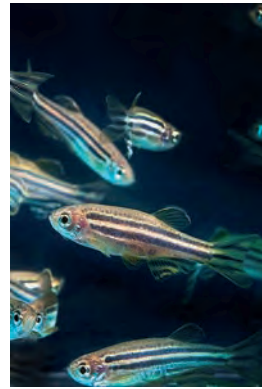


> La myopathie de Bethlem (BM) est une maladie caractérisée par des rétractions et une faiblesse musculaires. Cette pathologie résulte de mutations dans un des gènes codant l'une des trois chaînes α du collagène VI (COLVI), un composant de la matrice extracellulaire musculaire squelettique. Aujourd'hui, une question non résolue est de comprendre comment l'altération de COLVI présent à l'extérieur des cellules musculaires conduit à des modifications fonctionnelles dans les fibres musculaires. Le modèle poisson zèbre *col6a1* ^{Δ ex14} est actuellement un modèle animal unique de la BM puisqu'il est le seul à reproduire spécifiquement l'une des mutations la plus fréquemment retrouvée chez les patients. Chez les patients et le poisson *col6a1* ^{Δ ex14}, la structure du réticulum sarcoplasmique est altérée, suggérant une perturbation de l'homéostasie calcique musculaire et/ou des canaux ioniques qui, en contrôlant cette homéostasie, jouent un rôle crucial dans la fonction et la pathogenèse musculaire. Notre projet vise ainsi à étudier à l'aide de techniques électrophysiologiques et de mesure de Ca^{2+} les propriétés des canaux ioniques et la régulation du Ca^{2+} intracellulaire au repos et en activité dans la fibre musculaire du poisson *col6a1* ^{Δ ex14}. Nos recherches devraient contribuer à mieux comprendre comment la perturbation de la matrice influe sur la fonction musculaire et conduire à terme à identifier des cibles thérapeutiques pour traiter cette maladie actuellement incurable. Enfin, du fait de la rareté des études fonctionnelles sur la cellule musculaire de poisson zèbre, ce projet permettra de constituer une base de données de référence sur les propriétés électrophysiologiques de ce modèle. <

16^{es} JSFM : Prix Master 2018

Étude physiopathologique de la myopathie de Bethlem à l'aide d'un modèle de poisson zèbre

Romane Idoux¹, Sandrine Bretaud²,
Christine Berthier¹, Vincent Jacquemond¹,
Florence Ruggiero², Bruno Allard¹



¹ Institut NeuroMyoGène,
Université Lyon 1, Université
de Lyon, UMR CNRS 5310,
Inserm U1217, Lyon, France.

² Institut de Génétique
et Fonctionnelle de Lyon,
ENS de Lyon, UMR CNRS 5242,
INRA USC1370, Université Lyon 1,
Lyon, France.
romane.idoux@etu.univ-lyon1.fr

Contexte et hypothèse

La myopathie de Bethlem est une myopathie rétractile avec une faiblesse musculaire d'intensité variable et de topographie principalement proximale. Les rétractions sont très souvent au premier plan et précèdent fréquemment le déficit musculaire. Transmise sur le mode autosomique dominant ou récessif, la myopathie de Bethlem est désormais classée parmi les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD D5 et R22 selon le mode d'hérédité) [1]. Les symptômes s'aggravent au cours de la vie avec une perte musculaire proximale progressive, un risque accru d'insuffisance respiratoire et une mobilité réduite [2, 3]. Cette myopathie résulte de mutations dans un des gènes codant l'une des trois chaînes α du collagène VI (COLVI), un composant de la myomatrice [4]. Dans le muscle squelettique, COLVI est produit par les fibroblastes et une question non résolue est de comprendre comment l'altération de COLVI présent à l'extérieur des cellules musculaires conduit à des modifications fonctionnelles dans les fibres musculaires.

Pour tenter de répondre à cette question, plusieurs modèles de la myopathie ont déjà été générés telles qu'un modèle de souris dont le gène codant la chaîne $\alpha 1$ du COLVI a été invalidé ou des modèles de poisson zèbre dont l'expression de différentes chaînes α du COLVI a été transitoirement éteinte par injection de morpholinos. Parmi



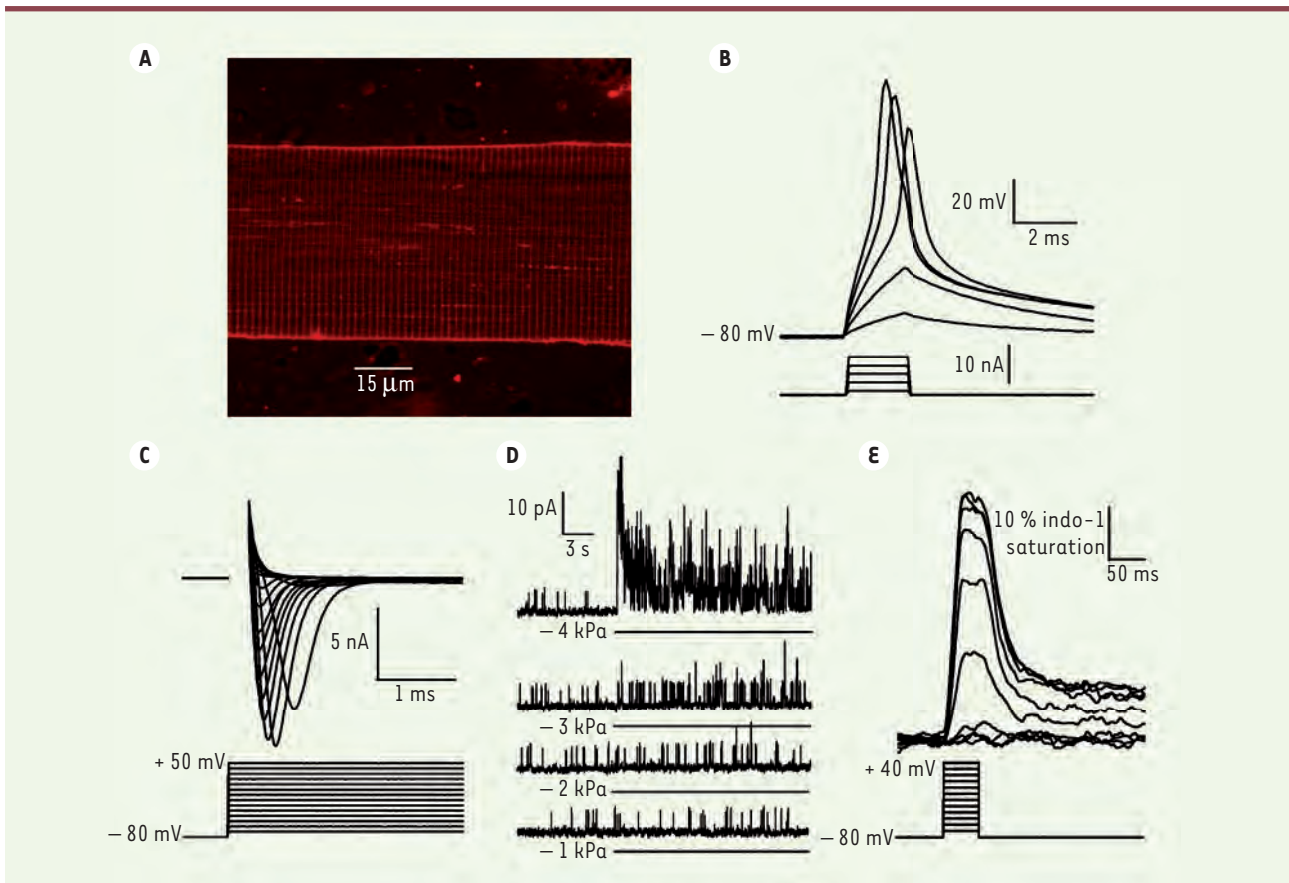


Figure 1. Illustration des différents signaux électrophysiologiques et de mesure de Ca^{2+} enregistrés sur la fibre musculaire isolée de poisson zèbre sauvage. **A.** Image confocale en fluorescence d'une section de fibre musculaire de poisson âgé d'un an dont les membranes plasmiques de surface et tubulaire ont été marquées au di-8-ANEPPS. **B.** Potentiels d'action enregistrés en réponse à l'application de courants dépolarisants d'amplitudes croissantes sur une fibre de poisson de 2 mois en condition de courant imposé. **C.** Courants sodiques voltage-dépendants enregistrés en réponse à l'application de dépolarisations d'amplitudes croissantes sur une fibre de larve âgée de 7 jours en condition de potentiel imposé. **D.** Enregistrements de courants potassiques unitaires activés par des étirements membranaires induits par l'application de dépressions d'intensités croissantes dans la pipette de patch sur une cellule de poisson âgé d'un an en configuration cellule-attachée à un potentiel de maintien de 0 mV. **E.** Enregistrements de signaux calciques induits par des dépolarisations d'amplitudes croissantes sur une fibre de poisson âgé d'un an chargée avec l'indicateur calcique indo-1.

ces modèles, de nombreuses anomalies du muscle ont été reportées, telles qu'en particulier la réduction de force musculaire, l'altération du réticulum sarcoplasmique (RS), une transmission neuromusculaire déficiente et une dysfonction mitochondriale [5-8]. Cependant, les modèles souris ne reproduisent pas les mutations retrouvées chez les patients BM et, dans le modèle poisson, l'extinction de l'expression des gènes par l'injection de morpholinos est transitoire alors que la BM est une pathologie qui s'aggrave avec l'âge. Afin de contourner ces limites, l'équipe de Florence Ruggiero (IGFL, Lyon) avec laquelle nous collaborons, a contribué à générer une lignée de poisson zèbre portant la mutation la plus fréquemment retrouvée chez les patients BM. Cette mutation provoque un saut d'exon 14 dans l'ARNm codant la chaîne $\alpha 1$ de COLVI (poisson *col6a1^{Δex14}*) [9]. Les analyses ultrastructurales chez le poisson *col6a1^{Δex14}* ont révélé une désorganisation des myofibrilles, des altérations de la structure du RS et des mitochondries et un mauvais alignement des

sarcomères, qui correspondent dans leur majorité aux caractéristiques de la BM.

Ce projet de thèse fait partie d'un programme de recherche dont l'objectif est d'utiliser le modèle de poisson zèbre *col6a1^{Δex14}* afin de déterminer quels sont les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la BM. Notre hypothèse de travail est que le COLVI muté perturbe l'excitabilité et/ou l'homéostasie calcique musculaire. Cette hypothèse est basée sur le fait que (1) dans le modèle poisson *col6a1^{Δex14}* la structure du réticulum sarcoplasmique (RS), qui joue un rôle central dans l'homéostasie calcique, est altérée, (2) les composants de la matrice ont été montrés réguler les canaux ioniques, (3) l'homéostasie calcique est sous le contrôle des canaux ioniques et joue un rôle crucial dans la fonction et la pathogenèse musculaire [10, 11].



Méthodologie et résultats attendus

Sachant que la BM est une maladie progressive, les expériences sont réalisées à partir de fibres musculaires isolées de poisson zèbre sauvages ou *col6a1*^{Δex14/-} à différents stades de développement, 7-10 jours, 1 mois, 4 mois et 1 an. Les cellules musculaires du tronc sont isolées par traitement enzymatique et la technique de patch clamp jusqu'à un mois, puis de silicone clamp sur les animaux de quatre mois ou d'un an, est appliquée sur les fibres de type rapide afin d'enregistrer les courants ioniques en condition de potentiel imposé, en configuration cellule entière ou canal isolé, ou les variations de potentiel en condition de courant imposé. En parallèle, l'indicateur calcique indo-1 est dialysé à l'intérieur des cellules afin de mesurer les variations de Ca²⁺ intracellulaire.

Étant donné que très peu d'études électrophysiologiques ont été réalisées sur la cellule musculaire de poisson zèbre, le but sera dans un premier temps de caractériser les propriétés des canaux ioniques dans les fibres musculaires de poissons sauvages durant l'activité, au repos et en condition de stress mécanique. Plus précisément, les potentiels d'action, les courants résultant de l'ouverture des canaux sodiques et potassiques voltage-dépendants, les courants s'écoulant à travers le sarcolemme au repos et l'activité de canaux susceptibles de présenter une mécano-sensibilité seront enregistrés. Les courants générés par le changement de configuration du récepteur des dihydropyridines présent dans la membrane tubulaire musculaire et en charge du contrôle de l'ouverture des canaux calciques du RS seront aussi mesurés. Les figures 1B, C et D présentent des exemples de tracés électrophysiologiques obtenus sur des fibres isolées de poissons sauvages. Dans un deuxième temps, l'ensemble de ces paramètres seront comparés dans les fibres de poissons mutants à différents âges.

De récentes expériences immunohistochimiques réalisées par nos collaborateurs ont révélé chez le poisson *col6a1*^{Δex14} une diminution de l'expression des canaux impliqués dans la libération de Ca²⁺ par le RS, appelés récepteurs de la ryanodine de type 1 (RyR1). Ce résultat consolide notre hypothèse sur le fait que la régulation du calcium intracellulaire serait altérée chez le poisson mutant. À l'issue d'une première étape qui consistera à mesurer le Ca²⁺ cytosolique au repos, la libération de Ca²⁺ du RS induite par la dépolarisation et l'activité des pompes Ca²⁺-ATPase du RS responsables de la relaxation musculaire chez le poisson sauvage, le projet de thèse visera à déterminer si ces paramètres sont modifiés chez le poisson *col6a1*^{Δex14}. La Figure 1E illustre les variations de Ca²⁺ intracellulaire induites par des dépolarisations d'amplitudes croissantes sur des fibres isolées de poissons sauvages.

La BM conduit au long terme à la perte de tissu musculaire. L'hypothèse actuellement la plus défendue suggère qu'un influx de Ca²⁺ exacerbé résultant en l'accumulation de Ca²⁺ cytosolique induit les processus dystrophiques [10]. Ainsi, l'entrée de Ca²⁺ spontanée dans la cellule musculaire au repos ou provoquée par la vidange calcique du RS telle qu'elle est décrite dans les muscles de mammifères sera mesurée à l'aide de la technique à très haute résolution d'extinc-

tion de la fluorescence par le Mn²⁺ en condition de potentiel imposé et comparée chez le poisson mutant à différents âges.

Devant la rareté des études fonctionnelles menées jusqu'à présent sur la cellule musculaire de poisson zèbre, ce projet de thèse permettra d'une part de constituer une base de données de référence sur les propriétés électrophysiologiques et les mécanismes de régulation du Ca²⁺ dans ce modèle. D'autre part, ce projet devrait aussi contribuer à déterminer si dans la BM l'altération d'une protéine appartenant à la matrice extracellulaire musculaire est responsable (i) d'une réduction de l'excitabilité de la cellule musculaire ou de la libération de Ca²⁺ induite par la dépolarisation, (ii) d'une surcharge calcique cytosolique, pouvant rendre compte respectivement de la faiblesse musculaire et des phénomènes dystrophiques qui caractérisent la maladie. Enfin, en déterminant quelles fonctions musculaires sont altérées dans la maladie, ce projet pourrait conduire à terme à identifier des cibles thérapeutiques pour traiter cette pathologie actuellement incurable.

SUMMARY

Unraveling the pathophysiology of Bethlem Myopathy using a unique zebrafish model for the disease

Bethlem myopathy (BM) is a neuromuscular disease characterized by joint contractures and muscle weakness. BM is caused by mutations in one of the genes encoding one of the three α -chains of collagen VI (COLVI), a component of the skeletal muscle extracellular matrix. Nowadays, an unresolved question is to understand how alteration of COLVI located outside the muscle cells leads to functional modifications in muscle fibers. The zebrafish model *col6a1*^{Δex14} is currently the unique animal model of the disease since it is the only model to reproduce a mutation that is the most frequently found in BM patients. In patient and *col6a1*^{Δex14} zebrafish muscles, the structure of the sarcoplasmic reticulum has been found to be altered, thus suggesting dysfunction in intracellular Ca²⁺ handling and/or in ion channels that are known to control Ca²⁺ homeostasis and to play pivotal roles in muscle function and pathogenesis. Therefore, our project aims at exploring the properties of ion channels and intracellular Ca²⁺ regulation using electrophysiological approaches and intracellular Ca²⁺ measurement at rest and during activity in isolated muscle fibers from *col6a1*^{Δex14} zebrafish. On one hand, this project should contribute to decipher how alteration in an extracellular matrix component transduces pathogenic signals within muscle fiber and should possibly lead to iden-

tify therapeutic targets for this currently incurable disease. On the other hand, because functional studies on zebrafish muscle cells are scarce, this project will provide a sound database on the electrophysiological properties of this cell model. \diamond

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Straub V, Murphy A, Udd B. 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies - Nomenclature and reformed classification. Naarden, the Netherlands, 17-19 March 2017. *Neuromuscul Disord* 2018 ; 28 : 702-10.
2. Lamandé SR, Bateman JF. Collagen VI disorders: insights on form and function in the extracellular matrix and beyond. *Matrix Biol* 2018 ; 72 : 348-67.
3. Allamand V, Briñas L, Bonne G, et al. ColVI myopathies: where do we stand, where do we go? *Skelet Muscle* 2011 ; 1 : 30.
4. Bönneman CG. The collagen VI-related myopathies: muscle meets its matrix. *Nat Rev Neurol* 2011 ; 7 : 379-90.
5. Bonaldo P, Braghetta P, Bressan GM, 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.
6. Irwin WA, Bergamin N, Sabatelli P, et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat Genet* 2003 ; 35 : 367-71. doi:10.1038/ng1270
7. Cescon M, Gregorio I, Eiber N, et al. Collagen VI is required for the structural and functional integrity of the neuromuscular junction. *Acta Neuropathol* 2018 ; 136 : 483-99.
8. Telfer WR, Busta AS, Bonnemann CG, et al. Zebrafish models of collagen VI related myopathies. *Hum Mol Genet* 2010 ; 19 : 2433-44.
9. Radev Z, Hermel JM, Elipot Y, et al. A TALEN-exon skipping design for a Bethlem myopathy model in zebrafish. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0133986.
10. Burr AR, Molkentin JD Genetic evidence in the mouse solidifies the calcium hypothesis of myofiber death in muscular dystrophy. *Cell Death Differ* 2015 ; 22 : 1402-12.
11. Allard B From excitation to intracellular Ca²⁺ movements in skeletal muscle: basic aspects and related clinical disorders. *Neuromuscul Disord* 2018 ; 28 : 394-401.

TIRÉS À PART

R. Idoux



Global Registry for COL6-related dystrophies

Registre global des dystrophies liées au collagène de type VI

S'inscrire sur : www.collagen6.org

Ou contactez-nous par e-mail à l'adresse : collagen6registry@ncl.ac.uk

La traduction française sera bientôt disponible sur le site web.

