



HAL
open science

Caractérisation électrophysiologique in situ à l'aide de la technique de patch-clamp de la cellule musculaire striée du Nématode *Caenorhabditis elegans*

Maëlle Jospin

► **To cite this version:**

Maëlle Jospin. Caractérisation électrophysiologique in situ à l'aide de la technique de patch-clamp de la cellule musculaire striée du Nématode *Caenorhabditis elegans*. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2004. Français. NNT : . tel-00012028

HAL Id: tel-00012028

<https://theses.hal.science/tel-00012028>

Submitted on 24 Mar 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE
présentée
devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
pour l'obtention
du DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le 18 juin 2004

par

Maëlle JOSPIN

**CARACTERISATION ELECTROPHYSIOLOGIQUE *IN SITU* A L'AIDE DE LA
TECHNIQUE DE PATCH-CLAMP DE LA CELLULE MUSCULAIRE STRIEE DU
NEMATODE *CAENORHABDITIS ELEGANS***

Directeur de thèse : M. Bruno ALLARD, Professeur

JURY :	M. Jean-Louis BESSEREAU, Chargé de Recherches	Rapporteur
	M. Pierre CHARNET, Directeur de Recherches	Rapporteur
	M. Bruno ALLARD, Professeur	Examineur
	M. Pascal BARBRY, Directeur de Recherches	Examineur
	M. Robert BONVALLET, Professeur	Examineur

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE INTEGRATIVE, CELLULAIRE ET MOLECULAIRE
UMR CNRS 5123
UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

INTRODUCTION.....	6
HISTORIQUE.....	9
CHAPITRE 1 : Le système musculaire de <i>Caenorhabditis elegans</i>	9
I. L'anatomie de <i>C. elegans</i>.....	9
1. L'anatomie générale.....	9
2. Les différentes catégories de muscles chez <i>C. elegans</i>	10
II. La structure des muscles striés	10
1. La morphologie des cellules musculaires de la paroi	10
2. L'ultrastructure des sarcomères	11
3. L'organisation spatiale des sarcomères	13
4. L'ancrage des cellules musculaires de la paroi	13
III. Le fonctionnement des muscles striés.....	15
1. Le couplage excitation-contraction des cellules musculaires striées de <i>C. elegans</i>	15
2. L'activation coordonnée des muscles de la paroi du corps de <i>C. elegans</i>	17
IV. La jonction neuromusculaire	18
1. L'innervation des muscles de la paroi du corps.....	18
2. La morphologie de la jonction neuromusculaire de <i>C. elegans</i>	19
3. Le fonctionnement de la jonction neuromusculaire.....	19
CHAPITRE 2 : Les canaux ioniques de <i>Caenorhabditis elegans</i>	22
I. Le développement des techniques électrophysiologiques <i>in situ</i> chez <i>C. elegans</i>.....	22
II. Les canaux calciques.....	24
1. Les canaux calciques voltage-dépendants chez <i>C. elegans</i>	25
1.1. Les sous-unités $\alpha 1$	25
1.1.1. EGL-19	26
1.1.2. UNC-2	27
1.1.3. Les autres sous-unités $\alpha 1$	28
1.2. Les sous-unités accessoires	29
2. Les canaux calciques non voltage-dépendants chez <i>C. elegans</i>	29
2.1. Le récepteur à la ryanodine	30
2.2. Le récepteur à l'IP3	30
2.3. Les canaux TRP.....	30
3. Les courants calciques enregistrés <i>in situ</i> chez <i>C. elegans</i>	32
III. Les canaux potassiques.....	32
1. Les canaux potassiques 6 TM.....	33
1.1. La famille Shaker, Shab, Shaw, Shal.....	34
1.1.1. EXP-2	34
1.1.2. KVS-1	35
1.1.3. EGL-36.....	36
1.2. La famille eag.....	37
1.2.1. EGL-2.....	37
1.2.2. UNC-103.....	38
1.3. La famille KQT.....	38
1.4. La famille SLO	39
1.4.1. SLO-1	39
1.4.2. SLO-2	40
1.5. La famille SK	41
2. Les canaux potassiques 4 TM.....	42
2.1. SUP-9	43
2.2. TWK-18	44
3. Les canaux potassiques 2 TM.....	45
4. Les courants potassiques enregistrés <i>in situ</i> chez <i>C. elegans</i>	45

IV. Les canaux sodiques.....	46
1. L'historique de la famille des canaux sodiques sensibles à l'amiloride	47
2. Les caractéristiques communes des canaux sodiques sensibles à l'amiloride	48
3. La diversité des canaux sodiques sensibles à l'amiloride	49
4. Les canaux sodiques sensibles à l'amiloride chez <i>C. elegans</i>	52
4.1. Le canal FLR-1	52
4.2. Les dégénérines.....	52
4.2.1. MEC-4/MEC-10	52
4.2.2. DEG-1.....	54
4.2.3. UNC-105.....	55
4.2.4. UNC-8/DEL-1	55
4.3. L'analyse structure-fonction des dégénérines	56
4.3.1. Le site "deg"	57
4.3.2. Le segment ERD.....	58
4.3.3. Le segment pré-M1	58
4.3.4. Le segment M2	59
4.4. Le complexe mécanotransducteur.....	60
V. Les autres canaux.....	62
 MATERIELS & METHODES	63
I. Le matériel biologique	63
1. Les souches.....	63
2. La culture.....	63
II. La dissection	63
1. L'immobilisation	64
2. L'incision.....	64
III. L'électrophysiologie.....	65
1. Les principes de la méthode	65
2. Le montage expérimental	65
3. L'analyse des résultats.....	66
4. L'uniformité de potentiel.....	67
IV. L'imagerie calcique.....	68
1. Les principes de la méthode	68
2. Le montage expérimental	68
V. Les solutions	69
 RESULTATS.....	70
Présentation des résultats.....	70
PARTIE 1. Etude <i>in situ</i> du canal calcique voltage-dépendant EGL-19 et de son rôle dans le fonctionnement de la cellule musculaire de <i>Caenorhabditis elegans</i> : ETUDE 1	71
PARTIE 2. Caractérisation <i>in situ</i> à l'aide de la technique de patch-clamp des courants potassiques de la cellule musculaire de <i>Caenorhabditis elegans</i> : ETUDE 2	73
Résultats complémentaires.....	74
PARTIE 3. Etude de deux canaux sodiques sensibles à l'amiloride dans la cellule musculaire de <i>Caenorhabditis elegans</i> : ETUDES 3 et 4	76
Etude 3 : Caractérisation <i>in situ</i> à l'aide de la technique de patch-clamp de la dégénérine musculaire UNC-105 et de son interaction avec le collagène LET-2 chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	76
Etude 4 : Mise en évidence de la présence d'un canal sodique sensible à l'amiloride activé par l'acidification extracellulaire dans le muscle de <i>Caenorhabditis elegans</i>	78

DISCUSSION	80
I. Les propriétés de base de l'activation des cellules musculaires striées de <i>C. elegans</i>	80
II. L'existence de conductances de réserve.....	83
III. Une activation des cellules musculaires par l'étirement membranaire?	85
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 88

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

verso

Figure 1. Anatomie générale de <i>Caenorhabditis elegans</i>	9
Figure 2. Organisation et morphologie des cellules musculaires de la paroi du corps de <i>C. elegans</i>	10
Figure 3. Organisation des sarcomères et des structures d'attache des cellules musculaires de la paroi	11
Figure 4. Cliché en microscopie électronique à transmission d'une coupe transversale d'une cellule musculaire de la paroi du corps de <i>C. elegans</i>	15
Figure 5. Enregistrements en configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp des courants évoqués par l'application de GABA et d'acétylcholine sur les cellules musculaires de la paroi du corps de <i>C. elegans</i> ..	19
Figure 6. Structure moléculaire des canaux calciques voltage-dépendants	24
Figure 7. Courbes courants-potentiels correspondant aux courants voltage-dépendants enregistrés <i>in situ</i> dans les cellules musculaires de la paroi et dans les neurones ASER de <i>C. elegans</i>	31
Figure 8. Structure moléculaire des sous-unités α des canaux potassiques des familles à 6, 4 et 2 segments transmembranaires	32
Figure 9. Courants potassiques enregistrés <i>in situ</i> en configuration cellule-entière sur les cellules musculaires de la paroi et dans les neurones ASER de <i>C. elegans</i>	44
Figure 10. Structure moléculaire d'un ASC et localisation des domaines conservés dans tous les ASCs	47
Figure 11. Modèle de complexes mécanotransducteurs centrés autour des dégénérines	59
Figure 12. Les différentes étapes de la microdissection de <i>C. elegans</i>	63
Figure 13. Les différentes configurations du patch-clamp utilisées	64
Figure 14. Fréquence d'apparition des deux types de canaux potassiques calcium-activés observés en configuration inside-out sur des animaux sauvages et différents mutants	74
Figure 15. Contribution de SLO-2 au courant global.....	75
Tableau 1. Tableau récapitulatif des principales protéines composant les canaux calciques chez <i>C. elegans</i> et leurs équivalents chez les Mammifères.....	25
Tableau 2. Tableau récapitulatif des principales sous-unités α des canaux potassiques de <i>C. elegans</i> et leurs équivalents chez les Mammifères.	33
Tableau 3. Composition des différentes solutions salines utilisées en configuration cellule-entière	68
Tableau 4. Composition des différentes solutions salines utilisées en configuration cellule-attachée et inside-out	69

Liste des abréviations et conventions

Abréviations :

4-AP	4-AminoPyridine
ARN (RNA)	Acide RiboNucléique
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
ASC	Amiloride-Sensitive Channel
ASIC	Acid-Sensing Ion Channel
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CICR	Calcium-Induced Calcium Release
COS	CV-1 Origin SV40
CRD	Cysteine-Rich Domain
DHP	DiHydroPyridine
ENaC	Epithelial Na ⁺ Channel
ERD	Extracellular Regulation Domain
FaNaC	FMRFamide-activated Na ⁺ Channel
GABA	Gamma-AminoButyric Acid
GFP	Green Fluorescent Protein
HEK	Human Embryonic Kidney
HERG	Human Eag Related Gene
IP3	Inositol triPhosphate
KCN	K ⁺ ChaNnel
LTP	Long Terme Potentialisation
MiRP	MinK-Related Peptide
PHA-1	PseudoHypoAldostéronisme de type 1
RNAi	RNA interférence
TEA	TetraEthylAmmonium
TRP	Transient Receptor Potentiel

Seules les abréviations utilisées au moins deux fois dans ce manuscrit sont indiquées dans cette section. De plus, la plupart provenant de la littérature internationale, leur signification est en langue anglo-saxonne et n'a pas été traduite ici.

Conventions :

Les gènes de *C. elegans* sont désignés par trois lettres minuscules, suivies d'un chiffre, l'ensemble étant noté en italique. Les trois lettres se réfèrent soit à la nature du gène (ex : *slo-1*, *slo-2*), soit au phénotype observé lorsque le gène est muté (ex : unc (*uncoordinated*), mec (*mechanosensory abnormal*) *deg* (*degeneration*), *egl* (*egg laying defective*), pat (*paralyzed, arrested at two-fold*), *let* (*lethal*)). Les produits géniques sont désignés par les trois lettres du gène en majuscules (ex : SLO-1). Les mutants portent le nom du gène muté (ex : les mutants *egl-19* portent une mutation dans le gène *egl-19*).

Selon les conventions de la classification systématique, les différents taxons nommés portent une majuscule au début de leur nom (ex : Mollusques). Les noms d'espèces indiqués en latin correspondent à ceux de la nomenclature binomiale et sont ainsi notés en italique (ex : *Caenorhabditis elegans*).

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Au milieu des années 1960, le Nématode *Caenorhabditis elegans* est choisi par Sydney Brenner comme organisme modèle pour l'étude de deux grandes problématiques liées à l'état multicellulaire : le développement embryonnaire et le fonctionnement du système nerveux. A ses yeux *C. elegans* possède en effet toutes les caractéristiques d'un organisme complexe réunies dans un animal simple et particulièrement adapté aux études génétiques. Ses travaux, associés à ceux de ses collaborateurs John Sulston et Robert Horvitz, ont été récompensés par le prix Nobel de Médecine en 2002 (voir pour revue Ankeny, 2001 ; Labouesse, 2003).

C. elegans présente plusieurs caractéristiques qui facilitent son élevage en laboratoire. Sa taille réduite (1 mm de long), son mode de vie non parasitique et son régime bactériophage permettent de le cultiver sur des boîtes de Pétri et de manipuler un grand nombre d'animaux à moindre coût. La possibilité de congeler les animaux et de les décongeler *ad libitum* favorise le stockage des différentes souches. Un grand nombre d'individus peuvent être obtenus en un minimum de temps grâce au temps de génération très court (1 génération en 3 jours) et le pouvoir reproductif élevé (environ 300 descendants par animal) de cet organisme. Le mode de reproduction de l'animal est également un atout considérable puisque les animaux sont capables de se reproduire sur un mode hermaphrodite, les lignées pures étant alors facilement maintenues, ou alors par croisement avec des individus mâles, ce qui permet de réaliser des croisements dirigés. De plus étant donné la taille restreinte de son génome (environ 100 mégabases), *C. elegans* a été le premier organisme multicellulaire dont le génome a été entièrement séquencé (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

L'ensemble de ces caractéristiques a rendu les approches de génétique très performantes chez cet animal. Elles se déroulent typiquement en quatre étapes successives : (i) une mutagenèse aléatoire d'un grand nombre d'animaux, (ii) un crible phénotypique visant à rechercher des animaux mutants présentant un phénotype particulier, (iii) la localisation génétique de ces mutations par les méthodes classiques de la génétique, (iv) l'identification des gènes mutés.

Parallèlement, deux autres techniques sont particulièrement mises en œuvre chez *C. elegans* : la transformation génétique et l'interférence par ARN double brin ou RNAi. La transformation génétique consiste en l'injection d'ADN exogène dans la partie syncytiale de la gonade d'un hermaphrodite adulte suivie du repérage dans la descendance des individus possédant le transgène. Cette technique a plusieurs applications possibles ; elle peut, entre

autre, être utilisée pour déterminer le profil d'expression d'un gène en l'associant à la GFP (Green Fluorescent Protein) ou pour étudier l'effet de la présence tissu-spécifique d'une protéine dans le cadre des analyses mosaïques. Le RNAi est une méthode d'inactivation génique qui consiste en l'introduction d'ARN double brin dans l'organisme déclenchant un mécanisme catalytique dégradant sélectivement les ARNs cellulaires correspondant à la séquence introduite. Cette méthode est particulièrement puissante et simple à mettre en œuvre chez *C. elegans*. De nombreux gènes peuvent être rapidement inactivés et leur fonction est alors extrapolée d'après le phénotype observé.

L'utilisation de ces différents outils a ainsi permis d'isoler chez *C. elegans* un grand nombre de gènes impliqués dans des processus biologiques ou comportements aussi variés que le développement, la locomotion, la mécanosensibilité, *etc...* La détermination précise du rôle de chacun des gènes isolés nécessite cependant une caractérisation rigoureuse du phénotype des mutants générés. Or, jusqu'à très récemment, cette caractérisation se limitait à une analyse sur l'organisme entier puisqu'elle consistait en la quantification de la fréquence de ponte ou d'alimentation, la qualité de la locomotion ou la présence d'anomalies anatomiques externes et également internes du fait de la transparence de l'animal. Le manque d'approches physiologiques à l'échelle cellulaire s'expliquait par la difficulté d'accès aux cellules de *C. elegans*. En effet, l'animal est entouré d'une cuticule externe très résistante, qui forme une véritable barrière, difficile à perméabiliser sans abîmer le ver en entier. Une alternative à la perméabilisation de la cuticule est la dissection de l'animal, mais là aussi un obstacle est rencontré du fait de la taille de l'animal. Ses dimensions réduites, 1 mm de long sur 50 µm de large, rendent la dissection extrêmement laborieuse et ont longtemps écarté cette approche. Cependant, en 1998, pour la première fois, une équipe américaine a réussi à exposer des neurones hors de l'animal en réalisant une petite incision derrière la tête (Goodman *et al.*, 1998). L'année suivante, J. Richmond est parvenue à ouvrir l'animal sur toute sa longueur, permettant ainsi l'accès aux cellules musculaires et aux neurones (Richmond & Jorgensen, 1999). Ces travaux pionniers ont ouvert la voie aux premiers enregistrements électrophysiologiques *in situ* et la possibilité de caractériser en détail des mutations portant sur des canaux ioniques ou des protéines y étant associées. Cependant, du fait de la difficulté de la préparation, ces études restent néanmoins peu nombreuses et le champ d'investigation est encore très ouvert.

Mon travail de thèse a été dans ce contexte d'adapter la technique de dissection sur *C. elegans* mise au point par Richmond & Jorgensen afin de réaliser la première description approfondie des propriétés électrophysiologiques des muscles striés de cet animal. La

première partie de ce manuscrit consiste en une synthèse bibliographique rappelant l'organisation générale et musculaire de *C. elegans* et présentant ensuite les travaux consacrés aux principales conductances ioniques, en insistant particulièrement sur celles étudiées dans ce travail de thèse. Après une partie dédiée aux matériels et méthodes utilisés, quatre publications sont présentées, chacune chapeautée d'un texte introductif et éventuellement le cas échéant de résultats supplémentaires. Enfin la dernière partie du manuscrit propose une synthèse des principales conclusions de ce travail ainsi que les perspectives qu'il permet d'envisager.

HISTORIQUE

HISTORIQUE

CHAPITRE 1 : Le système musculaire de *Caenorhabditis elegans*

I. L'anatomie de *C. elegans*

Le phylum des Nématodes, auquel *Caenorhabditis elegans* appartient, est un groupe zoologique qui se caractérise par une grande diversité au niveau de la taille, du mode et du milieu de vie des animaux. Tous les Nématodes partagent pourtant le même plan d'organisation générale avec un tube externe, composé de la cuticule et des tissus qui lui sont associés, entourant une cavité pseudocoelomique contenant les tractus digestif et génital. La forme de l'animal est assurée par une pression hydrostatique maintenue au sein de la cavité pseudocoelomique.

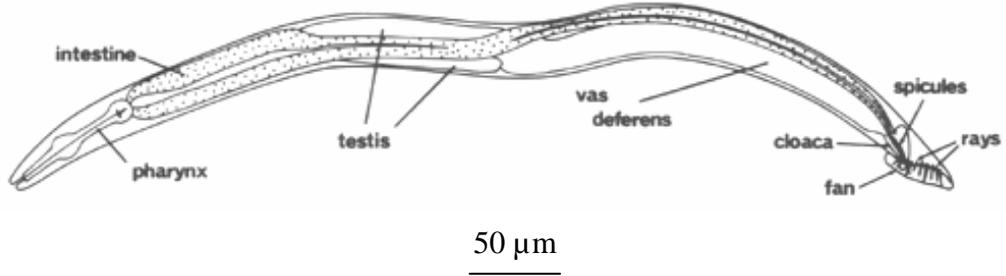
1. L'anatomie générale (White, 1988)

Sur une coupe transversale schématisée de *C. elegans* (Figure 1), le plan d'organisation typique des Nématodes est facilement observable. A l'extérieur on trouve la cuticule constituée de trois couches collagéniques et présentant des structures différenciées, les alae, qui participent au déplacement sur le côté de l'animal adulte sur milieu solide par adhérence avec le substrat. La cuticule est sécrétée par le tissu sous-jacent, appelé hypoderme et composé de cellules épithéliales syncytiales. Cet hypoderme forme des crêtes au niveau dorsal et ventral le long desquelles courent les cordes nerveuses. L'ensemble de l'hypoderme et des cordes nerveuses est recouvert d'une lame basale. En plus des cordes nerveuses, le système nerveux est composé d'un anneau péri-pharyngien, d'organes sensoriels localisés en avant de cet anneau et de neurones situés au niveau de la queue de l'animal.

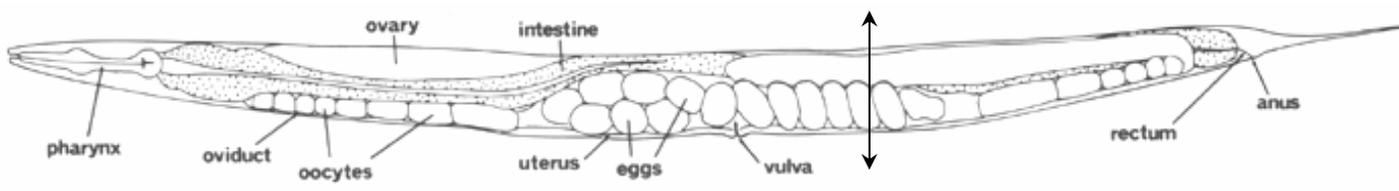
Les muscles de la paroi du corps, qui sont les muscles responsables de la locomotion, sont répartis en quatre quadrants, deux dorsaux et deux ventraux, apposés à la face pseudocoelomique de la lame basale et parcourant l'ensemble de l'animal.

A l'intérieur de la cavité pseudocoelomique, sont trouvés les tractus digestif et génital. Le tractus digestif est composé d'un pharynx bilobé qui pompe la nourriture, d'un intestin et d'un rectum localisé dans la partie postérieure de l'animal. Le tractus génital peut être chez *C. elegans* soit de type hermaphrodite soit de type mâle. Le système reproducteur hermaphrodite consiste en une gonade bilobée, avec un lobe s'étendant vers l'avant de l'animal et l'autre vers l'arrière. Chaque lobe est en forme de U et comprend un ovaire, un oviducte, une

C. elegans mâle



C. elegans hermaphrodite



↓
coupe transversale

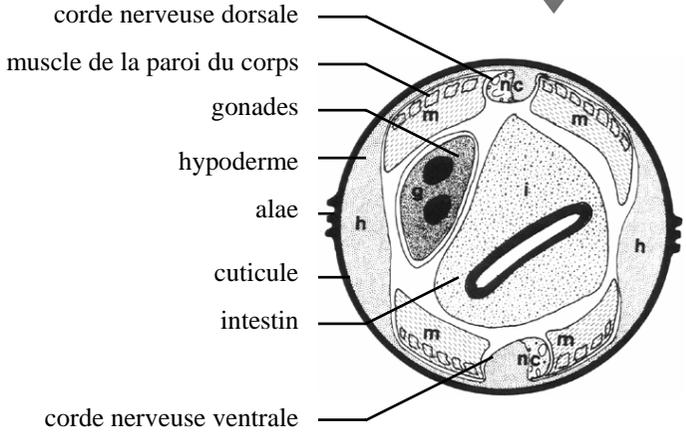


Figure 1. Anatomie générale de *Caenorhabditis elegans* (d'après Wood, 1988).

spermathèque et un utérus qui débouche sur la vulve (Figure 1). La gonade des vers mâles est unilobée ; elle comprend un testicule et un vas deferens qui se termine au niveau d'un cloaque situé à l'extrémité de la queue de l'animal.

2. Les différentes catégories de muscles chez *C. elegans*

Malgré sa simplicité, *C. elegans* possède deux types différents de muscles (voir pour revue Waterston, 1988 ; Moerman & Fire, 1997). Une première catégorie, qui regroupe l'ensemble des muscles nécessaires aux activités alimentaires et sexuelles, est constituée de cellules à sarcomère unique ancré aux extrémités de la cellule par des contacts focaux. Cette catégorie comprend les muscles pharyngiens, qui permettent à l'animal d'attraper et de broyer sa nourriture, les muscles intestinaux et anaux essentiels pour la défécation, les muscles utérins et vulvaires indispensables pour la ponte de l'animal hermaphrodite. De plus chez le mâle on trouve 41 muscles spécifiques nécessaires à l'accouplement. Toutes les cellules composant ces muscles sont mononuclées à l'exception de quatre localisées dans le pharynx.

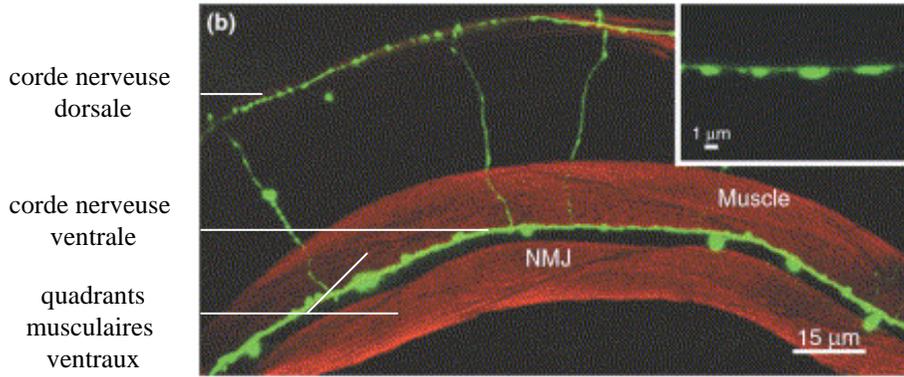
L'autre catégorie de muscle correspond aux cellules musculaires de la paroi du corps (ou body wall muscles) qui assurent la locomotion de l'animal. Ces cellules sont réparties en quatre quadrants musculaires, deux dorsaux et deux ventraux constitués chacun de deux rangs de cellules (Figure 2A). Chaque quadrant comporte 24 cellules mononuclées mis à part le quadrant ventral gauche qui n'en contient que 23 (Sulston & Horvitz, 1977). La locomotion de l'animal se fait par contraction des muscles ventraux et relaxation simultanée des muscles dorsaux et *vice versa*. Cette coordination génère un mouvement sinusoïdal dans le plan dorso-ventral. Les cellules musculaires de la paroi renferment plusieurs sarcomères et, observées au microscope, elles présentent un aspect strié (Rosenbluth, 1965). Ce sont les seules cellules musculaires striées de l'animal et leur structure est proche de celle des cellules musculaires des Vertébrés.

II. La structure des muscles striés

1. La morphologie des cellules musculaires de la paroi

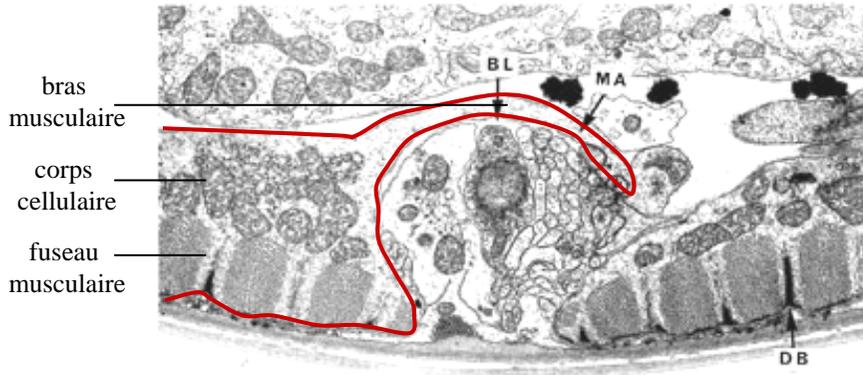
Comme toutes les cellules musculaires des Nématodes, les cellules de la paroi du corps de *C. elegans* présentent une morphologie très caractéristique, en partie liée à l'innervation originale des cellules musculaires de ces animaux. En effet, chez les Nématodes, les motoneurones ne projettent pas vers les cellules musculaires mais à l'inverse ce sont les cellules musculaires qui envoient des projections vers les axones des motoneurones

A



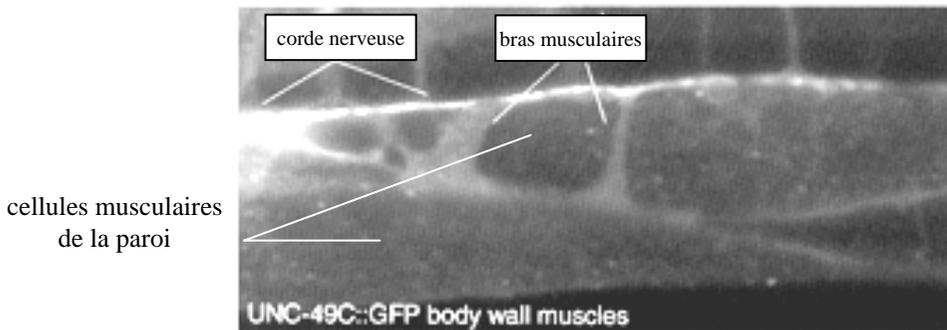
d'après
Broadie & Richmond,
2002

B



d'après
White *et al.*, 1986

C



d'après
Bamber *et al.*, 1999

Figure 2. Organisation et morphologie des cellules musculaires de la paroi du corps de *C. elegans*.

(A) Cliché en microscopie optique à fluorescence d'un animal incisé longitudinalement présentant deux quadrants musculaires ventraux intacts. Un marquage à la phalloïdine (rouge) couplé à une expression spécifique d'une construction GFP dans les neurones (vert) permet de repérer les cellules musculaires de la paroi du corps et les cordes nerveuses respectivement. (B) Cliché en microscopie électronique à transmission d'une section transversale au niveau de la corde nerveuse ventrale. Les contours d'une cellule musculaire ont été soulignés en rouge. MA indique la position du bras musculaire, BL celle de la lame basale et DB celle d'un corps dense. (C) Cliché en microscopie optique à fluorescence d'un animal exprimant une construction GFP spécifiquement dans les muscles de la paroi du corps et permettant de distinguer les bras musculaires.

(Chitwood & Chitwood, 1974).

Les cellules musculaires de la paroi du corps de *C. elegans* présentent ainsi trois parties distinctes : (i) le corps cellulaire qui renferme les organites cytoplasmiques et le noyau, (ii) les bras, qui sont les structures de projection du muscle vers le motoneurone, (iii) le fuseau qui contient une couche fine (1 à 2 μm d'épaisseur) de myofilaments (White *et al.*, 1986, Jorgensen & Nonet, 1995) (Figures 2B et 2C). Observées au microscope, ces cellules présentent une striation oblique dont l'origine est à rechercher dans l'arrangement spatial des sarcomères.

2. L'ultrastructure des sarcomères

Comme chez les Vertébrés, l'unité contractile de la cellule musculaire striée de *C. elegans* est le sarcomère. Ce sarcomère a une structure classique avec un enchaînement de filaments fins d'actine entre lesquels s'intercalent des filaments épais de myosine. De plus, on retrouve la majorité des protéines accessoires présentes chez les Vertébrés, comme par exemple la tropomyosine, les troponines et les protéines régulatrices de l'assemblage ou du maintien des filaments fins et épais (voir pour revue Waterston, 1988). Quelques différences sont quand même à noter comme la présence de paramyosine dans les filaments épais (Waterston *et al.*, 1974) et la différence de taille des myofilaments : les filaments épais sont plus longs et plus larges au centre que ceux des Vertébrés (10 μm de long et 33,4 nm de diamètre chez *C. elegans* à la place de 1,6 μm de long et 14 nm de diamètre chez les Vertébrés) tandis que les filaments fins sont plus longs (6 μm au lieu de 1 μm) (Harris *et al.*, 1977).

Pour obtenir une contraction musculaire efficace, il est nécessaire que la tension développée par les sarcomères soit transmise à l'ensemble de la cellule à l'aide de structures d'ancrage des sarcomères à la membrane plasmique. Chez *C. elegans*, l'ancrage des sarcomères sur la membrane musculaire se fait d'une part au niveau de plaques d'attachements, localisées aux extrémités des cellules musculaires et qui sont analogues aux structures présentes au niveau des jonctions myotendineuses chez les Mammifères, et d'autre part par une série d'ancrages latéraux constitués par les corps denses et les lignes M (Francis et Waterston, 1985).

Les corps denses sont les structures d'attache des filaments fins ; ils ont ainsi un rôle identique à celui des stries Z chez les Vertébrés (Waterston *et al.*, 1980). Ils présentent une structure "en forme de doigt" qui projette dans le cytoplasme des cellules musculaires à partir de la membrane plasmique (Francis et Waterston, 1985) (Figure 3). Les gènes codant les protéines constitutives des corps denses ont été identifiés par génétique classique (Williams &

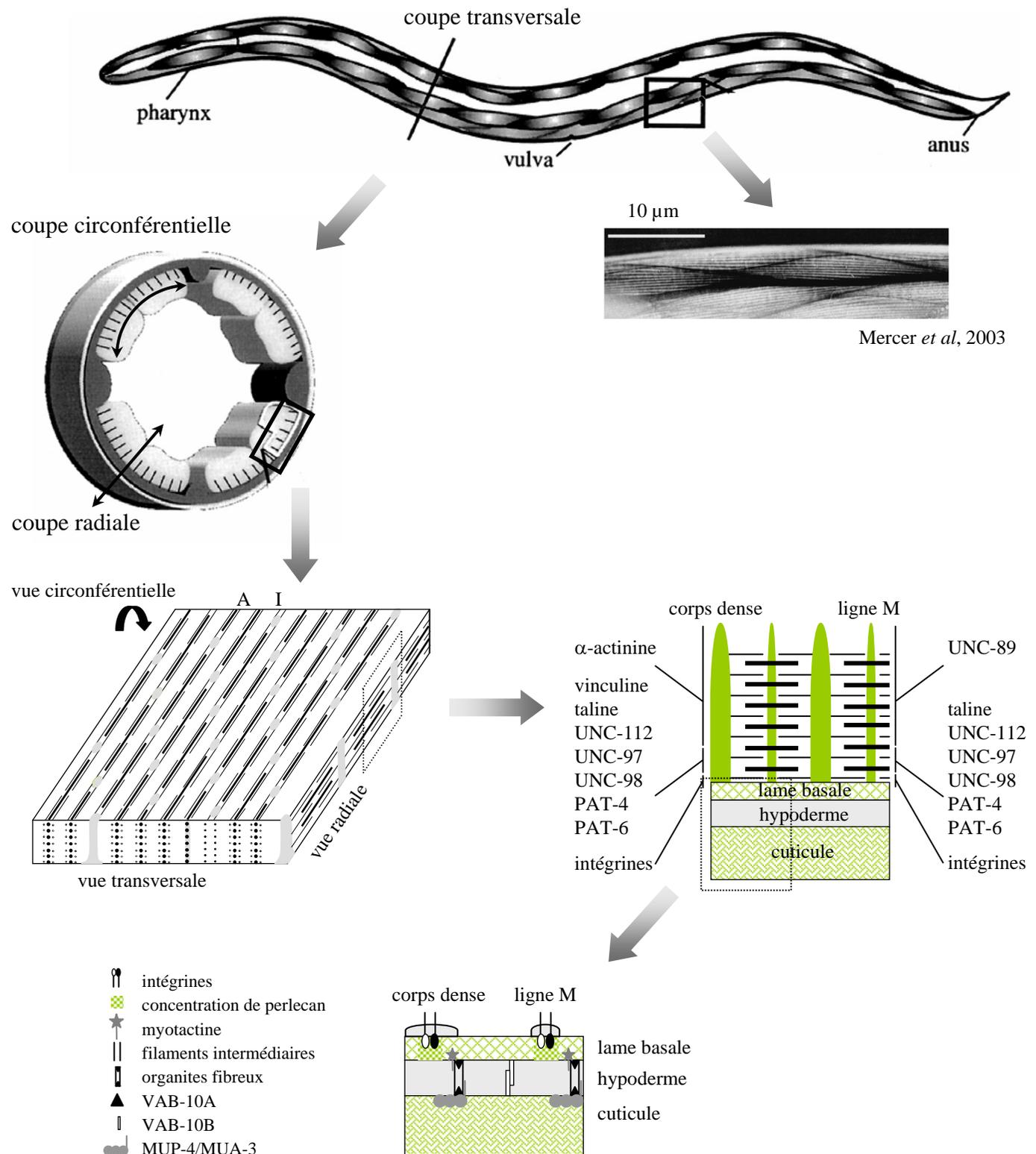


Figure 3. Organisation des sarcomères et des structures d'attache des cellules musculaires de la paroi . Pour plus de clarté sur les représentations schématiques, les dimensions cellulaires n'ont pas été respectées. Sur le diagramme en 3D, (A) et (I) indiquent respectivement la position d'une bande A et d'une bande I (d'après Mercer *et al.*, 1999 ; Mackinnon *et al.*, 2002 ; Boshier *et al.*, 2003).

Waterston, 1994) et ils ont ensuite été clonés et caractérisés. Les corps denses sont au contact de la lame basale, contacts au niveau desquels un composé de la lame basale est fortement concentré : le perlecan (Francis & Waterston, 1991 ; Rogalski *et al.*, 1993). Cette protéine, codée par le gène *unc-52*, est essentielle à la formation des corps denses et elle est indispensable pour une localisation appropriée des éléments transmembranaires des corps denses : les intégrines β et α codées respectivement par *pat-3* et *pat-2* (Hresko *et al.*, 1994 ; Gettner *et al.*, 1995 ; Williams, résultats non publiés) (Figure 3). Les éléments cytosoliques constitutifs des corps denses identifiés sont l' α -actinine (Francis and Waterston 1985; Barstead *et al.*, 1991), la taline (Moulder *et al.*, 1996), la vinculine appelée aussi DEB-1 (Francis & Waterston 1985 ; Barstead & Waterston, 1989) , PAT-4 (Mackinnon *et al.*, 2002), PAT-6 (Lin *et al.*, 2003), UNC-112 (Rogalski *et al.*, 2000), UNC-97 (Hobert *et al.*, 1999) et UNC-98 (Mercer *et al.*, 2003) (Figure 3). L' α -actinine semble être la seule protéine localisée sur l'ensemble de la longueur des corps denses alors que les autres composés sont restreints à la base de ces structures. Les corps denses présentent une forte similarité avec les contacts focaux des Vertébrés puisque ces derniers sont définis comme un lien entre le cytosquelette intracellulaire d'actine et la matrice extracellulaire (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka, 1996). De plus, les corps denses sont composés de protéines similaires à celles intervenant dans les contacts focaux comme la taline, la vinculine et l' α -actinine. PAT-4 et PAT-6 sont respectivement des membres des familles des kinases liées aux intégrines (ou ILK pour Integrin-Linked Kinase) et des actopaxines/parvines/affixines, alors que UNC-97 et UNC-112 sont les homologues respectifs de PINCH-1 et MIG-2. Chez les Mammifères, les protéines ILK, parvines, PINCH et MIG-2 ont des rôles structuraux et signalétiques au niveau des contacts focaux (voir pour revue Brakebusch & Fässler, 2003 ; Tu *et al.*, 2003).

Les filaments épais s'organisent autour des lignes M qui s'ancrent sur la membrane plasmique de la cellule musculaire au contact de la lame basale (Francis & Waterston, 1985) (Figure 3). Comme pour les corps denses ces régions d'ancrage sont concentrées en perlecan (Francis & Waterston, 1991). Les lignes M présentent une composition moléculaire semblable à celle des corps denses mis à part l'absence d' α -actinine et de vinculine et la présence d'une protéine supplémentaire, UNC-89 (Francis & Waterston, 1985 ; Benian *et al.*, 1996) (Figure 3).

Les plaques d'attachement sont localisées entre les cellules musculaires de la paroi et sont restreintes aux frontières des cellules non parallèles à l'axe des myofilaments. Ces plaques d'attachement prennent appui au niveau de la lame basale qui remonte légèrement entre les

cellules (d'environ 0.5 μm) et qui présente une concentration forte en perlecan (Francis & Waterston, 1985, 1991). Au niveau de la membrane plasmique musculaire on retrouve les intégrines, vinculine, UNC-112, PAT-4, et PAT-6 (Francis & Waterston, 1985 ; Rogalski *et al.*, 2000 ; Mackinnon *et al.*, 2002 ; Lin *et al.*, 2003).

3. L'organisation spatiale des sarcomères

Les cellules de la paroi du corps sont les seules cellules musculaires striées de *C. elegans*. Observées au microscope optique, ces cellules présentent une striation non pas perpendiculaire à l'axe longitudinal de la cellule mais oblique (Rosenbluth, 1965). L'origine de l'obliquité de la striation est à rechercher dans la distribution des structures d'ancrage des myofilaments dans la cellule. Chez les Vertébrés, les filaments fins sont attachés au niveau des disques Z, disposés perpendiculairement à l'axe longitudinal, ce qui conduit à un alignement des sarcomères sur l'ensemble de la myofibrille. Chez *C. elegans*, les filaments d'actine s'ancrent sur des structures ponctuelles, les corps denses, dont la répartition se fait sous forme de quadrillage, un des axes de ce quadrillage étant parallèle au grand axe de la cellule alors que l'autre forme un angle de 85° avec le petit axe de la cellule (Figure 3).

Il résulte de cette distribution spatiale des corps denses qu'en coupe radiale les sarcomères sont alignés, alors qu'en coupe circonférentielle les unités contractiles adjacentes dans la largeur de la cellule sont décalées d'environ 1 μm (Mackenzie & Epstein, 1980) (Figure 3). L'observation des cellules au microscope optique est l'équivalent d'une coupe circonférentielle ce qui explique l'obliquité des bandes A et I formées par l'enchaînement des sarcomères. Chez l'adulte une cellule musculaire de la paroi contient environ 10 bandes A et I. En section transversale, le décalage des sarcomères est également visible puisque sur un même niveau de coupe on peut distinguer au microscope électronique les différents niveaux de l'unité contractile (bande A, bande I, ligne M et corps denses) (Figure 4).

4. L'ancrage des cellules musculaires de la paroi

Pour que la force générée par la contraction musculaire génère un mouvement de l'animal, il est nécessaire que les cellules musculaires de la paroi du corps soient couplées mécaniquement à la cuticule. La continuité mécanique entre les cellules musculaires et la cuticule est assurée par des structures apparaissant très denses aux électrons, appelées organites fibreux et traversant la lame basale (20 nm d'épaisseur) et l'hypoderme (50 nm d'épaisseur) (Francis & Waterston, 1991).

Les organites fibreux sont constitués de deux structures différentes : (i) de plaques denses

aux électrons, localisées à la fois sur la membrane hypodermale basale apposée à la lame basale et sur la membrane apicale apposée à la cuticule et (ii) de faisceaux de filaments intermédiaires reliant les plaques membranaires se faisant face (Francis et Waterston, 1991). Ces structures présentent des similarités avec les hémidesmosomes existant chez les Mammifères (Hahn & Labouesse, 2001). La distribution des organites fibreux n'est pas aléatoire : elle est restreinte aux régions de l'hypoderme accolées aux muscles (striés ou non) et aux neurones mécanosensoriels (Francis & Waterston, 1991). De plus, leur répartition est corrélée avec la présence de structures périodiques sur la cuticule : en effet la cuticule est constituée d'une succession d'anneaux séparés par des sillons (Cox *et al.*, 1981) et les organites fibreux sont exclusivement localisés au niveau des anneaux (Francis & Waterston, 1991).

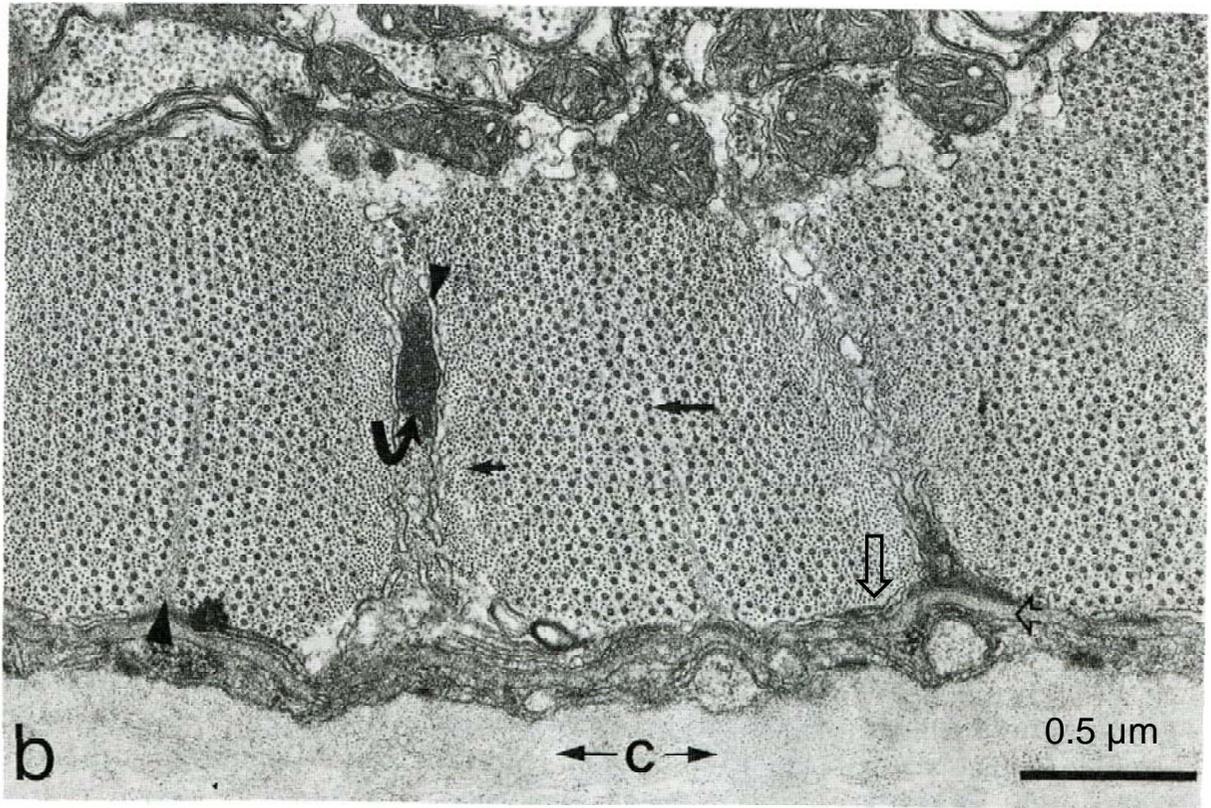
En une dizaine d'années, la composition moléculaire des organites fibreux a été en partie élucidée (Figure 3). Chez *C. elegans* il existe 11 gènes codant des filaments intermédiaires ; des mutations sur trois d'entre eux (*ifa-2*, *ifa-3* et *ifb-1*) conduisent à des perturbations au niveau de l'hypoderme (Dodemont *et al.*, 1994 ; Karabinos *et al.*, 2001). Par exemple, des mutations sur *ifa-2*, appelé aussi *mua-6*, conduisent à un détachement apparent des cellules musculaires de la cuticule, détachement dû à un épaissement important de l'hypoderme (Hapiak *et al.*, 2003). Les filaments intermédiaires constituent ainsi un lien physique entre les deux membranes de l'hypoderme (Figure 3). Au moins deux autres protéines sont impliquées dans le maintien de ce lien : les protéines VAB-10A et VAB-10B (Bosher *et al.*, 2003). Ces protéines sont issues de l'épissage alternatif du gène *vab-10* s'exprimant dans l'hypoderme. VAB-10B fonctionnerait sous forme d'homodimère et assurerait une continuité entre la lame basale et apicale de l'hypoderme alors que VAB-10A serait impliquée dans l'assemblage des filaments intermédiaires (Figure 3). Du côté de la membrane hypodermale apicale, les filaments intermédiaires seraient liés aux protéines MUP-4 et MUA-3 (Hong *et al.*, 2001 ; Bercher *et al.*, 2001). Ces protéines sont homologues et une mutation sur leurs gènes entraîne un détachement de l'hypoderme par rapport à la cuticule. D'après leur séquence en acides aminés ces protéines seraient capables d'établir des interactions moléculaires avec des composants de la cuticule par leur domaine extracellulaire et avec les filaments intermédiaires par leur domaine cytosolique (Figure 3). Du côté de la lame basale, les filaments intermédiaires seraient liés plus ou moins directement à la myotactine (Hresko *et al.*, 1999) (Figure 3). Cette protéine joue un rôle dans l'adhésion des cellules musculaires puisque des mutations sur le gène codant cette protéine mène à un détachement des cellules musculaires par rapport à l'hypoderme. Elle interagit probablement avec une (des) protéine(s) de la lame

basale séparant l'hypoderme et les muscles de la paroi. La nature moléculaire de cette (ces) protéine(s) demeure inconnue ; le perlecan et les intégrines sont des candidats potentiels peu satisfaisants puisque sur les mutants touchés sur ces deux protéines, la myotactine reste associée avec les cellules musculaires de la paroi (Hresko *et al.*, 1994). Le récepteur de la myotactine reste donc à identifier ; il est à rechercher soit parmi les protéines transmembranaires de la membrane musculaire soit parmi les protéines de la lame basale constituée majoritairement de collagène IV, de perlecan, d'ostéonectine, de laminines et de nidogène (Guo & Kramer, 1989 ; Rogalski *et al.*, 1993 ; Schwarzbauer & Spencer, 1993 ; Zhu *et al.*, 1999 ; Kang & Kramer, 2000).

III. Le fonctionnement des muscles striés

1. Le couplage excitation-contraction des cellules musculaires striées de *C. elegans*

Le couplage excitation-contraction convertit un signal électrique sous forme d'une dépolarisation membranaire en un signal chimique correspondant à une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Cette augmentation intracellulaire de calcium entraîne l'activation des protéines contractiles et la contraction des cellules musculaires. Dans le couplage excitation-contraction des cellules musculaires striées de Vertébrés, deux protéines jouent un rôle majeur : le récepteur aux dihydropyridines (DHP) jouant le rôle de voltage sensor (détecteur de potentiel) et/ou de canal calcique voltage-dépendant de type L, essentiellement localisé dans la membrane tubulaire, et le récepteur à la ryanodine correspondant à un canal calcique localisé dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. Ces deux protéines sont couplées : l'activation du récepteur aux DHP conduit à l'ouverture du récepteur à la ryanodine et à la libération de calcium par l'intermédiaire de ce canal à partir du réticulum sarcoplasmique. Dans les muscles squelettiques, le couplage est mécanique via une interaction vraisemblablement physique entre les deux protéines, alors que dans les muscles cardiaques, c'est l'entrée de calcium par le récepteur aux DHP qui active le récepteur à la ryanodine et la libération de calcium (voir pour revue Lamb, 2000). Ce phénomène de libération de calcium autocatalytique est appelé Ca^{2+} induced Ca^{2+} release (CICR). Chez les invertébrés, le couplage excitation-contraction met en jeu soit des phénomènes de type CICR (Györke & Palade, 1992) soit une activation directe des protéines contractiles par l'influx calcique à travers le récepteur aux DHP (Hagiwara & Byerly, 1981 ; Brezina *et al.*, 1994 ; Kits & Mansvelder, 1996).



d'après Waterston, 1988

Figure 4. Cliché en microscopie électronique à transmission d'une coupe transversale d'une cellule musculaire de la paroi du corps de *C. elegans*.

La photographie est centrée sur le fuseau musculaire apposé à la lame basale (flèche ouverte courte) qui repose sur la cuticule (C) par l'intermédiaire de l'hypoderme. Sur cette photographie deux corps denses sont visibles (dont l'un, celui de gauche, est indiqué par une flèche pleine courbe) ainsi que deux lignes M (dont l'une, celle de gauche, est indiquée par une grande tête de flèche). Les flèches pleines courtes et longues indiquent respectivement la position d'un filament fin et d'un filament épais. La flèche ouverte longue et la petite tête de flèche montrent respectivement un exemple de sac membranaire le long de la membrane musculaire et le long d'un corps dense.

Chez *C. elegans*, les mécanismes du couplage n'ont été élucidés que très partiellement en raison du manque d'approches électrophysiologiques. Un gène homologue de celui codant la sous-unité $\alpha 1$ du canal calcique de type L a été identifié dans le génome de *C. elegans* (Lee *et al.*, 1997). Ce gène correspond au locus *egl-19* et la protéine codée par ce gène joue probablement un rôle important dans la contraction puisque des mutations sur *egl-19* entraînent des perturbations de la contraction (voir le paragraphe II.1.1.1. de la section "Historique" chapitre 2).

La présence de récepteurs à la ryanodine chez *C. elegans* a été déterminée dans un premier temps par des études biochimiques sur fractions enrichies (Kim *et al.*, 1992) et elle a ensuite été confirmée par l'identification d'un gène unique homologue à celui codant le récepteur à la ryanodine des Vertébrés (Sakube *et al.*, 1993) et correspondant au locus *unc-68* (Maryon *et al.*, 1996). La protéine UNC-68 présente environ 40% d'identité avec chacune des trois isoformes du récepteur à la ryanodine des Mammifères avec un score légèrement supérieur (42% contre 40%) pour l'isoforme RyR2 qui est celle exprimée dans le cœur. Après quelques incertitudes, il a été démontré par immunocytochimie que UNC-68 était présent exclusivement dans le tissu musculaire de *C. elegans* (Hamada *et al.*, 2002). En ce qui concerne sa localisation subcellulaire, des expériences de double marquage anticorps dans les muscles de la paroi du corps ont montré que UNC-68 était localisé entre les myofilaments et la membrane plasmique à une profondeur équivalente à celle de la vinculine (Maryon *et al.*, 1998).

L'absence de structures stéréotypées comme celle des triades du muscle strié squelettique des Vertébrés rend l'identification du réticulum sarcoplasmique plus délicate dans les cellules musculaires de *C. elegans*. Dans ces cellules, des clichés de microscopie électronique ont mis en évidence l'absence de tubule T et la présence de sacs membranaires aplatis, répartis d'une part irrégulièrement le long de la membrane plasmique sous les myofilaments et d'autre part contre les corps denses (Waterston, 1988 ; Maryon *et al.*, 1998) (Figure 4). Chez les animaux portant une mutation nulle sur *unc-68*, la seule différence ultrastructurale observable dans les muscles striés est l'absence des sacs membranaires aplatis juxtaposés à la membrane plasmique et la présence corrélée de larges vésicules à leur place (Maryon *et al.*, 1998). Ainsi il a été proposé que les sacs membranaires aplatis localisés entre la membrane plasmique et les myofilaments correspondent au réticulum puisque leur distribution subcellulaire est modifiée sur les mutants *unc-68* (Maryon *et al.*, 1998) et que, de plus, ils montrent une localisation similaire à celle de UNC-68 (Maryon *et al.*, 1998).

Les mutants nuls sur *unc-68* présentent un défaut partiel de locomotion se traduisant par

une motilité plus lente. En raison de l'absence d'une paralysie sévère chez ces mutants, il a été proposé que le récepteur à la ryanodine ne joue qu'un rôle accessoire dans le couplage excitation-contraction et que l'essentiel du couplage implique d'autres mécanismes (Maryon *et al.*, 1998).

2. L'activation coordonnée des muscles de la paroi du corps de *C. elegans*

La locomotion de *C. elegans* se caractérise par des flexions dorso-ventrales du corps de l'animal donnant naissance à des ondes sinusoïdales. Ce mouvement n'est possible que si l'activation des muscles ventraux est en opposition de phase avec celle des muscles dorsaux et *vice versa*. Les mécanismes exacts à l'origine de la coordination entre les muscles dorsaux et ventraux et de la propagation des ondes sinusoïdales ne sont que partiellement élucidés. Outre l'intervention du système nerveux, il a été proposé que les muscles aient un rôle direct dans ces mécanismes (White *et al.*, 1976 ; Jorgensen & Nonet, 1995).

La propagation des ondes sinusoïdales implique que la contraction initiée localement se propage ensuite de proche en proche le long du corps de l'animal. White *et al.* (1976) ont proposé que ce phénomène pourrait avoir une origine musculaire et consisterait en un couplage électrique entre les cellules musculaires d'un même quadrant. En faveur de cette hypothèse, d'une part il a été démontré qu'il existait un couplage électrique entre les cellules musculaires du Nématode *Ascaris lumbricoïdes* (De Bell *et al.*, 1963) et d'autre part, des clichés de microscopie électronique chez *C. elegans* ont permis de mettre en évidence entre les corps cellulaires des cellules musculaires appartenant à un même quadrant la présence de structures similaires aux jonctions gap (White *et al.*, 1976 ; 1986).

Une autre hypothèse a proposé que les cellules musculaires de la paroi soient activées par l'étirement et qu'ainsi la contraction d'une cellule musculaire déclenche celle des cellules voisines (White *et al.*, 1976). Chez *Ascaris suum* des modèles mathématiques ont montré que des mécanismes d'activation par l'étirement pourraient effectivement être à la base de la propagation des ondes de contraction (Turner *et al.*, 2001). L'expression dans les cellules musculaires de *C. elegans* de protéines membranaires potentiellement sensibles à l'étirement, les dégénéérines, renforce également cette hypothèse (voir le paragraphe IV.4.2.3. de la section "Historique" chapitre 2).

La coordination de l'activation alternée des muscles dorsaux et ventraux met en jeu d'une part le système nerveux avec la double innervation cholinergique et GABAergique des cellules musculaires spécifique aux Nématodes (voir le paragraphe IV.1. de cette section), et d'autre part, probablement, des signaux rétrogrades proprioceptifs venant des muscles et

informant les motoneurones de leur état d'activation (White *et al.*, 1986 ; Jorgensen & Nonet, 1995). Deux propositions ont été faites quant à la nature de ces signaux rétrogrades. La première envisage que les motoneurones soient informés de l'état de contraction du muscle grâce à des mécanorécepteurs localisés dans les terminaisons synaptiques. Les terminaisons des motoneurones présentent effectivement une morphologie adaptée à une telle fonction avec de grands prolongements indifférenciés, et de plus ces cellules expriment plusieurs membres de la famille des dégénérines (voir le paragraphe IV.4.2.4. de la section "Historique" chapitre 2) (White *et al.*, 1986 ; Jorgensen & Nonet, 1995 ; Tavernarakis *et al.*, 1997). La deuxième hypothèse propose que les cellules musculaires envoient un message chimique vers les motoneurones (Jorgensen & Nonet, 1995). En faveur de cette hypothèse, l'implication de différents messagers chimiques rétrogrades issus des cellules musculaires a maintenant été mise en évidence dans plusieurs processus cellulaires (Zhao & Nonet, 2000 ; Doi & Iwasaki, 2002).

IV. La jonction neuromusculaire

Le système nerveux de *C. elegans*, qui regroupe 302 neurones, a été entièrement reconstitué à l'aide de clichés sériels en microscopie électronique (White *et al.*, 1986). Cette reconstitution a permis à la fois de déterminer le profil de connectivité entre les neurones et de connaître la structure des synapses chez *C. elegans*. Le système nerveux de cet animal contient environ 5000 synapses chimiques entre neurones, 2000 jonctions neuromusculaires et 700 jonctions gap.

1. L'innervation des muscles de la paroi du corps

L'innervation des cellules musculaires de la paroi du corps de *C. elegans* est typique de celle des Nématodes. Chez ces animaux ce sont les cellules musculaires qui envoient des projections, des bras musculaires, vers les axones des motoneurones localisés dans les cordes nerveuses ou l'anneau péri-pharyngien (Figures 2B et 2C). Les cellules musculaires des quadrants ventraux envoient des projections vers les motoneurones ayant leurs corps cellulaires et leurs axones dans la corde nerveuse ventrale alors que les muscles dorsaux sont innervés par des motoneurones ayant leurs corps cellulaires dans la corde nerveuse ventrale et projetant leurs axones dans la corde dorsale.

Une autre caractéristique spécifique de l'innervation des cellules musculaires chez les Nématodes est la présence de motoneurones excitateurs cholinergiques mais aussi de

motoneurones inhibiteurs GABAergiques (pour revue Toida *et al.*, 1975 ; Martin *et al.*, 1991).

La présence de jonctions gap est à noter entre les bras des cellules musculaires de quadrants adjacents et entre les corps cellulaires des cellules musculaires d'un même quadrant.

2. La morphologie de la jonction neuromusculaire de *C. elegans*

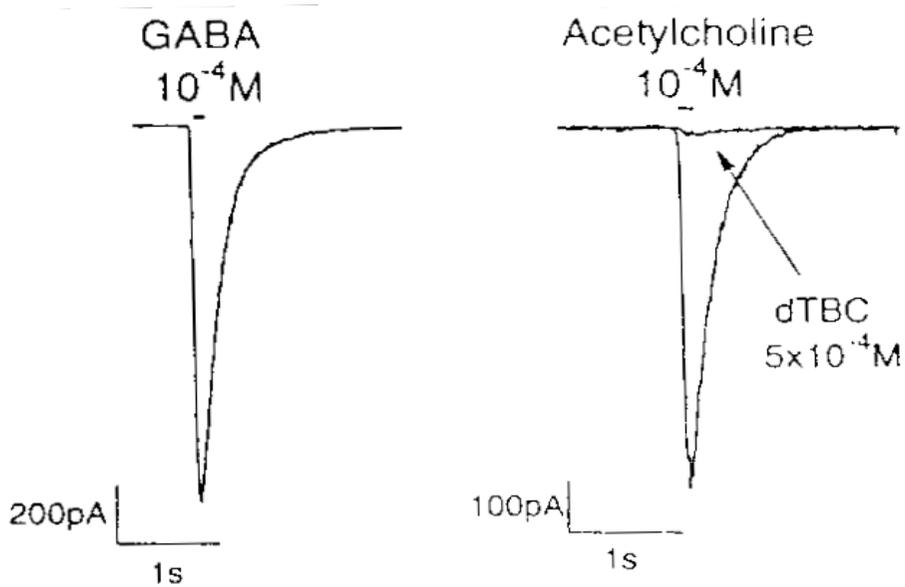
Comme chez la plupart des organismes, l'existence d'une lame basale séparant le tissu musculaire du tissu nerveux contraint la jonction neuromusculaire à s'établir dans le plan de la lame basale. Ces jonctions neuromusculaires sont de type en passant, comme le sont la plupart des autres synapses chez *C. elegans*.

Chez cet animal, la morphologie des jonctions neuromusculaires diffère peu de celle des synapses entre neurones. L'élément pré-synaptique présente une différenciation membranaire, opaque aux électrons, associée à la présence de nombreuses vésicules. L'élément post-synaptique présente en revanche peu de spécialisation.

3. Le fonctionnement de la jonction neuromusculaire

L'utilisation du modèle *C. elegans* a permis d'identifier un grand nombre de gènes codant des protéines impliquées dans le fonctionnement synaptique, en particulier de la jonction neuromusculaire. Ses principaux avantages sur l'autre organisme d'étude du fonctionnement des synapses, la *Drosophile*, sont une génétique encore plus rapide et surtout une viabilité beaucoup plus systématique des mutants générés. Le point faible de ce modèle était jusqu'à présent la difficulté de réaliser des enregistrements électrophysiologiques au niveau de la jonction neuromusculaire en raison de la difficulté d'accès à ces structures. Avec le développement des enregistrements électrophysiologiques par Richmond et Jorgensen, le rôle de deux nouvelles protéines essentielles au fonctionnement synaptique, UNC-13 et UNC-18, a été caractérisé (Richmond *et al.*, 1999 ; Richmond *et al.*, 2001, Weimer *et al.*, 2003 ; pour revue Richmond & Broadie, 2002).

Dans ce manuscrit, seules les avancées réalisées dans la compréhension de la synapse au niveau post-synaptique, c'est-à-dire celui du muscle, et en particulier du muscle strié, seront évoquées en détails. Trois types de récepteurs post-synaptiques localisés sur les muscles de la paroi du corps de *C. elegans* ont été caractérisés lors de la première étude électrophysiologique réalisée *in situ* sur le muscle par Richmond & Jorgensen (1999). Comme chez *Ascaris suum* (pour revue Toida *et al.*, 1975 ; Martin *et al.*, 1991), on retrouve à la fois des récepteurs à l'acétylcholine et au GABA. L'application de GABA ou d'acétylcholine au



Richmond & Jorgensen, 1999

Figure 5. Enregistrements en configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp des courants évoqués par l'application de GABA et d'acétylcholine sur les cellules musculaires de la paroi du corps de *C. elegans*.

Les animaux utilisés étaient des animaux sauvages et le potentiel membranaire était maintenu à -80 mV. La réponse à l'acétylcholine était inhibée en présence de curare (dTBC pour D-TuBoCurare).

niveau de la jonction neuromusculaire entraîne l'apparition de courants membranaires (Figure 5). Ces courants sont également observés en présence d'un milieu extracellulaire sans calcium, qui supprime tout processus d'exocytose, ce qui indique que ces deux neurotransmetteurs agissent directement sur le muscle et non pas par un intermédiaire neuronal.

La réponse au GABA a ensuite été testée sur le mutant *unc-49(e407)*, mutant nul sur le gène *unc-49*. Ce gène, qui est essentiel à la transmission synaptique GABAergique (McIntire *et al.*, 1993a), a la particularité de coder trois sous-unités du récepteur au GABA dont deux sont exprimées dans les muscles de la paroi et forment un canal fonctionnel en expression hétérologue (Bamber *et al.*, 1999). Sur les mutants *unc-49*, l'application de GABA au niveau de la jonction neuromusculaire ne génère pas de réponse membranaire (Richmond & Jorgensen, 1999).

L'application d'acétylcholine à la jonction neuromusculaire donne naissance à un courant constitué de deux composantes distinctes. La première est activée également par le levamisole et elle est absente sur les mutants *unc-38(e264)* et *unc-29(e1072)* (Richmond & Jorgensen, 1999). Le levamisole est un puissant nématocide qui agit en tant qu'agoniste cholinergique sur les récepteurs musculaires des Nématodes, entraînant la paralysie et la mort (Lewis *et al.*, 1980 ; Robertson & Martin, 1993). Des mutations nulles sur les gènes *unc-38* et *unc-49* confèrent aux animaux une résistance au levamisole (Lewis *et al.*, 1980). Ces gènes codent respectivement des sous-unités alpha et non alpha du récepteur ionotrope à l'acétylcholine (Fleming *et al.*, 1997). Ils sont exprimés dans les muscles de la paroi du corps et forment un canal fonctionnel quand ils sont coexprimés dans des ovocytes de Xénope. La deuxième composante cholinergique est activée également par la nicotine (Richmond & Jorgensen, 1999). Cette composante a une amplitude équivalente chez les animaux sauvages et les mutants nuls sur *unc-38* et *unc-29*, ce qui suggère qu'elle n'implique pas ces récepteurs. La nature moléculaire du canal responsable de ce courant n'est pas déterminée mais sa présence au niveau de la jonction neuromusculaire explique pourquoi la contraction demeure même chez les mutants *unc-38* et *unc-29*. La participation des deux composantes cholinergiques à la réponse musculaire à l'acétylcholine serait équivalente (Richmond & Jorgensen, 1999).

En plus de ces récepteurs canaux localisés sur les muscles de la paroi, d'autres récepteurs aux neurotransmetteurs sont trouvés sur les muscles à sarcomère unique. Sur ces muscles on retrouve des récepteurs cholinergiques et GABAergiques, qui ne sont pas forcément les mêmes que ceux localisés dans les muscles de la paroi. Un exemple en est donné avec la caractérisation récente de EXP-1, récepteur excitateur au GABA. Des expériences d'ablation

neuronale au laser avaient montré que la contraction des muscles entériques requérait la présence de deux neurones GABAergiques et que la présence de ces neurones était suffisante pour cette contraction (McIntire *et al.*, 1993b). Parallèlement des études de génétique sur le programme de défécation de *C. elegans* avaient conduit à l'isolation d'un mutant, le mutant *exp-1*, chez lequel la contraction entérique était inexistante (Thomas *et al.*, 1990). Berg et Jorgensen (2003) ont récemment cloné le gène *exp-1*. Ils ont montré que ce gène s'exprimait dans les muscles intestinaux et dans un des muscles anaux et qu'il appartenait à la famille des gènes codant les récepteurs ionotropiques au GABA. En expression hétérologue ce canal se comporte comme un canal cationique et non comme un canal chlore. Cette étude chez *C. elegans* a ainsi mis en évidence un canal excitateur, EXP-1, activé par le GABA qui pourrait être responsable de certains cas de transmissions GABAergiques excitatrices connues chez les invertébrés (Zhang *et al.*, 1997 ; Norekian, 1999) mais aussi chez les Vertébrés (Goldmakher & Moss, 2000).

HISTORIQUE

CHAPITRE 2 : Les canaux ioniques de *Caenorhabditis elegans*

Le séquençage complet et l'analyse du génome de *C. elegans* ont révélé la présence d'un très grand nombre de gènes codant potentiellement des canaux ioniques (Bargmann, 1998 ; *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Jusqu'à très récemment l'étude fonctionnelle de ces canaux se limitait à la caractérisation de leurs propriétés électrophysiologiques après expression dans des systèmes cellulaires hétérologues. L'environnement cellulaire dans lequel se trouvent les canaux exprimés ne correspond alors pas aux conditions natives. Les canaux peuvent ainsi présenter des comportements différents des comportements susceptibles de se manifester dans les conditions physiologiques. Une alternative aux systèmes d'expression hétérologues a été récemment proposée par Christensen *et al.* (2002) sous la forme de cultures cellulaires différenciées à partir de cellules embryonnaires. Cependant, à nouveau, le comportement des canaux ioniques peut être modifié en raison de l'absence des interactions cellulaires physiologiques. L'analyse électrophysiologique *in situ* chez *C. elegans* est par conséquent une approche incontournable qui a longtemps été écartée en raison de la difficulté d'accès aux cellules de cet animal.

I. Le développement des techniques électrophysiologiques *in situ* chez *C. elegans*

La première approche électrophysiologique *in situ* développée chez cet animal a été mise au point par Raizen et Avery (1994) pour l'étude des propriétés électriques des cellules musculaires du pharynx. Elle consiste, grâce à une électrode de succion placée autour de la tête de l'animal, à mesurer les courants capacitifs induits par les changements globaux de potentiel membranaire se produisant à l'échelle de l'organe. Cette technique d'enregistrement extracellulaire est appelée électropharyngeogramme ou EPG. Elle a permis d'apporter de nombreuses informations sur les canaux ioniques impliqués dans le fonctionnement des muscles pharyngiens (Raizen & Avery, 1994 ; Davis *et al.*, 1999 ; Dent *et al.*, 1997 ; Lee *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 2001 ; Niacariss & Avery, 2003). Cependant cette technique d'enregistrement extracellulaire à l'échelle du pharynx ne permet pas une résolution suffisante pour l'étude des courants ioniques de faible amplitude et ne peut pas être utilisée pour la caractérisation détaillée des courants voltage-dépendants.

Une technique d'enregistrement intracellulaire a également été mise au point pour l'étude de l'activité électrique des muscles du pharynx (Davis *et al.*, 1995). Dans cette préparation, le pharynx est exposé après section transversale de l'animal derrière le bulbe pharyngien et il est ensuite empalé à l'aide d'électrodes en verre. Cette technique a permis de mettre en évidence le rôle de différents canaux ioniques dans la genèse et la durée des potentiels d'action des cellules musculaires du pharynx (Lee *et al.*, 1997 ; Davis *et al.*, 1999 ; Franks *et al.*, 2002) et de tester l'effet de différents neurotransmetteurs sur ces cellules (Pemberton *et al.*, 2001 ; Rogers *et al.*, 2001). Cette technique très efficace sur le pharynx n'est malheureusement pas envisageable sur les cellules musculaires de la paroi ou sur les neurones en raison de leur taille restreinte.

La mise au point de techniques de microdissection donnant accès aux neurones et aux muscles de la paroi était une étape préliminaire obligatoire pour réaliser la caractérisation électrophysiologique de ces cellules. Goodman *et al.* (1998) ont développé les premiers une préparation permettant d'effectuer des enregistrements en patch-clamp sur des neurones. Dans cette technique, après immobilisation par une colle de cyanoacrylate, l'animal est incisé sur une longueur réduite mais suffisante pour faire bourgeonner un amas de neurones. Les neurones d'intérêt ont au préalable été rendus fluorescents par expression spécifique d'une construction GFP et ainsi ils peuvent aisément être repérables pour le scellement de la pipette de patch-clamp. Une alternative à cette méthode est celle proposée par Brockie *et al.* (2001) qui consiste à inciser l'animal latéralement le long du pharynx et à rabattre le volet de cuticule dévoilant ainsi l'accès aux neurones localisés dans la tête de l'animal tout en préservant, au moins partiellement, leur organisation spatiale. Dernièrement, une autre technique donnant accès aux neurones pour des études de patch-clamp a été décrite par Nickell *et al.* (2002). Elle présente l'avantage d'éviter la microdissection puisque les neurones sont isolés à partir de la même préparation que celle utilisée pour les enregistrements intracellulaires. L'animal est sectionné transversalement derrière le pharynx et dans un faible pourcentage des cas (5-10%) certains neurones localisés dans la tête restent intacts et sont alors disponibles pour les études électrophysiologiques.

L'accès aux cellules musculaires de la paroi du corps nécessite une dissection de l'ensemble de l'animal. Cette technique a été développée par Richmond et Jorgensen (1999) et comporte plusieurs étapes minutieuses. La première étape est l'immobilisation du ver par application de colle de cyanoacrylate le long d'un côté de l'animal. Une incision est ensuite pratiquée sur toute la longueur du corps et le volet de cuticule est déployé et collé. Après

élimination des viscères les cellules musculaires de la paroi sont alors accessibles pour les enregistrements électrophysiologiques.

En raison de la difficulté à réaliser les microdissections nécessaires aux études électrophysiologiques *in situ*, des techniques d'imagerie sur animaux intacts ont été parallèlement développées. Deux techniques d'imagerie calcique ont été mises au point. L'une consiste à micro-injecter directement un indicateur calcique dans les cellules d'intérêt (Dal Santo *et al.*, 1999 ; Samuel *et al.*, 2001) afin d'étudier les variations du signal calcique. Cette technique n'est cependant envisageable que sur des cellules suffisamment grandes pour permettre la micro-injection, ce qui n'est pas le cas pour les neurones ou les cellules musculaires. La deuxième technique d'imagerie calcique est applicable à ces deux types cellulaires. Elle repose sur l'utilisation de protéines, appelés caméléons, qui contiennent deux domaines fluorescents différents séparés par un domaine de liaison au calcium (Miyawaki *et al.*, 1997). La conformation de ces protéines change selon la concentration en calcium et favorise ou non le transfert d'énergie entre les deux domaines fluorescents. Ainsi, lorsque ces protéines sont exprimées dans les cellules d'intérêt par génie génétique, la mesure de l'intensité du rapport des fluorescences au cours du temps permet d'appréhender les variations de calcium intracellulaire dans ces cellules. L'utilisation des protéines caméléons est particulièrement favorable chez *C. elegans* puisqu'elles peuvent facilement être exprimées de façon tissu-spécifique en utilisant des promoteurs appropriés (Kerr *et al.*, 2000). Enfin une technique de suivi du potentiel membranaire par utilisation de la GFP est en cours de développement et pourrait permettre d'obtenir des mesures du potentiel membranaire sans nécessiter de microdissection. Cette technique a été utilisée une seule fois chez *C. elegans* et a présenté des résultats préliminaires intéressants sans toutefois que la correspondance entre le signal optique obtenu et les changements de potentiel soit possible (Khachatourians *et al.*, 2000).

II. Les canaux calciques

Le calcium joue un rôle crucial dans le contrôle d'une grande variété de fonctions cellulaires : il initie la contraction musculaire, déclenche la libération des neurotransmetteurs et des hormones, régule l'expression génique et constitue le médiateur de la mort cellulaire. La concentration intracellulaire en calcium est maintenue à un niveau très faible (environ 10^{-7} M) et ce sont les augmentations transitoires cytosoliques de cet ion qui constituent l'élément activateur des nombreux processus cellulaires impliquant le calcium. Les élévations

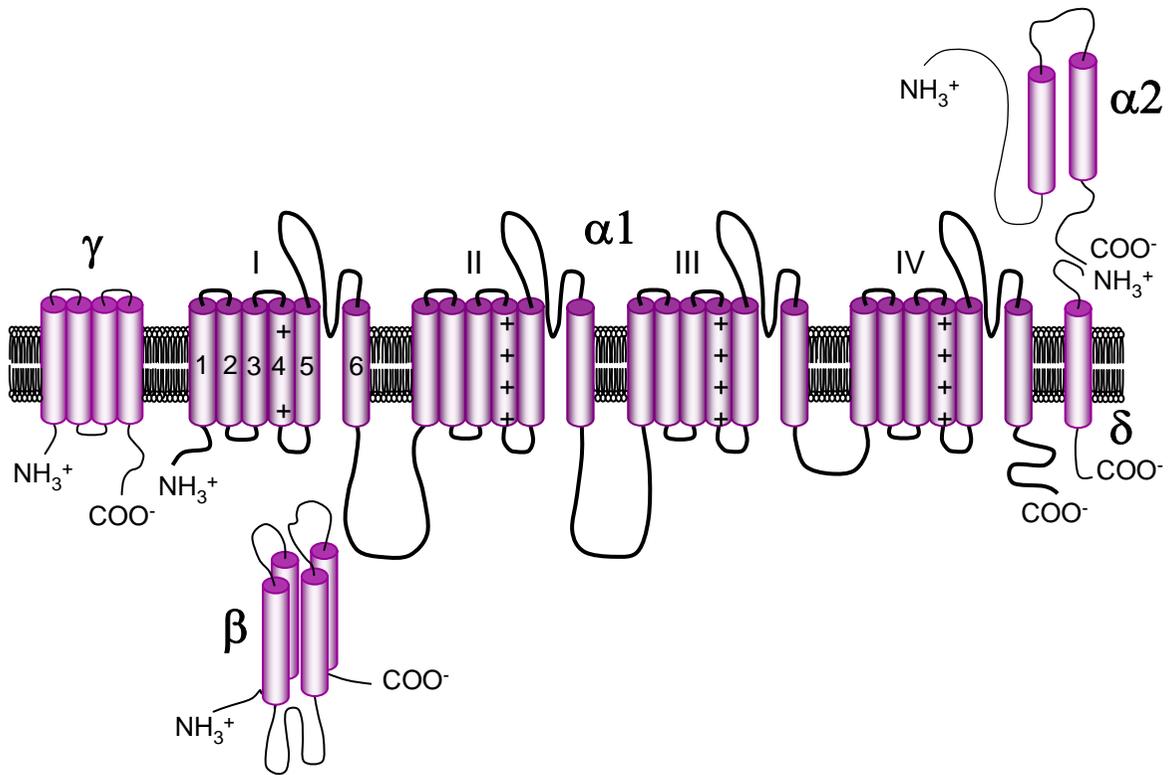


Figure 6. Structure moléculaire des canaux calciques voltage-dépendants.

Le canal calcique illustré ici correspond au canal calcique voltage-dépendant de type L de la cellule musculaire squelettique de Mammifères. Le nom des différentes sous-unités est indiqué en gras. Les différents domaines de la sous-unité $\alpha 1$ sont notés en chiffres romains. Pour le domaine I, le numéro des segments est figuré en chiffres arabes.

transitoires de calcium sont le résultat soit d'un influx calcique à travers la membrane plasmique soit d'une libération à partir du réservoir intracellulaire de calcium, le réticulum endoplasmique. Les canaux ioniques impliqués dans ces échanges sont de plusieurs types ; ici ils seront classés selon deux catégories : les canaux calciques voltage-dépendants et les canaux calciques non voltage-dépendants (Tableau 1).

1. Les canaux calciques voltage-dépendants chez *C. elegans*

Sur la base de propriétés électriques et pharmacologiques, différents types de courants calciques voltage-dépendants peuvent être distingués. Chez les Vertébrés, des études de purifications protéiques et de clonages ont montré que chacun de ces types de courant, appelés T, L, N, P, Q et R, était défini par la nature d'une des sous-unités formant le canal, la sous-unité $\alpha 1$. Cette sous-unité est constituée par la répétition de quatre domaines homologues, notés I à IV, contenant chacun six segments transmembranaires, appelés S1 à S6. Les quatre boucles externes entre les différents segments S5 et S6 forment le pore du canal alors que les segments S4, porteurs de plusieurs charges positives, constituent le voltage sensor (Figure 6). Les autres sous-unités du canal calcique voltage-dépendant, les sous-unités $\alpha 2/\delta$, β et γ interviennent dans la modulation des propriétés électriques et également dans l'adressage membranaire des canaux (voir pour revue Ashcroft, 2000).

Chez les invertébrés, différents types de courants calciques voltage-dépendants ainsi que plusieurs sous-unités $\alpha 1$ ont été caractérisés. Cependant, il a été démontré à plusieurs reprises que l'homologie entre deux sous-unités $\alpha 1$, l'une chez les invertébrés, l'autre chez les Vertébrés, ne garantissait pas forcément que les canaux correspondants partagent les mêmes propriétés électriques et pharmacologiques (voir pour revue Jeziorski *et al.*, 2000).

Chez *C. elegans*, les sous-unités des canaux calciques voltage-dépendants ont été identifiées dans le génome entièrement séquencé par homologie de séquence alors que leurs propriétés électrophysiologiques ont été très peu investiguées.

1.1. Les sous-unités $\alpha 1$

La sous-unité $\alpha 1$ est fonctionnellement la sous-unité principale du canal calcique voltage-dépendant. Elle forme le pore du canal et détermine ses principales caractéristiques biophysiques et pharmacologiques. Dans le génome de *C. elegans*, cinq gènes codant des sous-unités $\alpha 1$ potentielles ont été dénombrés (Bargmann, 1998).

Canaux calciques voltage-dépendants				
Protéine <i>C. elegans</i>	Sous- unité	Equivalent Mammifères		Caractéristiques du courant
		Ancienne nomenclature	Nomenclature HUGO	
EGL-19	$\alpha 1$	CaV1.2 CaV1.3	CACNA1C CACNA1D	ND
UNC-2	$\alpha 1$	CaV2.2	CACNA1B	ND
CCA-1	$\alpha 1$	CaV3.x	CACNA1G, H, I	ND
NCA-1, NCA-2	$\alpha 1$	Rb-21	?	ND
UNC-36, T24F1.6	$\alpha 2\delta$	CaV $\beta\alpha/\delta$	CACNA2D1	-
CCB-1, W10C8.1	β	CaV $\beta 3$	CACNB3	-
Canaux calciques non voltage-dépendants				
Protéine <i>C. elegans</i>	Equivalent Mammifères		Caractéristiques du courant	
	Ancienne nomenclature	Nomenclature HUGO		
UNC-68	RyR2	RYR2	ND	
ITR-1	IP3R1	ITPR1	ND	
OSM-9 GON-2	OTRPC LTRPC	TRPV TRPM	ND	

Tableau 1. Tableau récapitulatif des principales protéines composant les canaux calciques chez *C. elegans* et leurs équivalents chez les Mammifères.

Pour chaque protéine de *C. elegans* est (sont) indiquée(s) la (les) protéine(s) présentant le plus de similarité connue(s) chez les Mammifères. Les nomenclatures usuelles et HUGO sont précisées pour chacune des protéines homologues. Pour l'ensemble de ces canaux chez *C. elegans*, les caractéristiques des courants n'ont pas été déterminées, même en système d'expression hétérologue (ND : Non Déterminé).

1.1.1. EGL-19

Le gène *egl-19* a été initialement isolé à partir de mutants touchés sur la fonction musculaire au niveau du pharynx, de la vulve ou des muscles de la paroi du corps (Trent *et al.*, 1983 ; Avery, 1993, Williams & Waterston, 1994). Le clonage et le séquençage de ce gène ont révélé que son produit génique, EGL-19, présentait 75% d'identité avec les sous-unités $\alpha 1$ de type L des Vertébrés, c'est-à-dire $\alpha 1C$ exprimée principalement dans le cœur, $\alpha 1D$, exprimée dans le système nerveux central et $\alpha 1S$ localisée dans les cellules musculaires squelettiques (Lee *et al.*, 1997). EGL-19 possède de plus tous les domaines hautement conservés des sous-unités $\alpha 1$ de type L, comme par exemple le site de sensibilité aux dihydropyridines. Ce site fait intervenir principalement des acides aminés localisés dans et entre les segments S5 et S6 des domaines III et IV et comporte 23 résidus qui sont identiques dans toutes les sous-unités $\alpha 1$ de type L et différentes dans celles de type non L (Grabner *et al.*, 1996). EGL-19 présente 19 résidus identiques sur les 23 (Lee *et al.*, 1997).

EGL-19 joue probablement un rôle prépondérant chez *C. elegans* car il est exprimé dans l'ensemble des cellules musculaires et dans la plupart des neurones (Lee *et al.*, 1997). De plus, les mutations sur *egl-19* entraînent des perturbations sur plusieurs fonctions. Ces mutations peuvent être classées en trois catégories selon l'effet produit (Lee *et al.*, 1997). Les mutations létales, correspondant généralement à un allèle nul ou réduction-de-fonction sévère, entraînent un arrêt du développement embryonnaire. Les mutations flaccides sont des allèles réduction-de-fonction et sont responsables d'un défaut de contraction des muscles de l'animal. Pour l'une de ces mutations, l'allèle *n582*, des enregistrements intracellulaires dans les cellules musculaires du bulbe terminal pharyngien ont montré que les potentiels d'action observés occasionnellement dans ces cellules présentaient une vitesse de dépolarisation plus faible que pour les individus sauvages (Lee *et al.*, 1997). Cette observation concorde avec la localisation de la mutation qui consiste en le remplacement dans un des segments voltage sensor du canal, le segment IIIS4, d'une arginine par une histidine, c'est-à-dire le remplacement d'un résidu chargé positivement par un résidu non chargé (Lee *et al.*, 1997). En revanche, les transitoires calciques, estimés par l'utilisation des protéines caméléons, n'ont pas montré de différence entre les cellules d'animaux *egl-19(n582)* et les sauvages (Kerr *et al.*, 2000). Pour une autre mutation flaccide, *ad1006*, cette méthode a pourtant permis de mettre en évidence que la durée et l'amplitude des transitoires calciques étaient plus réduites chez ces animaux mutants (Kerr *et al.*, 2000). La troisième catégorie de mutations sur *egl-19* est celle des mutations myotoniques, caractéristiques des allèles gain-de-fonction. La

contraction musculaire pour ces animaux semble alors excessive. Une de ces mutations, l'allèle *ad695*, a été caractérisée au niveau du décours des potentiels d'action et des transitoires calciques dans les cellules musculaires du pharynx. La durée des potentiels d'action et des transitoires calciques ainsi que l'amplitude de ces derniers sont significativement plus élevées pour les animaux *egl-19(ad695)* que pour les témoins (Lee *et al.*, 1997 ; Kerr *et al.*, 2000). A nouveau le séquençage de l'allèle muté a montré une substitution d'un résidu, une alanine en valine, dans le segment IIIS4 (Lee *et al.*, 1997).

1.1.2. UNC-2

Le gène *unc-2* a été initialement isolé à partir de mutants touchés sur la fonction locomotrice (Brenner, 1974). Son clonage et séquençage partiel ont montré qu'il codait un homologue de la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques voltage-dépendants (Schafer & Kenyon, 1995). La séquence complète de UNC-2 a révélé que cette sous-unité $\alpha 1$ présentait plus de similarité avec les canaux de type N, P/Q et R correspondant respectivement aux sous-unités $\alpha 1B$, A et E (73, 67 et 66% de similarité respectivement) qu'avec ceux de type L (environ 55% de similarité). De plus la protéine ne possède pas les résidus hautement conservés impliqués dans la sensibilité aux dihydropyridines (Mathews *et al.*, 2003).

Le profil d'expression de *unc-2* est encore discuté puisque que Schafer et Kenyon (1995) ont montré par hybridation *in situ* que ce gène était exprimé dans plusieurs classes de neurones et dans les muscles de la paroi du corps alors que Mathews *et al.* (2003) n'ont pas pu retrouver l'expression de *unc-2* dans cette dernière catégorie de cellules avec l'utilisation d'une construction *unc-2::GFP*.

Le phénotype des mutants *unc-2* perte-de-fonction, comme le mutant *e55* qui possède un codon stop dans le segment codant la boucle cytosolique I-II, se caractérise entre autre par un défaut de locomotion, une diminution du pompage pharyngien et une ponte constitutive (Brenner, 1974 ; Avery, 1993 ; Schafer & Kenyon, 1995). Même si les mécanismes à l'origine de ce phénotype sont encore hypothétiques, il semblerait que UNC-2 intervienne dans le contrôle de la libération des vésicules synaptiques. En effet, il a été montré que les mutants *unc-2* étaient résistants à l'aldicarbe, inhibiteur de l'acétylcholine estérase, ce qui indique un défaut dans la transmission cholinergique (Miller *et al.*, 1996). En revanche, ces mutants présentent une sensibilité normale au levamisole et à la nicotine, suggérant qu'il s'agit d'un dysfonctionnement pré-synaptique (Miller *et al.*, 1996). Les perturbations de la fonction synaptique touchent aussi le système GABAergique puisque chez ces mutants on observe un nombre anormalement élevé d'échec d'expulsion par cycle de défécation (Miller *et al.*, 1996),

indice d'un défaut dans la transmission GABAergique (McIntire *et al.*, 1993a, b). Cette diminution de la transmission synaptique expliquerait ainsi le défaut de contraction musculaire à la base des perturbations de la locomotion et du pompage pharyngien. L'augmentation de la fréquence de ponte chez les mutants *unc-2* pourrait quant à elle être liée à la diminution de la libération d'un neurotransmetteur inhibiteur de la contraction des muscles vulvaires (Schafer & Kenyon, 1995 ; Schafer *et al.*, 1996), la nature de ce neurotransmetteur restant à déterminer.

En parallèle de ce rôle pré-synaptique, il a également été proposé que *unc-2* interagisse avec le système sérotoninergique. En effet, contrairement aux animaux sauvages, les mutants *unc-2* sont incapables de s'adapter à une exposition chronique de sérotonine (Schafer & Kenyon, 1995) et le système sérotoninergique de ces mutants présenterait des anomalies, en particulier dans le taux de sérotonine et dans le niveau d'expression de la tryptophane hydroxylase, enzyme limitante dans la synthèse de ce neurotransmetteur (Estevez *et al.*, 2004). Le lien entre UNC-2 et la voie de signalisation sérotoninergique demeure encore inconnu.

1.1.3. Les autres sous-unités $\alpha 1$

Contrairement à UNC-2 et EGL-19, l'existence des trois autres sous-unités $\alpha 1$ n'a été révélée qu'avec le séquençage complet du génome de *C. elegans*. L'une d'entre elle, celle codée par le gène *cca-1* appelé auparavant c54d2.5, est un homologue des sous-unités $\alpha 1$ des canaux calciques voltage-dépendants de type T des Vertébrés (Perez-Reyes *et al.*, 1998). Des études préliminaires ont montré que *cca-1* s'exprimait dans plusieurs classes de neurones, dont ceux du pharynx, et que les mutants sur ce gène présentaient un défaut dans le pompage du pharynx (Thacker & Snutch, International *C. elegans* Meeting 2001 ; Thacker *et al.*, International *C. elegans* Meeting 2003).

Les deux dernières sous-unités $\alpha 1$, NCA-1 et NCA-2, appelées initialement C11D2.6 et C27F2.3 respectivement, présentent des séquences en acides aminés très similaires entre elles et différentes des autres sous-unités $\alpha 1$ connues jusqu'à présent (Bargmann, 1998). En réalité, ces protéines sont autant proches des sous-unités α des canaux sodiques voltage-dépendants que des sous-unités $\alpha 1$ des canaux calciques (Jeziorski *et al.*, 2000). L'expression en système hétérologue de ces protéines, ou de leur homologue chez le rat appelé Rb21, n'a jamais donné naissance à des courants ioniques (Lee *et al.*, 1999 ; Jeziorski *et al.*, 2000). Chez *C. elegans*, des résultats préliminaires ont montré que *nca-1* et *nca-2* s'exprimaient dans les neurones de la tête, de la corde nerveuse et du ganglion préanal et que des mutations sur ces gènes

entraînaient une perturbation de la locomotion (Hamming *et al.*, International *C. elegans* Meeting 2003).

1.2. Les sous-unités accessoires

Alors que les sous-unités $\alpha 1$ déterminent le type du courant produit, les sous-unités accessoires ont un rôle important dans la modulation de chaque type de courant calcique voltage-dépendant. Chez les Vertébrés, il existe trois sous-unités accessoires : la sous-unité $\alpha 2\delta$, constitués de deux peptides, un membranaire et l'autre extracellulaire, liés par des ponts disulfures et codés par le même gène, la sous-unité β , cytosolique, et la sous-unité γ , membranaire et observée uniquement associée avec $\alpha 1S$ (voir pour revue Walker & De Waard, 1998) (Figure 6).

Chez *C. elegans*, l'analyse du génome a révélé la présence de deux sous-unités β , CCB-1 et W10C8.1, et deux sous-unités $\alpha 2\delta$, UNC-36 et T24F1.6 (Bargmann, 1998). Le rôle de ces sous-unités chez cet organisme reste encore largement méconnu, même si quelques données existent maintenant pour UNC-36. Les mutants perte-de-fonction sur *unc-36* présentent le même phénotype que ceux sur *unc-2*, à savoir un défaut de locomotion, de pompage du pharynx et une ponte constitutive (Brenner, 1974 ; Avery, 1993 ; Schafer *et al.*, 1996). De plus, comme les mutants *unc-2*, les animaux *unc-36* sont résistants à l'aldicarbe, inhibiteur de l'acétylcholine estérase, et incapables de s'adapter à une exposition chronique de sérotonine (Nguyen *et al.*, 1995 ; Schafer *et al.*, 1996). A cause de cette similarité de phénotype, il a été proposé que UNC-36 soit une sous-unité modulatrice de la sous-unité $\alpha 1$ UNC-2 et qu'en outre UNC-36 ait un rôle essentiel au fonctionnement du canal calcique voltage-dépendant formé, étant donné que le double mutant *unc-2; unc-36* ne présente pas un phénotype plus sévère que le simple mutant *unc-36* (Schafer *et al.*, 1996 ; Mathews *et al.*, 2003). L'utilisation des protéines caméléons sur les mutants *unc-36* a également permis de montrer que UNC-36 influencerait les transitoires calciques dans les cellules musculaires du pharynx (Kerr *et al.*, 2000).

2. Les canaux calciques non voltage-dépendants chez *C. elegans*

Chez *C. elegans*, outre les canaux calciques voltage-dépendants, d'autres canaux calciques ont été décrits. Ils ont été identifiés par homologie de séquence avec ceux connus et clonés chez les Vertébrés. Les canaux calciques non voltage-dépendants de *C. elegans* regroupent le récepteur à la ryanodine, le récepteur à l'inositol triphosphate (IP3) et les canaux TRP.

2.1. Le récepteur à la ryanodine

Il n'existe qu'un seul récepteur à la ryanodine, codé par *unc-68*, chez *C. elegans*. Les données actuelles connues pour cette protéine sont présentées dans le Chapitre 1 de ce manuscrit, section III.1 décrivant le couplage excitation-contraction dans les muscles striés de *C. elegans*.

2.2. Le récepteur à l'IP3

Les récepteurs à l'IP3 interviennent dans la libération de calcium par le réticulum endoplasmique dans un grand nombre de processus cellulaires (voir pour revue, Berridge, 1993). Un seul gène, *itr-1*, code ces récepteurs chez *C. elegans* (Baylis *et al.*, 1999). La transcription de ce gène, qui possède trois segments 5' et trois promoteurs, produit trois types d'ARNm et trois isoformes protéiques différentes. Ces protéines présentent environ 40% d'identité avec les récepteurs à l'IP3 connus chez les Mammifères et ont la même structure, à savoir un domaine de liaison à l'IP3 N-terminal, un domaine intermédiaire modulateur et un domaine C-terminal constitué de six segments transmembranaires impliqués dans la formation du pore ionique (voir pour revue Mikoshiba *et al.*, 1994). *itr-1* s'exprime dans le pharynx, l'intestin, les cellules excrétrices, certains neurones et les gonades, chaque isoforme ayant un profil d'expression spécifique et généralement non chevauchant (Baylis *et al.*, 1998 ; Gower *et al.*, 2001).

Chez *C. elegans*, ITR-1 semble impliqué dans de nombreux événements de la vie de l'animal, comme l'ovulation, la défécation, le pompage du pharynx et dans plusieurs étapes de l'embryogenèse (Clandinin *et al.*, 1998 ; Dal Santo *et al.*, 1999 ; Walker *et al.*, 2002). En particulier, il participerait à l'horloge biologique rythmant le cycle de défécation. Ce cycle consiste en la répétition toutes les cinquante secondes environ d'une phase de contraction des muscles postérieurs de la paroi du corps suivie par celle des muscles antérieurs et enfin des muscles intestinaux aboutissant à l'expulsion des déchets hors du rectum (Liu & Thomas, 1994). La rythmicité du cycle coïncide avec celle d'oscillations calciques enregistrées dans les cellules intestinales par micro-injection de fura-2 (Dal Santo *et al.*, 1999). Des mutations ponctuelles sur *itr-1* suffisent à éliminer ou espacer ces oscillations et corrélativement à supprimer ou ralentir le cycle de défécation, suggérant un rôle essentiel de cette protéine dans ce processus biologique (Dal Santo *et al.*, 1999).

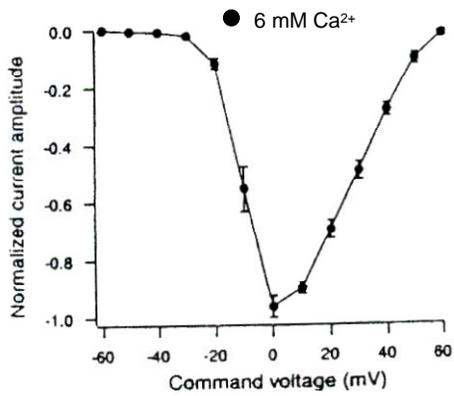
2.3. Les canaux TRP

Le premier gène codant un canal TRP a été identifié chez la Drosophile à partir d'études

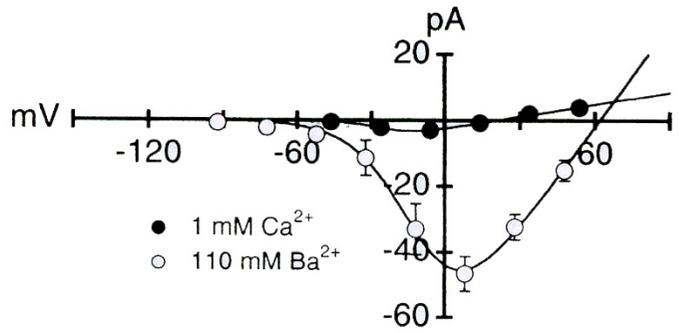
menées sur des mutants présentant au niveau de la rétine des potentiels récepteurs membranaires transitoires en réponse à la lumière (Transient Receptor Potential) et non pas maintenus comme pour les animaux sauvages (Cosens & Manning, 1969). Le clonage et l'expression hétérologue du gène *trp* ont permis de montrer qu'il codait un canal perméable au calcium activé par la voie de signalisation de la phospholipase C (voir pour revue Hardie & Minke, 1995).

A la suite de cette étude chez la *Drosophile*, de nombreux gènes *trp* ont été identifiés chez les Vertébrés et les invertébrés (voir pour revue Harteneck *et al.*, 2000). La première classification qui distinguait trois sous-familles a été abandonnée pour une nouvelle nomenclature qui fait maintenant état de six familles de canaux TRP : TRPC, TRPV, TRPM, TRPN, TRPP et TRPML (Montell, 2001 ; Montell *et al.*, 2002). Les canaux TRP partagent tous la même structure générale avec six segments transmembranaires contenant le pore du canal et séparant les domaines cytosoliques N-terminal et C-terminal dont la nature varie selon la famille d'appartenance du canal TRP (voir pour revue Montell *et al.*, 2002). La plupart sont des canaux cationiques plus ou moins perméables au calcium (voir pour revue Harteneck *et al.*, 2000). Les différents rôles de ces canaux ne sont sans doute encore pas tous connus et sont probablement très variés puisque des études ont déjà montré l'implication des canaux TRP dans la perception de différents stimuli sensoriels, aussi bien thermiques, chimiques que mécaniques, dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, et aussi dans la voie d'entrée calcique en réponse à une déplétion des réserves intracellulaires en calcium (voir pour revue Montell, 2001).

La recherche de gènes *trp* dans le génome de *C. elegans* a conduit à l'identification de 24 gènes codant potentiellement des canaux TRP (Goodman & Schwarz, 2003). Des mutations sur quelques uns de ces gènes ont permis de mettre en évidence que, comme chez les Vertébrés, les TRP chez *C. elegans* seraient impliqués dans plusieurs processus cellulaires. Les canaux OSM-9 et OCR-2, qui appartiennent à la famille des TRPV, sont par exemple impliqués dans les fonctions sensorielles puisque des mutations sur ces canaux entraînent un défaut de mécanosensation et de chemotaxie (Colbert *et al.*, 1997). D'autres TRP, comme GON-2, jouent un rôle dans la prolifération cellulaire (West *et al.*, 2001) alors que d'autres encore interviennent dans l'exocytose (Fares & Greenwald, 2001). Il faut de plus noter que sur les 24 gènes *trp* recensés, six n'appartiendraient à aucune famille de TRP connue et formeraient alors une famille spécifique de *C. elegans* (Goodman & Schwarz, 2003). L'activité électrique des canaux TRP de *C. elegans* n'a jamais été enregistrée, ni *in situ*, ni en expression hétérologue. L'exploration des propriétés et des rôles de ces canaux chez cet



Richmond & Jorgensen, 1999



Goodman *et al.*, 1998

Figure 7. Courbes courants-potentiels correspondant aux courants calciques voltage-dépendants enregistrés *in situ* dans les cellules musculaires de la paroi (panneau de gauche) et dans les neurones ASER (panneau de droite) de *C. elegans*.

organisme ne fait ainsi que commencer.

3. Les courants calciques enregistrés *in situ* chez *C. elegans*

Chez *C. elegans*, les canaux calciques ont été très peu caractérisés au niveau électrophysiologique. Goodman *et al.* (1998) ont enregistré un courant calcique voltage-dépendant dans les neurones chemosensoriels ASER. Ce courant s'activait pour des potentiels supérieurs à -50 mV et présentait un pic à -15 mV. En raison de son amplitude très réduite, les auteurs ont ensuite travaillé en 110 mM barium dans la pipette et le courant s'activait alors à partir de potentiels plus négatifs (autour de -70 mV) avec un pic de courant autour de +10 mV (Figure 7). Parallèlement Richmond et Jorgensen (1999) ont décrit un courant calcique voltage-dépendant dans les cellules des muscles de la paroi. Ce courant s'activait pour des potentiels supérieurs à -40 mV avec un pic autour de 0 mV (Figure 7). Une fois activé il restait maintenu tout le long de la dépolarisation (200 ms) en présentant toutefois une inactivation rapide partielle pour certains potentiels. L'addition de 50 μ M de cadmium dans la solution externe entraînait une inhibition complète du courant. Il est à noter qu'aucun courant calcique voltage-dépendant n'a pu être mis en évidence dans les neurones ou les cellules musculaires en culture (Christensen *et al.*, 2002) ce qui souligne encore une fois la nécessité de pratiquer des études électrophysiologiques *in situ*.

Ainsi les canaux calciques chez *C. elegans* ont surtout été étudiés par les méthodes de la génétique et de la biologie moléculaire. Ils ont été identifiés par homologie de séquence et leurs rôles physiologiques ont été extrapolés à partir de l'observation du phénotype des mutants touchés sur les gènes codant ces canaux. La nature moléculaire, le type et le rôle des courants calciques voltage-dépendants enregistrés *in situ* n'ont été établis ni dans les neurones ni dans les cellules musculaires de la paroi. Cette caractérisation dans les cellules musculaires de la paroi a fait l'objet de la première étude présentée dans ce manuscrit (voir l'étude 1 dans la section "Résultats").

III. Les canaux potassiques

Représentée des Archéobactéries jusqu'aux Mammifères, la classe des canaux potassiques est caractérisée par sa grande diversité structurale et fonctionnelle. Ces canaux jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'excitabilité cellulaire en assurant le maintien du potentiel de repos à des valeurs négatives et en conditionnant la susceptibilité des cellules à se dépolariser ainsi que leur vitesse de repolarisation. Ils interviennent ainsi dans un grand nombre de

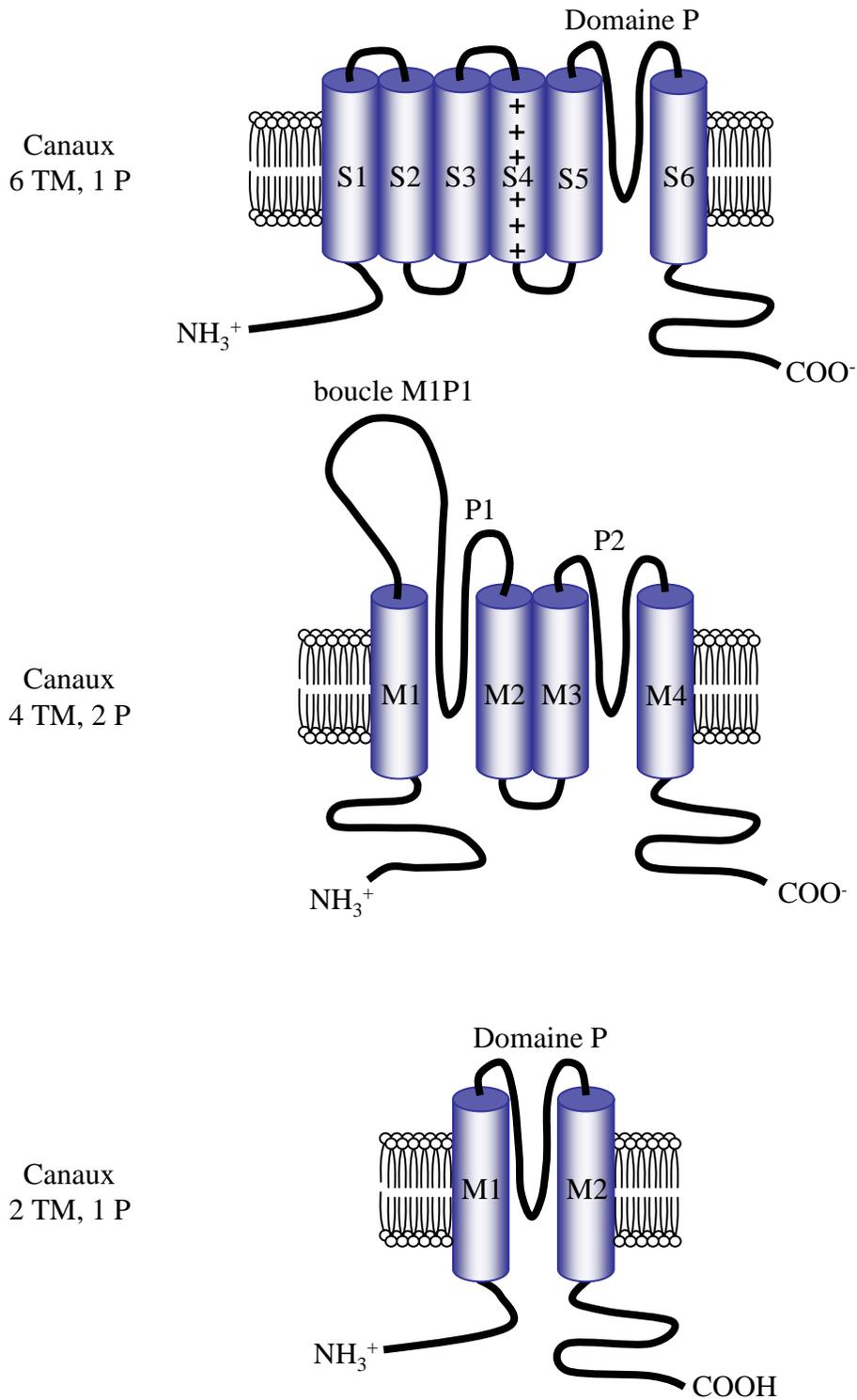


Figure 8. Structure moléculaire des sous-unités α des canaux potassiques des familles à 6, 4 et 2 segments transmembranaires.

fonctions cellulaires, comme dans la libération des neurotransmetteurs, la sécrétion des cellules endocrines ou la contraction des myocytes (voir pour revue Hille, 1992).

Malgré la diversité des canaux potassiques, leur structure générale est commune, avec une association de quatre (ou deux) sous-unités principales, appelées α , et de sous-unités régulatrices, membranaires comme celles de la famille MiRP (MinK Related Peptide) (voir pour revue Abbott & Goldstein, 2001) ou cytosoliques comme celles de la famille β (voir pour revue Hanlon & Wallace, 2002). L'autre point commun partagé par l'ensemble de ces canaux est la présence dans les sous-unités α d'une ou deux séquences dites "signature des canaux potassiques". Cette séquence, hautement conservée dans tous les canaux potassiques, est localisée dans la boucle P qui forme le pore du canal, et elle est impliquée dans sa sélectivité (Heginbotham *et al.*, 1994).

En raison de la diversité et de la découverte de nouveaux canaux potassiques au cours du temps, le système de classification a longtemps été peu homogène. Dans un souci d'harmonisation, une classification, appelée HUGO (HUman Genome Organisation) a été "officiellement" adoptée (White *et al.*, 1997). Elle désigne les canaux potassiques par le sigle KCN (K ChaNnels) suivi d'une lettre faisant référence à la famille d'appartenance de la sous-unité α puis d'un chiffre indiquant l'ordre du clonage de cette sous-unité. Cependant, cette classification est encore relativement peu courante et par conséquent, dans ce paragraphe consacré aux canaux potassiques chez *C. elegans*, j'utiliserai alors la classification suivie originellement par Wei *et al.* (1996) lors de la description des différentes familles de canaux potassiques chez cet organisme (voir aussi Tableau 2).

Chez *C. elegans*, l'analyse du génome entièrement séquencé a permis de mettre en évidence qu'il existait environ 70 gènes codant des canaux potassiques chez cet organisme (Wei *et al.*, 1996 ; Bargmann, 1998 ; Salkoff *et al.*, 1999). Comme chez les Vertébrés, ces canaux appartiennent à trois classes structurales : les canaux à six domaines transmembranaires ou 6 TM, ceux à quatre domaines transmembranaires ou 4 TM, et ceux à deux domaines transmembranaires ou 2 TM (Figure 8).

1. Les canaux potassiques 6 TM

Les sous-unités α de la classe des canaux potassiques 6 TM comportent six hélices α transmembranaires, notées S1 à S6, séparant les segments N et C-terminaux cytosoliques. Comme dans les canaux sodiques et calciques voltage-dépendants, la boucle P est localisée entre les segments S5 et S6, et dans la plupart des cas le segment S4 porte des charges

Canaux potassiques			
Protéines <i>C. elegans</i>	Equivalent Mammifères		Caractéristiques du courant
	Ancienne nomenclature	Nomenclature HUGO	
EXP-2	Kv?	?	Voltage-dépendant Rectification entrante
KVS-1	Kv4.2	KCND2	Voltage-dépendant Transitoire Sensible 4-AP
EGL-36	Kv3.1	KCNC1	Voltage-dépendant Retardé Maintenu Sensible 4-AP
EGL-2	EAG	KCNHx	Voltage-dépendant Retardé Maintenu
UNC-103	HERG	KCNH2	ND
SLO-1	BK	KCNMA1	Voltage-dépendant Maintenu Activé par Ca ²⁺ interne
SLO-2	r-SLACK	KCNMA2	Voltage-dépendant Maintenu Activé par Ca ²⁺ et Cl ⁻ interne
SUP-9	TASK1 TASK3	KCNK3 KCNK9	ND
TWK-18	TREK-1	KCNK2	Voltage-dépendant Activé par température

Tableau 2. Tableau récapitulatif des principales sous-unités α des canaux potassiques de *C. elegans* et leurs équivalents chez les Mammifères.

Pour chaque protéine de *C. elegans* est (sont) indiquée(s) la (les) protéine(s) présentant le plus de similarité connue(s) chez les Mammifères. Les nomenclatures usuelles et HUGO sont précisées pour chacune de ces protéines homologues. Les caractéristiques des courants indiquées correspondent à celles observées pour les canaux de *C. elegans* et ont été déterminées uniquement en système d'expression hétérologue (ND : Non Déterminé).

positives. Au sein de cette classe, Wei *et al.* (1996) distinguent plusieurs familles de canaux potassiques dont les membres présentent plus de similarité entre eux qu'avec ceux des autres familles.

1.1. La famille Shaker, Shab, Shaw, Shal

Les canaux Shaker, Shab, Shaw et Shal sont des canaux potassiques voltage-dépendants, initialement découverts chez la *Drosophile* et présents chez l'ensemble des Métazoaires (voir pour revue Salkoff *et al.*, 1992). Les sous-unités α de ces canaux présentent des domaines très conservés, comme les charges positives du segment S4 ou le segment T1 cytoplasmique responsable de l'interaction avec les sous-unités β régulatrices (voir pour revue Dolly & Parcej, 1996). La compréhension de la structure et du fonctionnement de ces canaux a été récemment très améliorée par la cristallisation du premier canal de cette famille (Jiang *et al.*, 2003 a,b). Ces canaux sont tous activés par la dépolarisation mais avec des cinétiques d'activation et d'inactivation très variées.

L'analyse du génome de *C. elegans* a montré qu'il contenait 11 gènes *shaker*, *shab*, *shaw* et *shal* (<http://nt-salkoff.wustl.edu/portal/hgxpp001.aspx?2>). Seuls trois canaux codés par ces gènes ont été caractérisés au niveau de leurs propriétés électriques par étude en système hétérologue.

1.1.1. EXP-2

Le gène *exp-2* a été originellement identifié à partir d'un criblage de mutants touchés sur la défécation (Thomas, 1990). L'allèle muté isolé, *sa26*, est une mutation gain-de-fonction qui entraîne également, à l'état hétérozygote, une hyperactivité des muscles de la tête, un défaut de ponte et une diminution de la durée des contractions rythmiques du pharynx. A l'état homozygote la mutation est létale. Les mutants nuls ne sont touchés qu'au niveau du pharynx et présentent alors des contractions anormalement longues (Davis *et al.*, 1999). Les défauts de contraction des muscles pharyngiens sont corrélés avec le décours des potentiels d'action dans ces cellules. En effet, chez le mutant gain-de-fonction, les potentiels d'action spontanés durent environ 70 ms au lieu de 200 ms chez l'animal sauvage, alors que pour les mutants *exp-2* nuls ils se prolongent pendant plusieurs secondes (Davis *et al.*, 1999).

En accord avec ces observations, le clonage de *exp-2* a montré que ce gène codait une sous-unité α d'un canal potassique appartenant à la famille des Shaker, Shab, Shaw, Shal (Davis *et al.*, 1999). L'expression de ce gène est détectable dans les muscles du pharynx, de l'intestin et de la vulve, ainsi que dans certains neurones (Davis *et al.*, 1999).

Exprimé dans l'ovocyte de Xénope, le canal EXP-2 sauvage est caractérisé par une activation lente et une inactivation extrêmement rapide. Lors d'une impulsion dépolarisante, l'inactivation du canal est tellement rapide que son activation n'est pas perceptible. A la fin de l'impulsion, le canal récupère de l'inactivation plus vite qu'il ne se désactive, et ainsi des courants de queue sont observables (Davis *et al.*, 1999 ; Fleischhauer *et al.*, 2000). Ces cinétiques d'activation et d'inactivation confèrent alors des propriétés de rectifieur entrant au canal et sont similaires à celles présentées par un canal potassique de la famille eag, le canal HERG (Human Eag Related Gene) (Fleischhauer *et al.*, 2000). Pour mimer la situation correspondante au mutant gain-de-fonction hétérozygote, EXP-2 sauvage a été coexprimé dans l'œuf de Xénope avec EXP-2(sa26), qui porte la mutation gain-de-fonction, consistant en la substitution d'un résidu dans le segment S6. Le courant potassique résultant présente alors une inactivation plus lente, ce qui permet à un courant sortant de se développer lors d'une impulsion dépolarisante, expliquant ainsi la durée réduite des potentiels d'action sur le mutant hétérozygote (Davis *et al.*, 1999). Le délai important de repolarisation du potentiel d'action dans les cellules musculaires du pharynx chez le mutant *exp-2* nul indique que le canal EXP-2 joue un rôle majeur dans cette phase, comme le fait HERG dans la repolarisation du potentiel d'action cardiaque (Bauer & Schwarz, 2001). Ces deux canaux, qui présentent une structure différente mais qui partagent les mêmes propriétés fonctionnelles, sont ainsi un exemple d'évolution convergente.

1.1.2. KVS-1

KVS-1 est la première sous-unité α d'un canal potassique chez *C. elegans* pour laquelle une interaction avec une sous-unité accessoire de la famille des MiRPs, MPS-1, a été montrée (Bianchi *et al.*, 2003). Chez les Vertébrés, les sous-unités MinK et MiRPs s'associent avec différents types de canaux potassiques, comme KvLQT1, HERG et Kv4.2, et ils en modifient certaines propriétés biophysiques et pharmacologiques (voir pour revue Abbott & Goldstein, 2001).

L'expression du canal KVS-1 dans les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) donne naissance à un courant sélectif au potassium, présentant une activation et une inactivation rapide, et bloqué par la 4-AP. MPS-1, exprimé seul, n'engendre aucun courant mais en revanche sa coexpression avec KVS-1 modifie les caractéristiques électrophysiologiques de ce dernier. L'inactivation est en particulier deux fois plus rapide et la sensibilité à la 4-AP est moindre (Bianchi *et al.*, 2003).

L'analyse des profils d'expression de *kvs-1* et *mps-1* chez *C. elegans* montre une

distribution principalement neuronale, et chevauchante pour certaines cellules, comme pour plusieurs neurones sensoriels. Le RNAi contre les gènes *kvs-1* ou *mpps-1* aboutit, en partie, aux mêmes perturbations, en particulier sur les fonctions sensorielles faisant intervenir les cellules où les deux gènes sont coexprimés. Le double RNAi n'engendre pas un phénotype plus marqué que les simples RNAi, suggérant que l'interaction entre KVS-1 et MPS-1 est également fonctionnelle *in vivo* (Bianchi *et al.*, 2003).

1.1.3. EGL-36

Le gène *egl-36* a été isolé à partir d'un criblage de mutants présentant un défaut de ponte et de défécation (Trent *et al.*, 1983 ; Reiner *et al.*, 1995). Le clonage et le séquençage du gène ont révélé qu'il codait une sous-unité α d'un canal potassique de type Shaw (Elkes *et al.*, 1997 ; Johnstone *et al.*, 1997). Exprimé en système hétérologue, EGL-36 est caractérisé par une cinétique d'activation lente, un seuil élevé, une absence d'inactivation et une sensibilité à la 4-AP (Elkes *et al.*, 1997 ; Johnstone *et al.*, 1997). Il est à noter que EGL-36 a été étudié parallèlement dans deux systèmes hétérologues différents, l'ovocyte de Xénope et les cellules COS, et que les résultats concernant l'étude du seuil d'activation du canal diffèrent de façon significative d'un système à l'autre. Effectivement le seuil d'activation du canal se situe autour de -20 mV dans l'ovocyte de Xénope (Johnstone *et al.*, 1997) alors que celui dans les cellules COS est plus proche de +20 mV (Elkes *et al.*, 1997). Cette différence est illustrative de l'interférence possible du système d'expression sur les propriétés du canal et de la nécessité de travailler *in situ* pour déterminer quelles sont les conditions physiologiques susceptibles d'activer le canal.

Les mutants sur *egl-36* qui présentent un défaut de ponte et de défécation sont des mutants gain-de-fonction. Deux allèles gain-de-fonction ont été caractérisés : l'allèle *n728*, qui consiste en une substitution d'un résidu dans le domaine N-terminal, et l'allèle *n2332*, qui est aussi une mutation ponctuelle mais localisée dans le segment S6 (Elkes *et al.*, 1997 ; Johnstone *et al.*, 1997). Chez ces deux mutants, le seuil d'activation du canal EGL-36 est significativement décalé vers les potentiels plus négatifs (autour de -50 mV) (Elkes *et al.*, 1997 ; Johnstone *et al.*, 1997). Ce décalage pourrait alors conduire à une ouverture constitutive du canal dans les conditions de repos, ce qui rendrait compte du phénotype des mutants gain-de-fonction. Le profil d'expression de la construction *egl-36::GFP* et l'effet de l'expression mosaïque de *egl-36(n2332)* suggèrent que EGL-36 aurait un rôle dans la défécation principalement neuronal, alors que pour la ponte il interviendrait majoritairement au niveau musculaire (Elkes *et al.*, 1997 ; Johnstone *et al.*, 1997).

Contrairement aux mutants gain-de-fonction, les mutants *egl-36* nuls ont un phénotype similaire aux animaux sauvages (Johnstone *et al.*, 1997). Ces mutations nulles silencieuses suggèrent que l'absence de EGL-36 a des répercussions soit trop discrètes pour être visibles au niveau phénotypique global, soit masquées en raison de l'existence d'un phénomène de redondance fonctionnelle.

1.2. La famille eag

La famille eag rassemble les sous-unités α de canaux potassiques voltage-dépendants qui présentent des similarités, au moins au niveau de la séquence en acides aminés, avec la protéine fondatrice de la famille, EAG, découverte chez la Drosophile. Des mutations sur le gène *eag* entraînent des mouvements désordonnés et rapides au niveau des pattes de la mouche lors de l'anesthésie à l'éther, un phénotype semblable mais moins accentué que le phénotype shaker. En référence au "go-go dancing", ce phénotype fut dénommé "ether-à-go-go" et abrégé *eag* (Kaplan & Trout, 1969). Chez les Vertébrés, cette famille est subdivisée en trois sous-familles : eag, qui regroupe des canaux produisant généralement un courant maintenu et modulé par les cations divalents, erg (Eag Related Protein), qui rassemble des canaux caractérisés par une activation lente et une inactivation rapide comme HERG, et elk (Eag-Like Protein) dont les membres présentent l'un ou l'autre des deux profils précédents (voir pour revue Bauer & Schwartz, 2001). Chez *C. elegans*, seuls deux membres de cette famille ont été identifiés : EGL-2 et UNC-103.

1.2.1. EGL-2

EGL-2 est une sous-unité α d'un canal potassique de la sous famille eag (Weinshenker *et al.*, 1999). Une mutation gain-de-fonction, consistant en une substitution d'un résidu dans le segment S6, est responsable d'un phénotype mutant présentant de nombreuses perturbations au niveau de la ponte, de la défécation, du système sensoriel, de la locomotion et du comportement sexuel du mâle (Weinshenker *et al.*, 1999). Le gène *egl-2* est exprimé dans les muscles de la vulve et de l'intestin, ainsi que dans plusieurs neurones. L'effet de la mutation gain-de-fonction serait musculaire pour les défauts de ponte et de défécation, et neuronal dans les autres cas (Reiner *et al.*, 1995, Weinshenker *et al.* 1995). Les mutations perte-de-fonction, comme pour celles sur EGL-36, n'ont pas de répercussions visibles (Weinshenker *et al.*, 1999).

Exprimé dans l'œuf de Xénope, EGL-2 laisse passer un courant potassique voltage-dépendant qui s'active lentement à partir de sauts de potentiels portant le potentiel de

membrane autour de -50 mV, et qui ne présente pas d'inactivation. Pour le canal muté gain-de-fonction, le seuil d'activation du courant est décalé vers les potentiels plus négatifs et l'activation est plus rapide (Weinshenker *et al.*, 1999). Ainsi, comme pour EGL-36, une mutation ponctuelle dans le segment S6 de EGL-2 modifie les propriétés d'activation du canal. *In situ*, ce canal muté diminue alors l'excitabilité des cellules l'exprimant, et conduit à un défaut de contraction ou de stimulation neuronale.

1.2.2. UNC-103

UNC-103 est l'autre sous-unité α des canaux potassiques de la famille eag de *C. elegans*. L'analyse du profil d'expression de constructions *unc103::GFP* montre que ce canal ne serait présent qu'au niveau neuronal, en particulier dans les neurones de la corde ventrale et ceux spécifiques aux animaux mâles (Garcia & Sternberg, 2003). Le phénotype des mutants nuls sur *unc-103* est assez discret puisque qu'il ne touche que le comportement de protraction des spicules sexuels des animaux mâles. Certaines mutations gain-de-fonction présentent un phénotype léthargique associé avec un défaut de ponte, sans perturbation de la protraction des spicules sexuels du mâle (Garcia & Sternberg, 2003). Aucune donnée électrophysiologique n'a pour le moment été obtenue pour ce canal.

1.3. La famille KQT

Chez *C. elegans*, la famille KQT est l'équivalent de la famille KCNQ des Vertébrés qui regroupe les sous-unités α des canaux potassiques présentant des similarités, au niveau de leur séquence en acides aminés, avec le canal potassique cardiaque KvLQT1. Des mutations sur les canaux KCNQ chez l'Homme sont impliquées dans plusieurs pathologies héréditaires, comme certains syndromes du QT long ou certaines formes de surdité congénitales ou d'épilepsies. KCNQ2 et KCNQ3 sont responsables du courant dit de type M, qui est un courant potassique maintenu, inhibé par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G, comme le récepteur muscarinique (voir pour revue Robbins, 2001).

Chez *C. elegans*, il existe trois membres de la famille KQT : KQT-1, KQT-2 et KQT-3. Des études préliminaires ont montré que ces canaux seraient exprimés exclusivement dans les cellules intestinales et qu'ils participeraient au contrôle de la rythmicité du programme de défécation (Wei & Salkoff, Biophysical Journal Annual Meeting 2004). Exprimés dans l'œuf de Xénope, KQT-1 et KQT-3 forment des canaux fonctionnels qui présentent les caractéristiques classiques des canaux KCNQ, c'est-à-dire une activation lente sans inactivation et une inhibition par la stimulation de récepteurs couplés aux protéines G (Wei &

Salkoff, Biophysical Journal Annual Meeting 2004).

1.4. La famille SLO

La famille SLO regroupe trois types de sous-unités α de canaux potassiques qui partagent au moins deux points communs : leur structure, atypique pour des canaux 6 TM, et une sensibilité à certains facteurs intracellulaires, comme la concentration en calcium, mais aussi en sodium, chlore ou protons.

Les canaux SLO appartiennent à la classe des canaux 6 TM car ils comportent le motif de base de six segments transmembranaires. Cependant, en plus de cette structure de base, ils possèdent, au moins pour la plupart, en position N-terminale par rapport au segment S1, un autre domaine transmembranaire, appelé S0. Leur domaine C-terminal est également original du fait de sa longueur inhabituelle et de la présence de plusieurs hélices α relativement hydrophobes (voir pour revue Magleby, 2003).

Chez *C. elegans*, seuls deux membres de la famille SLO ont été identifiés : SLO-1 et SLO-2 (Bargmann, 1998).

1.4.1. SLO-1

Le canal SLO-1, appelé aussi canal BK, est responsable du courant potassique de grande conductance activé par le calcium intracellulaire. Ce canal a été initialement cloné chez la Drosophile (Atkinson *et al.*, 1991) mais son existence dans d'autres organismes, comme la Souris ou le Nématode, a été rapidement mise en évidence (Butler *et al.*, 1993 ; Wang *et al.*, 2001).

Chez *C. elegans*, SLO-1 présente 58% d'identité en acides aminés avec les canaux SLO-1 de la Souris. Tous les domaines structuraux majeurs des canaux BK, en particulier la "calcium bowl" qui confère, en partie, la sensibilité du canal au calcium, sont présents dans la protéine de *C. elegans* (Wang *et al.*, 2001). Le marquage anticorps de SLO-1 révèle sa présence dans les neurones de l'anneau péri-pharyngien et de la corde nerveuse, ainsi que dans les muscles de la vulve et de la paroi du corps. Dans ces dernières cellules, le marquage n'est pas homogène mais ponctiforme (Wang *et al.*, 2001).

Exprimé dans l'ovocyte de Xénope, SLO-1 donne naissance à un courant potassique présentant les caractéristiques classiques des canaux BK, à savoir une activation par le voltage et le calcium intracellulaire, ainsi qu'une forte conductance (autour de 250 pS en gradient de potassium symétrique) (Wang *et al.*, 2001).

Des mutations nulles sur *slo-1*, qui, seules, sont responsables uniquement d'une légère

hyperactivité, améliorent le phénotype léthargique de mutants réduction-de-fonction sur *unc-64* (Wang *et al.*, 2001). Comme *unc-64* code la syntaxine, protéine du complexe SNARE impliqué dans la libération des neurotransmetteurs (Saifee *et al.*, 1998), il a été proposé que SLO-1 ait, entre autre, un rôle modulateur sur la libération des neurotransmetteurs au niveau pré-synaptique (Wang *et al.*, 2001). Cette hypothèse est renforcée par l'observation des courants post-synaptiques *in situ* dans les cellules musculaires de la paroi des mutants nuls *slo-1*, puisqu'ils présentent une amplitude et une durée plus grandes que celles des potentiels post-synaptiques des animaux sauvages (Wang *et al.*, 2001).

1.4.2. SLO-2

Le gène *slo-2* a été identifié par analyse du génome de *C. elegans* (Wei *et al.*, 1996). Des séquences homologues ont ensuite été recherchées chez le Mammifère et ont abouti à l'isolation du gène *r-slack* chez le Rat (Joiner *et al.*, 1998). L'étude fonctionnelle des produits géniques de ces gènes homologues s'est alors effectuée en parallèle et a conduit à plusieurs résultats similaires (Joiner *et al.*, 1998 ; Yuan *et al.*, 2000).

SLO-2 et r-SLACK présentent 41% d'identité entre eux et environ 20% avec Ce-SLO-1 ou r-SLO-1 (Yuan *et al.*, 2000). Les différences entre Ce-SLO-1 et SLO-2, ou entre r-SLACK et r-SLO-1, se traduisent par la non-conservation de plusieurs domaines, comme la "calcium bowl", le domaine S0 ou le domaine S4 (Joiner *et al.*, 1998 ; Yuan *et al.*, 2000). Pour les protéines de type SLO-1, la "calcium bowl" consiste en un enchaînement de résidus chargés négativement et participe à la sensibilité du canal au calcium (Schreiber & Salkoff, 1997). Pour SLO-2 et r-SLACK, les charges négatives de la "calcium bowl" sont remplacées par des charges positives. Le domaine S0, domaine transmembranaire propre aux canaux BK et impliqué dans la liaison avec des sous-unités régulatrices, est absent chez SLO-2 et r-SLACK, et ces protéines ne contiennent également que deux et non quatre hélices α cytoplasmiques en position C-terminale. Enfin, le segment S4 de SLO-2 et r-SLACK se caractérise par l'absence de charges positives, ce qui compromet alors probablement son rôle de voltage sensor dans l'activation du canal (Yuan *et al.*, 2000).

Exprimés dans l'ovocyte de Xénope, r-SLACK et SLO-2 partagent certaines propriétés biophysiques. Ils donnent tous deux naissance à un courant potassique voltage-dépendant, qui rectifie dans le sens du courant sortant. La voltage-dépendance des canaux SLO-2 et r-SLACK, en l'absence d'un segment S4 chargé positivement, laisse penser que d'autres domaines, qui restent à déterminer, sont responsables de cette propriété (Joiner *et al.*, 1998 ; Yuan *et al.*, 2000).

La sensibilité de SLO-2 aux facteurs intracellulaires a été étudiée plus en détail et a permis de mettre en évidence que l'activation de SLO-2 nécessitait la présence simultanée de calcium et de chlore à la face cytoplasmique. En l'absence de ces ions, l'ouverture du canal SLO-2 reste possible mais requiert de très fortes dépolarisations (Yuan *et al.*, 2000). La détermination du domaine impliqué dans la sensibilité au calcium et au chlore a nécessité des expériences de mutagenèse dirigée, visant en particulier à remplacer les résidus chargés positivement localisés à la place de la "calcium bowl". Le canal mutant produit n'est alors plus, ou très peu, sensible au chlore et au calcium (Yuan *et al.*, 2000). En raison de la présence de charges positives localisées sur ce segment, et par analogie avec la "calcium bowl", ce domaine du canal SLO-2 a été appelé "chloride bowl", même si en réalité il est indispensable aussi bien à la sensibilité au chlore qu'à celle au calcium.

SLO-2 est exprimé largement chez *C. elegans*, aussi bien dans le tissu nerveux que musculaire (Yuan *et al.*, 2000). Etant donné que le profil d'expression de SLO-2 est en partie chevauchant avec celui de SLO-1, il a été proposé que SLO-2 et SLO-1 puissent former des hétérotétramères. Cette hypothèse est renforcée par l'observation, en système hétérologue, de modifications fonctionnelles du courant porté par SLO-1 lorsque SLO-2 est présent (Yuan *et al.*, 2000).

Au moment où nous avons entamé notre étude, les données connues sur SLO-2 se limitaient à celles exposées plus haut. Sa présence, ses caractéristiques ainsi que son rôle *in situ* n'étaient pas déterminés. L'activité des canaux SLO-2 chez *C. elegans* a pour la première fois été enregistrée *in situ* au cours de l'étude 2 présentée dans ce manuscrit. Depuis, deux articles sur SLO-2 sont parus en 2003, amenant des données à la fois sur SLO-2 et r-SLACK. Etant postérieurs à notre étude, ces articles seront intégrés à la discussion sur SLO-2 en dernière partie du manuscrit.

1.5. La famille SK

Contrairement à la famille SLO, la structure des sous-unités α de la famille SK est classique, avec six segments transmembranaires séparant les domaines N et C-terminaux cytoplasmiques. Cette famille regroupe des canaux de conductance faible, les canaux SK, ou intermédiaire, les canaux IK. Ces deux types de canaux partagent les mêmes caractéristiques, à savoir une insensibilité au voltage même si le segment S4 est porteur de charges positives, et une sensibilité au calcium intracellulaire, qui n'implique pas de structure type "calcium-bowl" mais fait intervenir une interaction avec la calmoduline. En revanche, la sensibilité pharmacologique est différente entre les canaux SK et IK, les canaux SK étant sensibles à

l'apamine alors que les canaux IK sont sensibles à la charybdotoxine (voir pour revue Bond *et al.*, 1999 ; Jensen *et al.*, 2001).

Le génome de *C. elegans* contient au moins trois gènes de la famille SK dont les propriétés et les rôles demeurent inconnus (Salkoff *et al.*, 1999).

2. Les canaux potassiques 4 TM

La classe des canaux potassiques 4 TM est la classe la plus diversifiée chez *C. elegans* puisque, sur environ 70 gènes codant des sous-unités α de canaux potassiques, elle en regroupe plus de 40 (Bargmann, 1998 ; Salkoff *et al.*, 2001). Les canaux de cette classe partagent la même structure avec quatre segments transmembranaires, M1/4, et deux domaines P, P1 et P2, localisés entre M1 et M2 et entre M3 et M4. Un autre trait structural caractéristique de ces canaux est la présence d'une large boucle extracellulaire entre M1 et P1 (voir pour revue Lesage & Lazdunski, 2000 ; Thèse de François Maingret, 2001) (Figure 8). Etant donné que la participation de quatre domaines P est nécessaire pour avoir un canal fonctionnel (Doyle *et al.*, 1998) et que les canaux 4 TM contiennent deux domaines P, il a été proposé que les sous-unités α de type 4 TM fonctionnent sous forme de dimères. Des études biochimiques, ainsi que des expériences de mutagenèses dirigées et de constructions chimériques, ont confirmé cette hypothèse pour les canaux TWIK-1 (Tandem P domain in a Weak Inward rectifier K^+ channel) et TASK-1 (Twik related Acid Sensitive K^+ channels) des Mammifères (voir pour revue Thèse de François Maingret, 2001).

Malgré une structure générale bien conservée, les canaux 4 TM présentent peu de similarités de séquence entre eux. Ce manque d'homogénéité se traduit, au moins pour les canaux 4 TM des Mammifères qui sont à ce jour les mieux caractérisés, par des propriétés biophysiques et pharmacologiques très variées. Les agents activateurs de ces canaux sont en particulier très divers et regroupent, entre autre, les variations de pH intra- et extracellulaire, l'étirement membranaire, la présence d'acides gras polyinsaturés et les variations de température. Le rôle de ces canaux est encore en cours d'exploration, mais il semblerait qu'ils participent à l'établissement du potentiel de repos. Ils constitueraient ainsi, au moins en partie, des canaux potassiques de fuite dont l'activité serait modulable en fonction de différents facteurs intra- et extracellulaires (voir pour revue Lesage & Lazdunski, 2000 ; Thèse de François Maingret, 2001).

Chez *C. elegans*, le nombre élevé de canaux 4 TM, 45 alors qu'il n'y en a qu'une quinzaine chez l'Homme, ainsi que les profils d'expression de ces canaux généralement

limités à quelques cellules par canal, mais couvrant en globalité toutes les cellules de l'organisme, suggèrent que ces canaux auraient un rôle particulièrement important dans le contrôle fin de l'excitabilité cellulaire (Salkoff *et al.*, 2001). L'étude fonctionnelle des canaux 4 TM chez *C. elegans* est pour le moment restreinte à deux canaux, SUP-9 et TWK-18, qui sont les seuls à présenter des formes mutées.

2.1. SUP-9

Le gène *sup-9* code une sous-unité α d'un canal 4 TM présentant environ 50% d'identité de séquence en acides aminés avec les canaux TASK-1 et TASK-3 des Mammifères (Perez de la Cruz *et al.*, 2003). Des études génétiques ont montré que ce gène interagissait avec, entre autres, les gènes *unc-93* et *sup-10* (Greenwald & Horvitz, 1980, 1986 ; Levin & Horvitz, 1992, 1993). En effet, des mutations gain-de-fonction sur chacun de ces trois gènes entraînent le même phénotype, dit du "Rubber band", qui consiste pour l'animal à répondre à une stimulation tactile sur la tête par une phase de contraction puis de relaxation des muscles du corps, sans changement du sens de locomotion, alors que les animaux sauvages répondent simplement par un changement de direction (Greenwald & Horvitz, 1980, 1986). De plus des mutations perte-de-fonction sur l'un de ces trois gènes éliminent le phénotype "Rubber band" dû à une mutation gain-de-fonction sur l'un des autres gènes (Greenwald & Horvitz, 1980, 1986 ; Levin & Horvitz, 1992, 1993). Il a ainsi été proposé que SUP-9, SUP-10 et UNC-93 agissent au sein d'un même complexe protéique.

Le clonage et le séquençage de *unc-93* et *sup-10* ont révélé que ces gènes ne codaient pas des sous-unités α de canaux 4 TM mais des protéines membranaires, de cinq à dix et de un segments transmembranaires respectivement (Levin & Horvitz, 1992 ; Perez de la Cruz *et al.*, 2003). L'hypothèse actuelle propose alors que SUP-9 soit un canal 4 TM qui possède, au moins, deux sous-unités régulatrices, SUP-10 et UNC-93.

Ces trois protéines sont exprimées dans les muscles de la paroi du corps sous forme d'un marquage ponctiforme recouvrant celui des corps denses, mais aussi dans les muscles de la vulve, les muscles entériques, ainsi que quelques neurones de la tête (Perez de la Cruz *et al.*, 2003). Parallèlement, l'expression, uniquement dans les muscles de la paroi, d'une construction gain-de-fonction sur SUP-9, SUP-10 ou UNC-93 suffit à obtenir le phénotype "Rubber band", signifiant que SUP-9, SUP-10 et UNC-93 auraient principalement un rôle musculaire (Perez de la Cruz *et al.*, 2003).

Le phénotype "Rubber band" est également observé lors de l'application de muscimol sur des animaux sauvages (Perez de la Cruz *et al.*, 2003). Etant donné que le muscimol est un

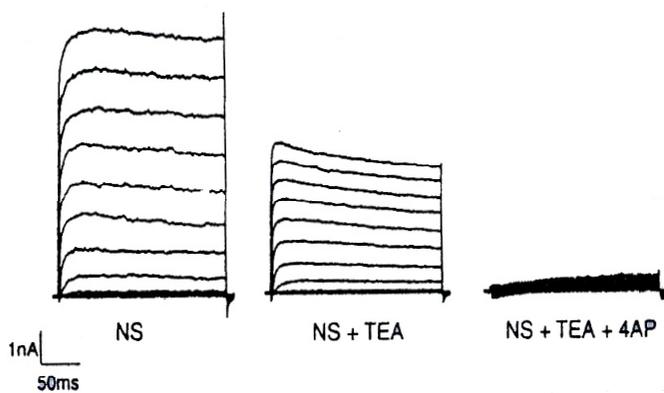
agoniste des récepteurs canaux au GABA, il inhibe la contraction musculaire probablement en hyperpolarisant les cellules (McIntire *et al.*, 1993b). Il a alors été proposé que les mutations gain-de-fonction, sur le canal ou ses sous-unités associées, conduisent à une ouverture constitutionnelle du canal menant à une hyperpolarisation des cellules. Cette hypothèse n'a pu être validée pour le moment car la coexpression de SUP-9 ou SUP-9(gain-de-fonction) avec SUP-10 et UNC-93, dans l'œuf de Xénope ou les cellules humaines HEK, ne donne pas de canaux fonctionnels, suggérant qu'il manque probablement encore d'autres protéines indispensables au fonctionnement ou à l'adressage membranaire de SUP-9 (Perez de la Cruz *et al.*, 2003).

Les animaux portant des mutations nulles sur *sup-9*, *unc-93*, ou *sup-10* sont indiscernables des animaux sauvages (Greenwald & Horvitz, 1980). Cette absence de phénotype peut avoir deux explications différentes : soit l'absence d'une de ces trois protéines est compensée par une protéine de la même famille, hypothèse favorisée par l'appartenance de *sup-9* et *unc-93* à des familles multigéniques (Salkoff *et al.*, 2001 ; Perez de la Cruz *et al.*, 2003), soit le complexe SUP-9/SUP-10/UNC-93 fonctionne en redondance avec un autre système capable de compenser son absence (Levin & Horvitz, 1992).

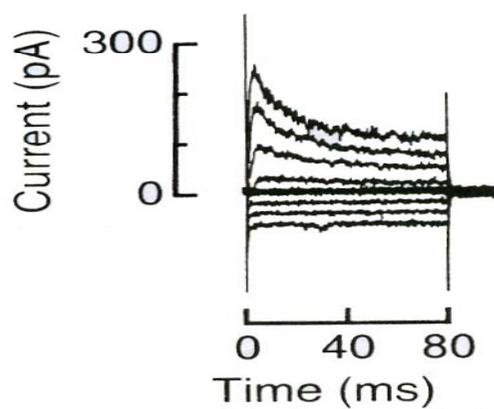
2.2. TWK-18

twk-18 code une sous-unité α d'un canal 4 TM qui pourrait être l'homologue du canal TREK-1 des Mammifères (<http://www.wormbase.org/>). Comme TREK-1, l'activité de ce canal, exprimé en système hétérologue, augmente avec les températures croissantes. Il est également caractérisé par une rectification sortante prononcée qui serait due à une diminution de la durée d'ouverture des canaux aux potentiels les plus négatifs. Enfin, l'activité de ce canal est modulée par les variations de pH mais pas par l'étirement membranaire (Kunkel *et al.*, 2000).

TWK-18 est exprimé exclusivement dans les cellules musculaires de la paroi du corps (Kunkel *et al.*, 2000). Des mutations gain-de-fonction sur *twk-18* entraînent un défaut de contraction de ces cellules, responsable d'un phénotype "UNC", caractérisé par une locomotion mal coordonnée, ou une paralysie dans les cas les plus sévères. Ces mutations consistent en des substitutions ponctuelles d'acides aminés sur les segments M2 ou M4. Exprimés en système hétérologue, les canaux mutés donnent naissance à des courants de plus grande amplitude que ceux des canaux sauvages (Kunkel *et al.*, 2000). Cette observation est en concordance avec la contraction plus faible des cellules musculaires chez les animaux mutants ; en effet un plus grand courant sortant diminue l'excitabilité cellulaire. Les



Richmond & Jorgensen, 1999



Goodman *et al.*, 1998

Figure 9. Courants potassiques enregistrés *in situ* en configuration cellule-entière sur les cellules musculaires de la paroi (panneau de gauche) et dans les neurones ASER (panneau de droite) de *C. elegans*.

Les cellules musculaires de la paroi étudiées étaient issues d'animaux sauvages adultes. Des dépolarisations d'amplitude croissante par pas de 10 mV ont été appliquées jusqu'à +60 mV à partir d'un potentiel de maintien de -60 mV, en présence de milieux extracellulaires physiologiques (NS), additionnés de 20 mM TEA (NS + TEA) ou de 20 mM TEA et de 3 mM 4-AP (NS + TEA + 4-AP). Les neurones ASER provenaient d'animaux au stade larvaire 3 et ont été stimulés à partir d'un potentiel de maintien de -74 mV par des impulsions hyperpolarisantes et dépolarisantes d'amplitude croissante par pas de 20 mV.

mutations nulles sur *twk-18*, comme la plupart des mutations nulles sur les gènes codant des canaux potassiques, ne sont pas associées avec un phénotype mutant, suggérant que le rôle de *twk-18* n'est pas essentiel ou qu'il est redondant avec celui d'autres canaux (Kunkel *et al.*, 2000).

3. Les canaux potassiques 2 TM

Les sous-unités α de la classe des canaux potassiques 2 TM sont composées de deux hélices α transmembranaires, appelées M1 et M2, séparées par un domaine P et comprises entre les extrémités N et C-terminales cytosoliques (Figure 8). Ces canaux sont les premiers canaux ioniques à avoir été cristallisés et dont la structure a été déterminée par rayons X (Doyle *et al.*, 1998). Ces sous-unités α sont l'équivalent de la structure S5-P-S6 des canaux potassiques 6 TM.

La classe des canaux potassiques 2 TM est la classe la moins diversifiée chez *C. elegans* puisqu'elle ne comprend que trois membres différents, codés par *irk-1*, *irk-2* et *irk-3*, alors qu'elle en contient une quinzaine chez les Mammifères. IRK-1, IRK-2 et IRK-3 sont apparentés à la famille des rectifieurs entrants intervenant dans l'excitabilité cardiaque et neuronale (Kir2.x) (<http://www.wormbase.org/>). Aucune donnée expérimentale sur ces canaux n'est disponible à ce jour.

4. Les courants potassiques enregistrés *in situ* chez *C. elegans*

Comme pour les canaux calciques, les canaux potassiques ont très peu été caractérisés *in situ* chez *C. elegans*. Au moment où nous avons entamé notre travail, seules deux études, une sur les cellules musculaires de la paroi et une sur les neurones, avaient présenté des enregistrements de courants potassiques réalisés *in situ*.

Dans les cellules musculaires de la paroi, un courant voltage-dépendant sortant est évoqué à partir de sauts de potentiels amenant le potentiel de membrane de -60 à -30 mV (Richmond & Jorgensen, 1999). L'utilisation de deux bloqueurs classiques des canaux potassiques voltage-dépendants, le TEA (TétraEthylAmmonium) et la 4-AP (4 AminoPyridine), a permis de mettre en évidence que ce courant sortant comportait au moins deux composantes potassiques différentes, activés à partir du même seuil de potentiel : une composante sensible à la 4-AP, s'activant rapidement et présentant une inactivation partielle, et une sensible au TEA, s'activant plus lentement mais restant maintenue le temps de la dépolarisation (Richmond & Jorgensen, 1999) (Figure 9). Ces courants potassiques sont également présents

dans les cellules musculaires de *C. elegans* en culture (Christensen *et al.*, 2002).

Dans les neurones, deux types de courants potentiellement potassiques ont été mis en évidence (Goodman *et al.*, 1998) (Figure 9). Le premier type de courant potassique s'active, sans présenter de dépendance au temps, à partir de potentiels inférieurs à -90 mV. Son potentiel d'inversion est autour de -90 mV, valeur correspondante au potentiel d'équilibre du potassium dans les conditions utilisées. Ce courant n'a pas été exploré plus en détails. L'autre courant potassique s'active rapidement à partir de potentiels supérieurs à -30 mV et s'inactive partiellement. Ce courant activé par la dépolarisation est bloqué en totalité en présence de 4-AP dans la solution extracellulaire, alors que le TEA n'a que peu d'effet. Les deux types de courants potassiques observés dans les neurones *in situ* sont également présents dans les neurones de *C. elegans* en culture (Christensen *et al.*, 2002).

Ainsi, au moment où nous avons entrepris la caractérisation des propriétés électrophysiologiques des cellules musculaires striées de *C. elegans*, les courants potassiques n'avaient été étudiés que partiellement. De plus, aucune information sur la nature moléculaire des canaux impliqués n'était disponible. Nous nous sommes alors efforcés de caractériser plus en détails les courants observés *in situ* sur les cellules musculaires de la paroi, et d'apporter des données sur la nature des canaux potassiques impliqués en caractérisant leurs propriétés à l'échelle unitaire et en les comparant à celles des canaux étudiés en expression hétérologue.

IV. Les canaux sodiques

Une des caractéristiques les plus marquantes au niveau des canaux sodiques de *C. elegans* est l'absence dans le génome de gènes codant des sous-unités α de canaux sodiques voltage-dépendants classiques (Bargmann, 1998). En revanche, il existe chez cet animal deux protéines, NCA-1 et NCA-2, qui présentent autant de similarités avec les sous-unités α des canaux sodiques voltage-dépendants qu'avec les sous-unités α_1 des canaux calciques voltage-dépendants (voir le paragraphe II.1.1.3 de cette section). L'existence d'un courant sodique voltage-dépendant pourrait alors être envisagée ; cependant, en expression hétérologue les canaux NCA-1 et NCA-2 ne sont pas fonctionnels (Jeziorski *et al.*, 2000), et de plus les enregistrements électrophysiologiques *in situ* n'ont jamais révélé la présence d'un courant sodique voltage-dépendant (Goodman *et al.*, 1998 ; Richmond & Jorgensen, 1999).

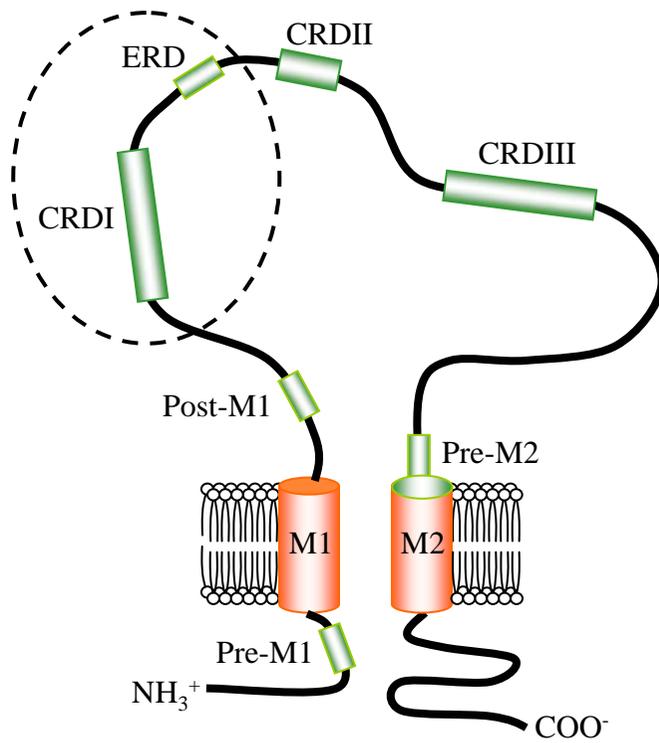
Ainsi, dans le génome de *C. elegans*, les seuls gènes identifiés actuellement comme codant des canaux ioniques sélectifs au sodium sont ceux codant les canaux sodiques sensibles à l'amiloride.

1. L'historique de la famille des canaux sodiques sensibles à l'amiloride

A partir des années 1980, plusieurs études se sont intéressées aux modalités de la mécanosensation chez *C. elegans*. Chez cet organisme, il existe trois formes de mécanosensation, impliquant des gènes et des réseaux neuronaux différents : la sensibilité au toucher léger, celle au toucher appuyé et celle au niveau du nez (voir pour revue Goodman & Schwarz, 2003). Des mutants déficients sur la perception du toucher léger ont été isolés par criblages génétiques et ont permis l'identification de plusieurs gènes, appelés *mec* (*mechanosensory abnormal*), impliqués dans cette fonction (Chalfie & Sulston, 1981 ; Chalfie & Au, 1989). En parallèle de ces mutants, tous perte-de-fonction, deux mutants gain-de-fonction ont été également isolés : *mec-4(e1611)*, appelé originellement *mec-13(e1611)*, et *deg-1(u38)* (pour *degeneration*). Ces mutants ont la particularité, en plus de l'insensibilité au toucher, de faire dégénérer les cellules les exprimant (Sulston & Chalfie, 1981 ; Chalfie & Wolinski, 1990). De plus *deg-1(u38)* engendre également une insensibilité au toucher appuyé (Chalfie & Wolinski, 1990). Les clonages et séquençages de *deg-1* et *mec-4* ont montré que ces deux gènes présentaient de fortes similarités et appartenaient alors probablement à la même famille (Chalfie & Wolinski, 1990 ; Driscoll & Chalfie, 1991). Cette famille a été appelée famille des dégénéérines du fait de la dégénérescence engendrée par les allèles gain-de-fonction, notés (*d*) (Driscoll & Chalfie, 1991).

L'appartenance des dégénéérines à une superfamille regroupant de nombreux canaux a été progressivement mise en évidence avec la découverte de plusieurs autres gènes homologues à ceux des dégénéérines. La première étape a été le rapprochement entre les dégénéérines et le canal sodique épithélial sensible à l'amiloride (ENaC), impliqué dans la réabsorption du sodium dans les épithéliums rénaux et pulmonaires (Canessa *et al.*, 1993). En effet, le clonage et le séquençage du gène codant une sous-unité de ce canal ont révélé qu'il présentait de fortes similarités avec *deg-1* et *mec-4* (Canessa *et al.*, 1993). La famille formée par ces trois gènes, appelée alors DEG/ENaC, s'est ensuite peu à peu agrandie avec l'ajout, par homologie de séquence, de nouveaux membres, identifiés chez *C. elegans* comme MEC-10, UNC-105, UNC-8, DEL-1 et FLR-1 (Huang & Chalfie, 1994 ; Liu *et al.*, 1996 ; Tavernarakis *et al.*, 1997 ; Take-Uchi *et al.*, 1998), mais aussi chez les Mollusques (Lingueglia *et al.*, 1995), chez les Vertébrés avec la découverte de la famille ASIC (Acid Sensitive Ionic Channels) (Waldmann *et al.*, 1997), et chez la Drosophile (Adams *et al.*, 1998a).

Au sein de cette famille multigénique, tous les produits géniques dont l'activité a pu être enregistrée, *in situ* ou en expression hétérologue, ont montré un comportement de canaux ioniques non voltage-dépendants, sélectifs au sodium et inhibés par l'amiloride. Cette famille



d'après Kellenberger & Schild, 2002

Figure 10. Structure moléculaire d'un ASC et localisation des domaines conservés dans tous les ASCs.

L'ellipse en pointillés regroupe 2 domaines propres aux dégénéérines.

est ainsi maintenant nommée famille des canaux sensibles à l'amiloride ou ASCs (Amiloride Sensitive Channels) (Goodman & Schwarz, 2003).

2. Les caractéristiques communes des canaux sodiques sensibles à l'amiloride

Un premier trait probablement commun aux ASCs est le fonctionnement sous forme de multimères. Cette caractéristique a été démontrée par des études électrophysiologiques, immunologiques, biochimiques et génétiques pour les ENaCs, le canal des Mollusques activé par les peptides FMRFamide ou FaNaC (FMRFamide-activated Na⁺ Channels) et les dégénérines MEC-4 et MEC-10 (voir pour revue Kellenberger & Schild, 2002). Selon les cas, il peut s'agir d'hétéro- ou d'homomères pour lesquels la stoechiométrie est encore débattue. Deux modèles s'opposent, l'un qui propose un fonctionnement à l'état de tétramères (Coscoy *et al.*, 1998 ; Firsov *et al.*, 1998), l'autre à l'état de nonamères (Snyder *et al.*, 1998).

Toutes les sous-unités des ASCs sont formées d'un enchaînement de 530 à 740 résidus et partagent la même structure moléculaire générale, avec deux segments transmembranaires, M1 et M2, séparés par une large boucle extracellulaire et reliant des segments N et C-terminaux cytosoliques (voir pour revue Kellenberger & Schild, 2002) (Figure 10).

En plus de la structure générale commune, l'existence de domaines extrêmement conservés pour l'ensemble des ASCs a été mise en évidence (voir pour revue Kellenberger & Schild, 2002). Ces domaines, présentés sur la figure 10, incluent un motif HG dans le domaine N-terminal à proximité de M1 et appelé alors pré-M1, une séquence FPxxTxC en aval de M1 et appelée post-M1, deux domaines CRD (Cystein Rich Domain), CRDII et CRDIII, riches en cystéine localisés dans la boucle extracellulaire, et une zone couvrant le segment M2 et la région en amont de M2, appelée pré-M2. Le rôle de ces domaines est encore en cours d'exploration, cependant, pour certains, des résultats ont déjà été obtenus. Les domaines CRD, par exemple, sont impliqués dans la formation de ponts disulfures au sein de la boucle extracellulaire qui seraient indispensables pour un adressage membranaire correct de la protéine (Firsov *et al.*, 1999). Un autre domaine dont le rôle a été bien étudié est le segment pré-M2. Les analyses des profils d'hydrophatie et de digestions enzymatiques laissent penser que le segment pré-M2 du canal est en partie membranaire (Renard *et al.*, 1994 ; Garcia-Anoveros, 1995). Ce segment pourrait alors jouer un rôle dans la formation du pore ionique. Cette hypothèse est renforcée par la présence dans le segment pré-M2 d'un domaine impliqué dans la sélectivité ionique. Ce filtre de sélectivité est constitué par l'enchaînement de trois résidus G/SxS, et son rôle crucial dans la sélectivité du canal a été mis en évidence par l'observation du comportement électrique de canaux mutants sur cette séquence. Le

remplacement de la seconde sérine par un autre résidu entraîne une perte de sélectivité pour les ENaCs (Snyder *et al.*, 1999) ou de fonctionnalité pour MEC-4, DEG-1, ou ASIC2a (Hong & Driscoll, 1994 ; Garcia-Anoveros *et al.*, 1995 ; Waldmann *et al.*, 1996). Le segment pré-M2 intervient également dans le blocage des canaux par l'amiloride. En effet, des expériences de mutagenèse dirigée sur les sous-unités de ENaC ont montré que la substitution d'un résidu, celui localisée quatre résidus en amont du filtre de sélectivité, entraînait une diminution d'affinité du canal pour l'amiloride très significative (Schild *et al.*, 1997). La conservation de ce résidu dans quasiment tous les ASCs suggère qu'il joue un rôle similaire pour les autres canaux de cette famille (voir pour revue Kellenberger & Schild, 2002).

Un dernier point commun à la plupart des ASCs est la possibilité de rendre ces canaux constitutivement actifs par des mutations ponctuelles. Ce type de mutations a été à l'origine mis en évidence pour les dégénéérines, avec les allèles gain-de-fonction (*d*) responsables de la dégénérescence, mais depuis des mutations équivalentes ont été isolées pour d'autres membres de la famille, comme les ASICs (Waldmann *et al.*, 1996).

3. La diversité des canaux sodiques sensibles à l'amiloride

La diversité des ASCs est multiple puisqu'elle porte à la fois sur les organismes exprimant ces canaux, leur distribution cellulaire, leurs rôles physiologiques, leurs modes et paramètres d'activation et d'inactivation, leur degré de sélectivité pour le sodium ou leur gamme de sensibilité à l'amiloride (voir pour revue Kellenberger & Schild, 2002). Dans la suite de ce paragraphe, la diversité des ASCs sera principalement envisagée sous l'aspect de leurs modalités d'activation, à l'origine de leurs différents rôles physiologiques.

Les ENaCs des Mammifères ainsi que le canal RPK/dGNaC1 (Ripped Pocket) de la *Drosophile* sont impliqués dans les transferts ioniques et aqueux au travers des membranes cellulaires. Ces canaux partagent un point commun qui consiste en leur activation, faible mais existante, à l'état basal. Le canal représentatif de cette catégorie le mieux caractérisé est le ENaC exprimé dans les cellules épithéliales de la partie distale des néphrons de Mammifères. Ce canal joue un rôle crucial dans le contrôle de l'homéostasie sodique et potassique, ainsi que de la volémie, à l'échelle de l'organisme. Des mutations perte- et gain-de-fonction sont à l'origine de pathologies humaines héréditaires, le pseudohypoaldostéronisme de type 1 (PHA-1) et le syndrome de Liddle respectivement, qui se caractérisent par une dérégulation de la tension artérielle et des perturbations de l'homéostasie ionique (voir pour revue Kellenberger & Schild, 2002).

L'identification de ASCs activés par l'acidification du milieu extracellulaire, les ASICs, a

suggéré que ces canaux pourraient intervenir dans la perception des phénomènes de douleur. En effet, les phénomènes douloureux, d'origine interne ou externe, étant généralement corrélés avec une acidose tissulaire, il a été proposé depuis une vingtaine d'années que la perception de la douleur fasse intervenir un système sensible aux protons (voir pour revue Reeh & Steen, 1996). L'implication des ASICs dans la perception de la douleur est soutenue par plusieurs observations : (i) les ASICs sont localisés, entre autres, dans les neurones sensoriels mis en jeu lors de la sensation de douleur, (ii) des courants activés par les protons sont enregistrables dans ces neurones, (iii) en situation d'inflammation une surexpression de certains ASICs est détectable, (iv) les Souris invalidées sur le gène codant ASIC-3 présentent un défaut de perception pour certaines formes de douleur intense. L'inconnue majeure dans le rôle réel des ASICs dans les phénomènes de douleur est l'ignorance de l'amplitude possible des variations locales de pH, et en particulier de l'existence possible de microdomaines où le pH puisse s'écarter largement des valeurs physiologiques (voir pour revue Waldmann & Lazdunski, 1998 ; Kellenberger & Schild, 2002 ; Kristhal, 2003).

Les ASICs, en particulier ceux exprimés au niveau du système nerveux central comme ASIC-1, joueraient également un rôle dans la neurotransmission. En effet chez les Souris invalidées sur ASIC-1, le phénomène de potentialisation à long terme, appelé LTP (Long Terme Potentialisation) est défectueux (voir pour revue Kristhal, 2003). La LTP consiste en la potentialisation maintenue de la réponse post-synaptique suite à une stimulation pré-synaptique de haute fréquence. Elle implique la mise en jeu des récepteurs NMDA au glutamate dont l'activation par le glutamate nécessite simultanément une dépolarisation membranaire suffisante pour lever leur inhibition voltage-dépendante due aux ions Mg^{2+} (voir pour revue Bliss & Collingridge, 1993). L'hypothèse actuelle corrélant la LTP et les ASICs propose que ces canaux soient activés, lors d'une stimulation pré-synaptique maintenue, par l'acidification du milieu extracellulaire de la fente synaptique, en raison de la libération d'un grand nombre de vésicules pré-synaptiques contenant le glutamate et dont le milieu interne est acide. L'activation des ASICs permettrait alors d'induire une dépolarisation membranaire capable de moduler la neurotransmission au niveau de la synapse en facilitant l'ouverture des canaux NMDA.

L'intervention de ASCs dans la neurotransmission est encore plus explicite chez les Mollusques, avec l'existence de canaux appartenant à cette famille, les FaNaCs, directement activés par la fixation de peptides de type FMRFamide. Etant donné le rôle omniprésent de ces peptides en tant que neurotransmetteurs chez les invertébrés (voir pour revue Cottrell, 1993), les FaNaCs seraient ainsi des acteurs essentiels de la neurotransmission chez ces

animaux.

Le dernier rôle des ASCs développé dans ce paragraphe concerne l'implication de ces canaux dans la mécanosensation cellulaire. Historiquement ce rôle est l'un des tout premiers à avoir été proposé, en raison du défaut de mécanosensation corrélé à l'absence des dégénérines chez *C. elegans* (Chalfie & Sulston, 1981 ; Chalfie & Au, 1989). Cette hypothèse s'est peu à peu étoffée avec la mise en évidence, par études génétiques, de l'interaction entre les dégénérines et des protéines appartenant soit au cytosquelette intracellulaire, soit à la matrice extracellulaire (voir pour revue Tavernarakis & Driscoll, 1997). A partir de ces observations, un modèle a été établi dans lequel la mécanosensation cellulaire serait perçue au niveau d'un complexe protéique, établissant un lien entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire, dont l'élément central serait un canal ionique de type dégénérine (voir pour revue Tavernarakis & Driscoll, 1997). L'existence de ce complexe et de sa capacité à répondre à un stimulus mécanique n'a pour le moment pas été clairement démontrée, probablement du fait de l'absence d'études électrophysiologiques *in situ* sur les dégénérines. L'implication de ces canaux dans la mécanosensation est ainsi encore un sujet polémique, dont les données actuelles seront développées dans le paragraphe IV.4 de cette section.

Au sein des ASCs, la sensibilité aux contraintes mécaniques n'est cependant pas le propre exclusif des dégénérines. Chez la Drosophile, l'expression de PPK/dmdNaC1 (Pickpocket) au niveau des dendrites de neurones sensoriels intervenant dans la mécanosensation et la proprioception a suggéré que ces canaux pourraient fonctionner dans la conversion du signal mécanique en signal électrique, c'est-à-dire la mécanotransduction (Darboux *et al.*, 1998). Cette hypothèse n'a pu être vérifiée jusqu'à présent car ces canaux ne sont pas fonctionnels après expression hétérologue (Adams *et al.*, 1998a ; Darboux *et al.*, 1998). Chez les Mammifères, l'observation de défauts de mécanosensation sur des Souris invalidées sur certains ASICs a également conduit à l'hypothèse que ces canaux interviendraient dans cette modalité, sans à nouveau que la sensibilité aux contraintes mécaniques des canaux n'ait été directement démontrée (Price *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2002). Enfin, la mécanosensibilité potentielle des ENaCs est depuis longtemps débattue. Différentes études ont cherché à démontrer la réalité de cette propriété pour ces canaux et ont conduit à des résultats contradictoires : certains ont infirmé cette hypothèse (Awayda & Subramanyam, 1998 ; Palmer & Frindt, 1996) alors que d'autres l'ont confirmée (Awayda *et al.*, 1995 ; Berdiev *et al.*, 1996 ; Ismailov *et al.*, 1997 ; Ma *et al.*, 2002). Cette variabilité dans les résultats obtenus tient peut-être au fait que la mécanosensibilité du canal met en jeu un ensemble protéique, dont l'intégrité varie d'une préparation à l'autre. L'hypothèse d'un complexe protéique autour

des ASCs a été particulièrement bien documentée pour les dégénérines chez *C. elegans*.

4. Les canaux sodiques sensibles à l'amiloride de *C. elegans*

Dans le génome de *C. elegans*, à ce jour, 28 gènes codant des ASCs ont été identifiés. Le degré de similarité entre ces gènes, ainsi qu'avec ceux codant les ASCs connus chez les autres organismes, permet de définir six familles, appelées ASC-1/6, dont cinq sont représentées chez *C. elegans* (Goodman & Schwarz, 2003). Actuellement, parmi les ASCs de *C. elegans*, seuls le canal FLR-1 et les dégénérines ont fait l'objet d'études expérimentales.

4.1. Le canal FLR-1

Le gène *flr-1* a été isolé à partir de deux criblages génétiques différents, l'un sur des mutants résistants à la toxicité du fluorure et l'autre sur des mutants défectueux dans la rythmicité du cycle de défécation (Katsura *et al.*, 1994 ; Iwasaki *et al.*, 1995). Le clonage et séquençage de ce gène ont montré que son produit génique appartenait à la famille des ASCs (Take-Uchi *et al.*, 1998). FLR-1 est exprimé spécifiquement dans les cellules intestinales de *C. elegans*. Des mutations nulles sur *flr-1* entraînent, entre autres, une diminution de l'intervalle de temps entre deux cycles de défécation, suggérant que ce gène participe dans la rythmicité de ce cycle (Take-Uchi *et al.*, 1998). Les caractéristiques du canal FLR-1 ainsi que les mécanismes moléculaires à l'origine de son implication dans le cycle de défécation restent à élucider.

4.2. Les dégénérines

Les dégénérines font partie de la famille ASC-2 et sont caractérisées structurellement par la présence d'un domaine CRD supplémentaire, en amont des deux autres conservés pour l'ensemble des ASCs, et d'un domaine ERD (Extracellular Regulation Domain) localisé entre CRDI et CRDII (Goodman & Schwarz, 2003) (Figure 10). A ce jour, six protéines de cette famille ont été caractérisées : MEC-4, MEC-10, DEG-1, UNC-8, DEL-1 et UNC-105.

4.2.1. MEC-4/MEC-10

Les protéines MEC-4 et MEC-10 sont coexprimées dans les six neurones, appelés cellules du toucher, responsables de la sensibilité de l'animal au toucher léger (Mitani *et al.*, 1993 ; Huang & Chalfie, 1994). De plus MEC-10 est aussi présente dans les neurones FLP et PVD, impliqués respectivement dans la sensibilité du toucher au niveau du nez et du toucher appuyé (Huang & Chalfie, 1994). Des mutations perte-de-fonction sur l'un ou l'autre des gènes codant ces protéines entraînent un défaut du toucher léger mais sans modification de la

morphologie des cellules du toucher (Chalfie & Sulston, 1981 ; Chalfie & Au, 1989). Les mutations gain-de-fonction induisent une neurodégénérescence, quoique moins marquée pour *mec-10* que pour *mec-4* (Huang & Chalfie, 1994).

MEC-4 et MEC-10 s'associeraient au minimum par quatre pour former un canal hétérotétramérique. L'association d'au moins deux sous-unités identiques a été proposée à partir d'études génétiques sur des animaux hétérozygotes sur *mec-4* ou sur *mec-10*. En effet, pour l'un ou l'autre de ces gènes, il existe des allèles perte-de-fonction qui sont capables *en trans* de compenser le phénotype de mutants gain-de-fonction sur le même gène (Hong & Driscoll, 1994 ; Huang & Chalfie, 1994). Cette compensation suggère qu'il existe une interaction entre les protéines MEC-4 (ou MEC-10) perte-de-fonction et gain-de-fonction, dont l'origine pourrait être la participation de plusieurs sous-unités MEC-4 (ou MEC-10) pour avoir un canal fonctionnel (Hong & Driscoll, 1994 ; Huang & Chalfie, 1994). La présence simultanée de MEC-4 et MEC-10 dans ce canal est soutenue par plusieurs arguments génétiques : (i) MEC-4 et MEC-10 ont un profil d'expression quasiment identique, (ii) les mutations nulles sur les gènes codant ces deux protéines ont le même phénotype, (iii) les mutations gain-de-fonction sur *mec-10* nécessitent la présence d'une protéine MEC-4 fonctionnelle pour entraîner la dégénérescence neuronale (Huang & Chalfie, 1994). De plus, récemment, l'interaction possible entre MEC-4 et MEC-10 a été confirmée par des études de co-immunoprécipitation (Chelur *et al.*, 2002).

Dans l'œuf de Xénope, l'expression de MEC-4, seul ou avec MEC-10, ne donne naissance à aucun courant (Goodman *et al.*, 2002). En revanche, MEC-4(d) associé ou non à MEC-10(d) permet le développement d'un courant sodique caractérisé par une absence de dépendance au temps, une légère rectification entrante et une sensibilité élevée à l'amiloride (Goodman *et al.*, 2002, Corrigendum Goodman *et al.*, 2002). En fonction de la présence ou de l'absence de MEC-10, la sensibilité à l'amiloride est plus ou moins grande puisque la constante d'inhibition apparente de l'amiloride est de 3.2 μM en absence de MEC-10 et de 0.4 μM en sa présence (à un potentiel maintenu de -60 mV) (Goodman *et al.*, 2002). Les ovocytes de Xénope exprimant les canaux mutants gain-de-fonction ont un potentiel de repos significativement plus positif que celui des ovocytes exprimant les canaux sous leur forme sauvage. L'application d'amiloride sur les ovocytes exprimant les canaux sauvages n'a pas d'effet, alors qu'elle induit sur ceux exprimant les canaux mutants gain-de-fonction un retour du potentiel membranaire vers des valeurs similaires à celles des œufs exprimant les canaux sauvages (Goodman *et al.*, 2002). Cette observation confirme l'hypothèse formulée dès le clonage de *mec-4* qui propose que la dégénérescence neuronale observée chez les mutants

mec-4(d) soit due à l'hyperactivité d'un canal ionique dépolarisant, en l'occurrence MEC-4 ou MEC-10 (Driscoll & Chalfie, 1991).

Après la caractérisation du courant développé en présence des canaux gain-de-fonction, l'enjeu suivant a été de déterminer les conditions susceptibles de conduire à l'activation du canal sauvage. En expression hétérologue, l'application de stimuli tels l'acidification du milieu extracellulaire ou le choc osmotique n'a jamais donné naissance à un courant sensible à l'amiloride (Goodman *et al.*, 2002). Cette absence d'effet ne peut conduire à la conclusion que MEC-4 et/ou MEC-10 sont insensibles aux protons ou à l'étirement membranaire, étant donné que ces canaux ne fonctionnent pas dans leur environnement natif et qu'ainsi il peut manquer des sous-unités ou protéines associées indispensables à leur activation. L'étude *in situ* de ces canaux est alors indispensable à la détermination des facteurs susceptibles ou non d'activer MEC-4 et MEC-10.

La seule étude physiologique *in situ* réalisée jusqu'à présent sur les canaux MEC-4/MEC-10 a consisté en la caractérisation des variations de calcium intracellulaire dans les cellules du toucher en réponse à des stimuli tactiles appliqués sur la cuticule (Suzuki *et al.*, 2003). Chez l'animal sauvage, l'application d'un tel stimulus induit une augmentation transitoire de la concentration en calcium libre intracellulaire, augmentation inexistante chez le mutant perte-de-fonction *mec-4* (Suzuki *et al.*, 2003). MEC-4 est ainsi indispensable pour l'obtention d'une réponse cellulaire, traduite par une augmentation de calcium, dans les cellules du toucher suite à une stimulation mécanique. En revanche, l'étape dans laquelle intervient ce canal ne peut être précisée ; en particulier, ces expériences ne démontrent pas que la stimulation mécanique a comme conséquence l'ouverture du canal MEC-4.

4.2.2. DEG-1

DEG-1 est exprimé dans plusieurs neurones sensoriels, interneurones et cellules musculaires, comme les muscles de la tête et le muscle dépresseur anal (Hall *et al.*, 1997). Les mutations *deg-1* perte-de-fonction n'ont pas de conséquence phénotypique alors que les mutations gain-de-fonction entraînent une dégénérescence d'une classe d'interneurones, les neurones PVC, exprimant ce gène (Chalfie & Wolinski, 1990). De plus les mutations gain-de-fonction sur *deg-1* s'accompagnent d'une insensibilité au toucher léger et appuyé (Chalfie & Wolinski, 1990). Aucune donnée électrophysiologique n'est à ce jour disponible pour DEG-1 mais des études génétiques ont indiqué que, comme MEC-4, DEG-1 serait fonctionnel sous forme de multimère (Garcia-Anoveros *et al.*, 1995). Cette dégénérine pourrait participer à la sensibilité au toucher appuyé mais ce rôle reste à confirmer.

4.2.3. UNC-105

Le gène *unc-105* a été identifié à partir d'un criblage de mutants gain-de-fonction présentant un défaut de locomotion. En plus de ce défaut, les mutants gain-de-fonction *unc-105* sont caractérisés par une taille réduite et une paralysie prononcée due à une hypercontraction musculaire (Park & Horvitz, 1986a). Dans un deuxième temps, un criblage pour isoler des mutants révertants a été réalisé, et, étant donné le nombre élevé de révertants intragéniques, il a été proposé que certaines de ces mutations révertantes correspondent à des allèles nuls (Park & Horvitz, 1986a). Le mutant nul *unc-105* ne présenterait alors pas de défaut phénotypique.

Comme pour MEC-4/MEC-10, l'expression de UNC-105 dans l'ovocyte de Xénope ne donne naissance à aucun courant (Garcia-Anoveros *et al.*, 1998). En revanche, avec les canaux gain-de-fonction, un courant sodique sensible à l'amiloride est enregistré. La constante d'inhibition apparente de l'amiloride est de 7.7 μM à un potentiel maintenu de -80 mV. Ce courant est également caractérisé par un blocage aux potentiels les plus négatifs, dépendant de la présence de cations divalents dans la solution externe (Garcia-Anoveros *et al.*, 1998). L'activité constitutive des canaux gain-de-fonction est à l'origine d'un potentiel de repos dépolarisé (autour de 0 mV) pour les ovocytes exprimant ces canaux. Le même phénomène est observé dans les cellules HEK exprimant les canaux UNC-105 gain-de-fonction, où il est associé avec une dégénérescence des cellules (Garcia-Anoveros *et al.*, 1998). L'analyse du profil d'expression de constructions *unc-105::GFP* montre que les canaux UNC-105 ne seraient présents que dans les cellules musculaires de la paroi du corps (Liu *et al.*, 1996). L'hypercontraction observée chez les mutants *unc-105* gain-de-fonction pourrait alors s'expliquer par l'hyperactivité des canaux UNC-105 dans ces cellules, responsables d'une dépolarisation permanente de ces cellules, dont la conséquence ne serait pas une dégénérescence comme pour les neurones exprimant MEC-4(d) mais une hypercontraction (Garcia-Anoveros *et al.*, 1998).

4.2.4. UNC-8/DEL-1

Originellement, *unc-8* a été isolé à partir d'un criblage de mutants défectueux sur la locomotion (Park & Horvitz, 1986a). En effet, des mutations gain-de-fonction sur ce gène sont responsables d'une posture du corps au repos enroulée et non sinusoidale comme chez les animaux sauvages (Park & Horvitz, 1986a). De plus, ce défaut s'accompagne d'un gonflement cellulaire des motoneurones, maximal au stade larvaire L2 et qui disparaît ensuite (Shreffler *et al.*, 1995). Les perturbations entraînées par les mutations nulles sur *unc-8* sont

plus discrètes, et nécessitent, pour être perçues, une observation minutieuse de la locomotion des vers. En effet, elles consistent en la diminution de l'amplitude et de la longueur d'onde des sinusoïdes laissées dans le tapis bactérien après le passage de l'animal (Tavernarakis *et al.*, 1997). Ce phénotype, ainsi que le profil d'expression de *unc-8* majoritairement localisé dans les interneurons de commande du circuit locomoteur et dans les motoneurons, suggèrent que UNC-8 participerait au programme locomoteur des vers. Le modèle proposé est le suivant : les canaux UNC-8 seraient localisés dans les terminaisons indifférenciées, c'est-à-dire sans synapses, des motoneurons, loin de la zone synaptique. La contraction des muscles à proximité de ces terminaisons neuronales constituerait un signal pour le motoneurone par le biais de l'activation des canaux UNC-8. Ce signal permettrait ainsi d'informer le motoneurone de l'état de contraction des muscles. Cette information pourrait ensuite être utilisée par exemple pour la préparation de la contraction des cellules musculaires plus éloignées (Tavernarakis *et al.*, 1997).

L'absence de phénotype sévère des mutants nuls *unc-8* suggère qu'il existe d'autres protéines de la même famille susceptibles de le remplacer ou alors qu'un autre système fonctionne en parallèle et est capable de compenser son absence. En faveur de la première hypothèse, l'expression de UNC-8 est souvent chevauchante avec celle d'autres membres de la famille des dégénérines. En effet, UNC-8 est coexprimé avec MEC-10 ou DEG-1 dans les neurones ASH et FLP impliqués dans le toucher du nez (Huang & Chalfie, 1994 ; Hall *et al.*, 1997), avec MEC-4 et MEC-10 dans la cellule du toucher PVM (Mitani *et al.*, 1993 ; Huang & Chalfie, 1994), et avec DEL-1, autre membre de la famille des dégénérines, dans les motoneurons (Tavernarakis *et al.*, 1997).

4.3. L'analyse structure-fonction des dégénérines

Les nombreux mutants, gain- et perte-de-fonction, sur les dégénérines de *C. elegans* ont permis de caractériser quatre domaines principaux essentiels au fonctionnement de ces protéines. Dans un certain nombre de cas, des mutations équivalentes sur d'autres ASCs ont également été mises en évidence. Seuls ces quatre domaines seront présentés dans ce paragraphe, cependant il en existe d'autres moins caractérisés, certains déjà identifiés comme le site post-M1 touché dans deux des mutations gain-de-fonction *unc-105* et d'autres probablement encore inconnus (Hong *et al.*, 2000 ; voir pour revue Goodman & Schwarz, 2003).

4.3.1. Le site "deg"

La caractérisation des premières mutations gain-de-fonction sur DEG-1 et MEC-4 a montré que, dans les deux cas, ces mutations consistaient en la substitution d'un même résidu (Chalfie & Wolinski, 1990 ; Driscoll & Chalfie, 1991). Ce site, appelé par la suite site "deg" et localisé peu avant le début du segment M2, se caractérise par la présence d'un résidu de faible encombrement stérique, l'alanine. Une hypothèse concernant l'origine de la dégénérescence associée à des mutations sur ce site a alors été formulée, suggérant que ces mutations puissent conduire, plus ou moins directement, à l'activation d'un canal ionique (Chalfie & Wolinski, 1990 ; Driscoll & Chalfie, 1991). Après le clonage du canal épithélial sensible à l'amiloride ENaC et la mise en évidence du lien de parenté entre ce canal et les dégénérines, il a été proposé que les canaux activés par les mutations gain-de-fonction sur les dégénérines correspondent aux dégénérines elles-mêmes (Canessa *et al.*, 1993). L'étude électrophysiologique des dégénérines a ensuite confirmé cette hypothèse. En effet, l'expression dans les ovocytes de Xénope de canaux UNC-105(A692V) ou MEC-4(A713T) mutés sur le site "deg" donne naissance à des courants sodiques sensibles à l'amiloride, qui ne peuvent être obtenus par l'expression des canaux sous leur forme sauvage (Garcia-Anoveros *et al.*, 1998 ; Goodman *et al.*, 2002).

L'effet activateur de mutations sur le site "deg" n'est pas le propre des dégénérines. Effectivement, l'expression en système hétérologue de canaux ASIC2a(G430F) portant ce type de mutation conduit au développement d'un courant sodique sensible à l'amiloride, maintenu et dont l'activation ne nécessite pas d'acidification extracellulaire comme cela est le cas avec les canaux sous leur forme sauvage (Waldmann *et al.*, 1996 ; Champigny *et al.*, 1998). De plus, des mutations équivalentes introduites sur des canaux, comme RPK et ENaCs, qui présentent une activité basale non nulle, augmentent très significativement leur probabilité d'ouverture (Adams *et al.*, 1998a ; Snyder *et al.*, 2000).

Toutes les mutations du site "deg" entraînant une hyperactivité du canal correspondent au remplacement d'un résidu de petite taille, l'alanine, la sérine ou la glycine, par un résidu de plus grande taille (Driscoll & Chalfie, 1991 ; Garcia-Anoveros *et al.*, 1995 ; Adams *et al.*, 1998a ; Champigny *et al.*, 1998 ; Garcia-Anoveros *et al.*, 1998 ; Snyder *et al.*, 2000). Pour ASIC2a par exemple, le remplacement de la glycine du site "deg", localisé en position 430, en sérine ou cystéine n'a pas de répercussion sur l'activité du canal (Champigny *et al.*, 1998 ; Adams *et al.*, 1998b). L'ouverture constitutive du canal ASIC2a(G430C) peut, en revanche, être induite par l'ajout dans le milieu extracellulaire de composés réactifs sulfonés, comme le MTSEA (2-aminoéthyl méthanesulfonate hydrobromide), capables de lier de façon

covalente un groupement éthylammonium à la cystéine 430 et de mimer l'effet de la présence d'un résidu de grand encombrement stérique à cette position (Adams *et al.*, 1998b ; Snyder *et al.*, 2000). Il faut noter que cette liaison n'est possible qu'après ouverture des canaux par acidification du milieu extracellulaire (Adams *et al.*, 1998b). Le composé se lie alors à la cystéine et induit une ouverture maintenue, persistante même après retour à un pH physiologique et lavage du MTSEA. Sans stimulation, le canal reste fermé, indiquant que la cystéine en position "deg" n'est pas accessible à l'état fermé pour la liaison avec le MTSEA. De ces observations, il a été proposé le modèle suivant : par analogie avec le modèle d'ouverture des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (voir pour revue Unwin, 2003), les ASCs s'ouvriraient par rotation des segments à proximité du pore (Adams *et al.*, 1998b). Le résidu "deg" passerait alors d'une position protégée à une position exposée lors de la transition entre l'état fermé et l'état ouvert. La présence d'un résidu encombrant en position "deg" ne serait pas compatible avec la position protégée et favoriserait ainsi largement l'état ouvert du canal.

4.3.2. Le segment ERD

Le segment ERD (Extracellular Regulation Domain), qui regroupe une vingtaine de résidus localisés entre les domaines CDRI et CRDII, est spécifique des dégénérines puisqu'il n'est trouvé pour aucun autre ASC (voir pour revue Goodman & Schwarz, 2003). L'importance de ce domaine dans le fonctionnement des dégénérines a été mise en évidence par l'existence de mutations gain-de-fonction, pour DEG-1, MEC-4 et UNC-8, localisées dans ce segment (Garcia-Anoveros *et al.*, 1995 ; Tavernarakis *et al.*, 1997). Ces mutations consistent en des substitutions ponctuelles de résidus et sont mimées par une délétion d'une partie du domaine ERD (Garcia-Anoveros *et al.*, 1995). Le domaine ERD aurait ainsi un rôle régulateur dans l'ouverture du canal et il a été proposé que ce soit ce domaine qui intervienne dans le contrôle de l'ouverture du canal en réponse aux contraintes mécaniques. Il pourrait ainsi être responsable de la fermeture du canal dans des conditions de repos par obstruction du pore, alors que l'application de contraintes mécaniques entraînerait l'ouverture du canal par déplacement du segment ERD (Garcia-Anoveros *et al.*, 1995).

4.3.3. Le segment pré-M1

Avec le domaine M2, le domaine pré-M1 est l'un des domaines dans lequel est localisé le plus grand nombre de mutations ponctuelles associées avec une perte de fonction des dégénérines (voir pour revue Goodman & Schwarz, 2003). Ce domaine, constitué d'une vingtaine de résidus en position N-terminale, est conservé pour l'ensemble des ASCs, en particulier au niveau d'un motif HG (voir pour revue Kellenberger & Schild, 2002).

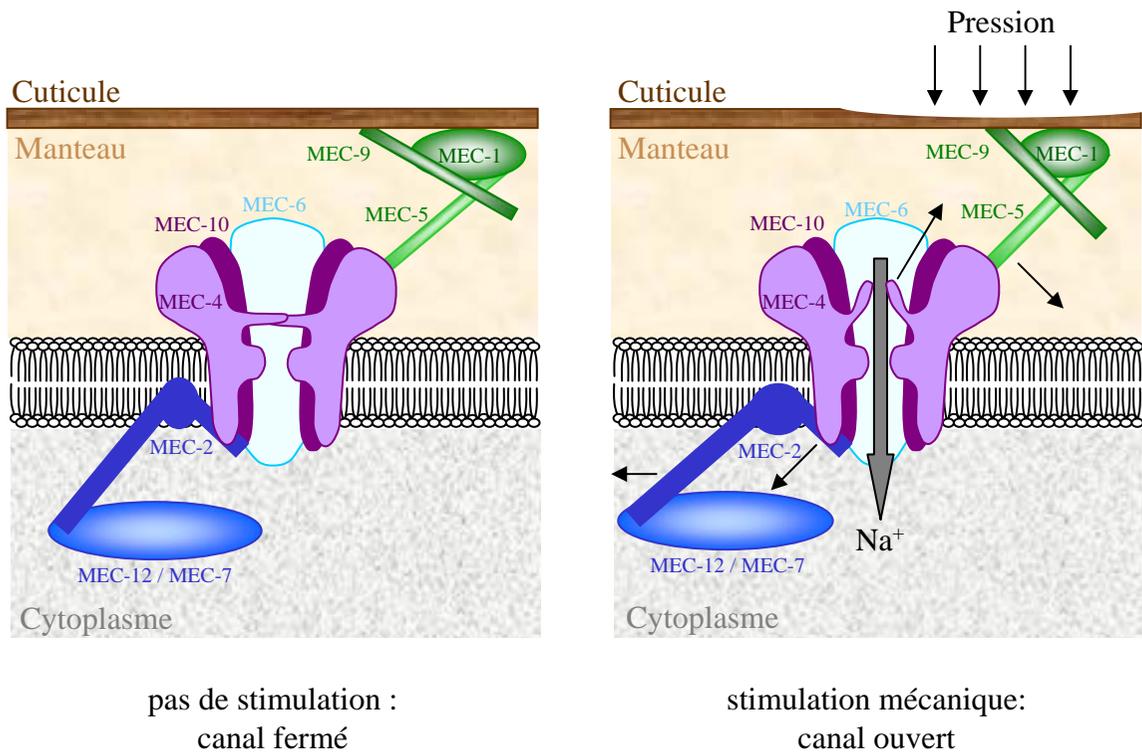
Une étude sur les mutants perte-de-fonction *mec-4* touchés sur le domaine pré-M1 a montré que ces mutations étaient capables de supprimer complètement la dégénérescence induite par les mutations gain-de-fonction (Hong *et al.*, 2000). De plus, la surexpression du domaine N-terminal chez des animaux sauvages entraîne une diminution de la sensibilité au toucher léger. Cette observation est interprétée comme le résultat d'une compétition, entre le segment N-terminal des canaux endogènes et le segment N-terminal libre surexprimé, pour l'interaction avec une protéine partenaire, indispensable au bon fonctionnement de MEC-4 dans la mécanosensation (Hong *et al.*, 2000). L'importance du domaine pré-M1 dans le fonctionnement des ASCs a été mise en évidence pour des canaux autres que les dégénérines. En effet, certaines formes de PHA-1 sont associées avec des mutations ponctuelles dans le segment pré-M1 des ENaCs (Chang *et al.*, 1996). En système hétérologue, ces mutations entraînent une diminution de la probabilité d'ouverture du canal, qui pourrait rendre compte du défaut de réabsorption rénale sodique à l'origine de la pathologie (Grunder *et al.*, 1997). Le domaine pré-M1 pourrait de plus participer à la formation du pore ionique, au moins pour ASIC-2 (Coscoy *et al.*, 1999).

4.3.4. Le segment M2

Le segment M2 est le premier domaine dans lequel des mutations perte-de-fonction ont été mises en évidence (Hong & Driscoll, 1994). Ces mutations concernaient MEC-4 et consistaient en des substitutions ponctuelles de résidus polaires localisés dans le domaine M2, juste en aval du filtre de sélectivité du domaine pré-M2. La nature hydrophile des résidus mutés, ainsi que l'effet supprimeur *en trans* de ces mutations perte-de-fonction sur les mutations gain-de-fonction, ont amené à la conclusion que les résidus touchés par ces mutations perte-de-fonction participaient à la formation du pore ionique, et que leur mutation entraînait alors la fermeture constitutionnelle du canal (Hong & Driscoll, 1994). Des mutations équivalentes ont ensuite été identifiées pour MEC-10 et DEG-1 (Huang & Chalfie, 1994 ; Garcia-Anoveros *et al.*, 1995).

L'hypothèse de la participation du segment M2 dans la formation du pore ionique des dégénérines n'a pas été directement confirmée jusqu'à présent, en raison de la difficulté pour caractériser électriquement ces canaux. En effet, l'activité des dégénérines n'a été, pour le moment, enregistrée qu'après expression des protéines en système hétérologue, et de plus une activité significative n'a été détectée qu'avec les formes gain-de-fonction (Goodman *et al.*, 2002). La nécessité de travailler *in situ* est particulièrement prononcée pour l'étude des dégénérines puisque le modèle actuel propose que ces protéines participent à la détection des

A



B

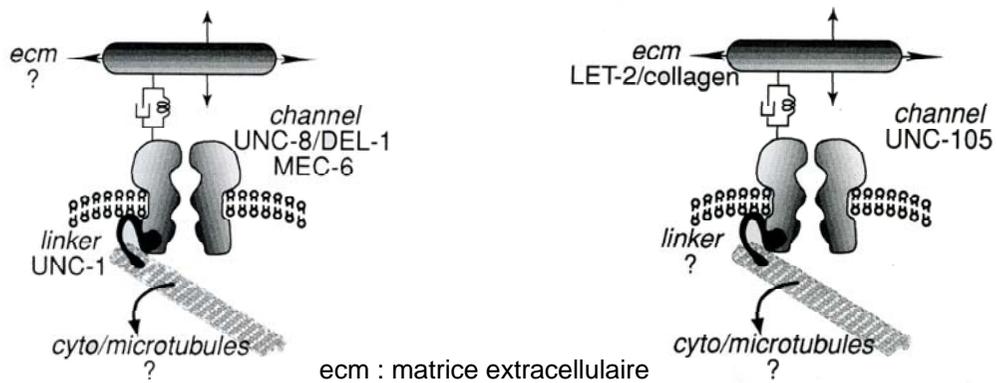


Figure 11. Modèle de complexes mécanotransducteurs centrés autour des dégénérines.

(A) En l'absence de contraintes mécaniques dans les cellules du toucher, le canal sodique formé par les dégénérines MEC-4 et MEC-10 serait fermé. L'application d'une pression sur la cuticule serait ressentie au niveau du complexe multiprotéique assemblé autour de MEC-4/MEC-10 et conduirait à l'ouverture du canal sodique. La dépolarisation induite par cette ouverture constituerait alors un signal électrique initiateur de la réponse cellulaire au stimulus mécanique (d'après Tavernarakis & Driscoll, 1997). (B) Des complexes multiprotéiques équivalents pourraient exister autour de UNC-8/DEL-1 dans les motoneurones (panneau de gauche) et autour de UNC-105 dans les cellules musculaires de la paroi (panneau de droite) (d'après Goodman & Schwarz, 2003).

stimuli mécaniques en formant le cœur d'un complexe multiprotéique, difficilement reconstituable en sa totalité en expression hétérologue.

4.4. Le complexe mécanotransducteur

L'existence d'un complexe protéique, organisé autour des dégénérines et nécessaire à la détection des stimuli mécaniques et à leur conversion en signal électrique, a été suggérée lors de la mise en évidence d'interactions génétiques entre les dégénérines et des protéines appartenant au cytosquelette intracellulaire ou à la matrice extracellulaire (Huang *et al.*, 1995 ; Du *et al.*, 1996 ; Gu *et al.*, 1996). Sur la base de ces interactions génétiques et de la nature moléculaire des protéines impliquées, un modèle pour le fonctionnement du complexe mécanotransducteur dans les neurones du toucher a été proposé par Gu *et al.* (1996), et repris ensuite par Tavernarakis & Driscoll (1997) (Figure 11A). Du côté intracellulaire, le canal formé par les dégénérines serait lié aux microtubules du cytosquelette intracellulaire, formés par MEC-7/ β -tubuline (Savage *et al.*, 1989) et MEC-12/ α -tubuline (Fukushige *et al.*, 1999), par l'intermédiaire de MEC-2. MEC-2 est une protéine possédant une insertion membranaire et qui présente une forte similarité avec la stomatine, protéine des Vertébrés connue pour son rôle régulateur dans les transferts ioniques des globules rouges (voir pour revue Stewart, 1997). Du côté extracellulaire, les dégénérines seraient en relation avec la cuticule par l'intermédiaire de la matrice extracellulaire, appelée le manteau dans les cellules du toucher. Les protéines du manteau impliquées dans cette interaction seraient un collagène atypique, MEC-5 (Du *et al.*, 1996), et deux protéines MEC-9 et MEC-1 dont le rôle reste inconnu. La tension transmise à l'ensemble du complexe aurait pour conséquence le passage de l'état fermé à l'état ouvert pour le canal formé par les dégénérines.

Le modèle proposé par Gu *et al.* (1996) n'a été, jusqu'à présent, que très peu modifié. La nature moléculaire de MEC-6 a été élucidée depuis et l'hypothèse originelle, établissant que MEC-6 appartiendrait aussi à la famille des dégénérines, abandonnée (Chelur *et al.*, 2002). MEC-6 est en effet une protéine transmembranaire, présentant des similarités avec une famille de protéines des Vertébrés, les paraoxonases, dont le rôle physiologique est encore inconnu. Des expériences de co-immunoprécipitations ont confirmé l'interaction physique entre MEC-4, MEC-10, MEC-2 et MEC-6 (Chelur *et al.*, 2002 ; Goodman *et al.*, 2002). De plus, des enregistrements électrophysiologiques en expression hétérologue ont montré que l'activité électrique des dégénérines était modifiée en présence de MEC-2 et MEC-6. L'expression de MEC-4 et MEC-10 sous leur forme gain-de-fonction donne naissance à un courant sodique sensible à l'amiloride, dont l'amplitude est augmentée par 40 en présence de MEC-2, par 20

avec MEC-6 et par 200 avec les deux protéines (Chelur *et al.*, 2002 ; Goodman *et al.*, 2002). MEC-2 permet également d'obtenir un courant de très faible amplitude en présence de la forme sauvage de MEC-4 dans 13 cellules sur 33 testées (Goodman *et al.*, 2002). Ce résultat non significatif n'a pas été plus étudié. Enfin, l'utilisation des protéines caméléons a montré que l'augmentation de calcium intracellulaire en réponse aux stimuli mécaniques nécessitait la présence de MEC-2 et MEC-6 tout autant que celle de MEC-4 (Suzuki *et al.*, 2003).

Des modèles équivalents ont été proposés dans les muscles de la paroi du corps pour UNC-105 et dans les motoneurones pour UNC-8/DEL-1 (Goodman & Schwarz, 2003) (Figure 11B). En effet, ces dégénérines semblent aussi interagir avec des protéines de la matrice extracellulaire ou du cytosquelette. Pour UNC-105 en particulier, une interaction génétique a été montrée avec le collagène de type IV, LET-2 (Park & Horvitz, 1986b ; Liu *et al.*, 1996). Une mutation ponctuelle, la mutation *n821*, dans le domaine C-terminal NC1 de LET-2 entraîne une suppression du phénotype hypercontracté induit par trois mutations gain-de-fonction différentes dans UNC-105. Cette mutation sur LET-2 n'a pas de répercussion dans des animaux sauvages, contrairement à la mutation perte-de-fonction sur LET-2 qui entraîne un arrêt du développement embryonnaire dans les stades précoces (Liu *et al.*, 1996).

Les études génétiques et moléculaires chez *C. elegans* ont ainsi permis l'élaboration du premier modèle de complexe protéique impliqué dans la mécanotransduction. La détection de stimuli mécaniques est pourtant à la base de nombreux processus biologiques, concernant tous les organismes et allant de l'osmorégulation à la locomotion ou l'audition (voir pour revue French, 1992). Mis à part pour le canal bactérien mécanosensible MscL, très peu de données sont à ce jour connues quant à la nature moléculaire des protéines impliquées dans la mécanotransduction chez les Eucaryotes. La difficulté de cette identification tient probablement au fait que ces protéines sont exprimées en des quantités faibles, qu'il n'existe pas d'agents pharmacologiques spécifiques pour réaliser des purifications biochimiques et que le clonage par criblage fonctionnel n'est pas envisageable puisque l'interaction de plusieurs protéines est probablement nécessaire pour avoir un complexe fonctionnel. L'approche génétique est ainsi la stratégie la plus efficace et elle a été particulièrement fructueuse pour l'identification des protéines responsables de la mécanotransduction chez *C. elegans*. La prochaine étape est à présent de vérifier la fonctionnalité de ce complexe, fonctionnalité qui ne pourra être définitivement confirmée ou infirmée que par des études électrophysiologiques *in situ*, préservant l'environnement natif des canaux. C'est dans cet objectif que nous avons réalisé les travaux décrits dans les études 3 et 4 de ce manuscrit, qui présentent, pour la première fois, une caractérisation *in situ* de deux ASCs chez *C. elegans*.

V. Les autres canaux

Chez *C. elegans*, comme pour tous les autres organismes, en plus des canaux calciques, potassiques et sodiques il existe des canaux chlorure et cationiques non spécifiques. N'ayant abordé aucune de ces conductances au cours de mon travail de thèse, cette partie bibliographique ne sera pas développée.

MATERIELS & METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. Le Matériel biologique

1. Les souches

Les quatre études présentées dans ce manuscrit ont utilisé des animaux dérivés de la souche sauvage de référence N2 ou de diverses souches mutées. Certaines de ces souches ont été obtenues auprès du Centre de Génétique de *C. elegans* (CGC, Université du Minnesota) : la souche MT1212 portant la mutation *egl-19(n582)*, la souche MT1098 portant la mutation *unc-105(n506)*, la souche MT1685 portant la double mutation *unc-105(n506n786)* et la souche LY100 portant la mutation *slo-2(nf100)*. L'équipe de L. Ségalat (CGMC, UMR CNRS 5534) a séquencé le gène *unc-105* (Megabace analyser, Amersham) de la souche MT1685 afin de déterminer la nature de la mutation *n786*. La même équipe est à l'origine de la construction de la souche portant la double mutation *unc-105(n506); let-2(n821)*. Enfin, les souches LS311, portant la mutation *slo-1(cx29)*, et LS543, exprimant spécifiquement la GFP dans les muscles de la paroi du corps, ont également été fournies par l'équipe de L. Ségalat. Les animaux LS543 ont été utilisés lors de la mise au point de la dissection, afin de faciliter le repérage des cellules musculaires. Ces animaux avaient été injectés par une construction *unc-54:gfp*, *unc-54* étant le gène codant l'isoforme majeure de la chaîne de myosine des muscles de la paroi du corps (Moerman *et al.*, 1982).

2. La culture

Les animaux ont été cultivés par l'équipe de L. Ségalat selon les méthodes préconisées par S. Brenner (1974). La souche utilisée est cultivée à 15°C sur des boîtes de Pétri contenant du milieu de croissance pour Nématodeensemencé de bactéries *Escherichia coli* OP 50. Seuls les animaux adultes (1 semaine) sont utilisés pour les expérimentations électrophysiologiques.

II. La dissection

La microdissection permettant l'accès aux cellules musculaires a été mise au point après adaptation de la technique utilisée par Richmond & Jorgensen (1999). Elle comporte plusieurs étapes délicates qui ont nécessité plusieurs mois de mise au point pour être franchies. L'ensemble de ces étapes se déroule à température ambiante (20-25°C).

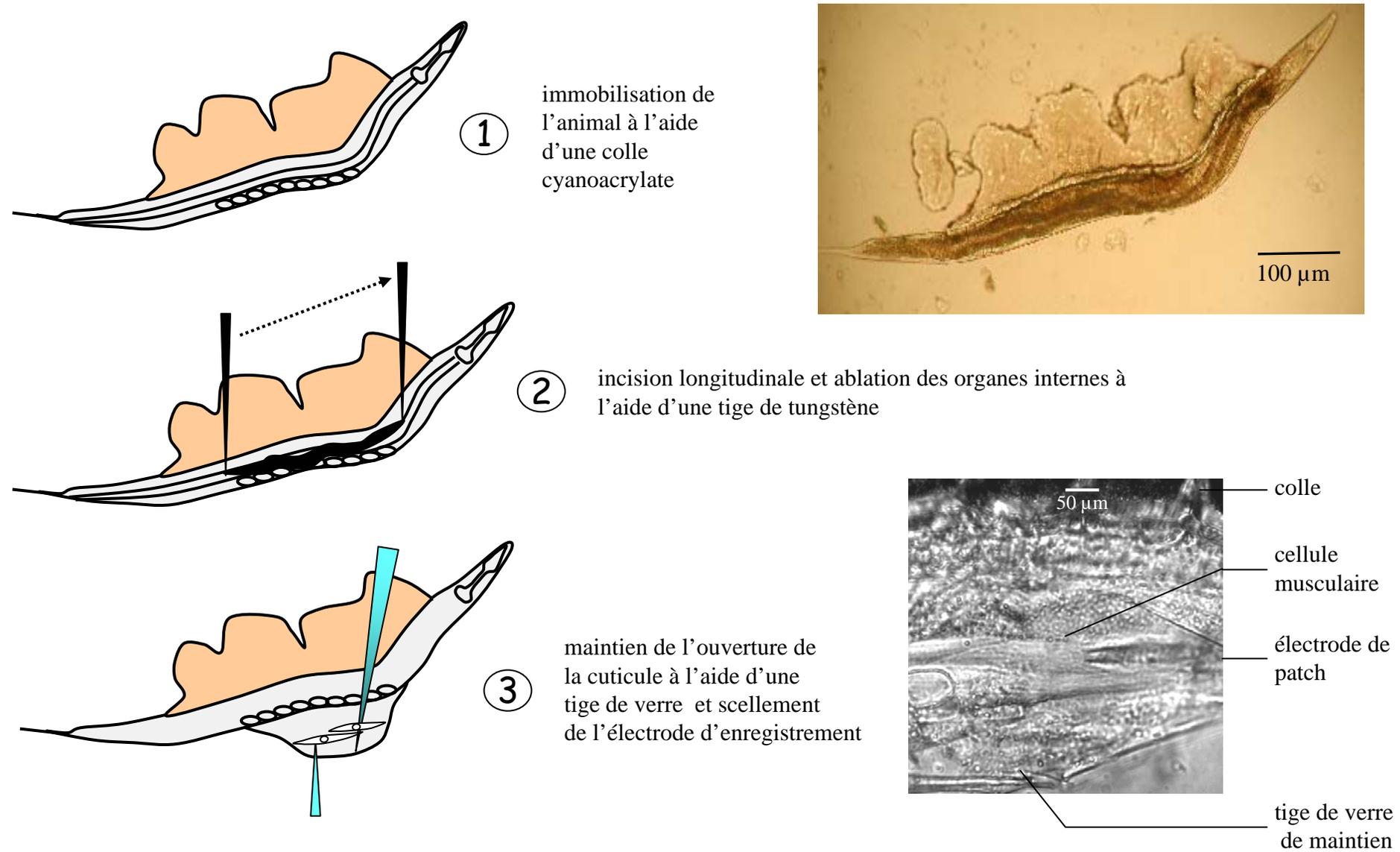


Figure 12. Les différentes étapes de la microdissection de *C. elegans*

1. L'immobilisation

Les animaux sont prélevés individuellement de leur boîte de culture et placés dans une goutte de milieu extracellulaire (voir le paragraphe V de cette section) déposée sur le fond d'une cuve de culture de 35 mm de diamètre. Leur immobilisation se réalise par application d'une goutte de colle cyanoacrylate (Histoacryl Blue, B. Braun) déposée à l'aide d'une micropipette (Borosilicate glass capillaries, Harvard), manipulée à la main sous loupe binoculaire (Figure 12). Ces micropipettes ont un diamètre supérieur à celles utilisées pour les enregistrements électrophysiologiques (à titre indicatif, la résistance de ces pipettes déterminée en présence de milieux physiologiques est d'environ 1 M Ω). L'application de la colle nécessite un assèchement temporaire de la goutte de milieu extracellulaire, mais qui doit rester le plus bref possible (quelques secondes maximum) afin de ne pas compromettre la survie des animaux. La colle est déposée le long d'un côté de l'animal en quantité modérée pour laisser le maximum de surface libre pour la dissection. La préparation est de nouveau immergée dans du liquide extracellulaire et est ensuite transférée sur un microscope inversé (Olympus IMT2) au grossissement x20.

2. L'incision

Nous n'avons trouvé dans le matériel scientifique disponible aucun outil de dissection suffisamment petit et acéré pour inciser longitudinalement la cuticule d'un animal de quelques dizaines de micromètres de diamètre. L'outil utilisé pour l'incision de la cuticule par Richmond & Jorgensen (1999) était une pipette de verre cassée à plusieurs reprises à son extrémité jusqu'à obtention d'une lame incisive. Nous n'avons pas opté pour cette solution qui, étant donné la fragilité du verre, nécessite quasiment systématiquement la confection d'un nouvel outil pour chaque dissection. Nous avons choisi d'utiliser des tiges de tungstène (Tungsten rods, Phymep) qui, acérées par électrolyse, permettent d'obtenir une pointe d'environ 2 μ m de diamètre. L'avantage du tungstène sur le verre réside dans le fait que, outre qu'il ne casse pas, il est possible de lui donner des formes "en crochet", particulièrement favorables à la dissection. L'incision est réalisée sur toute la longueur de l'animal, manuellement au microscope au moyen de cet outil fixé à un porte-mine (Figure 12). Ce même outil est ensuite utilisé pour procéder à l'ablation de l'intestin et des gonades qui compromettent l'accès aux cellules musculaires (Figure 12). L'intestin est sectionné en aval du pharynx et en amont de l'anus et est extrait de l'animal. Les gonades sont déroulées et éliminées par lacération au niveau de la vulve. Le volet de cuticule sur lequel sont plaquées

configuration cellule-attachée

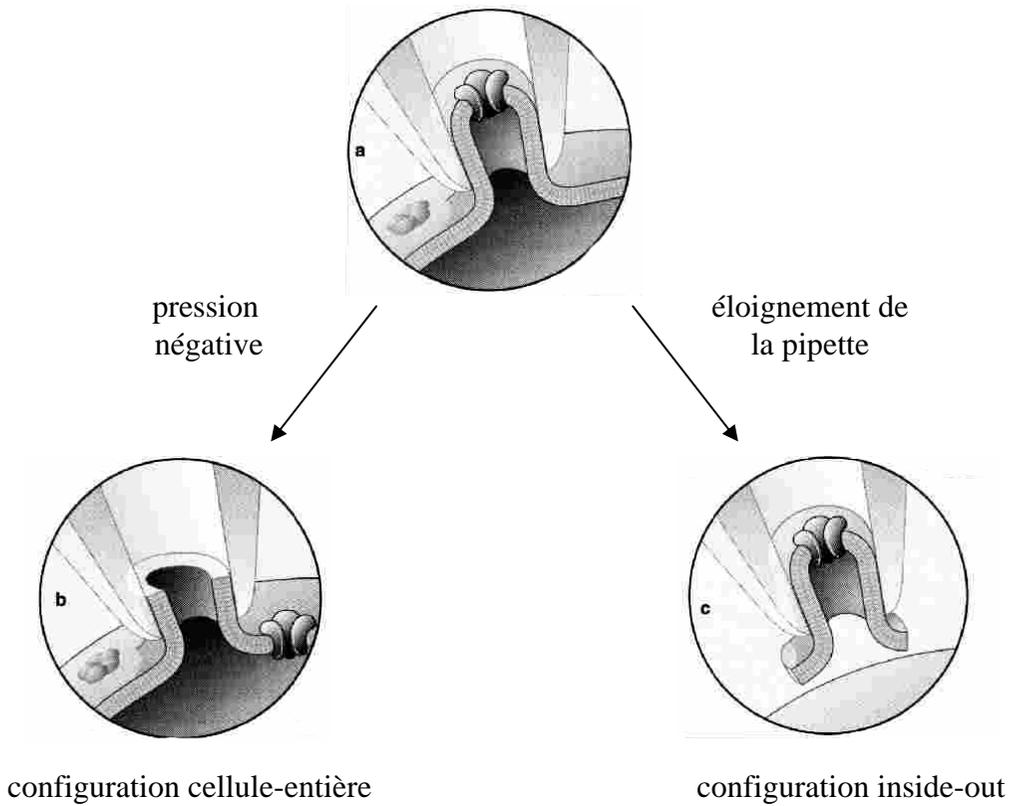


Figure 13. Les différentes configurations du patch-clamp utilisées.

les cellules musculaires est ensuite déployé et maintenu ouvert à l'aide d'une tige de verre montée sur un micromanipulateur (Figure 12). Les surfaces cellulaires ainsi exposées sont alors traitées avec une solution extracellulaire additionnée de 2 mg/mL de collagénase type 1 (Sigma) pendant 30 secondes. Dans un premier temps les cellules de la paroi du corps étaient repérées par fluorescence vu qu'elles exprimaient spécifiquement la GFP. Avec l'habitude, la fluorescence n'a progressivement plus été nécessaire et les cellules étaient alors uniquement repérées en lumière visible. Les enregistrements sont effectués jusqu'à une heure maximum après dissection.

III. L'électrophysiologie

1. Les principes de la méthode

La technique du patch-clamp est basée sur les propriétés d'adhérence entre le verre et les phospholipides de la membrane plasmique (Hamill *et al.*, 1981). Elle consiste à accoler une micropipette de verre, remplie d'une solution conductrice et reliée à un amplificateur, à la membrane cellulaire. Une résistance de plusieurs $G\Omega$ est obtenue en appliquant une légère succion dans la pipette. La portion de membrane située à l'intérieur de la pipette (appelé patch) est alors isolée électriquement du milieu baignant la cellule. C'est la configuration cellule-attachée (Figure 13). Elle permet l'étude des canaux ioniques au niveau unitaire tout en gardant l'intégrité de la cellule et les voies de signalisations intracellulaires. A partir de cette configuration, l'éloignement de la pointe de la pipette conduit à l'excision du patch de membrane et l'obtention de la configuration inside-out (Figure 13). La face interne de la membrane se retrouve ainsi au contact du bain et l'action de composés agissant à la face intracellulaire peut être alors testée. Une autre possibilité à partir de la configuration cellule-attachée est de rompre le morceau de membrane sous la pipette, sans compromettre le scellement de la pipette sur la membrane, par application d'une nouvelle aspiration : c'est la configuration cellule-entière (Figure 13). L'intérieur de la cellule est alors dialysé avec la solution contenue dans la pipette qui correspond à un milieu intracellulaire classique (voir le paragraphe V de cette section). Cette configuration permet d'enregistrer l'activité électrique générée par l'ensemble des canaux ioniques de la cellule.

2. Le montage expérimental

Les pipettes d'enregistrement sont obtenues en étirant en deux étapes un capillaire en verre (Borosilicate glass capillaries, Harvard) à l'aide d'une étireuse verticale (modèle 730, David

Kopf Instrument). La résistance des pipettes après étirement est de l'ordre de 3 MΩ. Les variations de potentiel membranaire et les courants macroscopiques et unitaires sont enregistrés en utilisant un amplificateur de patch-clamp (modèle RK 400, Bio-Logic). Les stimulations (sauts de potentiel ou injections de courant) et l'acquisition des données sont réalisées à l'aide d'un convertisseur, respectivement numérique/analogique et analogique/numérique (Lab Master DMA board, Scientific Solutions), couplé au logiciel Biopatch (Bio-Logic). Dans certaines conditions, pour plus de stabilité, les injections de courant ont été effectuées à l'aide d'un stimulateur programmable SMP-311 (Bio-Logic). Le potentiel de repos était enregistré en parallèle sur un enregistreur graphique (Kipp & Zonen). Les courants macroscopiques ont été mesurés après un filtrage à 3 kHz et un échantillonnage à 10 kHz sur des périodes d'enregistrement de quelques centaines de millisecondes, alors que les courants microscopiques ont été mesurés après un filtrage à 300 Hz et un échantillonnage à 1 kHz sur des périodes d'enregistrement de quelques secondes.

3. L'analyse des résultats

Les courants macroscopiques et les variations de potentiel enregistrés ont été analysés par l'utilisation du logiciel Microcal Origin version 7 (Microcal software Inc.). Pour les courants macroscopiques aucune compensation, ni de résistance, ni de capacité, n'a été faite au cours des enregistrements. De manière générale, les valeurs de courants ont été rapportées à la capacité cellulaire. Celle-ci a généralement été calculée à partir du courant capacitif enregistré en réponse à une impulsion dépolarisante de 10 mV à partir du potentiel de maintien de -70 mV. En ce qui concerne l'étude des courants calciques, la valeur du courant de fuite mesurée pour un saut de potentiel de 10 mV a été soustraite à tous les enregistrements de courants, en supposant une évolution linéaire de ce courant de fuite avec la dépolarisation.

Les courants unitaires ont été analysés avec le logiciel Biopatch. L'activité des canaux, NP_o , a été déterminée avec la formule $NP_o = I/i$ où N est le nombre de canaux dans le patch, P_o la probabilité d'ouverture, I le courant moyen et i le courant unitaire. i a été déterminé à partir d'histogrammes d'amplitude.

Les résultats sont présentés sous la forme de valeurs moyennes \pm SEM (écart à la moyenne). Les courbes ont été ajustées avec un algorithme classique Marquardt-Levenberg inclus dans le logiciel Microcal origin. Les comparaisons ont été réalisées à l'aide de tests statistiques "t" de Student non appariés, de tests de Mann Whitney et de Wilcoxon. La limite de significativité est fixée à une valeur de P égale à 5%.

4. L'uniformité de potentiel

La petite taille des cellules et la forte résistance d'entrée (environ $1\text{G}\Omega$) étaient favorables à un contrôle de qualité du potentiel imposé. De plus, nous avons travaillé sur les cellules musculaires ventrales de la paroi du corps, proches de la chaîne nerveuse et projetant des bras musculaires courts (White *et al.*, 1986 ; Jorgensen & Nonet, 1995) afin d'améliorer la qualité de contrôle du potentiel. Cependant des études structurales ont montré la présence de jonctions gap entre les cellules musculaires de la paroi du corps (White *et al.*, 1976, 1986). Le couplage électrique des cellules pouvait ainsi poser un problème d'uniformité de potentiel. La fonctionnalité de ces jonctions gap, dans nos conditions expérimentales, a été mise en doute par le fait que (i) dans les expériences d'imagerie calcique, la fluorescence due à la présence de fluo-3, composé capable de franchir les jonctions gap (Carter *et al.*, 1996), se limitait à la cellule patchée, et (ii) la stimulation par injection de courant dans les cellules enregistrées n'a jamais abouti à la contraction des cellules voisines. Néanmoins, nous avons quand même estimé l'uniformité du voltage en prenant en compte les approximations suivantes : les cellules sont assimilées à des câbles de $100\ \mu\text{m}$ de longueur (L) sur $10\ \mu\text{m}$ de diamètre ($2r$) et possèdent une résistance interne (R_I) de $100\ \Omega\cdot\text{cm}$. Le plus grand courant qui puisse se développer dans ces cellules est le courant potassique. Avec des dépolarisations jusqu'à $+80\ \text{mV}$ ce courant atteint environ $5\ \text{nA}$. Dans ce cas extrême, la résistance d'entrée (R_e) chute alors à $20\ \text{M}\Omega$. La résistance membranaire (R_m) est alors de $R_e \times 2\pi R = 628\ \Omega\cdot\text{cm}^2$. La constante d'espace (λ) est calculée selon l'équation suivante :

$$\lambda = [r \times (R_m)/2R_I]^{1/2}.$$

Dans l'article concernant le courant calcique, une erreur a été commise, car dans la formule c'est le diamètre et non le rayon qui a été utilisé. On aurait dû trouver une valeur pour λ de $400\ \mu\text{m}$ et non de $560\ \mu\text{m}$.

D'après la théorie du câble linéaire, si on injecte un courant à l'extrémité d'un câble de longueur L et de constante d'espace λ et qu'on effectue des enregistrements électriques à l'autre extrémité du câble, la variation de potentiel, $\Delta V/V$, le long du câble est prédite par l'équation d'Attwell & Wilson (1980) :

$$\Delta V/V = (1 + e^{2L/\lambda} - 2e^{L/\lambda}) / (1 + e^{2L/\lambda}).$$

En prenant $400\ \mu\text{m}$ comme valeur pour λ on trouve alors un $\Delta V/V$ de 0.031 , ce qui signifie que le potentiel imposé varie au maximum de $3.1\ \%$. Nous avons ainsi considéré que nos cellules étaient isopotentielles.

IV. L'imagerie calcique

1. Les principes de la méthode

Afin de suivre les variations de calcium libre dans le cytoplasme des cellules de la paroi du corps, un indicateur fluorescent "calcique", le fluo-3, est dialysé dans la cellule enregistrée en patch-clamp. Cette molécule est synthétisée chimiquement sur le modèle de la molécule chélatrice d'ions divalents EGTA. Elle possède un site tétracarboxylique qui lui confère le pouvoir de fixer le calcium. Illuminée par une longueur d'onde d'excitation située dans le domaine du visible dans la gamme des bleus, le fluo-3 émet une fluorescence dont le spectre d'émission est centré autour de 525 nm (gamme des verts). La fixation du calcium sur le fluo-3 provoque une augmentation de la fluorescence émise par l'indicateur. Il n'y a pas de déplacement du spectre d'émission : le fluo-3 est un indicateur non-ratiométrique. Dans de telles conditions, les variations de la concentration en calcium libre ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]$) suivent la relation suivante :

$$\Delta[\text{Ca}^{2+}] = K_d \times N1/N2 \times \Delta F/F,$$

où ΔF est la variation de quantité de fluorescence émise, F la quantité de fluorescence initiale, K_d la constante de dissociation de l'indicateur, $N1$ et $N2$ le nombre de molécules d'indicateur liées au Ca^{2+} et libres respectivement. La mesure de $\Delta F/F$ est ainsi corrélée à $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$: plus la concentration en calcium libre dans la cellule augmente, plus $\Delta F/F$ est grand.

2. Le montage expérimental

L'indicateur fluorescent fluo-3 (pentapotassium salt, Molecular Probes) a été ajouté à une concentration de 300 μM dans un milieu intrapipette pauvre en EGTA (voir le paragraphe V de cette section). Après le passage en configuration cellule-entière, un temps d'attente de deux minutes est respecté systématiquement afin de permettre à l'indicateur de diffuser suffisamment dans la cellule étudiée.

Les expériences de mesure de fluorescence ont été réalisées sur le microscope inversé à épifluorescence utilisé pour le patch-clamp. La fluorescence du fluo-3 est produite par une lampe à vapeur de mercure (HBO 100W/2, Osram) couplée à un jeu de filtres appropriés (excitation 450-480 nm ; émission au dessus de 515 nm ; miroir dichroïque 500 nm). La cellule enregistrée est centrée dans une région d'intérêt (280 \times 280 pixels), pour laquelle des images sont acquises à une fréquence de 50 Hz par une caméra DTC (Dispositif à transfert de charge ou CCD) Coolsnapfx (Roper Scientific). L'acquisition des images et leur analyse sont réalisées à l'aide du logiciel MetaVue (Universal Imaging Corp.). L'intensité de fluorescence

Milieux intracellulaires

Milieux extracellulaires

	Milieu interne classique	Milieu interne calcique	Milieu interne fluorescence	Milieu interne chlore pauvre	Milieu externe type Ascaris	Milieu externe type tyrode	Milieu externe calcique	Milieu normosmotique	Milieu hypo-osmotique	Milieu acide
Enregistrements effectués	Courants Na ⁺ , K ⁺ , potentiels	Courants Ca ²⁺	Signal Ca ²⁺ , courants Ca ²⁺	Courants K ⁺	Courants K ⁺ , signal Ca ²⁺	Courants Na ⁺ , potentiels	Courants Ca ²⁺	Courants Na ⁺	Courants Na ⁺	Courants Na ⁺
NaCl	-	-	-	-	23	140	-	60	60	140/0
Na-Acétate	-	-	-	-	110	-	-	-	-	-
NMG-Cl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/140
KCl	120	-	-	15	5	5	-	5	5	5
K-Aspartate	-	-	-	125	-	-	-	-	-	-
KOH	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CsCl	-	140	140	-	-	-	-	-	-	-
TEAMeS	-	-	-	-	-	-	140	-	-	-
MgCl ₂	4	4	4	-	5	5	5	5	5	5
CaCl ₂	-	-	-	-	6	6	6	6	6	6
Na ₂ ATP	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MgATP	-	4	4	5	-	-	-	-	-	-
TES	5	5	5	-	-	-	-	-	-	-
HEPES	-	-	-	10	5	5	10	5	5	-
MES	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
EGTA	5	5	-	5	-	-	-	-	-	-
Sucrose	36	-	-	-	-	-	-	160	-	-
Glucose	-	-	-	-	11	11	-	11	11	11
TEACl	-	5	5	-	-	-	-	-	-	-
4-AP	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-

Tableau 3. Composition des différentes solutions salines utilisées en configuration cellule-entière.

Les concentrations sont indiquées en mM (NMG : N-Méthyl-D-Glucamine, MeS : Methane-sulfonate)

est mesurée pour une aire définie située dans la cellule d'intérêt, loin de la pipette d'enregistrement, à laquelle est soustraite la fluorescence de base, représentée par la fluorescence émise par la même aire mais localisée dans une cellule voisine. Ceci permet alors de s'affranchir de la fluorescence non spécifique. Pour obtenir ΔF il faut soustraire aux valeurs de fluorescence spécifique la moyenne F des valeurs obtenues dans les conditions initiales, c'est-à-dire avant stimulation. Les valeurs ΔF sont ensuite rapportées à F .

V. Les solutions

Un des problèmes rencontré lors de la mise au point de la technique d'électrophysiologie chez *C. elegans* a été l'absence, en raison de la taille très réduite de l'animal, de données relatives à la composition des milieux intra- et extracellulaire. Dans une première série d'expériences, c'est-à-dire celles concernant l'étude des courants potassiques en configuration cellule-entière, nous avons utilisé des solutions salines similaires à celles employées par Richmond et Jorgensen dans leur premier article (1999). Le milieu externe avait la particularité d'être pauvre en chlore (50 mM Cl⁻) ce qui est une caractéristique du milieu extracellulaire du Nématode *Ascaris lombricoides*, espèce la plus proche de *C. elegans* pour laquelle la composition des milieux était connue. Cependant, avec la pratique, il a été observé que les cellules avaient bien meilleur aspect si le milieu externe présentait une concentration en chlore plus élevée (167 mM Cl⁻). Cette observation est à mettre en relation avec celle réalisée par Avery *et al.* (1995) qui ont noté que le pompage du pharynx était anormalement faible en présence d'une solution extracellulaire pauvre en chlore. Ainsi pour les enregistrements ultérieurs, comme ceux du courant sodique et du potentiel cellulaire, nous avons utilisé une solution extracellulaire riche en chlore.

La composition des solutions ioniques utilisées pour l'ensemble des expériences est indiquée dans les tableaux 1 et 2. Les milieux intrapipettes ont été systématiquement filtrés (0,22 μ m). Les potentiels de jonction n'ont été pas été pris en compte car ils ont été estimés dans les différents cas inférieurs à 5 mV. Les différentes drogues ont été diluées, soit directement dans le milieu ionique, soit après solubilisation dans le DMSO (DiMéthyl SulfOxyde) si précisé. Le pH des solutions a été ajusté à 7,2 sauf pour la solution externe dite acide, dont le pH était de 6,1. Les solutions externes sont superfusées par gravité à l'aide d'un système de capillaires Téflon.

	Milieu intra- pipette riche en Na ⁺	Milieu intra- pipette riche en K ⁺	Milieu bain classique	Milieu bain sans chlore	Milieu bain sans calcium
Enregistre- ments effectués	Courants unitaires en 5 mM K ⁺	Courants unitaires en 140 mM K ⁺	Courants unitaires	Courants en 10 Cl ⁻	Courants en Ca ²⁺
NaCl	140	-	-	-	-
KCl	5	140	140	-	140
K-Acétate	-	-	-	140	-
MgCl ₂	5	5	5	5	5
CaCl ₂	6	0.1	0.1	0.1	0
HEPES	5	5	10	10	10
EGTA	-	-	-	-	1

Tableau 4. Composition des différentes solutions salines utilisées en configuration cellule-attachée ou inside-out.

Les concentrations sont indiquées en mM.

RESULTATS

Présentation des Résultats

Au moment où j'ai débuté mon travail de thèse, la caractérisation de la cellule musculaire striée de *C. elegans* se limitait à la détermination des récepteurs aux neurotransmetteurs impliqués dans la transmission neuromusculaire. La mise au point de la technique de patch-clamp sur les cellules musculaires de la paroi du corps de *C. elegans* nous a ainsi ouvert un champ d'investigation extrêmement large. Mes trois années de thèse nous ont permis d'aborder successivement trois types de conductances, les conductances calciques, potassiques et sodiques.

Pour l'étude de chacune d'entre elles, nous avons appliqué une démarche similaire consistant en (i) la caractérisation des propriétés biophysiques et pharmacologiques du courant enregistré dans les cellules musculaires striées, (ii) l'étude de son rôle dans le fonctionnement de ces cellules et (iii) la détermination de la nature moléculaire des canaux ioniques responsables de ce courant, par l'utilisation d'animaux mutants.

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont fait l'objet de quatre manuscrits, trois publiés et l'un récemment soumis. Dans cette section "Résultats", ces quatre études seront présentées dans trois parties différentes, chacune dédiée à l'une des conductances ioniques abordées.

RESULTATS

PARTIE 1 : ETUDE *IN SITU* DU CANAL CALCIQUE VOLTAGE-DEPENDANT EGL-19 ET DE SON ROLE DANS LE FONCTIONNEMENT DE LA CELLULE MUSCULAIRE DE

CAENORHABDITIS ELEGANS

ETUDE 1

Après la mise au point de la technique de patch-clamp sur les cellules musculaires de la paroi du corps de *C. elegans*, notre premier objectif a été d'étudier le fonctionnement de ces cellules striées. En effet, à cette époque, seules les propriétés fonctionnelles de la jonction neuromusculaire avaient été caractérisées, avec la mise en évidence de la présence de différents récepteurs à l'acétylcholine et au GABA (Richmond & Jorgensen, 1999), sans que les caractéristiques propres à la cellule musculaire aient été réellement explorées.

Dans un premier temps, nous avons mesuré le potentiel de repos de ces cellules et nous avons trouvé sur 12 cellules une valeur moyenne de l'ordre de -20 mV. Dans quelques cellules, le potentiel de repos était interrompu par le développement de potentiels d'action, d'amplitude variable. En courant-imposé, ces potentiels d'action pouvaient être évoqués par l'injection de courant positif et, comme pour ceux observés chez un autre Nématode, *Ascaris lumbricoïdes*, leur amplitude était graduée. L'utilisation de bloqueurs pharmacologiques nous a permis de mettre en évidence que la phase de dépolarisation était le résultat de courants calciques alors que celle de repolarisation mettait en jeu des courants potassiques. En voltage-imposé, ces courants étaient aisément observables en réponse à des dépolarisations, et nous les avons tous deux étudiés séparément, le courant potassique faisant l'objet de l'étude suivante.

L'étude des propriétés biophysiques et pharmacologiques du courant calcique responsable de la phase de dépolarisation du potentiel d'action a montré que ce courant correspondait à un courant voltage-dépendant de type L. D'après les données de la littérature concernant les différents canaux voltage-dépendants chez *C. elegans*, le meilleur candidat pour le développement de ce courant était le canal EGL-19, seul canal calcique supposé de type L chez *C. elegans* (Lee *et al.*, 1997). Le mutant *egl-19* nul étant létal, nous avons travaillé sur un mutant réduction-de-fonction, *egl-19(n582)*, portant une mutation ponctuelle sur un résidu chargé du segment IIIIS4 et caractérisé au niveau phénotypique par une paralysie flaccide due à un défaut de contraction musculaire. L'altération du potentiel d'action et de la voltage-dépendance (au niveau du seuil ainsi que de la vitesse d'activation) du courant calcique

enregistré chez ce mutant nous a amené à la conclusion que le canal EGL-19 était bien, au moins en partie, responsable du courant calcique enregistré *in situ*.

Dans la dernière partie de cette étude, nous avons étudié le rôle du courant calcique voltage-dépendant dans l'activation de la cellule musculaire striée de *C. elegans*. Pour ce faire, nous avons couplé à la technique de patch-clamp une technique d'imagerie calcique, ce qui nous permettait alors de suivre simultanément le courant calcique voltage-dépendant et les variations de calcium libre intracellulaire. Les résultats obtenus ont montré que l'amplitude des transitoires calciques suivait celle des courants calciques. Ces résultats, couplés à ceux obtenus par Maryon *et al.* (1998) concernant le phénotype peu sévère des mutants nuls sur le récepteur à la ryanodine, nous ont conduit à proposer que la contraction de la cellule musculaire striée de *C. elegans* implique majoritairement une activation directe des protéines contractiles par le calcium entrant dans la cellule *via* les canaux calciques voltage-dépendants. Les résultats obtenus au niveau des transitoires calciques chez le mutant *egl-19(n582)* ont révélé que, d'une façon concomitante avec le décalage du seuil d'activation du courant calcique voltage-dépendant, les transitoires calciques apparaissaient pour des potentiels plus positifs que pour les animaux sauvages. Cette observation souligne le rôle majeur des canaux EGL-19 dans l'activation de la cellule musculaire striée de *C. elegans* et permet ainsi de rendre compte du phénotype flaccide observé chez les animaux mutants. Cette étude est alors la première étude d'un canal ionique chez *C. elegans* capable de faire le lien entre la mutation au niveau moléculaire, sa répercussion sur le fonctionnement *in situ* du canal et le phénotype de l'animal.

Article 1

The Journal of Cell Biology
Volume 159 (2) : 337-347, 2002

The L-type voltage-dependent Ca²⁺ channel EGL-19 controls body wall muscle function in *Caenorhabditis elegans*

Maëlle Jospin¹, Vincent Jacquemond¹, Marie-Christine Mariol², Laurent Ségalat² and Bruno Allard¹

¹ Physiologie des Eléments Excitables, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5123

² UMR 5534, Université C. Bernard Lyon I, 69622 Villeurbanne Cedex, France

Address correspondence to Bruno Allard, Physiologie des Eléments Excitables, UMR CNRS 5123, Université C. Bernard Lyon I, 43 boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France. Tel.: 33-4-72-43-1032. Fax: 33-4-78-94-6820. E-mail: bruno.allard@univ-lyon1.fr

Caenorhabditis elegans is a powerful model system widely used to investigate the relationships between genes and complex behaviors like locomotion. However, physiological studies at the cellular level have been restricted by the difficulty to dissect this microscopic animal. Thus, little is known about the properties of body wall muscle cells used for locomotion. Using in situ patch clamp technique, we show that body wall muscle cells generate spontaneous spike potentials and develop graded action potentials in response to injection of positive current of increasing amplitude. In the presence of K⁺ channel blockers, membrane depolarization elicited Ca²⁺ currents inhibited by nifedipine and exhibiting Ca²⁺-dependent inactivation. Our results give evidence that the Ca²⁺ channel involved belongs to the L-type class and corresponds to EGL-19, a putative Ca²⁺ channel originally thought to be a member of this class on the basis of genomic data. Using Ca²⁺ fluorescence imaging on patch-clamped muscle cells, we demonstrate that the Ca²⁺ transients elicited by membrane depolarization are under the control of Ca²⁺ entry through L-type Ca²⁺ channels. In reduction of function *egl-19* mutant muscle cells, Ca²⁺ currents displayed slower activation kinetics and provided a significantly smaller Ca²⁺ entry, whereas the threshold for Ca²⁺ transients was shifted toward positive membrane potentials.

Key Words: Ca²⁺ currents; *C. elegans*; muscle; *egl-19*; excitation-contraction coupling

Abstract : <http://www.jcb.org/cgi/content/abstract/159/2/337>

Online Article : <http://www.jcb.org/cgi/content/full/159/2/337>

PDF version : <http://www.jcb.org/cgi/reprint/159/2/337.pdf>

RESULTATS

PARTIE 2 : CARACTERISATION *IN SITU* A L'AIDE DE LA TECHNIQUE DE PATCH-CLAMP DES COURANTS POTASSIQUES DE LA CELLULE MUSCULAIRE DE *CAENORHABDITIS ELEGANS*

ETUDE 2

Au moment où nous avons abordé la caractérisation électrophysiologique de la cellule musculaire striée de *C. elegans*, très peu de données *in situ* étaient disponibles. Concernant les courants potassiques, Richmond & Jorgensen (1999) avait simplement montré qu'un courant sortant était activé dans ces cellules en réponse à la dépolarisation, et que ce courant pouvait être séparé par l'utilisation d'agents pharmacologiques en deux composantes différentes. Le but de l'étude 2 présentée dans ce manuscrit était alors de réaliser une description détaillée biophysique et pharmacologique des courants potassiques, en utilisant la configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp, mais aussi les configurations cellule-attachée et inside-out, afin de caractériser les propriétés unitaires des canaux potassiques présents dans les cellules musculaires de *C. elegans*.

En voltage-imposé dans la configuration cellule-entière, des dépolarisations à partir d'un potentiel de maintien de -70 mV donnent naissance à un courant sortant voltage-dépendant, présentant dans certaines cellules une phase transitoire (précoce) et une phase maintenue (tardive) bien discernables. L'utilisation de protocoles à doubles impulsions a permis de déterminer les potentiels d'inversion des courants de queue (ou de désactivation) correspondant à la phase précoce ou tardive du courant sortant activé par la dépolarisation. Alors que le courant de désactivation de la phase tardive présente un potentiel d'inversion très proche du potentiel d'équilibre des ions potassiques, celui de la phase précoce s'inverse pour des valeurs plus positives. Nous avons montré que ces potentiels plus positifs étaient dus, au moins en partie, à l'activation de canaux chlore, puisqu'en présence d'inhibiteurs de ces canaux le potentiel d'inversion des courants de désactivation de la phase précoce était déplacé vers des potentiels plus négatifs.

Nous avons ensuite mis en évidence à l'aide de deux bloqueurs des canaux potassiques, le TEA et la 4-AP, que le courant potassique voltage-dépendant était constitué de deux composantes différentes : l'une sensible à la 4-AP, s'activant rapidement et s'inactivant partiellement, et l'autre sensible au TEA, s'activant plus lentement et restant maintenue le temps de la stimulation. La détermination des courbes courants-potentiels pour les courants globaux, ceux sensibles à la 4-AP et ceux sensibles au TEA montre que les deux composantes

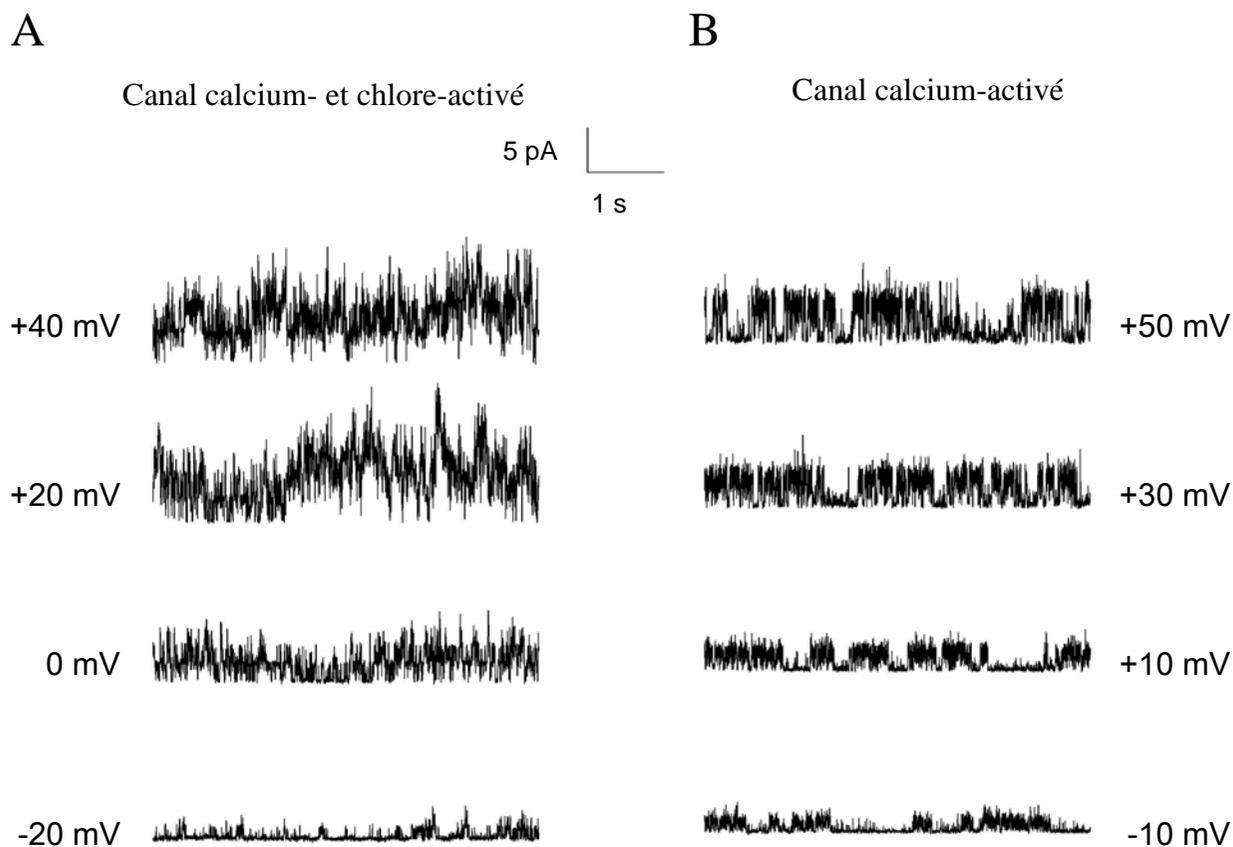
du courant potassique voltage-dépendant possèdent le même seuil d'activation (autour de -30 mV) et présentent une forte rectification sortante. La composante sensible à la 4-AP est majoritaire dans le courant précoce alors que celle sensible au TEA est majoritaire dans le courant tardif.

En enregistrements unitaires, deux populations de canaux potassiques ont été discernées. La première population était visible aussi bien en configuration cellule-attachée qu'en inside-out, et consistait en des canaux voltage-dépendants, activés par le calcium et le chlore intracellulaires et inhibés en présence de TEA à la face extracellulaire de la membrane plasmique. La caractérisation en expression hétérologue d'un canal voltage-, calcium- et chlore-activé, SLO-2, par Yuan *et al.* (2000) nous a laissé pensé que le canal que nous enregistrons pouvait correspondre à SLO-2. Sa participation dans le courant enregistré en configuration cellule-entière a été explorée en utilisant un milieu intrapipette pauvre en chlore, dans le but de limiter l'activation des canaux SLO-2. Le courant enregistré présentait alors systématiquement un courant maintenu de plus faible amplitude, ce qui nous a permis de conclure que SLO-2 participe à la composante maintenue du courant potassique voltage-dépendant.

La chute irréversible au cours du temps de l'activité des canaux voltage-, calcium- et chlore-activés a révélé la présence d'une deuxième population de canaux potassiques, observés dans 6 patches sur 17 en configuration inside-out. Ces canaux étaient également activés par le calcium mais insensibles à la concentration de chlore interne. Leurs temps d'ouverture et de fermeture très brefs, associée à une forte rectification sortante, nous ont conduit à sous-estimer leur conductance, et à en conclure, d'après la conductance apparente faible déterminée, que ces canaux appartenaient à la famille des canaux potassiques calcium-activés de faible conductance (ou canaux SK). Des expériences complémentaires, réalisées après cette étude, nous ont amenés à une autre conclusion et ont également permis de confirmer la nature moléculaire des canaux voltage-, calcium- et chlore-activés.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Juste après la publication de l'étude 2, un article décrivant pour la première fois des mutants nuls sur *slo-2* est paru (Wei *et al.*, 2002). Nous avons choisi de travailler sur l'un de ces mutants, *slo-2(nf100)*, portant une mutation qui consiste en la délétion de plus de 100 résidus dans une région très conservée de l'extrémité C-terminale de la protéine (Wei *et al.*, 2002). Sur toutes les cellules *slo-2(nf100)* enregistrées en configuration cellule-attachée et



C

	Canal calcium- et chlore-activé		Canal calcium-activé	
	Nombre de patches testés	Nombre de patches positifs	Nombre de patches testés	Nombre de patches positifs
N2	16	16	16	9
<i>slo-1(cx29)</i>	16	16	16	0
<i>slo-2(nf100)</i>	10	0	10	7

Figure 14. Fréquence d'apparition des deux types de canaux potassiques calcium-activés observés en configuration inside-out sur des animaux sauvages et différents mutants.

(A) Enregistrements de l'activité de canaux potassiques calcium- et chlore-activés dans une cellule musculaire de la paroi d'animal sauvage. Sur cette cellule, aucune activité de canal potassique activé uniquement par le calcium n'a été détectée après extinction de l'activité des canaux calcium- et chlore-activés. (B) Enregistrements de l'activité d'un canal potassique uniquement activé par le calcium dans une autre cellule musculaire de la paroi d'animal sauvage, après extinction de l'activité des canaux calcium- et chlore-activés. (C) Tableau illustrant le nombre de patches positifs, c'est-à-dire présentant au moins un canal du type indiqué, par rapport au nombre de patches testés.

inside-out, aucune activité électrique correspondant au canal sensible au calcium et au chlore n'a été détectée (Figure 14A et C). Nous en avons déduit que le canal voltage-, calcium- et chlore-activé observé précédemment *in situ* correspondait bien à SLO-2. En configuration cellule-entière, l'hypothèse que nous avons formulée sur la participation de SLO-2 au courant maintenu a été confirmée par l'observation des courants potassiques sur le mutant nul *slo-2(nf100)* qui présentaient un décours similaire à celui des courants enregistrés sur les animaux sauvages avec une solution intrapipette pauvre en chlore (Figure 15).

Nous avons ensuite cherché à déterminer la nature moléculaire des canaux uniquement activés par le calcium et de faible conductance apparente (figure 14B). Outre SLO-2, la présence d'un autre canal potassique sensible au calcium, SLO-1, a été mise en évidence par immunomarquage dans les cellules musculaires de *C. elegans* (Wang *et al.*, 2001). *slo-1* étant un homologue du gène des Vertébrés codant le canal potassique calcium-activé de grande conductance, il nous a paru dans un premier temps peu probable que l'activité potassique calcium-activée enregistrée corresponde à celle de SLO-1. Nous avons malgré tout testé cette activité sur des mutants nuls *slo-1*, les mutants *slo-1(cx29)* fournis par l'équipe de L. Ségalat et portant une mutation considérée comme nulle (une délétion de 436 nucléotides en position 5', induisant un changement de cadre de lecture). Sur ces mutants, en configuration inside-out, nous n'avons jamais observé d'activité de canaux potassiques calcium-activés après l'extinction de celle de SLO-2 (Figure 14 C). De plus, si la conductance du canal sensible au calcium présent dans les cellules sauvages est recalculée, non pas à 0 mV comme il a été fait originellement, mais à + 50 mV, potentiel pour lequel les temps d'ouverture sont plus longs, une valeur autour de 40 pA (en gradient de potassium physiologique) est trouvée. Nous en avons alors conclu que le canal sensible uniquement au calcium enregistré *in situ* correspondait à SLO-1.

En configuration cellule-entière, en revanche, aucune différence au niveau du courant global entre les animaux *slo-1(cx29)* et sauvages n'a été détectée, suggérant que SLO-1 ne participe pas ou peu au courant global.

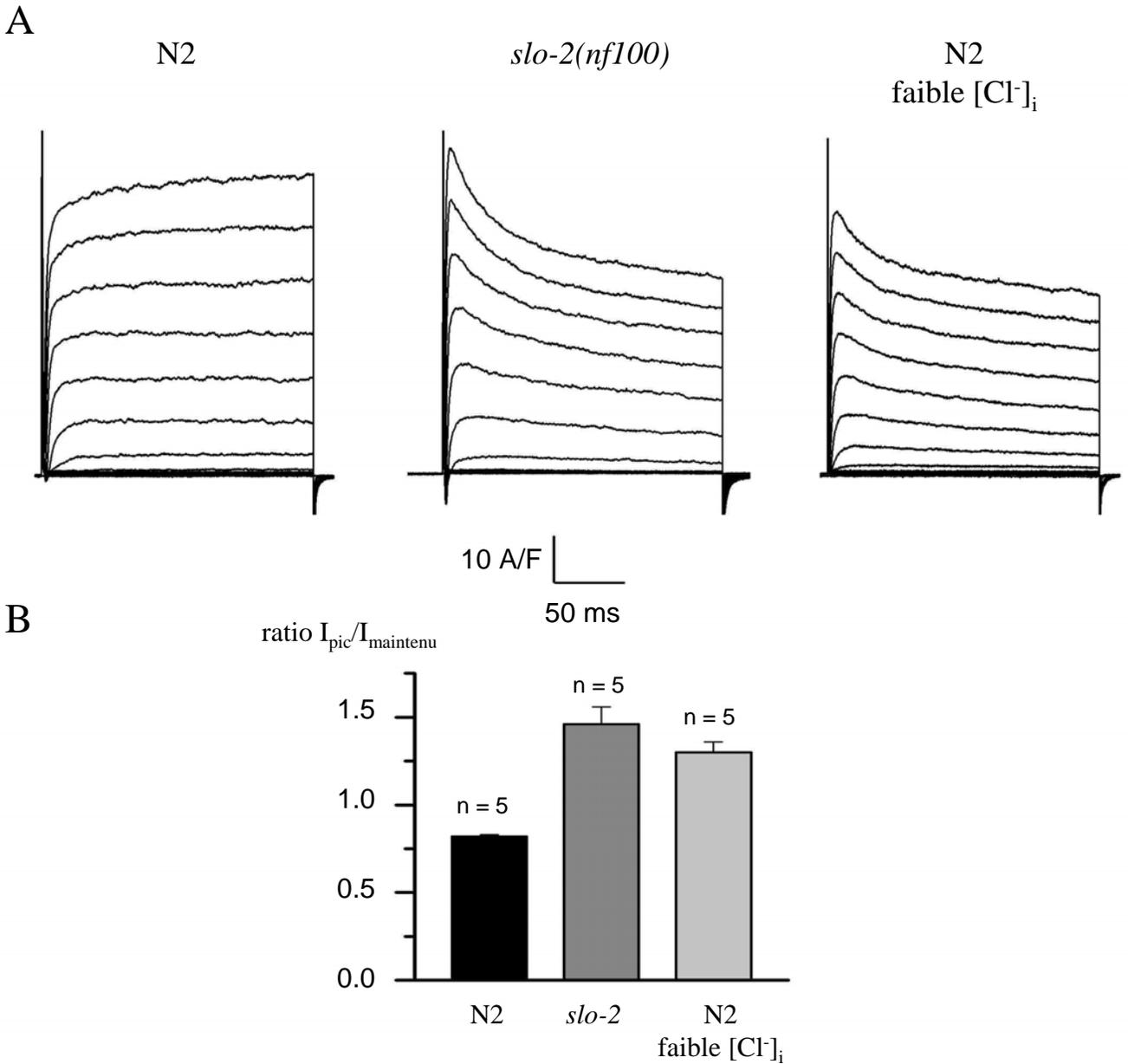


Figure 15. Contribution de SLO-2 au courant global.

(A) Courants évoqués en réponse à des dépolarisations d'amplitude croissante par pas de 10 mV de -70 mV à + 60 mV à partir d'un potentiel de maintien de -70 mV. La solution en faible $[Cl^-]_i$ contenait 15 mM de Cl^- au lieu de 128 mM. (B) Histogramme représentant le rapport entre le courant mesuré à 5 ms et celui en fin d'impulsion.

Article 2

Journal of Physiology
Volume 544 (2) : 373-384, 2002
DOI : 10.1113/jphysiol.2002.022293

Characterization of K⁺ currents using an in situ patch clamp technique in body wall muscle cells from *Caenorhabditis elegans*

Maëlle Jospin, Marie-Christine Mariol*, Laurent Ségalat* and Bruno Allard

*Physiologie des Eléments Excitables, UMR CNRS 5123 and *CGMC, UMR CNRS 5534, Université C. Bernard Lyon I, 43 boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France*

The properties of K⁺ channels in body wall muscle cells acutely dissected from the nematode *Caenorhabditis elegans* were investigated at the macroscopic and unitary level using an *in situ* patch clamp technique. In the whole-cell configuration, depolarizations to potentials positive to -40 mV gave rise to outward currents resulting from the activation of two kinetically distinct voltage-dependent K⁺ currents: a fast activating and inactivating 4-aminopyridine-sensitive component and a slowly activating and maintained tetraethylammonium-sensitive component. In cell-attached patches, voltage-dependent K⁺ channels, with unitary conductances of 34 and 80 pS in the presence of 5 and 140 mM external K⁺, respectively, activated at membrane potentials positive to -40 mV. Excision revealed that these channels corresponded to Ca²⁺-activated K⁺ channels exhibiting an unusual sensitivity to internal Cl⁻ and whose activity progressively decreased in inside-out conditions. After complete run-down of these channels, one third of inside-out patches displayed activity of another Ca²⁺-activated K⁺ channel of smaller unitary conductance (6 pS at 0 mV in the presence of 5 mM external K⁺). In providing a detailed description of native K⁺ currents in body wall muscle cells of *C. elegans*, this work lays the basis for further comparisons with mutants to assess the function of K⁺ channels in this model organism that is highly amenable to molecular and classical genetics.

Abstract : <http://jp.physoc.org/cgi/content/abstract/544/2/373>

Online Article : <http://jp.physoc.org/cgi/content/full/544/2/373>

PDF version : <http://jp.physoc.org/cgi/reprint/544/2/373>

RESULTATS

PARTIE 3 : ETUDE DE DEUX CANAUX SODIQUES SENSIBLES A L'AMILORIDE DANS LA CELLULE MUSCULAIRE DE *CAENORHABDITIS ELEGANS*

ETUDE 3 : Caractérisation *in situ* à l'aide de la technique de patch-clamp de la dégénérine musculaire UNC-105 et de son interaction avec le collagène LET-2 chez *Canorhabditis elegans*

Comme mentionné précédemment, l'utilisation du potentiel génétique de *C. elegans* a permis de mettre en évidence l'implication de différentes protéines dans la mécanosensation et a conduit à l'élaboration d'un modèle dans lequel la tension mécanique serait ressentie au niveau d'un complexe multiprotéique, dont le cœur consisterait en un canal sodique sensible à l'amiloride, appartenant à la famille des dégénérines. La validation de ce modèle nécessite (i) d'être capable de réaliser des enregistrements *in situ* de ces dégénérines, (ii) de démontrer qu'elles sont capables de s'activer en réponse à l'application de contraintes mécaniques et (iii) de mettre en évidence que cette activation fait défaut pour les mutants touchés sur les différents membres du complexe multiprotéique.

Dans l'étude 3 présentée dans cette section, nous avons testé la validité du modèle de complexe mécanotransducteur centré autour des dégénérines en caractérisant *in situ* l'activité d'une dégénérine musculaire, UNC-105, et l'effet sur celle-ci d'une mutation sur son partenaire présumé, le collagène LET-2 (voir dans la section "Historique" le paragraphe IV.4.4.).

En utilisant la configuration cellule-entière de la technique de patch-clamp, nous avons étudié l'effet de l'application extracellulaire d'amiloride, bloqueur de la famille des canaux sodiques à laquelle UNC-105 appartient, sur le courant de fond ou le potentiel de repos des cellules musculaires de la paroi du corps de *C. elegans*. Dans les deux cas, aucune modification du courant ou du potentiel membranaire n'a pu être enregistrée en réponse à l'application de l'amiloride.

Afin de vérifier la capacité de l'amiloride à bloquer les canaux UNC-105 dans notre préparation *in situ*, nous avons alors travaillé sur des mutants gain-de-fonction *unc-105*, pour lesquels une activité constitutive avait été mise en évidence en expression hétérologue (Garcia-Anoveros *et al.*, 1998). Nous avons utilisé le mutant gain-de-fonction *n506* qui présentait le phénotype hypercontracté le moins sévère, pour ne pas compromettre les chances

de réussite pour la microdissection. Cette mutation consiste en la substitution d'un résidu localisé dans le segment pré-M2, quelques résidus en amont du site "deg" (Liu *et al.*, 1996). Les résultats obtenus sur ce mutant ont montré que le potentiel de repos des cellules musculaires était significativement plus dépolarisé que celui des cellules des animaux sauvages N2, et qu'il revenait vers des valeurs similaires à celui de N2 en présence d'amiloride. Des expériences de voltage-imposé ont montré que cette différence de polarisation entre les cellules *unc-105(n506)* et N2 s'expliquait par l'existence d'un courant sensible à l'amiloride constitutionnellement actif chez le mutant, et présentant les mêmes caractéristiques que celui enregistré en expression hétérologue. Ces résultats nous ont amenés à trois conclusions : (i) la mutation gain-de-fonction sur UNC-105 entraîne une hyperactivité du canal *in situ*, (ii) cette hyperactivité est responsable d'une dépolarisation de la cellule, dont la conséquence est l'hypercontraction des cellules musculaires des animaux mutants, (iii) l'amiloride étant capable de bloquer l'activité de UNC-105 à des concentrations de l'ordre du μM , l'absence d'effet de l'amiloride observée sur les cellules musculaires des animaux sauvages est à interpréter comme une absence d'activité des dégénérines au repos.

Nous avons alors essayé d'activer UNC-105 sauvage par l'application de différentes contraintes mécaniques. Quel que soit le type de contraintes mécaniques appliqué, aucune réponse cellulaire sensible à l'amiloride n'a pu être détectée, et ce malgré l'observation de déformations cellulaires prononcées. En dépit de la difficulté à valider avec certitude un résultat négatif, nous avons conclu, aux vues des nombreuses cellules testées et de l'utilisation de différents stimuli mécaniques, que UNC-105 ne s'activait probablement pas en réponse aux contraintes mécaniques. Le désaccord entre nos résultats et l'hypothèse proposée par les études génétiques a également été retrouvé quant à l'effet des mutations ponctuelles sur le collagène LET-2, partenaire supposé de UNC-105 au sein du complexe mécanotransducteur.

En effet, à partir des données génétiques (voir dans la section "Historique" le paragraphe IV.4.4.) le modèle suivant a été proposé par Liu *et al.* en 1996 : UNC-105 sous sa forme sauvage serait activé par la tension mécanique appliquée à la cuticule par l'intermédiaire du collagène LET-2. L'hyperactivité de UNC-105 serait due à une hypersensibilité aux contraintes mécaniques qui entraînerait l'ouverture du canal pour des stimuli mécaniques non ressentis chez l'animal sauvage. La mutation ponctuelle *n821* dans LET-2 aurait comme résultat la rupture du lien physique entre UNC-105 et LET-2, conduisant à la fermeture du canal. Nous avons testé cette dernière hypothèse en caractérisant le courant sensible à l'amiloride présent dans la souche double mutant *unc-105(n506); let-2(n821)*, dans des conditions contrôles et après traitement à la collagénase. Ce traitement avait pour but de

digérer le collagène LET-2 et ainsi de reproduire des conditions dans lesquelles le lien physique entre LET-2 et UNC-105 était détruit.

Les résultats obtenus sur le double mutant *unc-105(n506); let-2(n821)* se sont avérés similaires à ceux obtenus avec des animaux sauvages. Nous avons ainsi vérifié que la mutation sur *let-2* conduit à la fermeture du canal UNC-105 muté. En revanche, les résultats obtenus en présence de collagénase contredisent l'hypothèse formulée par Liu *et al.*. En effet, selon cette hypothèse, l'application de collagénase sur les doubles mutants ne devrait pas avoir d'effet puisque la mutation de LET-2 a déjà éliminé le lien entre LET-2 et UNC-105. Or nous avons observé l'inverse, c'est-à-dire qu'après traitement à la collagénase, le potentiel membranaire des cellules du double mutant revient vers des valeurs équivalentes aux simples mutants *unc-105(n506)* et il est de nouveau sensible à l'amiloride. Ces résultats sont ainsi incompatibles avec le modèle proposé par Liu *et al.*, et nous avons alors proposé le modèle suivant : le canal UNC-105 sauvage serait fermé dans la cellule musculaire alors que la mutation gain-de-fonction entraînerait une ouverture constitutive du canal, indépendamment de son interaction avec le collagène LET-2. L'addition de la mutation dans LET-2 conduirait, par un mécanisme inconnu, à la fermeture du canal muté, alors que la destruction du collagène, et donc du lien entre les deux protéines, permettrait au canal de se rouvrir librement. UNC-105 ne participerait alors pas à un complexe de mécanotransduction en dépit de son interaction avec LET-2.

ETUDE 4 : Mise en évidence de la présence d'un canal sodique sensible à l'amiloride activé par l'acidification extracellulaire dans le muscle de *Caenorhabditis elegans*

Après avoir conclu que UNC-105 était insensible aux contraintes mécaniques, nous avons ensuite testé si UNC-105 pouvait être activé par les autres stimuli classiquement activateurs des autres ASCs : les peptides FMRFamide et l'acidification du milieu extracellulaire (voir dans la section "Historique" le paragraphe IV.3.). La résolution de cette question nous a amené à l'étude 4.

Contrairement à l'application de FMRFamide qui n'a donné aucun résultat, l'acidification du milieu extracellulaire a entraîné dans toutes les cellules testées une dépolarisation, plus ou moins importante, partiellement supprimée par l'addition d'amiloride. En voltage-imposé, des résultats concordants ont été obtenus puisque le passage d'une solution externe contrôle (pH 7.2) à une solution acide (pH 6.1) donnait naissance à un courant entrant, sodique, bloqué à 65% par l'addition de 1 mM amiloride et présentant une phase d'inactivation.

Notre première hypothèse a été que le canal responsable de cette réponse pourrait être UNC-105, puisqu'à ce jour UNC-105 est la seule dégénérine décrite dans les cellules musculaires de la paroi du corps de *C. elegans*. Pour tester cette hypothèse, nous avons cherché à travailler sur un mutant nul sur *unc-105*. L'équipe de L. Ségalat a alors séquencé plusieurs des doubles mutants *unc-105* portant une mutation révertante intragénique isolés par Park & Horvitz (1986a), afin d'identifier un mutant nul. Le séquençage du double mutant *unc-105(n506n786)* a mis en évidence que ce mutant, en plus de la mutation gain-de-fonction, possédait une mutation non-sens dans le domaine CRDII. La protéine UNC-105 chez ce double mutant est ainsi tronquée bien avant le deuxième segment transmembranaire et n'est certainement pas fonctionnelle. Nous avons observé que l'acidification du milieu extracellulaire entraînait toujours une réponse chez les animaux mutants dépourvus de canaux UNC-105 fonctionnels, et nous en avons alors conclu qu'un ASC autre que UNC-105 était impliqué dans la réponse au pH.

Etant donné que la dissection de l'animal préserve la chaîne nerveuse ventrale et ses connections avec les cellules musculaires, le canal sodique sensible à l'amiloride, responsable de la réponse à l'acidification extracellulaire, pouvait être soit musculaire, soit neuronal. Nous avons discriminé entre les deux possibilités en travaillant en milieu externe dépourvu de calcium libre, supposé inhiber la quasi-totalité de la libération synaptique. La persistance dans ces conditions d'une réponse à l'acidification extracellulaire, sensible à l'amiloride, indique que la réponse est musculaire. L'ensemble de ces résultats nous a ainsi permis de conclure qu'il existe dans les cellules musculaires de la paroi un ASC activé par le pH acide, autre que UNC-105. Ce canal, qui pourrait alors s'apparenter aux canaux ASICs des Vertébrés, est le premier canal sensible aux protons décrits chez les invertébrés. Son activation, conduisant à une dépolarisation des cellules musculaires, pourrait participer, en favorisant la locomotion des animaux, au comportement d'évitement des environnements acides décrits chez *C. elegans* (Sambongi *et al.*, 2000).

Article 3

Journal of Physiology
Volume 557 (2) : 379-388, 2004
DOI : 10.1113/jphysiol.2003.057687

Patch clamp study of the UNC-105 degenerin and its interaction with the LET-2 collagen in *Caenorhabditis elegans* muscle

Maëlle Jospin¹, Marie-Christine Mariol², Laurent Segalat² and Bruno Allard¹

¹ *Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, UMR CNRS 5123*² *Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, UMR CNRS 5534, Université C. Bernard Lyon 1, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France*

Degenerins have emerged from genetic studies in *Caenorhabditis elegans* as candidate mechanically gated amiloride-sensitive ion channels for transducing mechanical stimuli into cellular responses. In *C. elegans* muscle, the existence of a genetic interaction between the *unc-105* degenerin gene and *let-2*, a gene encoding an $\alpha 2(\text{IV})$ collagen, raised the possibility that UNC-105 may function as a mechanically gated channel in a stretch receptor complex. However, to date, ion channel activity of UNC-105 has only been recorded in a gain-of-function mutant form in heterologous expression systems. In this study we investigated the *in situ* properties of UNC-105 using the whole cell configuration of the patch clamp technique on body wall muscle cells from acutely dissected *C. elegans*. Amiloride was found to be without effect on membrane potential of wild-type muscle cells, suggesting that the UNC-105 degenerin is electrically silent in resting muscle. Hypo-osmotic shocks induced a reversible depolarization of muscle cells but which was not affected by amiloride. Deformation of the cells by applying tension to the filamentous complex on which muscle cells remained attached or by ejecting external solution under pressure failed to induce any change of membrane potential. In gain-of-function *unc-105(n506)* mutant cells, an amiloride-sensitive inward Na^+ current was found to be constitutively active, leading to maintained muscle depolarization. An associated mutation in the $\alpha 2(\text{IV})$ collagen LET-2 led to the closure of the mutant UNC-105(n506) channel while a collagenase treatment of these double mutant cells caused it to re-open, giving evidence for a functional interaction between LET-2 collagen and mutant UNC-105 channel.

Corresponding author B. Allard: Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, UMR CNRS 5123, University Claude Bernard Lyon 1, 43 bd 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France. Email: bruno.allard@univ-lyon1.fr

Abstract : <http://jp.physoc.org/cgi/content/abstract/557/2/379>

Online Article : <http://jp.physoc.org/cgi/content/full/557/2/379>

PDF version : <http://jp.physoc.org/cgi/reprint/557/2/379>

Article 4

Journal of Physiology
Volume 559 (3) : 715-720, 2004

An amiloride-sensitive H⁺-gated Na⁺ channel in *Caenorhabditis elegans* body wall muscle cells.

Jospin M, Allard B.

Physiologie Integrative, Cellulaire et Moléculaire, UMR CNRS 5123, Université C. Bernard Lyon I, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France.

About 30 genes are predicted to encode degenerin/epithelial sodium channels (DEG/ENaCs) in *Caenorhabditis elegans* but the gating mode of these channels has not been determined. Using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique in acutely dissected *C. elegans*, we investigated the effects of H⁺ as a potential activating factor of DEG/ENaCs on electrical properties of body wall muscle cells. Under current-clamp conditions, decreasing external pH from 7.2 to 6.1 led to a reversible depolarization of muscle cells associated with a decrease in input resistance which was partially inhibited by amiloride. Under voltage-clamp conditions, extracellular acidification activated an inward desensitizing current at -60 mV. In the absence of external Ca²⁺, H⁺-gated channels were found to be slightly more permeable to Na⁺ than to K⁺ and were blocked by amiloride with a K_{0.5} of 31 microm at -60 mV. An inward current could be also activated by protons in a GABA receptor null mutant in the presence of D-tubocurarine and in an *unc-105* null mutant. These results demonstrate that ion channels sharing common properties with mammalian acid-sensing ion channels (ASICs) are functional in *C. elegans* muscle which should prove useful for understanding proton sensing in animals.

Abstract : <http://jp.physoc.org/cgi/content/abstract/559/3/715>

On line article : <http://jp.physoc.org/cgi/content/full/559/3/715>

PDF version : <http://jp.physoc.org/cgi/reprint/559/3/715>

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Le travail effectué lors de ma thèse constitue la première étude *in situ* détaillée des propriétés électrophysiologiques de la cellule musculaire de la paroi du corps de *C. elegans*. La mise au point de la microdissection de cet animal, couplée à l'utilisation des techniques de patch-clamp et d'imagerie calcique, nous a permis (i) d'enregistrer les principales conductances ioniques présentes dans les cellules musculaires striées d'animaux sauvages, (ii) d'étudier leur rôle dans l'activation de ces cellules, et (iii) de déterminer la nature moléculaire de certains canaux ioniques mis en jeu, par la caractérisation de différents mutants. Cette section a ainsi pour objectif de récapituler et discuter les principaux résultats obtenus, qui seront présentés en trois parties successives : la première concernant les propriétés de base d'activation des cellules musculaires de cet organisme, la deuxième abordant l'existence éventuelle de conductances dites "de réserve" et la troisième présentant les données relatives à l'activation possible des cellules musculaires par l'étirement membranaire.

I. Les propriétés de base de l'activation des cellules musculaires striées de *C. elegans*

Le potentiel de repos moyen des cellules musculaires de la paroi du corps de *C. elegans* se situe autour de -20 mV, valeur beaucoup moins négative que celle classiquement observée dans les cellules musculaires striées de Vertébrés. La réalité physiologique de cette valeur peut faire l'objet d'interrogations dans la mesure où elle dépend directement des concentrations ioniques intra- et extracellulaires et que ces dernières sont encore inconnues chez *C. elegans*. Plusieurs arguments nous laissent cependant croire que le potentiel de repos déterminé dans nos conditions ioniques n'est pas très éloigné de sa valeur physiologique chez *C. elegans* : (i) au moment du passage en configuration cellule-entière, avant dialyse du milieu intracellulaire, la valeur de potentiel affichée est comprise entre -15 et -35 mV et évolue très peu, (ii) les muscles de la paroi du corps d'un autre Nématode, *Ascaris*, pour lequel les compositions des milieux intra- et extracellulaire sont connues, présentent également un potentiel de repos peu polarisé (Brading & Caldwell, 1971), et (iii) la détermination du potentiel membranaire d'une autre population de cellules excitables de *C. elegans*, les neurones chemosensoriels, par l'utilisation de la technique de patch-clamp dans

sa configuration patch-perforé, n'entraînant pas de dialyse intracellulaire, a conduit à des valeurs équivalentes (Nickell *et al.*, 2002).

Dans plusieurs cellules, des potentiels d'action spontanés d'amplitude variable ont été observés. Deux hypothèses concernant leur origine peuvent être envisagées : (i) soit ces potentiels d'action ont une origine myogénique, comme il l'a été montré pour ceux enregistrés chez l'autre Nématode *Ascaris* (De Bell *et al.*, 1963), (ii) soit ils sont le résultat d'une stimulation par les motoneurones, dans la mesure où les connections neuromusculaires sont préservées dans notre préparation. En faveur de cette dernière hypothèse, nous avons observé en conditions de voltage-imposé, dans plusieurs cellules, la présence d'activités électriques spontanées, similaires à celles enregistrées par Richmond *et al.* (1999) et illustrées par exemple dans la figure 2 de l'étude 4. Richmond *et al.* ayant montré que ces activités spontanées correspondaient aux ouvertures des récepteurs à l'acétylcholine et au GABA de la membrane plasmique musculaire en réponse à la libération de ces neurotransmetteurs par les motoneurones, il peut ainsi être supposé que cette stimulation neuronale puisse conduire au développement de potentiels d'action dans les cellules musculaires.

L'observation d'une inhibition de la phase de dépolarisation du potentiel d'action en présence de bloqueurs des canaux calciques voltage-dépendants dans le milieu extracellulaire suggère que ces canaux jouent un rôle essentiel dans cette phase. En voltage-imposé, ce courant a été enregistré et l'utilisation de mutants réduction-de-fonction sur *egl-19*, gène codant le seul canal calcique voltage-dépendant de type L trouvé dans le génome de *C. elegans*, nous a amené à la conclusion que le courant enregistré *in situ* mettait en jeu les canaux EGL-19. La létalité du mutant *egl-19* nul ne nous a pas permis de montrer directement que le courant calcique enregistré dépendait uniquement de la présence de EGL-19. Mis à part EGL-19, il n'existe que quatre autres sous-unités $\alpha 1$ potentielles de canaux calciques voltage-dépendants : UNC-2, CCA-1, NCA-1 et NCA-2 (voir le paragraphe II.1.1. de la section "Historique" chapitre 2). Les données de la littérature indiquant que CCA-1, NCA-1 et NCA-2 ne semblent pas être exprimés dans les cellules de la paroi du corps de *C. elegans* (voir dans le paragraphe II.1.1.3. dans la section "Historique" chapitre 2), le seul autre candidat possible pour l'origine du courant calcique enregistré dans ces cellules était UNC-2. Nous avons effectué des enregistrements *in situ* sur quelques cellules musculaires de mutants nuls *unc-2*, les mutants *unc-2(e55)*, et il semblerait que ces mutants ne présentent pas de différence au niveau du courant calcique voltage-dépendant par rapport aux animaux sauvages (résultats non illustrés). De plus nous avons montré que l'allure biphasique du courant calcique voltage-dépendant était à attribuer à une inactivation calcium-dépendante. Ainsi il nous paraît

probable que seuls les canaux EGL-19 soient responsables du courant calcique voltage-dépendant enregistré dans les cellules musculaires striées de *C. elegans*.

L'effet drastique des mutations, mêmes ponctuelles, sur *egl-19* est à corrélérer avec la mise en évidence du rôle crucial du courant calcique voltage-dépendant dans le couplage excitation-contraction des cellules musculaires striées de *C. elegans*. Dans ces cellules, nos résultats ont montré que l'entrée de calcium à travers les canaux EGL-19 déclenchait directement l'activation des protéines contractiles, même si une amplification *via* le récepteur à la ryanodine UNC-68 ne peut être complétement exclue. Toute mutation sur *egl-19* ayant un effet sur le courant calcique voltage-dépendant va ainsi avoir une répercussion directe sur l'activation des cellules musculaires striées et entraîner en conséquence un phénotype sévère des mutants concernés.

La phase de repolarisation du potentiel d'action fait intervenir des canaux potassiques voltage-dépendants appartenant à deux populations distinctes : une s'activant rapidement, présentant une inactivation et sensible à la 4-AP, et l'autre plus lente à se mettre en place, maintenue et sensible au TEA. Il est intéressant de noter que les mêmes types de courants potassiques ont été enregistrés chez *Ascaris* (Martin *et al.*, 1992). Une étude postérieure à nos travaux a récemment déterminé la nature moléculaire de ces deux types de canaux potassiques voltage-dépendants chez *C. elegans*, par utilisation de techniques RNAi sur des cellules musculaires en culture : la composante transitoire et la composante maintenue sont ainsi respectivement le résultat de l'activation des canaux codés par les seuls gènes *shal* et *shaker* présents dans le génome (Santi *et al.*, 2003). En configuration cellule-attachée ou inside-out, nous n'avons pas détecté d'activités unitaires correspondant à l'un ou l'autre de ces canaux potassiques voltage-dépendants. Ce manque de correspondance entre l'activité enregistrée en cellule-entière et celle en cellule-attachée ou inside-out n'est pas exceptionnelle et a classiquement trois explications possibles : (i) les canaux ne sont pas accessibles aux enregistrements unitaires, ce qui paraît peu probable dans le cas présent puisque les cellules musculaires striées de *C. elegans* ne possèdent pas d'invaginations membranaires de type tubules transverses, (ii) la densité des canaux est très faible et la probabilité d'en isoler sous la pipette d'enregistrement est alors très réduite, ou (iii) la conductance unitaire de ces canaux est si faible que leur activité est difficilement détectable. Les travaux de Nickell *et al.* (2002) appuient cette dernière hypothèse en mettant en évidence, avec des enregistrements unitaires réalisés *in situ* sur des neurones chemosensoriels de *C. elegans*, la présence de canaux potassiques voltage-dépendants à activation transitoire de très faible conductance, (autour de 0.9 pA à +100 mV en gradient de potassium physiologique). N'ayant pas travaillé à des

potentiels aussi dépolarisés, nous ne pouvons pas conclure sur la présence éventuelle de ces canaux sur la membrane plasmique des cellules musculaires striées.

Nos enregistrements unitaires ont en revanche révélé la présence systématique d'un autre canal potassique, SLO-2, dont la participation au courant activé dans les conditions de base est discutée dans le paragraphe suivant.

II. L'existence de conductances de réserve

La présence d'une activité imputable à SLO-2 dans tous les patches enregistrés en configurations cellule-attachée et inside-out, ainsi que sa forte contribution au courant maintenu observé en configuration cellule-entière, peuvent laisser penser que ce canal est un des canaux majeurs activés dans les conditions de base dans la cellule musculaire striée de *C. elegans* sauvages. Cependant, cette hypothèse nous a paru peu convaincante au vu des résultats que nous avons obtenus, couplés à ceux présentés dans deux autres études récentes (Yuan *et al.*, 2003 ; Santi *et al.*, 2003) : (i) les mutants nuls *slo-2* ne présentent pas de phénotype particulier en conditions de culture standard, indiquant que les animaux sont capables de vivre normalement en l'absence de SLO-2, (ii) avec un milieu intracellulaire pauvre en calcium et en chlore, comme c'est le cas pour la plupart des milieux intracellulaires physiologiques, le courant potassique enregistré sur les mutants nuls *slo-2* n'est pas plus faible que celui observé sur les animaux sauvages et (iii) l'activité de SLO-2 que nous avons enregistrée en configuration cellule-attachée est probablement anormalement forte étant donné que nous avons travaillé avec un bain extracellulaire riche en chlorure de potassium, susceptible d'entraîner une augmentation significative de la concentration intracellulaire en chlore. Ces trois observations remettent alors en question la contribution réelle de SLO-2 lors d'une activation des cellules musculaires dans des conditions standard. En revanche, dans certaines conditions environnementales, les canaux SLO-2 semblent jouer un rôle important. Les travaux de Yuan *et al.* (2003) ont en effet montré qu'en situation d'hypoxie, les mutants nuls sur SLO-2 survivaient significativement moins bien que les animaux sauvages. Dans la même étude les auteurs ont établi que les canaux homologues à SLO-2 chez les Mammifères, comme r-SLACK (appelé aussi r-SLO-2) chez le Rat, correspondent aux canaux responsables du courant potassique activé par le sodium intracellulaire, connu depuis plusieurs années mais dont le support moléculaire était encore indéterminé. Le rôle de ce courant chez les Mammifères est encore débattu mais la plupart des auteurs s'accordent sur une participation de ce courant uniquement dans des conditions hypoxiques ou ischémiques (voir pour revue

Dryer, 1994). Chez le Nématode, les canaux SLO-2 pourraient ainsi avoir un rôle similaire et n'être mobilisés qu'en cas de stress hypoxique. Cette conductance importante, rapidement activable, permettrait alors à l'animal de s'adapter très rapidement au changement environnemental et de le préserver du stress hypoxique en diminuant son activité générale. La conductance SLO-2 constituerait alors une conductance dite "de réserve".

L'hypothèse des conductances de réserve a été pour la première fois formulée par Cook *et al.* (1988) concernant le rôle des canaux potassiques sensibles à l'ATP et appliquée aux canaux potassiques de *C. elegans* par Santi *et al.* (2003). Cette hypothèse propose que dans une cellule excitable il existe un certain nombre de canaux ioniques, actifs dans les conditions de base et appelés les canaux "de ménage", qui seraient responsables de l'excitabilité membranaire de base, auxquels s'ajoutent d'autres canaux, dits "de réserve", mobilisés uniquement dans certaines conditions environnementales et impliqués dans la réponse adaptative de l'animal à son environnement. Etant donné son mode de vie libre, *C. elegans* est un animal susceptible de rencontrer différents environnements, auxquels il doit être capable de s'adapter. Cette adaptation pourrait alors passer par des activations de canaux de réserve, en particulier potassiques, comme SLO-2 dans les conditions hypoxiques ou TWK-18 avec l'élévation de température. Le nombre important de canaux potassiques potentiels chez *C. elegans*, associé au fait que les mutants nuls sur la plupart des gènes codant ces canaux n'ont pas de phénotype dans les conditions standard de culture, soutient cette hypothèse.

Le canal SLO-1 pourrait également être l'un de ces canaux de réserve, au moins dans les cellules musculaires striées de *C. elegans* dans lesquelles nous avons montré qu'il ne participe pas à l'établissement du courant global. En revanche, dans les neurones de cet animal, une étude récente menée *in situ* a mis en évidence que le canal SLO-1 était actif dans les conditions de base (Davies *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que la conductance unitaire de SLO-1 indiquée dans cette étude, 51 et 38 pS respectivement en gradient de potassium symétrique et physiologique, est proche de la valeur que nous avons trouvée en la calculant comme explicité dans les résultats supplémentaires de l'étude 2 (autour de 40 pS en gradient de potassium physiologique), et en revanche assez éloignée de celle qui avait été donnée après expression hétérologue de SLO-1 dans les œufs de Xénope (250 pS en gradient de potassium symétrique). Cette différence peut s'expliquer par la présence de sous-unités régulatrices *in situ*, absentes en expression hétérologue, ou alors par la formation éventuelle d'hétérotétramères SLO-1/SLO-2, hypothèse qui nous paraît peu probable étant donné que nous avons trouvé sur les mutants nuls *slo-2* la même conductance unitaire pour SLO-1 que chez les animaux sauvages (résultats non illustrés).

III. Une activation des cellules musculaires par l'étirement membranaire ?

La dernière partie de mon travail de thèse a consisté en l'étude *in situ* des courants sodiques sensibles à l'amiloride présents dans les cellules musculaires striées de *C. elegans*. Dans un premier temps, nous avons étudié les propriétés de UNC-105, seule dégénérine dont l'expression a été jusqu'à présent mise en évidence dans ces cellules. Nous avons montré que (i) le canal formé par UNC-105 est probablement silencieux dans les cellules musculaires au repos, (ii) la mutation gain-de-fonction *unc-105(n506)* entraîne une activation constitutive du canal UNC-105, responsable d'une dépolarisation permanente des cellules musculaires exprimant ces canaux mutés et probablement à l'origine du phénotype hypercontracté des animaux mutants, et (iii) le canal UNC-105 interagit avec le collagène de la matrice extracellulaire LET-2, mais, malgré cette interaction, il ne s'ouvre pas en réponse à l'application de contraintes mécaniques.

Les résultats électrophysiologiques que nous avons obtenus *in situ* vont ainsi à l'encontre de l'hypothèse génétique qui propose que UNC-105 forme un canal ionique, localisé au cœur d'un complexe multiprotéique mécanotransducteur, qui s'ouvrirait sous l'effet de l'étirement membranaire provoqué lors de la contraction et qui pourrait ainsi favoriser la propagation de l'onde de contraction le long du corps de l'animal (Liu *et al.*, 1996). Même si nous ne pouvons pas totalement exclure la possibilité d'une altération de la préparation du fait de la dissection, la validité de nos résultats s'appuie sur (i) le nombre de cellules testées, (ii) l'utilisation de différents stimuli mécaniques, (iii) le degré important de déformation des cellules musculaires observée, (iv) le maintien de l'association étroite entre la cuticule et les cellules musculaires, (v) la conservation du lien entre UNC-105 et le collagène LET-2 de la matrice extracellulaire et (vi) la capacité d'obtenir une réponse cellulaire aux contraintes mécaniques, mais non sensible à l'amiloride (voir figure 2 de l'étude 3 dans la section "Résultats").

L'absence d'activation du canal UNC-105 sous l'effet de contraintes mécaniques ne remet pas forcément en cause que les autres dégénérines puissent y être sensibles. UNC-105 étant la plus ancestrale des dégénérines jusque-là caractérisées, il peut être imaginé par exemple que la mécanosensibilité n'ait été acquise qu'après la divergence entre UNC-105 et les autres dégénérines. Il est également possible que l'absence d'activation de UNC-105 en réponse aux contraintes mécaniques soit généralisable aux autres membres de la famille. En effet, il faut noter que l'ensemble des travaux réalisés à ce jour, qui concernent particulièrement MEC-4 et son rôle dans la sensibilité mécanique des neurones du toucher, n'a fait que démontrer la

nécessité de la présence des dégénéérines pour avoir une réponse cellulaire à l'application de stimuli mécaniques, mais n'a jamais donné directement d'indices que cette sensibilité passe par l'ouverture des canaux formés par les dégénéérines. La réalité physiologique de l'activation mécanique de MEC-4 devrait bientôt être confirmée ou infirmée puisque cette protéine fait actuellement l'objet d'une étude électrophysiologique, menée *in situ* sur les neurones du toucher. Les résultats préliminaires obtenus ont montré qu'un courant entrant sodique s'activait en réponse à l'application de stimuli mécaniques sur le corps de l'animal et que ce courant était absent sur les mutants nul *mec-4*. La sensibilité de ce courant à l'amiloride reste cependant encore à confirmer (O'Hagan *et al.*, International *C. elegans* Meeting 2003).

L'absence d'activation du canal UNC-105 sous l'effet de contraintes mécaniques ne remet pas non plus forcément en cause l'hypothèse d'une contraction musculaire propagée de proche en proche du fait de la sensibilité mécanique des cellules musculaires. D'autres canaux présents sur la membrane des cellules musculaires, comme le laisse présager la figure 2 de l'étude 3, pourraient être à l'origine de cette activation mécanique.

Concernant le mode d'activation de UNC-105, deux possibilités sont envisageables : (i) UNC-105 ne se comporte pas physiologiquement comme un canal ionique dans les cellules musculaires striées d'animaux sauvages et, étant donné sa nature transmembranaire et son interaction avec le collagène de la matrice extracellulaire LET-2, il pourrait alors par exemple intervenir au sein d'un complexe protéique participant à l'ancrage des cellules musculaires, ou (ii) ce canal s'active sous l'effet d'un stimulus, mais dont la nature est encore inconnue. L'étude 4 portant sur les effets de l'acidification extracellulaire sur les cellules musculaires de la paroi du corps de *C. elegans* n'exclut pas par exemple une contribution éventuelle de UNC-105 à la réponse cellulaire activée par le pH acide et sensible à l'amiloride.

Cette même étude montre en revanche clairement qu'il existe au moins un autre ASC fonctionnel, sensible à l'acidification extracellulaire, dans les cellules musculaires striées de *C. elegans*. Vu le nombre important de gènes codant des ASCs chez *C. elegans*, ce résultat était prévisible, même si des études préliminaires sur le profil d'expression de ces gènes indiquent que la plupart des ASCs seraient neuronaux (Goodman & Schwarz, 2003). L'appartenance des ASCs de *C. elegans* à cinq familles différentes laisse présager que ces canaux puissent être activés par différents stimuli. Deux de ces ASCs font en particulier partie de la même famille que les ASICs (voir le matériel supplémentaire de Goodman & Schwarz, <http://arjournals.annualreviews.org/article/suppl/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142659?file=goods1.pdf>) et pourraient alors correspondre aux canaux activés par l'acidification extracellulaire mis en évidence dans notre étude. La confirmation de cette hypothèse nécessite

maintenant (i) de générer des mutants sur les différents ASCs candidats et (ii) d'enregistrer le courant ionique développé dans leurs cellules musculaires en réponse à l'acidification extracellulaire.

En conclusion, la richesse du modèle animal *C. elegans* tenait jusqu'à présent en la possibilité illimitée de générer des mutants, presque toujours viables même à l'âge adulte vu les besoins restreints nécessaires à la survie de ces animaux, et en la rapidité de l'identification des gènes à l'origine des défauts phénotypiques observés chez ces mutants. Son principal point faible résidait en la quasi-absence de caractérisations fonctionnelles à l'échelle cellulaire des mutants générés. Le développement actuel d'approches fonctionnelles sur cet organisme, comme les enregistrements électrophysiologiques réalisés *in situ* sur les neurones ou les cellules musculaires, est en passe d'éliminer ce point faible, et laisse alors entrevoir de nouvelles possibilités pour l'utilisation de *C. elegans* dans la compréhension de phénomènes biologiques conservés pour l'ensemble des Métazoaires. Avec la possibilité de couplage entre les approches génétiques et électrophysiologiques, *C. elegans* est maintenant par exemple un modèle de choix pour l'étude des complexes multiprotéiques membranaires faisant intervenir des canaux ioniques. Il devient en effet tout à fait envisageable chez cet organisme, contrairement aux Vertébrés, de muter un à un, et de façon ciblée, les différents partenaires protéiques du complexe, pour déterminer leur rôle et leur participation dans le fonctionnement global de l'ensemble.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES
(256 titres)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES (256 titres)

- Abbott G.W. & Goldstein S.A. (2001) Potassium Channel Subunits: The MiRP Family. *Mol. Interv.* **1**, 95-107.
- Adams C.M., Anderson M.G., Motto D.G., Price M.P., Johnson W.A. & Welsh M.J. (1998a) Ripped pocket and Pickpocket, novel *Drosophila* DEG/ENaC subunits expressed in early development and in mechanosensory neurons. *J. Cell Biol.* **140**, 143-152.
- Adams C.M., Snyder P.M., Price M.P. & Welsh M.J. (1998b) Protons activate brain Na⁺ channel 1 by inducing a conformational change that exposes a residue associated with neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* **273**, 30204-30207.
- Ankeny R.A. (2001) The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 474-479.
- Ashcroft M.A. (2000) Voltage-gated Ca²⁺ channels in "Ion channels and disease" (Ashcroft) Academic Press, London, UK. pp. 161-183.
- Atkinson N.S., Robertson G.A. & Ganetzky B. (1991) A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. *Science* **253**, 551-555.
- Attwell D. & Wilson M. (1980) Behaviour of the rod network in the tiger salamander retina mediated by membrane properties of individual rods. *J. Physiol.* **309**, 287-315.
- Avery L. (1993) The genetics of feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **133**, 897-917.
- Avery L., Raizen D. & Lockery S. (1995) Electrophysiological methods. *Methods Cell Biol.* **48**, 251-269.
- Awayda M.S., Ismailov I.I., Berdiev B.K. & Benos D.J. (1995) A cloned renal epithelial Na⁺ channel protein displays stretch activation in planar lipid bilayers. *Am. J. Physiol.* **268**, C1450-C1459.
- Awayda M.S. & Subramanyam M. (1998) Regulation of the epithelial Na⁺ channel by membrane tension. *J. Gen. Physiol.* **112**, 97-111.
- Bamber B.A., Beg A.A., Twyman R.E. & Jorgensen E.M. (1999) The *Caenorhabditis elegans unc-49* locus encodes multiple subunits of a heteromultimeric GABA receptor. *J. Neurosci.* **19**, 5348-5359.
- Bargmann C.I. (1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* **282**, 2028-2033.
- Barstead R.J., Kleiman L. & Waterston R.H. (1991) Cloning, sequencing, and mapping of an alpha-actinin gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **20**, 69-78.
- Barstead R.J. & Waterston R.H. (1989) The basal component of the nematode dense-body is vinculin. *J. Biol. Chem.* **264**, 10177-10185.
- Bauer C.K. & Schwarz J.R. (2001) Physiology of EAG K⁺ channels. *J. Membr. Biol.* **182**, 1-15.
- Baylis H.A., Furuichi T., Yoshikawa F., Mikoshiba K. & Sattelle D.B. (1999) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are strongly expressed in the nervous system, pharynx, intestine, gonad and excretory cell of *Caenorhabditis elegans* and are encoded by a single gene (*itr-1*). *J. Mol. Biol.* **294**, 467-476.
- Benian G.M., Tinley T.L., Tang X. & Borodovsky M. (1996) The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-89*, required for muscle M-line assembly, encodes a giant modular protein composed of Ig and signal transduction domains. *J. Cell Biol.* **132**, 835-848.
- Bercher M., Wahl J., Vogel B.E., Lu C., Hedgecock E.M., Hall D.H. & Plenefisch J.D. (2001) *mua-3*, a gene required for mechanical tissue integrity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a novel transmembrane protein of epithelial attachment complexes. *J. Cell Biol.* **154**, 415-426.
- Berdiev B.K., Prat A.G., Cantiello H.F., Ausiello D.A., Fuller C.M., Jovov B., Benos D.J., Ismailov I.I. (1996) Regulation of epithelial sodium channels by short actin filaments. *J. Biol. Chem.* **271**, 17704-17710.
- Berg A.A. & Jorgensen E.M. (2003) EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nat. Neurosci.* **6**, 1145-1152.
- Berridge M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325.
- Bianchi L., Kwok S.M., Driscoll M. & Sesti F. (2003) A potassium channel-MiRP complex controls neurosensory function in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **278**, 12415-12424.

- Bliss T.V. & Collingridge G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31-39.
- Bond C.T., Maylie J. & Adelman J.P. (1999) Small-conductance calcium-activated potassium channels. *Ann. NY Acad. Sci.* **868**, 370-378.
- Bosher J.M., Hahn B.S., Legouis R., Sookhareea S., Weimer R.M., Gansmuller A., Chisholm A.D., Rose A.M., Bessereau J.L. & Labouesse M. (2003) The *Caenorhabditis elegans vab-10* spectraplakins isoforms protect the epidermis against internal and external forces. *J. Cell Biol.* **161**, 757-768.
- Brading A.F. & Caldwell P.C. (1971) The resting membrane potential of the somatic muscle cells of *Ascaris lumbricoides*. *J. Physiol.* **217**, 605-624.
- Brakebusch C. & Fässler R. (2003) The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J.* **22**, 2324-2333.
- Brenner S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Brezina V., Evans C.G. & Weiss K.R. (1994) Characterization of the membrane ion currents of a model molluscan muscle, the accessory radula closer muscle of *Aplysia californica*. III. Depolarization-activated Ca current. *J. Neurophysiol.* **71**, 2126-2138.
- Broadie K.S. & Richmond J.E. (2002) Establishing and sculpting the synapse in *Drosophila* and *C. elegans*. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**, 491-498.
- Brockie P.J., Mellem J.E., Hills T., Madsen D.M. & Maricq A.V. (2001) The *C. elegans* glutamate receptor subunit NMR-1 is required for slow NMDA-activated currents that regulate reversal frequency during locomotion. *Neuron* **31**, 617-630.
- Burridge K. & Chrzanowska-Wodnicka M. (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 463-518.
- Butler A., Tsunoda S., McCobb D.P., Wei A. & Salkoff L. (1993) mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* **261**, 221-224.
- Canessa C.M., Horisberger J.D. & Rossier B.C. (1993) Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* **361**, 467-470.
- Carter T.D., Chen X.Y., Carlile G., Kalapothakis E., Ogden D. & Evans W.H. (1996) Porcine aortic endothelial gap junctions: identification and permeation by caged InsP₃. *J. Cell Sci.* **109**, 1765-1773.
- C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-2018.
- Chalfie M. & Au M. (1989) Genetic control of differentiation of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *Science* **243**, 1027-1033.
- Chalfie M. & Sulston J. (1981) Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **82**, 358-370.
- Chalfie M. & Wolinsky E. (1990) The identification and suppression of inherited neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **345**, 410-416.
- Champigny G., Voilley N., Waldmann R. & Lazdunski M. (1998) Mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* drastically alter the pH sensitivity and inactivation of the mammalian H⁺-gated Na⁺ channel MDEG1. *J. Biol. Chem.* **273**, 15418-15422.
- Chang S.S. *et al.* (1996) Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat. Genet.* **12**, 248-253.
- Chelur D.S., Ernstrom G.G., Goodman M.B., Yao C.A., Chen L., O' Hagan R. & Chalfie M. (2002) The mechanosensory protein MEC-6 is a subunit of the *C. elegans* touch-cell degenerin channel. *Nature* **420**, 669-673.
- Chen C.C., Zimmer A., Sun W.H., Hall J., Brownstein M.J. & Zimmer A. (2002) A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8992-8997.
- Chitwood B.G. & Chitwood M.B. (1974) Introduction to nematology. University Park Press, Baltimore, Maryland.

- Christensen M., Estevez A., Yin X., Fox R., Morrison R., McDonnell M., Gleason C., Miller D.M. & Strange K. (2002) A primary culture system for functional analysis of *C. elegans* neurons and muscle cells. *Neuron* **33**, 503-514.
- Clandinin T.R., DeModena J.A. & Sternberg P.W. (1998) Inositol trisphosphate mediates a RAS-independent response to LET-23 receptor tyrosine kinase activation in *C. elegans*. *Cell* **92**, 523-533.
- Colbert H.A., Smith T.L. & Bargmann C.I. (1997) OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **17**, 8259-8269.
- Cook D.L., Satin L.S., Ashford M.L. & Hales C.N. (1988) ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells. Spare-channel hypothesis. *Diabetes* **37**, 495-498.
- Coscoy S., Lingueglia E., Lazdunski M. & Barbry P. (1998) The Phe-Met-Arg-Phe-amide-activated sodium channel is a tetramer. *J. Biol. Chem.* **273**, 8317-8322.
- Coscoy S., de Weille J.R., Lingueglia E. & Lazdunski M. (1999) The pre-transmembrane 1 domain of acid-sensing ion channels participates in the ion pore. *J. Biol. Chem.* **274**, 10129-10132.
- Cosens D.J. & Manning A. (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* **224**, 285-287.
- Cottrell G.A. (1993) The wide range of actions of the FMRFamide-related peptides and the biological importance of peptidergic messengers. *EXS* **63**, 279-85.
- Cox G.N., Kusch M. & Edgar R.S. (1981) The cuticle of *Caenorhabditis elegans* : its isolation and partial characterization. *J. Cell Biol.* **90**, 7-17.
- Dal Santo P., Logan M.A., Chisholm A.D. & Jorgensen E.M. (1999) The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in *C. elegans*. *Cell* **98**, 757-767.
- Darboux I., Lingueglia E., Champigny G., Coscoy S., Barbry P. & Lazdunski M. (1998) dGNaCl, a gonad-specific amiloride-sensitive Na⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **273**, 9424-9429.
- Davies A.G., Pierce-Shimomura J.T., Kim H., VanHoven M.K., Thiele T.R., Bonci A., Bargmann C.I. & McIntire S.L. (2003) A central role of the BK potassium channel in behavioral responses to ethanol in *C. elegans*. *Cell* **15**, 655-666.
- Davis M.W., Fleischhauer R., Dent J.A., Joho R.H. & Avery L. (1999) A mutation in the *C. elegans* EXP-2 potassium channel that alters feeding behavior. *Science* **286**, 2501-2504.
- Davis M.W., Somerville D., Lee R.Y., Lockery S., Avery L. & Fambrough D.M. (1995) Mutations in the *Caenorhabditis elegans* Na,K-ATPase alpha-subunit gene, *eat-6*, disrupt excitable cell function. *J. Neurosci.* **15**, 8408-8418.
- De Bell J.T., Del Castillo J. & Sanchez V. (1963) Electrophysiology of the somatic muscle cells of *Ascaris lumbricoides*. *J. Cell Comp. Physiol.* **62**, 159-178.
- Dent J.A., Davis M.W. & Avery L. (1997) *avr-15* encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **16**, 5867-5879.
- Dodemont H., Riemer D., Ledger N. & Weber K. (1994) Eight genes and alternative RNA processing pathways generate an unexpectedly large diversity of cytoplasmic intermediate filament proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **13**, 2625-2638.
- Doi M. & Iwasaki K. (2002) Regulation of retrograde signaling at neuromuscular junctions by the novel C2 domain protein AEX-1. *Neuron* **33**, 249-259.
- Dolly J.O. & Parcej D.N. (1996) Molecular properties of voltage-gated K⁺ channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 231-253.
- Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
- Driscoll M. & Chalfie M. (1991) The *mec-4* gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature* **349**, 588-593.

- Dryer S.E. (1994) Na(+)-activated K⁺ channels: a new family of large-conductance ion channels. *Trends Neurosci.* **17**, 155-160.
- Du H., Gu G., William C.M. & Chalfie M. (1996) Extracellular proteins needed for *C. elegans* mechanosensation. *Neuron* **16**, 183-194.
- Elkes D.A., Cardozo D.L., Madison J. & Kaplan J.M. (1997) EGL-36 Shaw channels regulate *C. elegans* egg-laying muscle activity. *Neuron* **19**, 165-174.
- Estevez M., Estevez A.O., Cowie R.H. & Gardner K.L. (2004) The voltage-gated calcium channel UNC-2 is involved in stress-mediated regulation of tryptophan hydroxylase. *J. Neurochem.* **88**, 102-113.
- Fares H. & Greenwald I. (2001) Genetic analysis of endocytosis in *Caenorhabditis elegans*: coelomocyte uptake defective mutants. *Genetics* **159**, 133-145.
- Firsov D., Gautschi I., Merillat A.M., Rossier B.C. & Schild L. (1998) The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J.* **17**, 344-352.
- Firsov D., Robert-Nicoud M., Gruender S., Schild L. & Rossier B.C. (1999) Mutational analysis of cysteine-rich domains of the epithelium sodium channel (ENaC). Identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface. *J. Biol. Chem.* **274**, 2743-2749.
- Fleischhauer R., Davis M.W., Dzhura I., Neely A., Avery L. & Joho R.H. (2000) Ultrafast inactivation causes inward rectification in a voltage-gated K(+) channel from *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **20**, 511-520.
- Fleming J.T., Squire M.D., Barnes T.M., Tornoe C., Matsuda K., Ahnn J., Fire A., Sulston J.E., Barnard E.A., Sattelle D.B. & Lewis J.A. (1997) *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *J. Neurosci.* **17**, 5843-5857.
- Francis G.R. & Waterston R.H. (1985) Muscle organization in *Caenorhabditis elegans*: localization of proteins implicated in thin filament attachment and I-band organization. *J. Cell Biol.* **101**, 1532-1549.
- Francis G.R. & Waterston R.H. (1991) Muscle cell attachment in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **114**, 465-479.
- Franks C.J., Pemberton D., Vinogradova I., Cook A., Walker R.J. & Holden-Dye L. (2002) Ionic basis of the resting membrane potential and action potential in the pharyngeal muscle of *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurophysiol.* **87**, 954-961.
- French A.S. (1992) Mechanotransduction. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 135-152.
- Fukushige T., Siddiqui Z.K., Chou M., Culotti J.G., Gogonea C.B., Siddiqui S.S. & Hamelin M. (1999) MEC-12, an alpha-tubulin required for touch sensitivity in *C. elegans*. *J. Cell Sci.* **112**, 395-403.
- Garcia-Anoveros J., Garcia J.A., Liu J.D. & Corey D.P. (1998) The nematode degenerin UNC-105 forms ion channels that are activated by degeneration- or hypercontraction-causing mutations. *Neuron* **20**, 1231-1241.
- Garcia-Anoveros J., Ma C. & Chalfie M. (1995) Regulation of *Caenorhabditis elegans* degenerin proteins by a putative extracellular domain. *Curr. Biol.* **5**, 441-448.
- Garcia L.R. & Sternberg P.W. (2003) *Caenorhabditis elegans* UNC-103 ERG-like potassium channel regulates contractile behaviors of sex muscles in males before and during mating. *J. Neurosci.* **23**, 2696-2705.
- Gettner S.N., Kenyon C. & Reichardt L.F. (1995) Characterization of beta *pat-3* heterodimers, a family of essential integrin receptors in *C. elegans*. *J. Cell Biol.* **129**, 1127-1141.
- Goldmakher G.V. & Moss R.L. (2000) A subset of periglomerular neurons in the rat accessory olfactory bulb may be excited by GABA through a Na(+)-dependent mechanism. *Brain Res.* **871**, 7-15.
- Goodman M.B., Ernstrom G.G., Chelur D.S., O'Hagan R., Yao C.A. & Chalfie M. (2002) MEC-2 regulates *C. elegans* DEG/ENaC channels needed for mechanosensation. *Nature* **415**, 1039-1042.
- Goodman M.B., Hall D.H., Avery L. & Lockery S.R. (1998) Active currents regulate sensitivity and dynamic range in *C. elegans* neurons. *Neuron* **20**, 763-772.
- Goodman M.B. & Schwarz E.M. (2003) Transducing touch in *Caenorhabditis elegans*. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 429-452.
- Gower N.J., Temple G.R., Schein J.E., Marra M., Walker D.S. & Baylis H.A. (2001) Dissection of the promoter region of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gene, *itr-1*, in *C. elegans*: a molecular basis for cell-specific expression of IP3R isoforms. *J. Mol. Biol.* **306**, 145-157.

- Grabner M., Wang Z., Hering S., Striessnig J. & Glossmann H. (1996) Transfer of 1,4-dihydropyridine sensitivity from L-type to class A (BI) calcium channels. *Neuron* **16**, 207-218.
- Greenwald I.S. & Horvitz H.R. (1980) *unc-93(e1500)*: A behavioral mutant of *Caenorhabditis elegans* that defines a gene with a wild-type null phenotype. *Genetics* **96**, 147-164.
- Greenwald I.S. & Horvitz H.R. (1986) A visible allele of the muscle gene *sup-10X* of *C. elegans*. *Genetics* **113**, 63-72.
- Grunder S., Firsov D., Chang S.S., Jaeger N.F., Gautschi I., Schild L., Lifton R.P. & Rossier B.C. (1997) A mutation causing pseudohypoaldosteronism type 1 identifies a conserved glycine that is involved in the gating of the epithelial sodium channel. *EMBO J.* **16**, 899-907.
- Gu G., Caldwell G.A. & Chalfie M. (1996) Genetic interactions affecting touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6577-6582.
- Guo X.D. & Kramer J.M. (1989) The two *Caenorhabditis elegans* basement membrane (type IV) collagen genes are located on separate chromosomes. *J. Biol. Chem.* **264**, 17574-17582.
- Györke S. & Palade P. (1992) Calcium-induced calcium release in crayfish skeletal muscle. *J. Physiol.* **457**, 195-210.
- Hagiwara S. & Byerly L. (1981) Calcium channel. *Annu. Rev. Neurosci.* **4**, 69-125.
- Hahn B.S. & Labouesse M. (2001) Tissue integrity: hemidesmosomes and resistance to stress. *Curr. Biol.* **11**, R858-861.
- Hall D.H., Gu G., Garcia-Anoveros J., Gong L., Chalfie M. & Driscoll M. (1997) Neuropathology of degenerative cell death in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **17**, 1033-1045.
- Hamada T., Sakube Y., Ahnn J., Kim do H. & Kagawa H. (2002) Molecular dissection, tissue localization and Ca²⁺ binding of the ryanodine receptor of *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* **324**, 123-135.
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B. & Sigworth F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**, 85-100.
- Hamming K., Thacker C. & Snutch T. Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Class of Voltage-Gated Ion Channel. *International C. elegans Meeting 2003*, University of California, Los Angeles, **9**.
- Hanlon M.R. & Wallace B.A. (2002) Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits. *Biochemistry* **41**, 2886-2894.
- Hapiak V., Hresko M.C., Schriefer L.A., Saiyasisongkhram K., Bercher M. & Plenefisch J. (2003) *mua-6*, a gene required for tissue integrity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a cytoplasmic intermediate filament. *Dev. Biol.* **263**, 330-342.
- Hardie R.C. & Minke B. (1995) Phosphoinositide-mediated phototransduction in Drosophila photoreceptors: the role of Ca²⁺ and trp. *Cell Calcium* **18**, 256-274.
- Harris H.E., Tso M.Y. & Epstein H.F. (1977) Actin and myosin-linked calcium regulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Biochemical and structural properties of native filaments and purified proteins. *Biochemistry* **16**, 859-865.
- Harteneck C., Plant T.D. & Schultz G. (2000) From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.* **23**, 159-166.
- Heginbotham L., Lu Z., Abramson T. & MacKinnon R. (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* **66**, 1061-1067.
- Hille B. (1992) Potassium channels and chloride channels in "Ionic Channels of Excitable Membrane" (Hille, 2nd eds) Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts. pp. 115-139.
- Hobert O., Moerman D.G., Clark K.A., Beckerle M.C. & Ruvkun G. (1999) A conserved LIM protein that affects muscular adherens junction integrity and mechanosensory function in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **144**, 45-57.
- Hong K. & Driscoll M. (1994) A transmembrane domain of the putative channel subunit MEC-4 influences mechanotransduction and neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature* **367**, 470-473.
- Hong K., Mano I, Driscoll M. (2000) In vivo structure-function analyses of *Caenorhabditis elegans* MEC-4, a candidate mechanosensory ion channel subunit. *J. Neurosci.* **20**, 2575-2588.

- Hong L., Elbl T., Ward J., Franzini-Armstrong C., Rybicka K.K., Gatewood B.K., Baillie D.L. & Bucher E.A. (2001) MUP-4 is a novel transmembrane protein with functions in epithelial cell adhesion in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **154**, 403-414.
- Hresko M.C., Schriefer L.A., Shrimankar P. & Waterston R.H. (1999) Myotactin, a novel hypodermal protein involved in muscle-cell adhesion in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **146**, 659-672.
- Hresko M.C., Williams B.D. & Waterston R.H. (1994) Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **124**, 491-506.
- Huang M. & Chalfie M. (1994) Gene interactions affecting mechanosensory transduction in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **367**, 467-470.
- Huang M., Gu G., Ferguson E.L. & Chalfie M. (1995) A stomatin-like protein necessary for mechanosensation in *C. elegans*. *Nature* **378**, 292-295.
- Ismailov I.I., Berdiev B.K., Shlyonsky V.G. & Benos D.J. (1997) Mechanosensitivity of an epithelial Na⁺ channel in planar lipid bilayers: release from Ca²⁺ block. *Biophys. J.* **72**, 1182-1192.
- Iwasaki K., Liu D.W. & Thomas J.H. (1995) Genes that control a temperature-compensated ultradian clock in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10317-10321.
- Jensen B.S., Strobaek D., Olesen S.P. & Christophersen P. (2001) The Ca²⁺-activated K⁺ channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? *Curr. Drug Targets* **2**, 401-422.
- Jeziorski M.C., Greenberg R.M. & Anderson P.A. (2000) The molecular biology of invertebrate voltage-gated Ca(2+) channels. *J. Exp. Biol.* **203**, 841-856.
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B.T. & MacKinnon R. (2003a) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**, 33-41.
- Jiang Y., Ruta V., Chen J., Lee A. & MacKinnon R. (2003b) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**, 42-48.
- Johnstone D.B., Wei A., Butler A., Salkoff L. & Thomas J.H. (1997) Behavioral defects in *C. elegans egl-36* mutants result from potassium channels shifted in voltage-dependence of activation. *Neuron* **19**, 151-164.
- Joiner W.J., Tang M.D., Wang L.Y., Dworetzky S.I., Boissard C.G., Gan L., Gribkoff V.K. & Kaczmarek L.K. (1998) Formation of intermediate-conductance calcium-activated potassium channels by interaction of Slack and Slo subunits. *Nat. Neurosci.* **1**, 462-469.
- Jorgensen E.M. & Nonet M.L. (1995) Neuromuscular junctions in the nematode *C. elegans*. *Semin. Dev. Biol.* **6**, 207-220.
- Kang S.H. & Kramer J.M. (2000) Nidogen is nonessential and not required for normal type IV collagen localization in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3911-3923.
- Kaplan W.D. & Trout W.E. (1969) The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*. *Genetics* **61**, 399-409.
- Karabinos A., Schmidt H., Harborth J., Schnabel R. & Weber K. (2001) Essential roles for four cytoplasmic intermediate filament proteins in *Caenorhabditis elegans* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7863-7868.
- Katsura I., Kondo K., Amano T., Ishihara T. & Kawakami M. (1994) Isolation, characterization and epistasis of fluoride-resistant mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **136**, 145-154.
- Kellenberger S. & Schild L. (2002) Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol. Rev.* **82**, 735-767.
- Kerr R., Lev-Ram V., Baird G., Vincent P., Tsien R.Y. & Schafer W.R. (2000) Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron* **26**, 583-594.
- Khatchaturians A., Lewis A., Rothman Z., Loew L. & Treinin M. (2000) GFP is a selective non-linear optical sensor of electrophysiological processes in *Caenorhabditis elegans*. *Biophys. J.* **79**, 2345-2352.
- Kim Y.K., Valdivia H.H., Maryon E.B., Anderson P. & Coronado R. (1992) High molecular weight proteins in the nematode *C. elegans* bind [3H]ryanodine and form a large conductance channel. *Biophys. J.* **63**, 1379-1384.

- Kits K.S. & Mansvelder H.D. (1996) Voltage gated calcium channels in molluscs: classification, Ca²⁺ dependent inactivation, modulation and functional roles. *Invert. Neurosci.* **2**, 9-34.
- Krishtal O. (2003) The ASICs: signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci.* **26**, 477-483.
- Kunkel M.T., Johnstone D.B., Thomas J.H. & Salkoff L. (2000) Mutants of a temperature-sensitive two-P domain potassium channel. *J. Neurosci.* **20**, 7517-7524.
- Labouesse M. (2003) *Caenorhabditis elegans*. *M/S : Médecine sciences* **19**, 1171-1172.
- Lamb G.D. (2000) Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **27**, 216-224.
- Lee J.H., Cribbs L.L. & Perez-Reyes E. (1999) Cloning of a novel four repeat protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *FEBS Lett.* **445**, 231-236.
- Lee R.Y., Lobel L., Hengartner M., Horvitz H.R. & Avery L. (1997) Mutations in the alpha1 subunit of an L-type voltage-activated Ca²⁺ channel cause myotonia in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **16**, 6066-6076.
- Lesage F. & Lazdunski M. (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**, F793-F801.
- Levin J.Z. & Horvitz H.R. (1992) The *Caenorhabditis elegans unc-93* gene encodes a putative transmembrane protein that regulates muscle contraction. *J. Cell Biol.* **117**, 143-155.
- Levin J.Z. & Horvitz H.R. (1993) Three new classes of mutations in the *Caenorhabditis elegans* muscle gene *sup-9*. *Genetics* **135**, 53-70.
- Lewis J.A., Wu C.H., Levine J.H. & Berg H. (1980) Levamisole-resistant mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* appear to lack pharmacological acetylcholine receptors. *Neuroscience* **5**, 967-989.
- Lin X., Qadota H., Moerman D.G. & Williams B.D. (2003) *C. elegans* PAT-6/actopaxin plays a critical role in the assembly of integrin adhesion complexes in vivo. *Curr. Biol.* **13**, 922-932.
- Lingueglia E., Champigny G., Lazdunski M. & Barbry P. (1995) Cloning of the amiloride-sensitive FMRamide peptide-gated sodium channel. *Nature* **378**, 730-733.
- Liu D.W. & Thomas J.H. (1994) Regulation of a periodic motor program in *C. elegans*. *J. Neurosci.* **14**, 1953-1962.
- Liu J., Schrank B. & Waterston R.H. (1996) Interaction between a putative mechanosensory membrane channel and a collagen. *Science* **273**, 361-364.
- Ma H.P., Li L., Zhou Z.H., Eaton D.C. & Warnock D.G. (2002) ATP masks stretch activation of epithelial sodium channels in A6 distal nephron cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **282**, F501-F505.
- Mackenzie J.M. & Epstein H.F. (1980) Paramyosin is necessary for determination of nematode thick filament length in vivo. *Cell* **22**, 747-755.
- Mackinnon A.C., Qadota H., Norman K.R., Moerman D.G. & Williams B.D. (2002) *C. elegans* PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr. Biol.* **12**, 787-797.
- Magleby K.L. (2003) Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J. Gen. Physiol.* **121**, 81-96.
- Maingret François (Thèse 2001) Les canaux potassiques à deux domaines P: caractérisation électrophysiologique de la famille des canaux mécanosensibles activés par les lipides. Université de Nice Sophia-Antipolis.
- Martin R.J., Pennington A.J., Duittoz A.H., Robertson S. & Kusel J.R. (1991) The physiology and pharmacology of neuromuscular transmission in the nematode parasite, *Ascaris suum*. *Parasitology* **102**, S41-S48.
- Martin R.J., Thorn P., Gration K.A. & Harrow I.D. (1992) Voltage-activated currents in somatic muscle of the nematode parasite *Ascaris suum*. *J. Exp. Biol.* **173**, 75-90.
- Maryon E.B., Coronado R. & Anderson P. (1996) *unc-68* encodes a ryanodine receptor involved in regulating *C. elegans* body-wall muscle contraction. *J. Cell Biol.* **134**, 885-893.
- Maryon E.B., Saari B. & Anderson P. (1998) Muscle-specific functions of ryanodine receptor channels in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Sci.* **111**, 2885-2895.

- Mathews E.A., Garcia E., Santi C.M., Mullen G.P., Thacker C., Moerman D.G & Snutch TP. (2003) Critical residues of the *Caenorhabditis elegans unc-2* voltage-gated calcium channel that affect behavioral and physiological properties. *J. Neurosci.* **23**, 6537-6545.
- McIntire S.L., Jorgensen E. & Horvitz H.R. (1993a) Genes required for GABA function in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **364**, 334-337.
- McIntire S.L., Jorgensen E., Kaplan J. & Horvitz H.R. (1993b) The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **364**, 337-341.
- Mercer K.B., Flaherty D.B., Miller R.K., Qadota H., Tinley T.L., Moerman D.G. & Benian G.M. (2003) *Caenorhabditis elegans* UNC-98, a C2H2 Zn finger protein, is a novel partner of UNC-97/PINCH in muscle adhesion complexes. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2492-2507.
- Mikoshiba K., Furuichi T. & Miyawaki A. (1994) Structure and function of IP3 receptors. *Semin. Cell Biol.* **5**, 273-281.
- Miller K.G., Alfonso A., Nguyen M., Crowell J.A., Johnson C.D. & Rand J.B. (1996) A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12593-12598.
- Mitani S., Du H., Hall D.H., Driscoll M. & Chalfie M. (1993) Combinatorial control of touch receptor neuron expression in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **119**, 773-783.
- Miyawaki A., Llopis J., Heim R., McCaffery J.M., Adams J.A., Ikura M. & Tsien R.Y. (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-887.
- Moerman D. & Fire A. (1997) Muscle: structure, function, development in "*C. elegans* II" (Riddle *et al.*, eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York. pp. 417-470.
- Moerman D.G., Plurad S., Waterston R.H. & Baillie D.L. (1982) Mutations in the *unc-54* myosin heavy chain gene of *Caenorhabditis elegans* that alter contractility but not muscle structure. *Cell* **29**, 773-781.
- Montell C. (2001) Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE*. **2001**, RE1.
- Montell C., Birnbaumer L. & Flockerzi V. (2002) The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108**, 595-598.
- Moulder G.L., Huang M.M., Waterston R.H. & Barstead R.J. (1996) Talin requires beta-integrin, but not vinculin, for its assembly into focal adhesion-like structures in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1181-1193.
- Nguyen M., Alfonso A., Johnson C.D. & Rand J.B. (1995) *Caenorhabditis elegans* mutants resistant to inhibitors of acetylcholinesterase. *Genetics* **140**, 527-535.
- Niacaris T. & Avery L. (2003) Serotonin regulates repolarization of the *C. elegans* pharyngeal muscle. *J. Exp. Biol.* **206**, 223-231.
- Nickell W.T., Pun R.Y., Bargmann C.I. & Kleene S.J. (2002) Single ionic channels of two *Caenorhabditis elegans* chemosensory neurons in native membrane. *J. Membr. Biol.* **189**, 55-66.
- Norekian T.P. (1999) GABAergic excitatory synapses and electrical coupling sustain prolonged discharges in the prey capture neural network of *Clione limacina*. *J. Neurosci.* **19**, 1863-1875.
- O'Hagan R., Goodman M.B. & Chalfie M. *In vivo* recordings of sensory transduction currents in *C. elegans* touch cells. *International C. elegans Meeting 2003*, University of California, Los Angeles, **18**.
- Palmer L.G. & Frindt G. (1996) Gating of Na channels in the rat cortical collecting tubule: effects of voltage and membrane stretch. *J. Gen. Physiol.* **107**, 35-45.
- Park E.C. & Horvitz H.R. (1986a) Mutations with dominant effects on the behavior and morphology of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **113**, 821-852.
- Park E.C. & Horvitz H.R. (1986b) *C. elegans unc-105* mutations affect muscle and are suppressed by other mutations that affect muscle. *Genetics* **113**, 853-867.
- Pemberton D.J., Franks C.J., Walker R.J. & Holden-Dye L. (2001) Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wild-type and mutant *Caenorhabditis elegans* delineates the role of the subunit GluCl- α 2 in the function of the native receptor. *Mol. Pharmacol.* **59**, 1037-1043.

- Perez de la Cruz I., Levin J.Z., Cummins C., Anderson P. & Horvitz H.R. (2003) *sup-9*, *sup-10*, and *unc-93* may encode components of a two-pore K⁺ channel that coordinates muscle contraction in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **23**, 9133-9145.
- Perez-Reyes E., Cribbs L.L., Daud A., Lacerda A.E., Barclay J., Williamson M.P., Fox M., Rees M. & Lee J.H. (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **391**, 896-900.
- Price M.P. *et al.* (2000) The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature* **407**, 1007-1011.
- Raizen D.M. & Avery L. (1994) Electrical activity and behavior in the pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* **12**, 483-495.
- Reeh P.W. & Steen K.H. (1996) Tissue acidosis in nociception and pain. *Prog. Brain Res.* **113**, 143-151.
- Reiner D.J., Weinshenker D. & Thomas JH. (1995) Analysis of dominant mutations affecting muscle excitation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **141**, 961-976.
- Renard S., Lingueglia E., Voilley N., Lazdunski M. & Barbry P. (1994) Biochemical analysis of the membrane topology of the amiloride-sensitive Na⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **269**, 12981-12986.
- Richmond J.E. & Broadie K.S. (2002) The synaptic vesicle cycle: exocytosis and endocytosis in *Drosophila* and *C. elegans*. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**, 499-507.
- Richmond J.E., Davies W.S. & Jorgensen E.M. (1999) UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*. *Nat. Neurosci.* **2**, 959-964.
- Richmond J.E. & Jorgensen E.M. (1999) One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nat. Neurosci.* **2**, 791-797.
- Richmond J.E., Weimer R.M. & Jorgensen E.M. (2001) An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. *Nature* **412**, 338-341.
- Robbins J. (2001) KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Ther.* **90**, 1-19.
- Robertson S.J. & Martin R.J. (1993) Levamisole-activated single-channel currents from muscle of the nematode parasite *Ascaris suum*. *Br. J. Pharmacol.* **108**, 170-178.
- Rogalski T.M., Mullen G.P., Gilbert M.M., Williams B.D. & Moerman D.G. (2000) The *unc-112* gene in *Caenorhabditis elegans* encodes a novel component of cell-matrix adhesion structures required for integrin localization in the muscle cell membrane. *J. Cell Biol.* **150**, 253-264.
- Rogalski T.M., Williams B.D., Mullen G.P. & Moerman D.G. (1993) Products of the *unc-52* gene in *Caenorhabditis elegans* are homologous to the core protein of the mammalian basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *Genes Dev.* **7**, 1471-1484.
- Rogers C.M., Franks C.J., Walker R.J., Burke J.F. & Holden-Dye L. (2001) Regulation of the pharynx of *Caenorhabditis elegans* by 5-HT, octopamine, and FMRFamide-like neuropeptides. *J. Neurobiol.* **49**, 235-244.
- Rosenbluth J. (1965) Ultrastructure of somatic muscle cells in *Ascaris lumbricoides*. II. Intermuscular junctions, neuromuscular junctions, and glycogen stores. *J. Cell Biol.* **26**, 579-591.
- Saifee O., Wei L. & Nonet M.L. (1998) The *Caenorhabditis elegans unc-64* locus encodes a syntaxin that interacts genetically with synaptobrevin. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1235-1252.
- Sakube Y., Ando H. & Kagawa H. (1993) Cloning and mapping of a ryanodine receptor homolog gene of *Caenorhabditis elegans*. *Ann. NY Acad. Sci.* **707**, 540-545.
- Salkoff L., Baker K., Butler A., Covarrubias M., Pak M.D. & Wei A. (1992) An essential 'set' of K⁺ channels conserved in flies, mice and humans. *Trends Neurosci.* **15**, 161-166.
- Salkoff L., Butler A., Fawcett G., Kunkel M., McArdle C., Paz-y-Mino G., Nonet M., Walton N., Wang Z.W., Yuan A. & Wei A. (2001) Evolution tunes the excitability of individual neurons. *Neuroscience* **103**, 853-859.
- Salkoff L., Kunkel M.T., Wang Z.-W., Butler A., Yuan A., Nonet M. & Wei, A. (1999). The impact of the *Caenorhabditis elegans* genome project on potassium channel biology in "Potassium ion channels: molecular structure and diseases" (Kurachi Y., Jan L.Y. & Lazdunski M., eds). Academic Press, San Diego. pp. 9-27.

- Sambongi Y., Takeda K., Wakabayashi T., Ueda I., Wada Y. & Futai M. (2000) *Caenorhabditis elegans* senses protons through amphid chemosensory neurons: proton signals elicit avoidance behavior. *Neuroreport* **11**, 2229-2232.
- Samuel A.D., Murthy V.N. & Hengartner M.O. (2001) Calcium dynamics during fertilization in *C. elegans*. *BMC Dev. Biol.* **1**, 1-8.
- Santi C.M., Yuan A., Fawcett G., Wang Z.W., Butler A., Nonet M.L., Wei A., Rojas P. & Salkoff L. (2003) Dissection of K⁺ currents in *Caenorhabditis elegans* muscle cells by genetics and RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 14391-14396.
- Savage C., Hamelin M., Culotti J.G., Coulson A., Albertson D.G. & Chalfie M. (1989) *mec-7* is a beta-tubulin gene required for the production of 15-protofilament microtubules in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* **3**, 870-881.
- Schafer W.R. & Kenyon C.J. (1995) A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **375**, 73-78.
- Schafer W.R., Sanchez B.M. & Kenyon C.J. (1996) Genes affecting sensitivity to serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **143**, 1219-1230.
- Schild L., Schneeberger E., Gautschi I. & Firsov D. (1997) Identification of amino acid residues in the alpha, beta, and gamma subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation. *J. Gen. Physiol.* **109**, 15-26.
- Schreiber M. & Salkoff L. (1997) A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys. J.* **73**, 1355-1363.
- Schwarzbauer J.E. & Spencer C.S. (1993) The *Caenorhabditis elegans* homologue of the extracellular calcium binding protein SPARC/osteonectin affects nematode body morphology and mobility. *Mol. Biol. Cell* **4**, 941-952.
- Shreffler W., Magardino T., Shekdar K. & Wolinsky E. (1995) The *unc-8* and *sup-40* genes regulate ion channel function in *Caenorhabditis elegans* motoneurons. *Genetics* **139**, 1261-1272.
- Snyder P.M., Bucher D.B. & Olson D.R. (2000) Gating induces a conformational change in the outer vestibule of ENaC. *J. Gen. Physiol.* **116**, 781-790.
- Snyder P.M., Cheng C., Prince L.S., Rogers J.C. & Welsh M.J. (1998) Electrophysiological and biochemical evidence that DEG/ENaC cation channels are composed of nine subunits. *J. Biol. Chem.* **273**, 681-684.
- Snyder P.M., Olson D.R. & Bucher D.B. (1999) A pore segment in DEG/ENaC Na(+) channels. *J. Biol. Chem.* **274**, 28484-28490.
- Stewart G.W. (1997) Stomatatin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 271-274.
- Sulston J.E. & Horvitz H.R. (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **56**, 110-156.
- Suzuki H., Kerr R., Bianchi L., Frokjaer-Jensen C., Slone D., Xue J., Gerstbrein B., Driscoll M. & Schafer W.R. (2003) In vivo imaging of *C. elegans* mechanosensory neurons demonstrates a specific role for the MEC-4 channel in the process of gentle touch sensation. *Neuron* **39**, 1005-1017.
- Take-Uchi M., Kawakami M., Ishihara T., Amano T., Kondo K. & Katsura I. (1998) An ion channel of the degenerin/epithelial sodium channel superfamily controls the defecation rhythm in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11775-11780.
- Tavernarakis N. & Driscoll M. (1997) Molecular modeling of mechanotransduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 659-689.
- Tavernarakis N., Shreffler W., Wang S. & Driscoll M. (1997) *unc-8*, a DEG/ENaC family member, encodes a subunit of a candidate mechanically gated channel that modulates *C. elegans* locomotion. *Neuron* **18**, 107-119.
- Thacker C., Evans T., Mathews E., Garcia E. & Snutch T. Genetic Analysis of the Voltage Gated Calcium Channel I-Subunit Genes *unc-2* and *cca-1*. *International C. elegans Meeting 2003*, University of California, Los Angeles, **472**.
- Thacker C. & Snutch T. Identifying Modulators of Voltage-Gated Calcium Channels. *International C. elegans Meeting 2001*, University of California, Los Angeles, **696**.

- Thomas J.H. (1990) Genetic analysis of defecation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **124**, 855-872.
- Toida N., Kuriyama H., Toshiro N. & Ito Y. (1975) Obliquely striated muscle. *Physiol. Rev.* **55**, 700-756.
- Trent C., Tsuing N. & Horvitz H.R. (1983) Egg-laying defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **104**, 619-647.
- Tu Y., Wu S., Shi X., Chen K. & Wu C. (2003) Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell* **113**, 37-47.
- Turner R.E. (2001) A model for an *Ascaris* muscle cell. *Exp. Physiol.* **86**, 551-559.
- Unwin N. (2003) Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett.* **555**, 91-95.
- Waldmann R., Champigny G., Bassilana F., Heurteaux C. & Lazdunski M. (1997) A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* **386**, 173-177.
- Waldmann R., Champigny G., Voilley N., Lauritzen I. & Lazdunski M. (1996) The mammalian degenerin MDEG, an amiloride-sensitive cation channel activated by mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **271**, 10433-10436.
- Waldmann R. & Lazdunski M. (1998) H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 418-424.
- Walker D. & De Waard M. (1998) Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function. *Trends Neurosci.* **21**, 148-154.
- Walker D.S., Gower N.J., Ly S., Bradley G.L. & Baylis H.A. (2002) Regulated disruption of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in *Caenorhabditis elegans* reveals new functions in feeding and embryogenesis. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1329-1337.
- Wang Z.W., Saifee O., Nonet M.L. & Salkoff L. (2001) SLO-1 potassium channels control quantal content of neurotransmitter release at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Neuron* **32**, 867-881.
- Waterston R.H., Epstein H.F. & Brenner S. (1974) Paramyosin of *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* **90**, 285-290
- Waterston R.H., Thomson J.N. & Brenner S. (1980) Mutants with altered muscle structure of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **77**, 271-302.
- Waterston R.H. (1988) Muscle in "The nematode *Caenorhabditis elegans*" (Wood W.B. *et al.*, eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York. pp. 281-336.
- Wei A., Jegla T. & Salkoff L. (1996) Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* **35**, 805-829.
- Wei A. & Salkoff L. Diacylglycerol suppression of M-currents from cloned Vertebrate and *C. elegans* KCNQ/KQT channels. *Biophysical Journal Annual Meeting 2004*. Baltimore, **2703**.
- Wei A., Yuan A., Fawcett G., Butler A., Davis T., Xu S.Y. & Salkoff L. (2002) Efficient isolation of targeted *Caenorhabditis elegans* deletion strains using highly thermostable restriction endonucleases and PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**, e110.
- Weimer R.M., Richmond J.E., Davis W.S., Hadwiger G., Nonet M.L. & Jorgensen E.M. (2003) Defects in synaptic vesicle docking in *unc-18* mutants. *Nat. Neurosci.* **6**, 1023-1030.
- Weinshenker D., Garriga G. & Thomas J.H. (1995) Genetic and pharmacological analysis of neurotransmitters controlling egg laying in *C. elegans*. *J. Neurosci.* **15**, 6975-6985.
- Weinshenker D., Wei A., Salkoff L. & Thomas J.H. (1999) Block of an ether-a-go-go-like K(+) channel by imipramine rescues *egl-2* excitation defects in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **19**, 9831-9840.
- West R.J., Sun A.Y., Church D.L. & Lambie E.J. (2001) The *C. elegans gon-2* gene encodes a putative TRP cation channel protein required for mitotic cell cycle progression. *Gene* **266**, 103-110.
- White J.G., Southgate E., Thomson J. N. & Brenner S. (1976) The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **275**, 327-348.
- White J.G., Southgate E., Thomson J. N. & Brenner S. (1986) The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **314**, 1-340.

- White J.G. (1988) Anatomy in "The nematode *Caenorhabditis elegans*" (Wood W.B. *et al.*, eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York. pp. 81-112.
- White J.A. *et al.* (1997) Guidelines for human gene nomenclature. HUGO Nomenclature Committee. *Genomics* **45**, 468-471.
- Williams M.E. & Waterston R.H. (1994) Genes critical for muscle development and function in *Caenorhabditis elegans* identified through lethal mutations. *J. Cell Biol.* **124**, 475-490.
- Wood W.B. (1988) Introduction to *C. elegans* Biology in "The nematode *Caenorhabditis elegans*" (Wood W.B. *et al.*, eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York. pp. 1-16.
- Yuan A., Dourado M., Butler A., Walton N., Wei A. & Salkoff L. (2000) SLO-2, a K⁺ channel with an unusual Cl⁻ dependence. *Nat. Neurosci.* **3**, 771-779.
- Yuan A., Santi C.M., Wei A., Wang Z.W., Pollak K., Nonet M., Kaczmarek L., Crowder C.M. & Salkoff L. (2003) The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. *Neuron* **37**, 765-773.
- Zhang W., Han X.Y., Wong S.M. & Takeuchi H. (1997) Pharmacologic characteristics of excitatory gamma-amino-butyric acid (GABA) receptors in a snail neuron. *Gen. Pharmacol.* **28**, 45-53.
- Zhao H. & Nonet M. (2000) A retrograde signal is involved in activity-dependent remodeling at a *C. elegans* neuromuscular junction. *Development* **127**, 1253-1266.
- Zhu X., Joh K., Hedgecock E.M. & Hori K. (1999) Identification of *epi-1* locus as a laminin alpha chain gene in the nematode *Caenorhabditis elegans* and characterization of *epi-1* mutant alleles. *DNA Seq.* **10**, 207-217.

Caractérisation électrophysiologique *in situ* à l'aide de la technique de patch-clamp de la cellule musculaire striée du Nématode *Caenorhabditis elegans*.

Caenorhabditis elegans est un modèle animal de choix pour l'identification à partir d'animaux mutants des gènes intervenant dans différents comportements. En revanche, la caractérisation des mutants à l'échelle cellulaire a longtemps été limitée par la taille restreinte de l'animal. La mise au point de la dissection et l'application de la technique de patch-clamp et d'imagerie Ca^{2+} sur la cellule musculaire striée de *C. elegans* nous ont permis de caractériser pour la première fois les principales conductances ioniques de cette cellule. Nous avons montré le rôle crucial que jouaient les canaux Ca^{2+} EGL-19 dans le couplage excitation-contraction et mis en évidence les propriétés d'activation de canaux K^+ voltage-dépendants et Ca^{2+} -activés. Nous avons aussi démontré que le canal Na^+ UNC-105, de la famille des dégénérines, n'était pas mécanosensible comme le supposaient les études génétiques, tandis qu'un autre membre de cette famille s'est avéré sensible à l'acidification extracellulaire.

***In situ* electrophysiological characterisation of *Caenorhabditis elegans* striated muscle cells**

Caenorhabditis elegans is a powerful model system widely used to investigate the relationships between genes and behaviours. However, physiological studies at the cellular level have been greatly restricted by the small size of the animal. Using *in situ* patch-clamp and Ca^{2+} imaging techniques on body-wall muscle cells, we have characterised the main ionic conductances of these cells. We gave evidence for the crucial role of EGL-19 voltage-dependent Ca^{2+} channels in excitation-contraction coupling and described the activation properties of voltage-dependent and Ca^{2+} -activated K^+ channels. We also demonstrated that the UNC-105 Na^+ channel of the degenerin family was not mechanically-gated contrary to the genetic-based model, while another member of this channel family was found to be activated by external protons.

DISCIPLINE : Physiologie cellulaire

MOTS-CLES : *Caenorhabditis elegans*, muscle, patch-clamp, canaux ioniques

Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire
UMR CNRS 5123
Université Claude Bernard – LYON 1
43 boulevard du 11 novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex