représente un support structural important pour la stabilité du muscle squelettique [35]. Le phénotype dystrophique du mutant *loss contact* du poisson zèbre résulte d'une mutation du gène codant la kinase associée à l'intégrine, l'ILK (*integrin/integrin-linked kinase*), qui se lie au domaine intracellulaire de l'intégrine $\beta 1$ [36] (Tableau 1). Le recrutement de cette protéine d'adhésion focale au niveau de la jonction myotendineuse nécessite lama4 (*laminin, alpha 4*) et l'intégrine $\alpha 7$. Elle est de plus nécessaire au maintien de l'intégrité de l'adhésion du muscle à la jonction myotendineuse [34]. L'action d'ILK et celle du complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine sont redondantes. Postel et ses collègues ont montré, par la méthode du double hybride réalisée chez la levure, que l'ILK interagit avec la β -parvine (affixine), et que cette interaction est indispensable à l'adhésion des fibres musculaires [34]. Chez le morphant intégrine $\alpha 7$, Goody et ses collègues ont montré que la nicotinamide riboside kinase 2b, qui interagit avec la partie cytoplasmique de l'intégrine $\beta 1$, peut réduire le phénotype de dégénérescence musculaire [37]. Ils montrent également que l'intégrine $\alpha 6$ est présente au niveau du myosepte vertical, démontrant que les composants intracellulaires qui interagissent avec les intégrines sont nécessaires à la stabilité mécanique des fibres musculaires au niveau de la jonction myotendineuse, même s'ils ne sont pas indispensables à son assemblage.

La protéine dystroglycane interagit avec lama2 de la lame basale par l'intermédiaire de sa sous-unité α , et avec le cytoplasme via sa sous-unité β . Une des protéines qui lui sont associées, la dystrophine, permet notamment de transférer la force de contraction musculaire à la membrane basale. Le modèle murin développé ne permet pas de mimer la sévérité des symptômes cliniques observés chez l'homme au cours de la myopathie de Duchenne (DMD). En revanche, chez le poisson zèbre, différents allèles de mutations nulles (voir Glossaire) de dystrophine, ou des morpholinos spécifiques, ont permis de montrer que la progression et la sévérité du phénotype chez le poisson étaient proches de celles observées chez les patients atteints de dystrophinopathies [27] (Tableau 1). L'absence de dystrophine entraîne l'accumulation progressive de fibres nécrotiques. Elle provoque également une importante fibrose accompagnée d'une inflammation. Chez le poisson zèbre, en conditions anesthésiantes, les myofibres restent attachées. Les fibres ne se détachent que lorsque la larve est replacée dans des conditions normales et que ses premiers mouvements se mettent en place [20]. Le mutant *sapje* (*sap*)³ a permis de

³ Le mutant *sapje* présente une mutation non-sens qui se traduit par un codon stop au niveau du gène de la dystrophine.

Gène poisson zèbre	Type de modèle	Maladie humaine phénocopiée	Référence
Lame basale			
<i>col6a1, col6a3</i>	Morphant	Dystrophie congénitale musculaire d'Ullrich et myopathie de Bethlem	[21]
<i>col22a1</i>	Morphant	Types multiples	[32]
<i>lama2</i>	Mutant (<i>candyfloss</i>)	Dystrophie musculaire congénitale (MDC1A)	[23, 28]
<i>lamb2</i>	Mutant (<i>softy</i>)	Types multiples	[27]
Complexe d'adhésion			
<i>cav3</i>	Morphant	Cavéolinopathie	[22]
<i>dag1</i>	Morphant	Dystrophie musculaire des ceintures de type 2P	[8]
	Mutant (<i>patchytail</i>)		[32]
	Mutant		[41]
<i>dmd</i>	Morphant	Dystrophie musculaire de Duchenne	[19]
	Mutant (<i>sapje</i>)		[37, 38]
	Mutant (<i>sapje-like</i>)		[27]
<i>ilk</i>	Mutant (<i>loss contact</i>)	Types multiples	[34]
<i>itg7</i>	Morphant	Dystrophie musculaire congénitale	[27]
<i>sgcd</i>	Morphant	Dystrophie musculaire des ceintures de type 2F	[22]
Glycosylation d'alpha-DG			
<i>b3galnt2</i>	Morphant	Dystroglycanopathie	[43]
<i>b3gnt1</i>	Morphant	Syndrome de Walker-Warburg	[44]
<i>fkrp</i>	Morphant	Dystroglycanopathie	[41]
<i>fktn</i>	Morphant	Dystroglycanopathie	[41]
<i>gmppb</i>	Morphant	Types multiples	[34, 45]
<i>gtdc2</i>	Morphant	Syndrome de Walker-Warburg	[46]
<i>ispd</i>	Morphant	Syndrome de Walker-Warburg	[47]
<i>pomk</i>	Morphant	Dystroglycanopathie	[48]
<i>pomt1, pomt2</i>	Morphant	Dystrophie musculaire des ceintures de type 2P et 2N	[49]
Autres			
<i>apo2a, apo2b</i>	Morphant	Types multiples	[27]
<i>dnajb6b</i>	Morphant	Dystrophie musculaire des ceintures de type 1E	[27]
<i>dux4</i>	Surexpression	Dystrophie facio-scapulo-humérale	[27]
<i>mstn2</i>	Surexpression	Types multiples	[27]
<i>sepn1</i>	Morphant	Types multiples	[27]
<i>tcap</i>	Morphant	Dystrophie musculaire des ceintures de type 2G	[27]
<i>ttn</i>	Mutant (<i>runzel</i>)	Types multiples	[50]
<i>tsp4b</i>	Morphant	Types multiples	[27]

Tableau 1. Modèles poissons zèbres de dystrophies musculaires congénitales. DG : dystroglycane.

montrer que la dystrophine est essentielle pour maintenir l'intégrité du sarcolemme au niveau de la jonction myotendineuse [38]. Récemment, il a également été montré que le traitement par la trichostatine A (TSA), un inhibiteur des histone déacétylases (HDAC), pouvait améliorer le processus évolutif de la maladie chez le poisson, ouvrant ainsi des perspectives pour une thérapie fondée sur l'utilisation de cet inhibiteur [39].

La protéine partenaire de la dystrophine, le dystroglycane, a également été largement étudiée chez le poisson zèbre. L'utilisation de morpholinos antisens pour invalider transitoirement le gène codant le dystroglycane engendre des mutants présentant une altération des fibres musculaires avec des signes d'apoptose et de nécrose [8]. *dag1^{hu3072}* et *patchytail* sont deux mutants de poisson zèbre caractérisés par une absence de sous-unités α et β du dystroglycane [32]. Ces mutants ont des phénotypes différents, illustrant la diversité des signes cliniques que l'on peut observer chez des patients atteints de dystrophies musculaires. Chez le mutant *dag1^{hu3072}*, les myofibres se détachent du myosepte et le sarcolemme se rompt [27]. Chez le mutant *patchytail*, le phénotype est plus léger et on n'observe qu'un myosepte plus large [32].

Le complexe d'adhésion à la jonction myotendineuse joue donc un rôle essentiel dans la stabilisation structurale entre le cytosquelette des myofibres et la lame basale. Les mutants obtenus chez le poisson zèbre permettent l'étude de la jonction myotendineuse et des dystrophies qui résultent de son altération.

La glycosylation de l' α -dystroglycane

L'avantage du poisson zèbre dans l'étude des dystroglycanopathies repose sur la conservation, chez ce poisson, des protéines de glycosylation de l' α -dystroglycane [40]. Beaucoup de gènes impliqués dans les dystroglycanopathies sont présents chez le poisson et permettent ainsi l'étude de la pathogenèse de la maladie observée chez l'homme (Tableau 1). Contrairement aux modèles murins où on observe une létalité précoce des embryons affectés par ces mutations de l' α -dystroglycane ou de la voie de glycosylation de ce dernier [22], plusieurs signes cliniques sont exprimés chez les poissons qui présentent une mutation de ces mêmes gènes. Des anticorps spécifiques, reconnaissant en *western blot* ou en immunofluorescence le motif de glycosylation de l' α -dystroglycane, révèlent une hypoglycosylation. Une étude histologique réalisée chez ces poissons a également permis de révéler une désorganisation de la lame basale et un détachement des fibres musculaires au niveau du myosepte vertical. Dans certains modèles, des défauts structuraux de l'œil ou du cerveau ont également été associés au phénotype, reproduisant ainsi la pathogenèse des dystroglycanopathies chez l'homme.

En effet, chez les patients présentant une dystroglycanopathie, la dystrophie musculaire peut être associée à des anomalies cérébro-oculaires. C'est le cas des patients atteints du syndrome de Walker-Warburg, du syndrome muscle-œil-cerveau, de la DMC de Fukuyama ou encore de la dystrophie musculaire précoce avec microcéphalie et retard mental. À ce jour, un défaut génétique n'a pu être mis en évidence que chez seulement la moitié des patients présentant les

caractéristiques cliniques des dystroglycanopathies. Le poisson zèbre a permis de caractériser certains des gènes impliqués dans ces atteintes et, à ce jour, quinze mutations de gènes ont été mises en évidence [41]. L'étude de ces maladies repose sur l'analyse histologique des muscles. Elle permet de révéler un défaut de la glycosylation de l' α -dystroglycane, responsable d'une réduction de son affinité pour α -laminine au niveau de la membrane basale, ce qui provoque le détachement des fibres musculaires [42].

La contribution du poisson zèbre à l'étude des dystroglycanopathies est donc cruciale. La pléiotropie des gènes identifiés dans ce modèle laisse présager une extension des recherches utilisant ce modèle pour cette classe de DMC.

Conclusion

Des mutations situées au niveau de plus de vingt-cinq gènes ont été identifiées comme responsables de différentes DMC [4]. D'autres restent encore à identifier. Grâce à ses caractéristiques, le poisson zèbre s'est avéré un outil précieux pour appréhender la pathogenèse de ces maladies. Il peut, en outre, contribuer au développement de stratégies thérapeutiques [27]. La modélisation future de nouvelles pathologies musculaires, conduisant à l'identification de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans ces maladies [32], ou confirmant l'implication de gènes dont l'altération a été caractérisée chez l'homme [43, 44], sera certainement source de progrès pour l'étude de ces pathologies graves. ♦

SUMMARY

Potential of the zebrafish model to study congenital muscular dystrophies

In order to better understand the complexity of congenital muscular dystrophies (CMD) and develop new strategies to cure them, it is important to establish new disease models. Due to its numerous helpful attributes, the zebrafish has recently become a very powerful animal model for the study of CMD. For some CMD, this vertebrate model is phenotypically closer to human pathology than the murine model. Over the last few years, researchers have developed innovative techniques to screen rapidly and on a large scale for muscle defects in zebrafish. Furthermore, new genome editing techniques in zebrafish make possible the identification of new disease models. In this review, the major attributes of zebrafish for CMD studies are discussed and the principal models of CMD in zebrafish are highlighted. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Sparks S, Quijano-Roy S, Harper A, et al. Congenital muscular dystrophy overview. In : Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., eds. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA) : University of Washington, 1993.
- Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet* 2002 ; 359 : 687-95.
- Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 ; 7 : 762-73.
- Kaplan JC, Hamroun D. The 2015 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul Disord* 2014 ; 24 : 1123-53.
- Lisi MT, Cohn RD. Congenital muscular dystrophies: new aspects of an expanding group of disorders. *Biochem Biophys Acta* 2007 ; 1772 : 159-72.
- Santoriello C, Zon LI. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest* 2012 ; 122 : 2337-43.
- Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 2007 ; 8 : 353-67.
- Berger J, Berger S, Hall TE, et al. Dystrophin-deficient zebrafish feature aspects of the Duchenne muscular dystrophy pathology. *Neuromuscul Disord* 2010 ; 20 : 826-32.
- Telfer WR, Busta AS, Bonnemann CG, et al. Zebrafish models of collagen VI-related myopathies. *Hum Mol Genet* 2010 ; 19 : 2433-44.
- Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, et al. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 1989 ; 244 : 1578-80.
- Bassett DL, Bryson-Richardson RJ, Daggett DF, et al. Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development* 2003 ; 130 : 5851-60.
- Jackson HE, Ingham PW. Control of muscle fibre-type diversity during embryonic development: the zebrafish paradigm. *Mech Dev* 2013 ; 130 : 447-57.
- Dou Y, Andersson-Lendahl M, Arner A. Structure and function of skeletal muscle in zebrafish early larvae. *J Gen Physiol* 2008 ; 131 : 445-53.
- Guyon JR, Mosley AN, Zhou Y, et al. The dystrophin associated protein complex in zebrafish. *Hum Mol Genet* 2003 ; 12 : 601-15.
- Parsons MJ, Campos I, Hirst EM, Stemple DL. Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development* 2002 ; 129 : 3505-12.
- Berger J, Currie PD. Zebrafish models flex their muscles to shed light on muscular dystrophies. *Dis Mod Mech* 2012 ; 5 : 726-32.
- Saint-Amant L, Drapeau P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J Neurobiol* 1998 ; 37 : 622-32.
- Granato M, van Eeden FJ, Schach U, et al. Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. *Development* 1996 ; 123 : 399-413.
- Roostalu U, Strahle U. In vivo imaging of molecular interactions at damaged sarcolemma. *Dev Cell* 2012 ; 22 : 515-29.
- Schulte-Merker S, Stainier DY. Out with the old, in with the new: reassessing morpholino knockdowns in light of genome editing technology. *Development* 2014 ; 141 : 3103-4.
- Haffter P, Granato M, Brand M, et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 1996 ; 123 : 1-36.
- Gibbs EM, Horstlick EJ, Dowling JJ. Swimming into prominence: the zebrafish as a valuable tool for studying human myopathies and muscular dystrophies. *FEBS J* 2013 ; 280 : 4187-97.
- Hall TE, Bryson-Richardson RJ, Berger S, et al. The zebrafish candyfloss mutant implicates extracellular matrix adhesion failure in laminin alpha2-deficient congenital muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 7092-7.
- Auer TO, Del Bene F. CRISPR/Cas9 and TALEN-mediated knock-in approaches in zebrafish. *Methods* 2014 ; 69 : 142-50.
- Sztaf T, Berger S, Currie PD, Hall TE. Characterization of the laminin gene family and evolution in zebrafish. *Dev Dyn* 2011 ; 240 : 422-31.
- Sztaf T, Sonntag C, Hall TE, Currie PD. Epistatic dissection of laminin-receptor interactions in dystrophic zebrafish muscle. *Hum Mol Genet* 2012 ; 21 : 4718-31.
- Wood AJ, Currie PD. Analysing regenerative potential in zebrafish models of congenital muscular dystrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 2014 ; 56C : 30-7.
- Gupta VA, Kawahara G, Myers JA, et al. A splice site mutation in laminin-alpha2 results in a severe muscular dystrophy and growth abnormalities in zebrafish. *PLoS One* 2012 ; 7 : e43794.
- Bonaldo P, Braghetta P, Zanetti M, et al. Collagen VI deficiency induces early onset myopathy in the mouse: an animal model for Bethlem myopathy. *Hum Mol Genet* 1998 ; 7 : 2135-40.
- Millay DP, Sargent MA, Osinska H, et al. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat Med* 2008 ; 14 : 442-7.
- Merlini L, Angelini A, Tiepolo T, et al. Cyclosporin A corrects mitochondrial dysfunction and muscle apoptosis in patients with collagen VI myopathies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 5225-9.
- Charvet B, Guiraud A, Malbouyres M, et al. Knockdown of col22a1 gene in zebrafish induces a muscular dystrophy by disruption of the myotendinous junction. *Development* 2013 ; 140 : 4602-13.
- Rooney JE, Welser JV, Dechert MA, et al. Severe muscular dystrophy in mice that lack dystrophin and alpha7 integrin. *J Cell Sci* 2006 ; 119 : 2185-95.
- Jimenez-Mallebrera C, Brown SC, Sewry CA, Muntoni F. Congenital muscular dystrophy: molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci* 2005 ; 62 : 809-23.
- Danen EH, Sonnenberg A. Integrins in regulation of tissue development and function. *J Pathol* 2003 ; 200 : 471-80.
- Lin YY. Muscle diseases in the zebrafish. *Neuromusc Dis* 2012 ; 22 : 673-84.
- Goody MF, Kelly MW, Reynolds CJ, et al. NAD⁺ biosynthesis ameliorates a zebrafish model of muscular dystrophy. *PLoS Biol* 2012 ; 10 : e1001409.
- Gupta V, Kawahara G, Gundry SR, et al. The zebrafish dag1 mutant: a novel genetic model for dystroglycanopathies. *Hum Mol Genet* 2011 ; 20 : 1712-25.
- Johnson NM, Farr GH, 3rd, Maves L. The HDAC inhibitor TSA ameliorates a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS Curr* 2013 ; 5.
- Moore CJ, Goh HT, Hewitt JE. Genes required for functional glycosylation of dystroglycan are conserved in zebrafish. *Genomics* 2008 ; 92 : 159-67.
- Muntoni F, Torelli S, Wells DJ, Brown SC. Muscular dystrophies due to glycosylation defects: diagnosis and therapeutic strategies. *Curr Opin Neurol* 2011 ; 24 : 437-42.
- Godfrey C, Foley AR, Clement E, Muntoni F. Dystroglycanopathies: coming into focus. *Curr Opin Genet Dev* 2011 ; 21 : 278-85.
- Stevens E, Carss KJ, Cirak S, et al. Mutations in B3GALT2 cause congenital muscular dystrophy and hypoglycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet* 2013 ; 92 : 354-65.
- Buyse K, Riemersma M, Powell G, et al. Missense mutations in beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (B3GNT1) cause Walker-Warburg syndrome. *Hum Mol Genet* 2013 ; 22 : 1746-54.
- Carss KJ, Stevens E, Foley AR, et al. Mutations in GDP-mannose pyrophosphorylase B cause congenital and limb-girdle muscular dystrophies associated with hypoglycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet* 2013 ; 93 : 29-41.
- Manzini MC, Tambunan DE, Hill RS, et al. Exome sequencing and functional validation in zebrafish identify GTDC2 mutations as a cause of Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet* 2012 ; 91 : 541-7.
- Roscioli T, Kamsteeg EJ, Buyse K, et al. Mutations in ISPD cause Walker-Warburg syndrome and defective glycosylation of alpha-dystroglycan. *Nat Genet* 2012 ; 44 : 581-5.
- Di Costanzo S, Balasubramanian A, Pond HL, et al. POMK mutations disrupt muscle development leading to a spectrum of neuromuscular presentations. *Hum Mol Genet* 2014 ; 23 : 5781-92.
- Willer T, Prados B, Falcon-Perez JM, et al. Targeted disruption of the Walker-Warburg syndrome gene Pomt1 in mouse results in embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 14126-31.
- Steffen LS, Guyon JR, Vogel ED, et al. The zebrafish runzel muscular dystrophy is linked to the titin gene. *Dev Biol* 2007 ; 309 : 180-92.
- Bernut A, Lutfalla G, Kremer L. Regard à travers le dano pour mieux comprendre les interactions hôte/pathogène. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 638-46.
- Dupret B, Angrand PO. L'ingénierie des génomes par les TALEN. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 186-93.
- Gilgenkrantz H. La révolution des CRISPR est en marche. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 1066-9.

TIRÉS À PART

L. Ryckebüsch

**Abonnez-vous
à médecine/sciences**

**Bulletin d'abonnement
page 933 dans ce numéro de m/s**