



HAL
open science

**Recherche de gènes et de molécules freinant la
dégénérescence musculaire chez deux modèles animaux
de la myopathie de Duchenne, *Cænorhabditis elegans* et
la souris mdx.**

Maïté Carre-Pierrat

► **To cite this version:**

Maïté Carre-Pierrat. Recherche de gènes et de molécules freinant la dégénérescence musculaire chez deux modèles animaux de la myopathie de Duchenne, *Cænorhabditis elegans* et la souris mdx.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2006. Français. NNT : . tel-00140848

HAL Id: tel-00140848

<https://theses.hal.science/tel-00140848>

Submitted on 10 Apr 2007

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.

Université Claude Bernard Lyon I
UFR de Biologie
École doctorale de Biologie Moléculaire Intégrée et Cognitive

Numéro d'ordre 206-2006

Année 2006

THÈSE

présentée devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON I
pour l'obtention du **DIPLOME DE DOCTORAT**

(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le 13/11/2006

par

Maïté CARRE-PIERRAT

**RECHERCHE DE GÈNES ET DE MOLÉCULES FREINANT LA
DÉGÉNÉRESCENCE MUSCULAIRE CHEZ DEUX MODÈLES
DE LA MYOPATHIE DE DUCHENNE,
LE NÉMATODE *CÆNORHABDITIS ELEGANS* ET LA SOURIS *MDX*.**

Directeur de thèse : M Laurent SÉGALAT

<u>Jury</u> :	M Bruno ALLARD, Professeur	Examineur
	M Christophe MARCELLE, Professeur	Examineur
	M Christian NERI, Directeur de Recherche	Rapporteur
	Mme Francesca PALLADINO, Chargé de Recherche	Examineur
	Mme Isabelle RICHARD, Directeur de Recherche	Rapporteur

REMERCIEMENTS

J'ai réalisé mon année de DEA et mes trois années de thèse dans l'équipe de Génétique de *Cænorhabditis elegans*, dirigée par Laurent Ségalat, au Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire (CNRS UMR5534, Villeurbanne).

Je remercie toute les personnes de cette équipe, présentes pendant quelques mois ou durant la totalité de ces 4 années. Elles ont toutes participé à l'ambiance du laboratoire, celle qui fait que l'on passe de bonnes journées, quoiqu'il advienne.

Je remercie particulièrement Laurent qui nous permet à tous de travailler dans de bonnes conditions, matérielles autant qu'intellectuelles. Il m'a par ailleurs permis d'acquérir le précieux talent de pouvoir déchiffrer n'importe quelle ordonnance de médecin.

Je remercie Kathrin pour toutes les discussions à bâtons rompus sur des points bien particuliers de notre thématique, de ces discussions dont on ressort avec l'impression de n'être plus sûr de rien, ni même du contraire.

Je remercie Edwige pour l'organisation et la logistique sans défaut qu'elle assure ; Jean, Marie-Christine, et Stefan qui furent mes compagnons de café du matin.

Je remercie spécialement Lucie et Laure avec qui toutes les raisons sont bonnes pour rire.

Toutes ces personnes font que j'ai eu envie de rester un peu plus longtemps avant d'aller voir ce qui se passe ailleurs.

Enfin, parmi les personnes extérieures, je remercie Jonathan, qui est particulièrement heureux que cette période d'écriture se termine, et Céline, qui a bien voulu relire ce manuscrit.

ABRÉVIATIONS ET CONVENTIONS

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNdb	ARN double brin
ARNi	ARN interférence
ARNm	acide ribonucléique messenger
<i>C. elegans</i>	<i>Cænorhabditis elegans</i>
DAPC	dystrophin associated protein complex (ou complexe des protéines associées à la dystrophine)
DGC	dystrophin glycoprotein complex (ou complexe de la dystrophine)
DMD	Duchenne muscular dystrophy (ou myopathie de Duchenne)
Dp	dystrophin protein
DRP	dystrophin related protein (ou protéine ressemblant à la dystrophine)
GFP	green fluorescent protein
GRMD	Golden Retriever muscular dystrophy
HFMD	hypertrophic feline muscular dystrophy
kb	kilobases
<i>mdx</i>	muscular dystrophy X-linked
N2	souche sauvage de référence de <i>C. elegans</i>
PCR	polymerase chain reaction (ou réaction de polymérisation en chaîne)

Les abréviations spécifiques aux noms de gènes et à leurs protéines sont précisées au fil des pages. Certains termes, notamment les noms de souches de souris ont pu être raccourci par souci de clarté, cela aussi est précisé en temps utiles.

Conventions

Les gènes de *C. elegans* portent souvent deux noms : un nom correspondant au cosmide dans lequel est cloné la séquence du gène, suivi d'un numéro correspondant à leur place sur le cosmide, par exemple : F30A10.8. Puis, lorsque le gène a été étudié plus avant, on lui assigne un nom composé de trois lettres minuscules, suivies d'un numéro, le tout en italique, par exemple : *stn-1*. Les trois lettres sont choisies soit d'après la protéine codée (*stn-1* code pour l'homologue de la syntrophine), soit d'après le phénotype observé suite à l'inactivation du gène (*egl* pour egg-laying), et le numéro correspond à l'ordre d'identification du gène si plusieurs gènes du même nom existent.

Les produits protéiques des gènes portent le même nom que le gène, en majuscules non italiques, STN-1. Les mutants portent le nom du gène muté : les mutants *dys-1* portent une mutation dans le gène *dys-1*.

SOMMAIRE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	10
Chapitre I - La dystrophine dans le muscle et les maladies qui lui sont associées.....	10
A. Les maladies associées à la dystrophine	10
A.1 La myopathie de Duchenne.....	10
A.2 La myopathie de Becker	11
B. La dystrophine et son complexe	13
B.1 Découverte du gène.....	13
B.2 La protéine.....	13
B.3 Les différentes isoformes et leurs expressions tissulaires	15
B.4 Corrélations entre les mutations affectant le gène de la dystrophine et les phénotypes Duchenne et Becker	17
B.5 Les protéines de même famille.....	19
C. Les protéines associées à la dystrophine	22
C.1 Les dystroglycanes	22
C.2 Les sarcoglycanes.....	23
C.3 Le sarcospane	24
C.4 Les syntrophines.....	24
C.5 L'α-dystrobrevine	25
D. Le DGC et son rôle dans les myopathies de Duchenne et Becker	28
D.1 Le DGC.....	28
D.2 Hypothèse structurale	30
D.3 Hypothèse métabolique	30
D.4 Hypothèse signalétique.....	31
D.5 Conclusion.....	31
Chapitre II - Mise en place et maintenance du muscle strié.....	33
A. Formation des fibres musculaires striées	33
A.1 Détermination des myoblastes	33
A.2 Fusion en myotubes	34
A.3 Myofibrillogenèse et formation des autres structures spécifiques.....	34
B. Sarcomère et contraction musculaire.....	35
B.1 Le sarcomère	35
B.2 Mécanisme de la contraction musculaire.....	35
C. Maintenance et réparation du muscle	36
C.1 Les voies de signalisation de contrôle de la masse musculaire.....	36
C.2 Régénération musculaire	36
Chapitre III - Les modèles d'étude animaux et les traitements des myopathies de Duchenne et Becker	37
A. Les modèles animaux	37
A.1 Modèles mammifères.....	37
A.2 Autres modèles.....	41
B. Les traitements	44

B.1 Thérapie génique.....	44
B.2 Thérapie cellulaire.....	47
B.3 Autres stratégies envisagées.....	49
B.4 Conclusion.....	51
Chapitre IV - <i>Caenorhabditis elegans</i> comme modèle d'étude.....	52
A. Présentation générale de <i>C. elegans</i>	52
A.1 Anatomie et caractéristiques physiologiques.....	52
A.2 Ressources et outils d'investigation.....	56
A.3 Conclusion.....	57
B. <i>Caenorhabditis elegans</i> comme modèle d'étude de la dégénérescence musculaire en absence de dystrophine.....	59
B.1 Le Muscle chez <i>C. elegans</i>	59
B.2 La Dystrophine chez <i>C. elegans</i>	60
B.3 Notre modèle de dégénérescence.....	62
B.4 Le complexe de la dystrophine chez <i>C. elegans</i>	63
B.5 Conclusion.....	64
Chapitre V - Conclusion.....	66

RESULTATS **68**

Chapitre I - Les gènes fonctionnellement reliés à DYS-1 chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	69
A. The SLO-1 BK channel of <i>Caenorhabditis elegans</i> is critical for muscle function and is involved in dystrophin-dependant muscle dystrophy. <u>M. Carre-Pierrat</u> , K. Grisoni, K. Gieseler, M-C. Mariol, E. Martin, M. Jospin, B. Allard and L. Ségalat. Journal of Molecular Biology (2006) 358 , 357-395.....	71
B. The <i>stm-1</i> syntrophin gene of <i>C. elegans</i> is functionally related to dystrophin and dystrobrevin. K. Grisoni, K. Gieseler, M-C. Mariol, E. Martin, <u>M. Carre-Pierrat</u> , G. Moulder, R. Barstead and L. Ségalat. Journal of Molecular Biology (2003) 332 , 1037-1046.....	82
Chapitre II - Recherche de gènes suppresseurs de la dégénérescence musculaire chez <i>Caenorhabditis elegans</i>.....	93
A. Matériels et méthodes.....	95
A.1 Evaluation de l'état musculaire : la souche LS761.....	95
A.2 ARN interférence (ARNi).....	96
A.3 Protocole.....	98
A.4 Mesure de la fluorescence.....	100
A.5 Confirmation des clones positifs.....	102
B. Résultats.....	103
B.1 Rendement du protocole d'ARNi à grand échelle.....	103
B.2 Méthodes d'analyse des résultats.....	105
B.3 Clones positifs après une première confirmation.....	113

Chapitre III - Les molécules freinant la dégénérescence musculaire en absence de DYS-1 chez *Cænorhabditis elegans*116

- A. Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Cænorhabditis elegans*. A. Gaud, J-M. Simon, T. Witzel, M. Carre-Pierrat, C.G. Wermuth and L. Ségalat. *Neuromuscular Disorders* (2004) **14**, 365-370117
- B. Blocking of striated muscle degeneration by serotonin in *C. elegans*. M. Carre-Pierrat, M-C. Mariol, L. Chambonnier, A. Laugraud, F. Heskia, J. Giacomotto and L. Ségalat. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* (2006) **27**, 253-258.....117
- C. Characterization of the *C. elegans* G protein-coupled serotonin receptors. M. Carre-Pierrat, D. Baillie, R. Johnsen, R. Hyde, A. Hart, L. Granger and L. Ségalat. Accepted in *Invertebrate Neuroscience*131
- D. Vue d'ensemble des molécules ayant un effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*.150

Chapitre IV - Les molécules freinant la dégénérescence musculaire chez les souris *mdx*153

- A. Matériels et méthodes155
- A.1 Souche de souris.....155
- A.2 Molécules et voie d'administration.....155
- A.3 Période de traitement157
- A.4 Tests pratiqués.....157
- B. Résultats162

DISCUSSION167

- A. Les gènes fonctionnellement liés à DYS-1172
- B. Les suppresseurs de la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*.180
- C. Apports du crible de molécules chez *C. elegans*183
- D. Les molécules efficaces chez la souris *mdx*.187
- E. Conclusion.189

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES190

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I - La dystrophine dans le muscle et les maladies qui lui sont associées

Figure 1 : Structure protéique de la dystrophine	12
Figure 2 : Les promoteurs alternatifs du gène de la dystrophine	14
Tableau 1 : Masse moléculaire et expression tissulaire des isoformes de la dystrophine	14
Figure 3 : Principales délétions dans le gène de la dystrophine à l'origine des myopathies de Duchenne et Becker	16
Figure 4 : Structure protéique des protéines appartenant à la même famille que la dystrophine.....	18
Tableau 2 : Protéines associées à la dystrophine dans le DGC	21
Figure 5 : Représentation schématique des interactions de la dystrophine et du DGC	27
Figure 6 : Représentation tridimensionnelle du DGC.....	29

Chapitre II - Mise en place et maintenance du muscle strié

Figure 7 : Représentation schématique de la formation d'une fibre musculaire striée.....	32
Figure 8 : Le sarcomère	35

Chapitre III - Les modèles d'étude animaux et les traitements des myopathies de Duchenne et Becker

Figure 9 : Schéma des principales thérapies envisagées contre les myopathies de Duchenne et Becker	43
--	----

Chapitre IV - *Cænorhabditis elegans* comme modèle d'étude

Figure 10 : Photos et organes d'un mâle et d'un hermaphrodite <i>C. elegans</i>	53
Figure 11 : Représentation du cycle de vie du nématode <i>Cænorhabditis elegans</i>	54
Figure 12 : Les muscles striés chez <i>Cænorhabditis elegans</i>	58
Figure 13 : Mutations dans le gène <i>dys-1</i> et expression tissulaire de DYS-1 chez <i>C. elegans</i>	60
Figure 14 : Dégénérescence des cellules musculaires striés des vers <i>dys-1</i> ; <i>h1h-1</i>	62

Chapitre V - Conclusion

Figure 15 : Stratégie d'étude des mécanismes de la dégénérescence musculaire chez <i>C. elegans</i> et chez la souris	65
---	----

RESULTATS

Chapitre II - Recherche de gènes suppresseurs de la dégénérescence musculaire chez *Cænorhabditis elegans*

Figure 16 : Photos des cellules musculaires striées et de leurs noyaux de vers sains et LS761.....	94
Figure 17 : Schéma du protocole d'ARNi sur les vers LS761	97
Figure 18 : Trieur de vers BIOSORT de Union Biometrica.....	99
Figure 19 : Profil de fluorescence d'un ver LS761	101
Figure 20 : Hétérogénéité des profils de fluorescence des vers LS761	104

Figure 21 : Stratégie de sélection des gènes suppresseurs	106
Figure 22 : Variation des scores au cours du temps	108
Figure 23 : Représentation graphique du recouplement des méthodes d'analyse	110
Tableau 3, page 1 : Liste des 60 gènes dont l'inactivation réduit la dégénérescence musculaire chez <i>C. elegans</i>	112
Figure 24 : Répartition des gènes sélectionnés par rapport aux différentes méthodes d'analyse ..	113
Tableau 3, page 2 : Liste des 60 gènes dont l'inactivation réduit la dégénérescence musculaire chez <i>C. elegans</i> ..	114

Chapitre III - Les molécules freinant la dégénérescence musculaire en absence de DYS-1 chez *Cænorhabditis elegans*

Tableau 4, page 1 : Liste des molécules réduisant la dégénérescence chez <i>C. elegans</i>	149
Tableau 4, page 2 : Liste des molécules réduisant la dégénérescence chez <i>C. elegans</i>	151
Figure 25 : Représentation de l'effet des molécules réduisant la dégénérescence musculaire chez <i>C. elegans</i>	152

Chapitre IV - Les molécules freinant la dégénérescence musculaire chez les souris *mdx*

Figure 26 : Photo d'une souris en train d'effectuer le test d'endurance ou « wire test »	156
Figure 27 : Schéma représentant l'inclusion et la coupe de l'EDL droit et du diaphragme	158
Tableau 5 : Liste des molécules testées chez la souris <i>mdx-5Cv</i>	161
Figure 28 : Graphique d'évaluation de la dégénérescence musculaire des souris <i>mdx5Cv</i> après traitement	163
Figure 29 : Photos de coupe d' <i>Extensor Digitorum Longus</i> (EDL) de souris <i>mdx</i> traitée à l'Imipramine 5X et contrôle	165

DISCUSSION

Figure 15 : Stratégie d'étude des mécanismes de la dégénérescence musculaire chez <i>C. elegans</i> et chez la souris	169
Figure 30 : Représentation du complexe de protéines liées à l'homologue de la dystrophine chez <i>C. elegans</i>	172
Figure 31 : Représentation du rôle putatif de SLO-1 dans la contraction musculaire	176
Figure 32 : Hypothèse d'un rôle de STN-1 à la jonction neuromusculaire	178

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I - La dystrophine dans le muscle et les maladies qui lui sont associées

A. Les maladies associées à la dystrophine

A.1 La myopathie de Duchenne

La myopathie de Duchenne est une maladie génétique dont la cause est l'absence de dystrophine fonctionnelle dans les muscles (et du complexe protéique qui lui est associé). Cette myopathie est observée quasi exclusivement chez les garçons (qui sont encore appelés garçons DMD) car le gène de la dystrophine se situe sur le chromosome X et le mode de transmission est récessif. Les garçons DMD ne donnent pas de descendance, il est donc impossible pour eux de transmettre le chromosome X porteur du gène défectueux à leur fille. L'X porteur est transmis par la mère et s'exprime pleinement chez les garçons qui sont XY, alors que les filles sont dites porteuses asymptomatiques puisqu'elles ont un X porteur et un X sain. Cependant, il existe quelques rares cas de myopathie symptomatique chez des femmes porteuses. Ceci peut s'expliquer par l'inactivation aléatoire d'un des deux chromosomes X. Chez les femmes, seul un des deux chromosomes X exprime ses gènes. L'autre est inactivé au cours de l'embryogenèse et se présente sous la forme de chromatine extrêmement condensée : le corpuscule de Barr. Le choix du chromosome X inactivé se fait de façon aléatoire et indépendante de cellule à cellule (Avner and Heard, 2001). Il est donc possible qu'une partie des cellules somatiques exprime l'X porteur alors que l'autre partie exprime l'X sain. Les fibres musculaires étant des cellules multi-nucléées, il faut encore que la majorité des noyaux expriment l'X porteur pour que la fibre manque de dystrophine et dégénère (Vainzof et al., 1992). La plupart des cas de myopathie chez les femmes sont asymétriques et moins marqués que chez les hommes car seulement une partie des muscles est touchée, les tissus où l'X porteur est exprimé (Emery, 1993).

Dans de très rares cas, l'X porteur du gène déficient est le seul présent. C'est le cas des femmes atteintes du syndrome de Turner dont le caryotype est 45, X0.

La myopathie de Duchenne est classée en France comme maladie orpheline. Elle touche un garçon sur 3500 à la naissance (Emery, 1991). Environ les 2/3 des mutations sont héritées, le tiers restant étant des néo-mutations (Barbujani et al., 1990). La majorité des mutations sont des délétions (entre 60 et 65%), 6% sont des duplications et le reste des mutations ponctuelles.

La maladie n'est généralement décelée qu'au moment où les enfants apprennent à marcher, bien que des lésions histologiques soient déjà décelables pendant la période

anténatale, et que le taux de créatine kinase, une enzyme musculaire dont la présence dans le sang indique une lésion musculaire, soit élevée dans le sang dès la naissance (De Recondo and De Recondo, 2001a). Les garçons atteints de la myopathie de Duchenne ont souvent un retard d'apprentissage de la marche et ne courent jamais. On peut observer une hypertrophie des mollets et parfois des muscles proximaux de la jambe. Les chutes sont fréquentes, et, généralement vers l'âge de 10 ou 12 ans, les garçons doivent se déplacer en fauteuil roulant. De plus en plus de muscles sont atteints, touchant les fonctions vitales, telles que la respiration ou la déglutition, aussi bien que des fonctions plus annexes comme la miction (De Recondo and De Recondo, 2001a).

À la fin de l'évolution de la maladie des troubles cardiaques se manifestent en plus des troubles respiratoires. Les patients nécessitent souvent une assistance respiratoire. Ces atteintes physiques sont parfois accompagnées de troubles d'ordre mental. Ceux-ci peuvent être légers comme une difficulté d'abstraction et de raisonnement, mais ils peuvent aller jusqu'au pseudo-autisme (Polakoff et al., 1998).

A.2 La myopathie de Becker

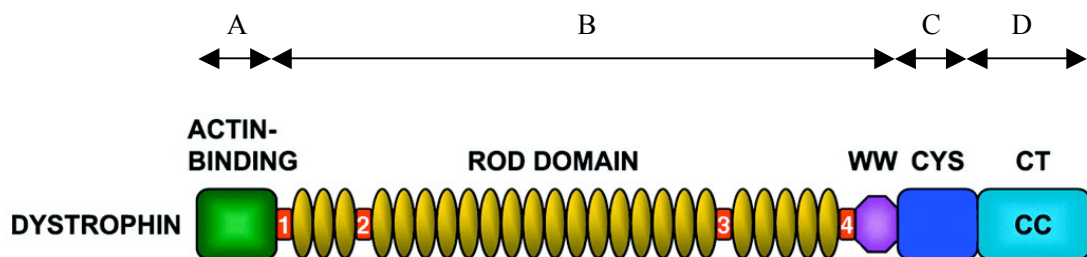
La myopathie de Becker a été identifiée en 1955 par Becker et Kiener (Becker and Kiener, 1955). Elle est caractérisée par les mêmes symptômes que la myopathie de Duchenne, mais débute plus tardivement avec des symptômes moins prononcés. Elle est due à des mutations dans le gène de la dystrophine, principalement des délétions dans les exons 45 à 49, sans décalage du cadre de lecture. Il y a formation d'une protéine tronquée de sa partie médiane, où les deux extrémités amino et carboxy terminales sont présentes (N et C terminales). Son incidence est 10 fois moins grande que la myopathie de Duchenne car les mutations responsables sont beaucoup plus localisées (De Recondo and De Recondo, 2001a). Les garçons atteints par la maladie de Becker peuvent donner une descendance, et donc la plupart des mutations sont héritées (90%) (De Recondo and De Recondo, 2001a).

L'apparition des symptômes se fait beaucoup plus tard que chez les garçons DMD et est plus étalée dans le temps. Les problèmes moteurs apparaissent en moyenne vers 12 ans et, bien souvent, les personnes peuvent se déplacer de façon autonome jusqu'à leur quatrième décennie (De Recondo and De Recondo, 2001a).

Figure 1 : Structure protéique de la dystrophine

La dystrophine est composée de quatre domaines. Le domaine N-ter, en A, vraisemblablement capable de se fixer à l'actine. En B, le domaine central souple, constitué de répétitions spectrines (en jaune). Ce domaine contient un motif WW (représenté en violet) permettant l'interaction avec d'autres protéines. Le domaine riche en cystéines, en C, permettant notamment la fixation de la calmoduline. Le domaine *coiled-coil*, en D, qui est le siège d'interactions avec d'autres protéines.

Figure adaptée de (Blake, 2002).



B. La dystrophine et son complexe

B.1 Découverte du gène

Le gène de la dystrophine a été l'un des premiers gènes de maladie cloné. Il a été identifié par clonage de position sur le bras court du chromosome X (Harper, 1986; Kunkel et al., 1986; Murray et al., 1982), puis son ADN complémentaire a été cloné par l'équipe de Lou Kunkel à Boston (Hoffman et al., 1987; Koenig et al., 1987).

La protéine pour laquelle il code a été baptisée dystrophine du fait que son absence provoque une dystrophie, c'est-à-dire une altération des tissus (Koenig et al., 1987). Il est intéressant de noter que son identification a été possible notamment grâce à l'étude d'un cas rare de myopathie de Duchenne chez la femme, induit par une translocation X/autosome (Boyd et al., 1986).

C'est le plus grand gène connu chez l'homme, environ 2,5Mb (Coffey et al., 1992; Monaco et al., 1992). Il représente à lui seul 1% du chromosome X et comporte 79 exons (Roberts et al., 1993).

L'ARN messager total ne fait que 14kb (Hoffman et al., 1987), ce qui ne représente que 0,6% de la séquence génomique. Ceci est dû au fait que ce gène comporte d'énormes introns, tel l'intron 44 qui fait plus de 170kb (Nobile et al., 1997).

B.2 La protéine

Le gène de la dystrophine code pour une protéine de 427kDa, lorsqu'il est transcrit et traduit dans son intégralité. La dystrophine, représentée ci-contre (figure 1), comporte 4 grands domaines.

En A, le domaine amino terminal (N-ter), de 240 acides aminés, présente une forte homologie avec le domaine de fixation à l'actine de l' α -actinine (Koenig et al., 1989).

En B, le domaine adjacent, de 2400 acides aminés, comporte 24 motifs spectrine d'environ 100 acides aminés chacun. Ces motifs sont appelés ainsi car ils ressemblent à la spectrine, la protéine responsable de l'élasticité des globules rouges. Ces 24 répétitions sont interrompues par 4 régions charnières riches en proline (Koenig and Kunkel, 1990; Koenig et al., 1988). A la fin de ce second domaine, il existe un motif WW qui permet l'interaction avec d'autres protéines (Bork and Sudol, 1994).

En C, le troisième domaine, de 280 acides aminés. Ce troisième domaine contient 15 cystéines qui pourraient former un site de fixation pour les cations divalents tels que le zinc : Zn^{2+} (Ponting et al., 1996). Ce domaine permet la fixation calcium-dépendante de la calmoduline à la dystrophine (Anderson et al., 1996b). Le troisième domaine comporte aussi une séquence de 142 acides aminés qui présente 24% d'homologie avec le domaine

Figure 2 : Les promoteurs alternatifs du gène de la dystrophine

Le gène de la dystrophine possède plusieurs promoteurs qui donnent lieu à des isoformes de tailles différentes. Chaque isoforme possède un premier exon propre. Leurs expressions tissulaires sont décrites dans le tableau 1, ci-dessous.

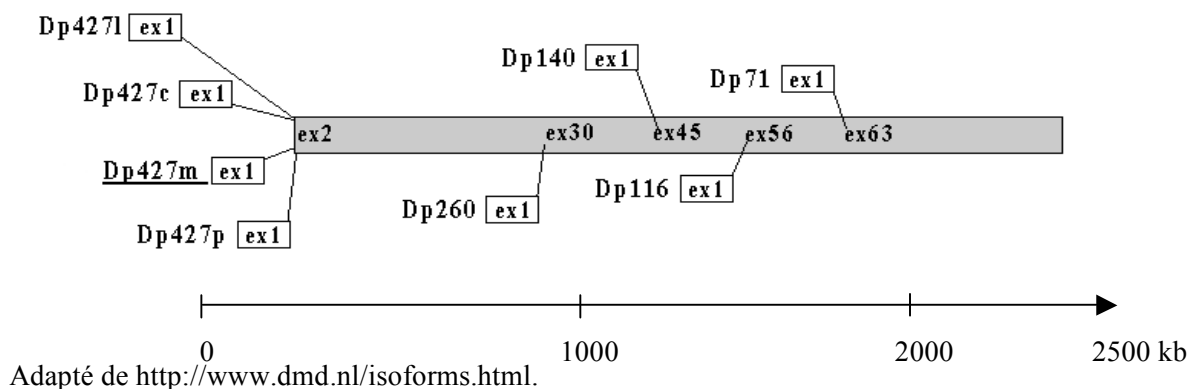


Tableau 1 : Masse moléculaire et expression tissulaire des différentes isoformes de la dystrophine

Nom	Exons transcrits	Masse moléculaire	Expression tissulaire
Isoformes longues			
Dp427m	1er exon spécifique puis exons 2 à 79	427 kDa	Muscles squelettiques, muscle cardiaque, cellules gliales du cerveau
Dp427l	1er exon spécifique puis exons 2 à 79	427 kDa	Cellules lymphoblastoïdes mais existence de cette isoforme controversée
Dp427c	1er exon spécifique puis exons 2 à 79	427 kDa	Neurones du cortex et hippocampe
Dp427p	1er exon spécifique puis exons 2 à 79	427 kDa	Cellules du cortex, muscles squelettiques, muscle cardiaque
Isoformes courtes			
Dp260	1er exon spécifique puis exons 30 à 79	260 kDa	Rétine, cerveau et muscle cardiaque
Dp140	1er exon spécifique puis exons 45 à 79	140 kDa	Système nerveux central et rein
Dp116	1er exon spécifique puis exons 56 à 79	116 kDa	Cellules de Schwann
Dp71	1er exon spécifique puis exons 63 à 79	71 kDa	Ubiquitaire

Références, voir le chapitre B.3 : Les différentes isoformes de la dystrophine et leurs expressions tissulaires.

C terminal de l' α -actinine, et qui pourrait permettre la fixation du calcium : Ca^{2+} (Koenig et al., 1988).

En D, le domaine C terminal, composé des 420 derniers acides aminés, est appelé le domaine *coiled-coil* car sa séquence forme des boucles α -hélicoïdales qui sont connues pour être le siège d'interactions entre protéines (Blake et al., 1995).

B.3 Les différentes isoformes et leurs expressions tissulaires

Le gène de la dystrophine est à l'origine de protéines de différentes longueurs, ceci grâce à trois mécanismes :

- des promoteurs alternatifs, représentés dans la figure 2, ci-contre,
- des phénomènes d'épissage alternatif,
- des sites de terminaison de la transcription (site de polyadénylation) alternatifs.

On utilise l'abréviation Dp pour « *dystrophin protein* », suivie de leur poids moléculaire de la protéine et éventuellement d'une lettre pour préciser son expression tissulaire principale (voir tableau 1, ci-contre).

B.3.1 Isoformes longues

Le gène de la dystrophine code pour 4 isoformes longues de 427kDa, exprimées dans différents tissus grâce à des promoteurs spécifiques. Ces isoformes ont un promoteur et un premier exon spécifique, mais partagent tout le reste de la séquence à partir de l'exon 2 (pour revue, voir (Sadoulet-Puccio and Kunkel, 1996)).

La forme appelée Dp427m est exprimée dans les muscles squelettiques et les cellules du muscle cardiaque, ainsi que dans certaines cellules gliales du cerveau (Barnea et al., 1990).

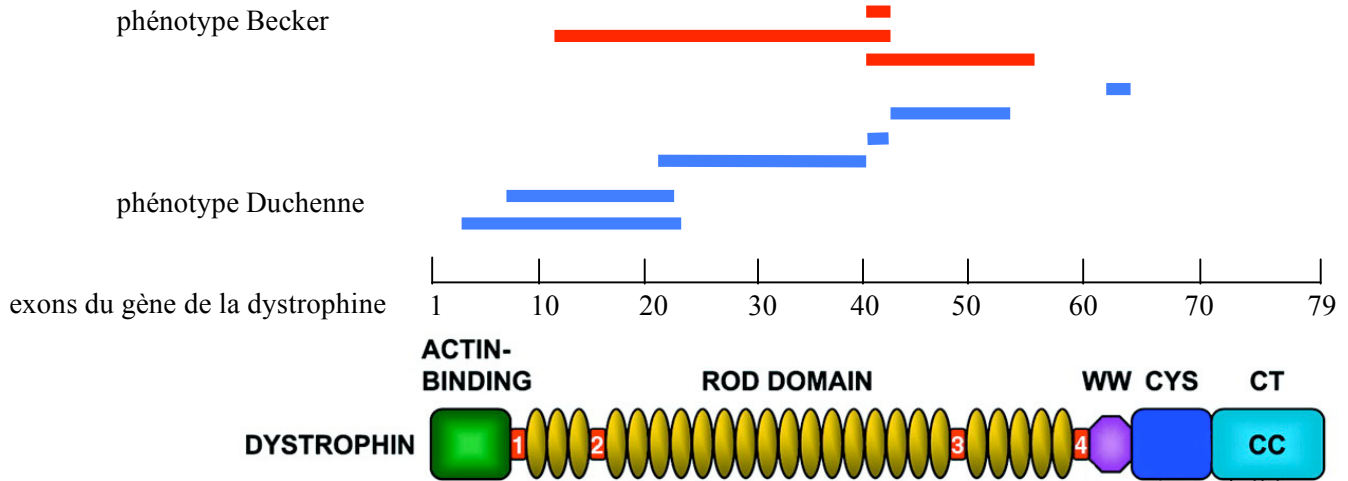
La forme appelée Dp427l a été trouvée dans les cellules lymphoblastoïdes (Nishio et al., 1994). Cependant, des données récentes indiquent que cette forme de dystrophine est très improbable car le promoteur aurait été détecté quelques 4Mb en amont de l'exon 2 de la dystrophine, et le temps de transcription d'un tel pré-ARNm est estimé à 2 jours (Wheway and Roberts, 2003).

La forme appelée Dp427c est exprimée dans les neurones du cortex et dans l'hippocampe (Nudel et al., 1989). Son promoteur est situé environ 130kb en amont de celui de la forme musculaire Dp427m (Boyce et al., 1991).

La forme appelée Dp427p est exprimée dans les cellules de Purkinje, des neurones (Gorecki et al., 1992), mais aussi dans le reste du cortex, les muscles squelettiques et, à un taux moins élevé, dans le tissu musculaire cardiaque (Holder et al., 1996).

Figure 3 : Principales délétions dans le gène de la dystrophine à l'origine des myopathies de Duchenne et Becker

Les principales délétions à l'origine de la myopathie de Becker sont représentées par les barres rouges. La grande majorité sont des délétions entre les exons 45 et 49. Les délétions à l'origine de la myopathie de Duchenne sont représentées par les barres bleues. Elles sont beaucoup plus diverses. Figure adaptée de (Blake, 2002; Karpati, 2002).



B.3.2 Isoformes courtes

En plus de ces formes longues, il existe 4 formes plus courtes dues à des promoteurs internes.

- Dp260 est une forme courte exprimée principalement dans la rétine mais aussi dans le cerveau et le muscle cardiaque (D'Souza et al., 1995; Pillers et al., 1993). Elle serait responsable du défaut de vision nocturne observé chez les garçons DMD.
- Dp140 est exprimée dans tout le système nerveux central et le rein, mais dans aucun tissu musculaire (Lidov et al., 1995). Cette isoforme a été impliquée dans le développement des reins (Durbeej et al., 1997).
- Dp116 est exprimée dans les cellules de Schwann (Byers et al., 1993).
- Dp71 est exprimée de façon ubiquitaire dans beaucoup de tissus non musculaires, notamment le foie et le cerveau, où cette forme est majoritaire (Bar et al., 1990; Rapaport et al., 1992).

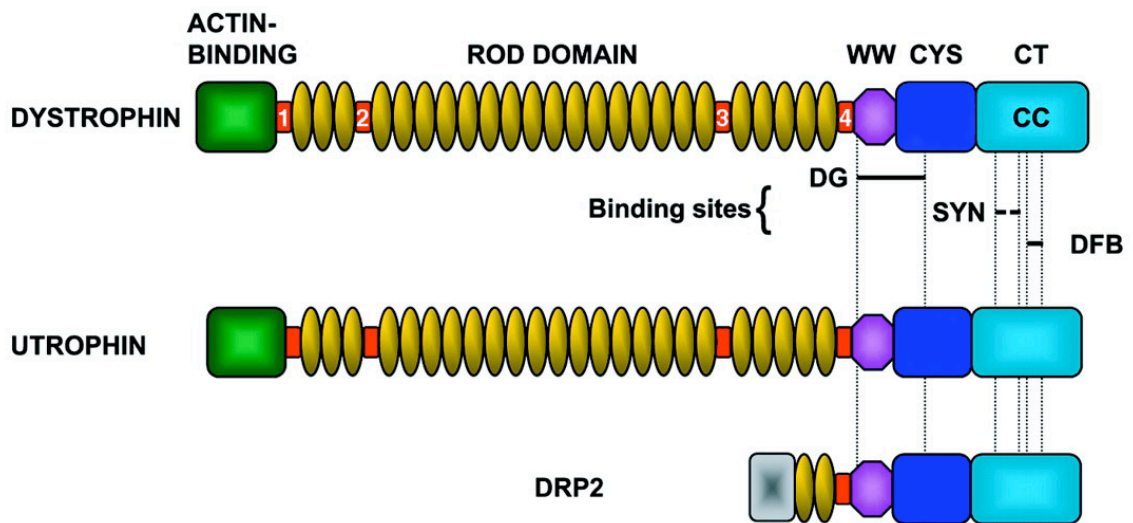
En plus des différents promoteurs, il existe des phénomènes d'épissage alternatif et un site interne d'addition de polyA (qui termine un ARNm). Ceci donne lieu à d'innombrables variants des différentes isoformes protéiques (Feener et al., 1989).

B.4 Corrélations entre les mutations affectant le gène de la dystrophine et les phénotypes Duchenne et Becker

Les différentes isoformes de la dystrophine (et leurs variants) sont donc exprimés dans de nombreux tissus parmi lesquels on peut retenir les muscles, le cerveau et le système nerveux central, ainsi que la rétine. Ces expressions tissulaires sont en accord avec les signes cliniques principaux des myopathies de Duchenne et de Becker : dégénérescence musculaire, retard mental dans certains cas, et défaut de vision nocturne. Les mutations affectant le gène de la dystrophine sont principalement des délétions. Elles sont représentées dans la figure 3, ci-contre. Les délétions produisant la myopathie de Duchenne sont représentées par des barres bleues. Elles sont variées et couvrent une grande partie du gène de la dystrophine. Ce sont des délétions qui décalent le cadre de lecture. La forme longue musculaire de la dystrophine n'est pas produite. Ces délétions affectent parfois l'expression des autres formes de la dystrophine.

Figure 4 : Structure protéique des protéines appartenant à la même famille que la dystrophine

Comparaison entre les structures protéiques de la dystrophine, de l'utrophine et de DRP2. L'utrophine a une structure extrêmement ressemblante à celle de la dystrophine, ce qui en fait une candidate pour la remplacer. DRP2 est une version raccourcie, qui comprend la partie C-ter de la dystrophine. Les sites de liaison pour certaines protéines associées à la dystrophine sont représentés : DG pour dystroglycane, SYN pour syntrophine et DFB pour dystrobrevine. On constate que l'utrophine et DRP2 conservent ces sites de liaison. Figure adaptée de (Blake, 2002).



Dans la myopathie de Becker, les délétions sont le plus souvent localisées entre l'exon 45 et 49 (barres rouges), plus rarement ce sont des délétions étendues. Elles ne produisent pas de décalage du cadre de lecture. Ainsi, des formes tronquées des isoformes longues sont produites. On peut supposer que la dystrophine tronquée assurent une partie de ses fonctions de façon suffisante pour que la maladie survienne plus tardivement.

B.5 Les protéines de même famille

La dystrophine fait partie d'une famille de protéines ayant toutes un domaine riche en cystéines et un domaine C-ter présentant des hélices *coiled-coil* (Blake et al., 1998). La figure 4, ci-contre, montre leurs structures par rapport à celle de la dystrophine.

B.5.1 Utrophine ou DRP (*Dystrophin Related Protein*)

L'utrophine a été identifiée en 1989 (Love et al., 1989). Son gène est localisé sur le chromosome 6 et donne lieu à une protéine de 395kDa, ainsi qu'à plusieurs formes courtes (Buckle et al., 1990; Tinsley et al., 1992). L'utrophine présente 80% d'homologie avec la dystrophine, particulièrement aux extrémités N et C terminales (Tinsley et al., 1992). L'utrophine peut ainsi se lier aux différentes protéines associées à la dystrophine (James et al., 1995).

Elle est exprimée dans les différents types de muscles, l'endothélium vasculaire, les cellules gliales de la rétine, les plaquettes, les cellules de Schwann et d'autres types cellulaires encore (Earnest et al., 1995; Nguyen et al., 1991; Pons et al., 1994). Dans les fibres musculaires, l'utrophine est présente à la jonction myotendineuse, ainsi qu'à la jonction neuromusculaire, où elle interagit avec les protéines du DAPC (Khurana et al., 1991; Khurana et al., 1992; Nguyen et al., 1991; Nguyen et al., 1992), à l'inverse de la dystrophine qui est localisée tout le long de la fibre, sous la membrane plasmique (pour revue, voir (Love et al., 1993)).

L'utrophine est parfois décrite comme une forme embryonnaire de la dystrophine car elle est localisée tout le long des fibres en formation pendant l'embryogenèse, et n'est remplacée par la dystrophine qu'après la naissance (Clerk et al., 1993). Cependant l'expression de l'utrophine perdure à l'âge adulte et semble coordonnée avec l'expression de la dystrophine puisqu'on les trouve dans les fibres musculaires striées squelettiques, cardiaques ou lisses à des localisations subcellulaires bien distinctes (Khurana et al., 1991; Ohlendieck et al., 1991). La dystrophine et l'utrophine sont très certainement des paralogues, issus de duplications ancestrales (Roberts and Bobrow, 1998).

La grande similarité de séquence entre ces deux protéines, et le fait que l'utrophine est une forme pseudo-embryonnaire de dystrophine, ont permis de mettre de grands espoirs

dans l'idée que l'utrophine pourrait pallier au manque de dystrophine dans la myopathie de Duchenne. Ce point est discuté dans le chapitre sur les thérapies.

B.5.2 DRP2

La DRP2 pour (*Dystrophin Related Protein 2*) est une protéine dont on sait peu de choses car elle est peu étudiée. Elle ressemble à l'isoforme courte de la dystrophine, Dp116 (Dixon et al., 1997; Roberts et al., 1996). Son expression est essentiellement cérébrale (cerveau et moelle épinière).

B.5.3 Dystrobrevines

Les dystrobrevines font partie de la même famille de protéines que la dystrophine car elles présentent une forte homologie avec le domaine riche en cystéines et le domaine C terminal de la dystrophine (Blake, 2002). Les dystrobrevines sont détaillées dans le chapitre ci-après, consacré aux protéines associées à la dystrophine.

Tableau 2 : Protéines associées à la dystrophine dans le DGC

Présentation de protéines appartenant au DGC, de la localisation de leurs isoformes (membranaire, intra- ou extracellulaire), et des maladies associées à leurs absences respectives.

Protéine associée à la dystrophine dans le muscle		Expression dans le muscle	Maladies liées à l'absence de la protéine
Dystroglycanes	α	extracellulaire	MEB, FCMD, WWS
	β	transmembranaire	aucune connue
Sarcoglycanes	α	transmembranaire	LGMD 2D
	β	transmembranaire	LGMD 2E
	γ	transmembranaire	LGMD 2F
	δ	transmembranaire	LGMD 2C
Sarcospane		transmembranaire	aucune connue
Syntrophines	$\alpha 1$	cytoplasmique, forme prédominante dans toutes les types de fibres musculaires	aucune connue
	$\beta 1$	cytoplasmique, plutôt dans les fibres rapides	
	$\beta 2$	cytoplasmique, plutôt à la jonction neuromusculaire	
Dystrobrévines	$\alpha 1$	cytoplasmique, plutôt à la jonction neuromusculaire	Cardiomyopathie congénitale du nom de syndrome de Barth
	$\alpha 2$	cytoplasmique, plutôt sous la membrane plasmique	

MEB : *Muscle Eye Brain disease*

FCMD : *Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy*

WWS : *Walker-Warburg Syndrome*

LGMD : *Limb Girdle Muscular Dystrophy*

Références, voir le chapitre C, consacré aux protéines associées à la dystrophine.

C. Les protéines associées à la dystrophine

Dans les muscles striés, la dystrophine est associée à plusieurs protéines en un complexe appelé DGC (*Dystrophin Glycoprotein Complex*) ou encore DAPC (*Dystrophin Associated Protein Complex*). Ce complexe se situe sous la membrane des fibres musculaires (Campbell and Kahl, 1989; Yoshida and Ozawa, 1990). Lors de sa purification par Yoshida et coll. (Yoshida et al., 1994), trois sous-complexes ont été isolés:

- le complexe des dystroglycanes,
- le complexe des sarcoglycanes (et le sarcospane),
- et le complexe cytoplasmique, incluant la dystrophine.

Le tableau 2, ci-contre, résume les isoformes des protéines associées à la dystrophine dans le muscle, ainsi que les maladies liées à leur absence.

C.1 Les dystroglycanes

Les dystroglycanes ont été identifiées en 1992 par Ibraghimov-Beskrovnaya et coll. (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). Il existe deux types de dystroglycanes, issus d'un même gène : l' α et le β dystroglycane (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993). Les deux types de dystroglycanes existent sous plusieurs formes qui diffèrent par leur degré de glycosylation. Les maladies musculaires liées aux dystroglycanes viennent de glycosylations aberrantes de l' α -dystroglycane (pour revue, voir (Endo, 2005)).

L' α -dystroglycane est une protéine extracellulaire. Elle est liée à plusieurs protéines de la matrice extracellulaire :

- la laminine- $\alpha 2$, composante de la matrice extracellulaire, qui est liée aux intégrines. Son absence provoque une myopathie musculaire congénitale, CMD (pour *merosin-deficient Congenital Muscular Dystrophy*) (pour revue voir (Miyagoe-Suzuki et al., 2000)).
- Le perlecan, une protéoglycane héparane sulfate qui lie la matrice extracellulaire à la membrane cellulaire par ses interactions avec les intégrines. Le perlecan joue un rôle dans l'agrégation des acétylcholinestérases à la jonction neuromusculaire, ces enzymes qui lysent l'acétylcholine et arrêtent ainsi l'excitation du muscle par le motoneurone (Peng et al., 1998). Son absence provoque le syndrome myotonique de Schwartz-Jampel (Arikawa-Hirasawa et al., 2002; Nicole et al., 2000).
- L'agrine (Gee et al., 1994; Hohenester et al., 1999), une protéine sécrétée, impliquée dans l'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine aux jonctions neuromusculaires.

La β -dystroglycane est une protéine transmembranaire. Du côté extracellulaire de la membrane plasmique, elle est liée à l' α -dystroglycane par son côté N terminal. Du côté cytoplasmique, elle interagit par son extrémité C terminale, riche en proline, avec le domaine riche en cystéine de la dystrophine (Jung et al., 1995; Suzuki et al., 1994; Suzuki et al., 1992). La β -dystroglycane interagit avec plusieurs protéines intracellulaires :

- la protéine adaptatrice Grb2 (*Growth factor Receptor Bound protein 2*) (Yang et al., 1995). Cette protéine est impliquée dans la transduction du signal et l'organisation du cytosquelette (Chardin et al., 1995; Lowenstein et al., 1992).
- La cavéoline-3, une protéine transmembranaire dont les extrémités C et N terminales se trouvent dans le cytoplasme (Sotgia et al., 2000). Les cavéolines sont des protéines qui peuvent former des *caveolae*, sorte de petit sacs, qui s'invaginent dans la cellule, ceci afin d'internaliser des récepteurs ou d'endocyter de petites molécules. La cavéoline-3 est impliquée dans la régulation négative de l'enzyme nNOS (neuronal Nitric Oxide Synthase) dans les muscles squelettiques (Venema et al., 1997). Dernièrement, Smythe et coll. ont montré que la cavéoline-3 est impliquée dans la localisation, et est nécessaire à l'activité normale, de la Src tyrosine kinase qui module notamment l'apoptose (Smythe et al., 2003). Son absence provoque la myopathie des ceintures de type 1C (LGMD 1C) (Minetti et al., 1998).
- La rapsyne, une protéine essentielle à la formation des jonctions neuromusculaires (Cartaud et al., 1998).

Le complexe des dystroglycane interagit avec de nombreuses protéines que ce soit à l'extérieur ou à l'intérieur de la fibre musculaire. Ces protéines soulignent deux rôles putatifs :

- l'organisation de la jonction neuromusculaire (agrine, rapsyne, perlecan),
- la transduction du signal (Grb2, cavéoline-3).

C.2 Les sarcoglycane

Les sarcoglycane sont des protéines transmembranaires. Il en existe plusieurs :

- l' α -sarcoglycane (Roberds et al., 1993) ;
- la β -sarcoglycane (Bonnemann et al., 1995; Lim et al., 1995) ;
- la γ -sarcoglycane (Noguchi et al., 1995) ;
- et la δ -sarcoglycane (Nigro et al., 1996a; Nigro et al., 1996b).

Ces 4 sarcoglycane sont associées en un complexe transmembranaire dans les fibres musculaires striées (pour revue, voir (Ozawa et al., 2005)).

L' ϵ -sarcoglycane remplace l' α -sarcoglycane dans les tissus autres que les muscles striés (Ettinger et al., 1997). La ζ -sarcoglycane (zéta) est la dernière identifiée (Wheeler et al., 2002). Pour l'instant, elle n'est pas reliée au complexe de la dystrophine.

Il existe plusieurs arguments en faveur d'une interaction directe entre le complexe des sarcoglycanes et le complexe des dystroglycanes, plutôt qu'avec la dystrophine :

- Yoshida et coll. ont extrait le complexe des sarcoglycanes avec le complexe des dystroglycanes (et le sarcospane) par une dissociation douce de tout le DGC à 37°C dans du NaCl 0,1M (Yoshida et al., 2000).
- Les sarcoglycanes α , β et δ interagissent in vitro avec l' α -dystroglycane (Sakamoto et al., 1997), donc du côté extracellulaire de la membrane plasmique.

Ce complexe est lié à plusieurs protéines intracellulaires, comme la dystrobrevine dont nous parlerons un peu plus tard, et la γ -filamine ou filamine 2 (Thompson et al., 2000).

La filamine est une protéine du cytosquelette qui participe à l'organisation des filaments d'actine en réseau tridimensionnel.

La perte des sarcoglycanes γ , α , β ou δ cause respectivement les myopathies musculaires des ceintures LGMD 2C, 2D, 2E, et 2F (pour revue, voir (Bushby, 1999)) (LGMD pour *Limb Girdle Muscular Dystrophy*).

C.3 Le sarcospane

Le sarcospane est une protéine transmembranaire non-glycosylée (Crosbie et al., 1997). Il est purifié en association avec le complexe des sarcoglycanes (Yoshida et al., 2000). Le complexe des sarcoglycanes est d'ailleurs nécessaire à la stabilisation du sarcospane à la membrane plasmique (Crosbie et al., 1999), mais l'inverse n'est pas vrai. Son absence n'est à l'origine d'aucune maladie musculaire connue.

C.4 Les syntrophines

Les syntrophines sont des protéines cytoplasmiques. Il en existe plusieurs formes. Trois sont exprimées dans les muscle striés : $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\beta 2$ (Ahn et al., 1996) et deux dans les neurones : $\gamma 1$ et $\gamma 2$ (Piluso et al., 2000). Elles présentent toutes une structure similaire, avec deux domaines d'homologie avec la pleckstrine (domaines PH) et un domaine PDZ. Les motifs PH sont retrouvés dans de nombreuses protéines de signalisation intracellulaire, souvent impliquées dans l'adressage à la membrane de leurs interacteurs (pour revue, voir (Cozier et al., 2004)). Les protéines à motif PDZ sont souvent impliquées dans l'adressage en des endroits sub-cellulaires précis des protéines avec lesquelles elles interagissent (Ponting and Phillips, 1995).

L' α -syntrophine est la forme prédominante dans les fibres musculaires. Elle est présente sous la membrane plasmique de toutes les fibres musculaires alors que la β 1-syntrophine est préférentiellement exprimée dans les fibres rapides et la β 2-syntrophine se trouve au niveau de la jonction neuromusculaire (Ahn et al., 1996; Peters et al., 1994). Les syntrophines se lient à la dystrophine et à la dystrobrevine, dans leurs parties C terminales (Ahn et al., 1996). Il existe deux sites de fixation aux syntrophines sur la dystrophine ainsi que sur la dystrobrevine (Newey et al., 2000), quatre syntrophines peuvent donc théoriquement être associées au complexe de la dystrophine.

Les syntrophines semblent être impliquées dans la transduction du signal au sens large. Pour exemple, l' α -syntrophine interagit avec plusieurs protéines intracellulaires, parmi lesquelles :

- nNOS (*neuronal Nitric Oxide Synthase*), qui permet la synthèse du monoxyde d'azote (NO), celui-ci est impliqué dans la signalisation intercellulaire de proximité (Brenman et al., 1996; Brenman et al., 1995).
- Une protéine kinase activée par un stress, la SAPK3 (Hasegawa et al., 1999), qui est une MAP kinase.
- Des canaux sodiques dépendant du voltage, dont elle permettrait l'agrégation à la jonction neuromusculaire (Gee et al., 1998).
- La calmoduline (Schultz et al., 1998), une protéine activée par le calcium, qui, à son tour, interagit avec d'autres protéines comme l'adénylate cyclase ou certaines kinases.
- La pompe à ions calcium ATPase, dépendante de la calmoduline (Williams et al., 2006), qui sert à repomper les ions calcium hors de la fibre musculaire.

Aucune maladie musculaire n'a été reliée à l'absence des syntrophines jusqu'à présent.

C.5 L' α -dystrobrevine

Les dystrobrevines sont des protéines cytoplasmiques très ressemblantes à la dystrophine en terme de structure. Elles possèdent les mêmes domaines riches en cystéines et C terminaux que la dystrophine mais ne possèdent pas de site de liaison à l'actine, ni la longue partie de répétitions spectrines (Blake, 2002).

Il existe plusieurs formes de dystrobrevines, codées par deux gènes, le gène des α -dystrobrevines et le gène des β -dystrobrevines. Les β -dystrobrevines sont exprimées dans de nombreux tissus non-musculaires où elles s'associent aussi à la dystrophine (Blake et al., 1999; Loh et al., 2000). Le gène des α -dystrobrevines donne au moins 5 produits d'épissages alternatifs (Sadoulet-Puccio et al., 1996), dont les formes musculaires prédominantes : α 1 et α 2. L' α 1-dystrobrevine est principalement présente aux jonctions neuromusculaires alors que l' α 2-dystrobrevine est préférentiellement localisée sous la

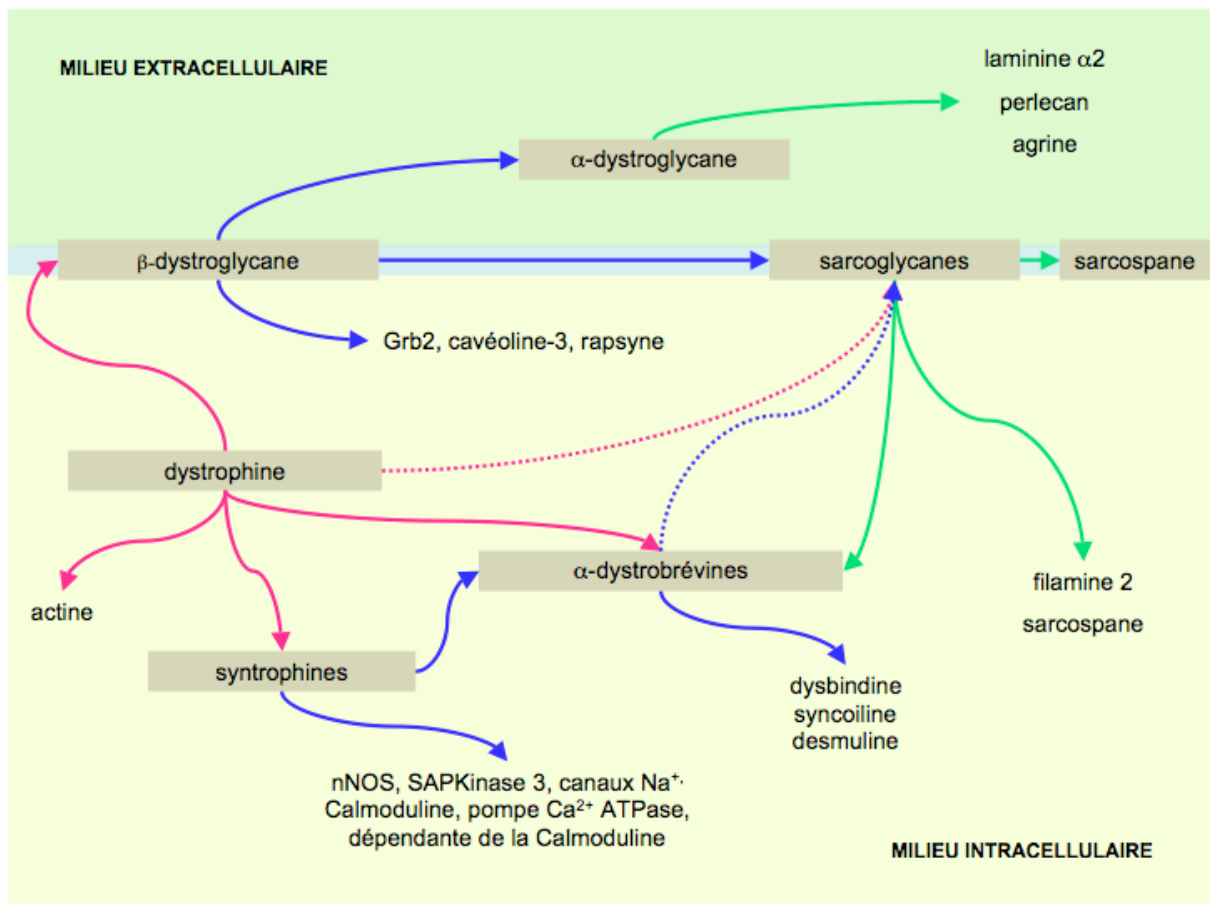
membrane plasmique (Peters et al., 1998). Dans les muscles striés, les dystrobrevines s'associent directement à la dystrophine, dans sa partie C terminale, et aux syntrophines (Roberts, 2001). On suppose qu'elles interagissent aussi avec le complexe des sarcoglycanes (Yoshida et al., 2000).

Trois protéines interagissant avec l' α -dystrobrevine ont été identifiées par crible double hybride chez la levure : la dysbindine, la syncoiline et la desmuline (Benson et al., 2001; Mizuno et al., 2001; Newey et al., 2001). Ce sont vraisemblablement des protéines de type filament intermédiaire, qui constituent le cytosquelette, avec l'actine et les microtubules. Au sein du DGC, l' α -dystrobrevine constitue donc un second lien mécanique avec le cytosquelette. De plus, elle aurait un rôle dans l'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine à la jonction neuromusculaire (Grady et al., 1999; Grady et al., 2000).

L' α -dystrobrevine est associée à une forme de cardiomyopathie congénitale, le syndrome de Barth (Hamamichi et al., 2001; Ichida et al., 2001).

Figure 5 : Représentation schématique des interactions de la dystrophine et du DGC

L'extérieur de la fibre musculaire est représentée en vert, l'intérieur en jaune et la membrane plasmique en bleu. Les protéines du DGC sont encadrées. Les interactions entre la dystrophine et d'autres protéines, sont représentées par des flèches rouges. Les interactions entre les protéines liées de façon directe à la dystrophine et d'autres protéines, sont représentées en bleu. Les interactions entre des protéines associées de façon indirecte à la dystrophine et d'autres protéines, sont représentées en vert. Les flèches en pointillées représentent des interactions controversées. Figure réalisée à partir des références situées dans le paragraphe C, consacré aux protéines associées à la dystrophine.



D. Le DGC et son rôle dans les myopathies de Duchenne et Becker

Ce sont des mutations dans le gène de la dystrophine, entraînant une diminution ou la disparition complète de dystrophine dans les muscles, qui sont à l'origine des myopathies de Duchenne et Becker. La ou les fonctions de la dystrophine restent encore à découvrir, mais on sait que la dystrophine est la pierre angulaire d'un complexe protéique appelé *Dystrophin Glycoprotein Complex* (DGC). Ce complexe est complètement désorganisé en absence de dystrophine.

D.1 Le DGC

Le DGC comprend :

- la dystrophine ;
- l' α et la β 1-syntrophines qui sont cytoplasmiques, et sont directement liées aux parties C terminales de la dystrophine et à la dystrobrevine;
- l' α -dystrobrevine, cytoplasmique, liée à la partie C terminale de la dystrophine, ainsi qu'aux syntrophines et potentiellement aux sarcoglycanes;
- le sarcospane et les 4 formes musculaires de sarcoglycane, qui sont transmembranaires et sont liés à la dystrobrevine et aux complexes des dystroglycanes ;
- le complexe transmembranaire des dystroglycanes, lié aux sarcoglycanes et à la dystrophine (interaction de la β -dystroglycane avec le domaine riche en cystéine).

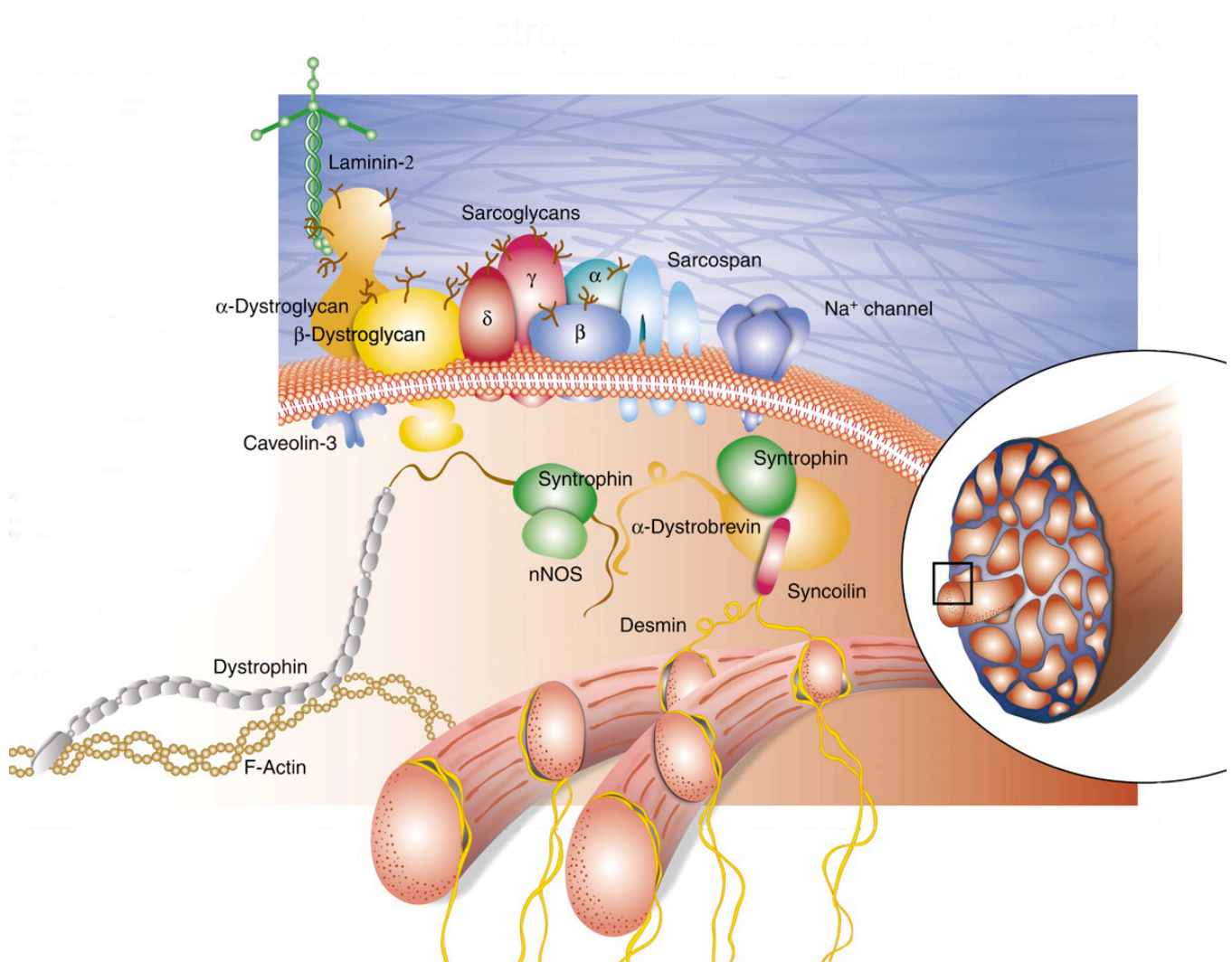
Les interactions protéiques du DGC sont nombreuses. La figure 5, ci-contre, a pour but de résumer les interactions des différentes protéines du DGC entre elles, et avec d'autres protéines. La figure 6, page suivante, montre une représentation tridimensionnelle du DGC, tirée de (Ehmsen et al., 2002). Toutes les protéines composant le DGC sont représentées, ainsi que quelques unes des protéines qui leurs sont liées.

Bien que l'on ne sache pas précisément quels sont les rôles de ce complexe, la nature des protéines liées directement ou indirectement à la dystrophine nous donne de précieuses indications. On peut supposer que le DGC participe au maintien de l'intégrité de la membrane (lien entre la matrice extracellulaire et l'actine intracellulaire). Il pourrait être impliqué dans la régulation du niveau d'excitabilité de la fibre en régulant les canaux ioniques. Ses multiples interactions avec des protéines du signal (Grb2, calmoduline) indique un rôle dans la signalisation intracellulaire. Ces hypothèses sont exposées ci-après.

Figure 6 : Représentation tridimensionnelle du DGC

La dystrophine est liée au complexe des dystroglycane, et par celui-ci à la laminine-2 du côté extracellulaire, et la cavéoline-3 du côté intracellulaire. Le complexe des dystroglycane est lié directement au complexe des sarcoglycane qui, lui, est directement lié au sarcospane.

En intracellulaire, la dystrophine est directement liée à l'actine et à la syntrophine, ainsi qu'à l' α -dystrobrevine. Par ces protéines, le complexe est lié à nNOS, à un canal sodique voltage-dépendant et à la syntrophine. Tiré de (Ehmsen et al., 2002).



D.2 Hypothèse structurale

Le DGC forme un lien physique entre les protéines structurales de la membrane basale (laminines) et les protéines structurales du cytosquelette (filaments intermédiaires et actine). Une hypothèse est que ce lien permettrait de maintenir l'intégrité membranaire (Petrof et al., 1993). En son absence, on peut observer des lésions ponctuelles de la membrane des fibres musculaires chez les garçons DMD, appelées lésions delta, ainsi que la libération de créatine kinase dans le sang, une enzyme normalement exclusivement intracellulaire (Helliwell et al., 1994). On peut imaginer que la dystrophine, avec son grand domaine central de répétitions spectrines, confère une certaine élasticité à la membrane des fibres musculaires, ce qui leur permet de résister à la force développée par chaque contraction (Koenig and Kunkel, 1990). Une étude récente suggère que la perte d'intégrité membranaire serait l'événement déclencheur de la dégénérescence des fibres musculaires (Judge et al., 2006), mais cette question reste très controversée.

D.3 Hypothèse métabolique

Très tôt, on a observé que les fibres musculaires des garçons DMD étaient surchargées en calcium (Bertorini et al., 1982; Duncan, 1978). Ces observations initiales ont largement été controversées. Les études les plus récentes semblent toutefois confirmer cette augmentation du taux de calcium intracellulaire dans les fibres musculaires dépourvues de dystrophine (Mallouk et al., 2000). Le niveau de calcium dans les fibres musculaires est régulé par différents mécanismes :

- il entre par des canaux passifs et des canaux dépendants de l'activité contractile ou du voltage ;
- il sort par des canaux échangeurs d'ions ;
- il est stocké par des protéines dans le cytoplasme ou dans le réticulum sarcoplasmique (RS).

L'hypothèse métabolique établit un lien entre l'interaction du DGC avec des canaux ioniques, et l'excitabilité de la fibre musculaire. Par exemple, le canal sodique voltage dépendant, lié à la syntrophine (figure 6), participe à l'établissement du potentiel d'action qui déclenche la libération massive du calcium dans la fibre. On peut supposer que l'absence de DGC entraîne le dysfonctionnement de ce canal et une excitabilité plus grande. Ceci entraînerait des libérations de calcium répétées, dépassant la capacité des systèmes d'évacuation du calcium, et donc une concentration calcique intracellulaire plus élevée. On peut noter que l'augmentation de calcium intracellulaire est aussi imputable aux lésions delta, qui entraînent une entrée, non contrôlée et continue, de calcium dans le cytoplasme.

Cette augmentation permanente du niveau de calcium pourrait activer les calpaïnes, des protéases dépendantes du calcium (pour revue, voir (Batchelor and Winder, 2006)). De plus, cela favoriserait la contraction musculaire, qui elle-même entraîne des dommages membranaires.

D.4 Hypothèse signalétique

Nombre de protéines interagissant avec les protéines associées à la dystrophine ont un rôle dans la signalisation intracellulaire. L'hypothèse signalétique suppose que lorsque le complexe se désorganise, toutes les voies de signalisation dans lesquelles sont impliquées ces protéines sont touchées (Rando, 2001). Parmi les protéines interagissant avec des protéines du DGC, on peut citer :

- Grb2, qui est impliqué dans la transduction du signal (voir le chapitre sur les dystroglycanes) ;
- la cavéoline-3, qui est notamment impliquée dans la régulation de nNOS et celle de la tyrosine kinase Src (voir le chapitre sur les dystroglycanes) ;
- nNOS, l'enzyme qui fabrique le NO, un second messager (voir le chapitre sur les syntrophines) ;
- SAPK3, une protéine kinase activée par le stress (voir le chapitre sur les syntrophines) ;
- la calmoduline, une protéine régulée par le calcium qui régule elle-même l'activité de certaines enzymes intracellulaires (voir le chapitre sur les syntrophines).

Cette liste n'est pas exhaustive et pour la plupart des protéines citées, il n'a pas été établi que l'absence de dystrophine provoque leur dérégulation.

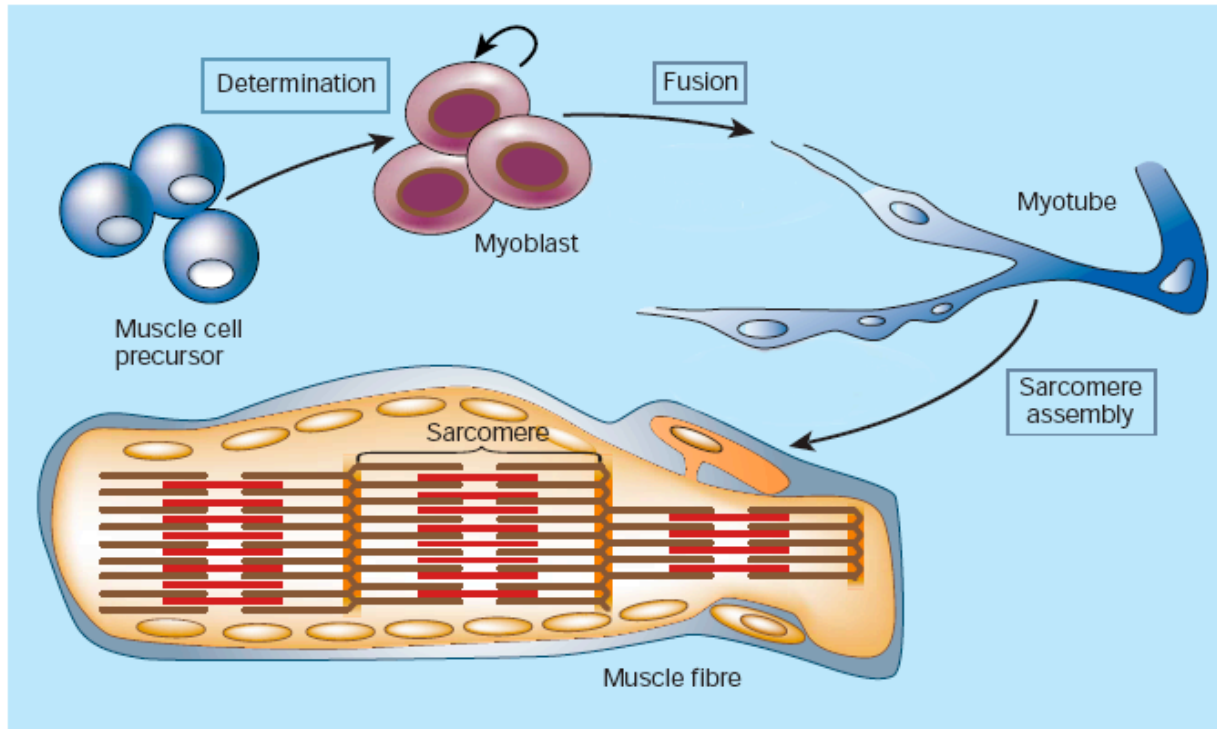
D.5 Conclusion

Le nombre d'interactions connues et supposées du DGC indique que c'est un carrefour protéique. Ses fonctions sont très certainement multiples. Les hypothèses énoncées ci-dessus ne sont pas exclusives, et peuvent même s'autoalimenter, comme les lésions membranaires et l'augmentation du calcium intracellulaire.

Dans le cadre de l'élaboration de thérapies contre les myopathies de Duchenne et Becker, l'élucidation des fonctions de la dystrophine et du DGC est un point crucial. Ceci pourrait aider à comprendre plus précisément comment et où commence la dégénérescence des fibres musculaires en absence de dystrophine.

Figure 7 : Représentation schématique de la formation d'une fibre musculaire striée

Les cellules précurseurs sont déterminées en myoblastes par des facteurs de transcription. Ces myoblastes migrent vers leur destination et prolifèrent. Ils fusionnent en myotubes primaires puis secondaires sous l'influence de facteurs de transcription. Les myotubes se différencient ensuite en fibres musculaires, et acquiert les structures spécifiques de ces fibres, tel que le sarcomère. Adapté de (Gullberg, 2003).



Chapitre II - Mise en place et maintenance du muscle strié

Le principal signe clinique des myopathies de Duchenne et Becker est la dégénérescence des muscles striés, et particulièrement des muscles des membres. Je donne ici un bref aperçu des mécanismes impliqués dans la formation, la fonction et la réparation des muscles striés chez les mammifères. Ceci afin de mieux comprendre les recherches de thérapies, ainsi que les modèles utilisés et leurs limites, qui seront traités dans le chapitre suivant.

A. Formation des fibres musculaires striées

Les muscles des membres des mammifères se forment à partir du mésoderme embryonnaire, plus particulièrement à partir des somites. Une succession de signaux permet la détermination des cellules des précurseurs des somites en myoblastes, les cellules à destinée musculaire, puis leur migration vers les endroits où vont se former les muscles, et enfin leur différenciation en fibres musculaires (figure 7).

A.1 Détermination des myoblastes

Les facteurs de transcription principaux qui entrent en jeu dans ce processus sont Pax3, MyoD et Myf5. Pax3 permet l'engagement des cellules du somite dans la détermination myoblastique, ainsi que leur migration. Plus tard dans l'embryogenèse, sont activés les facteurs de transcriptions myogéniques MyoD et Myf5. Ils font partie de la famille des *Myogenic Regulatory transcription Factors* (MRFs) de type *basic helix-loop-helix* (bHLH). L'activation de ces deux facteurs de transcription est régulée par des signaux provenant des tissus environnant le somite. Leur activation marque l'engagement définitif dans le lignage musculaire.

L'étude de *knock-out* de ces gènes chez les souris montre que MyoD et Myf5 sont fonctionnellement redondants. Seule l'inactivation des deux en même temps empêche totalement la formation des muscles squelettiques. Ils sont nécessaires à la formation et à la survie des myoblastes (De Recondo and De Recondo, 2001b).

A.2 Fusion en myotubes

Une fois arrivés à destination, les myoblastes fusionnent en myotubes. Cette fusion se fait sous l'influence de la myogénine, un autre MRF de type bHLH. La myogénine est activée par des facteurs de transcription, notamment Myf5. Il existe deux vagues de fusion, la première donne lieu rapidement aux myotubes primaires, puis de nouveaux myoblastes s'amoncellent autour de ces myotubes primaires et prolifèrent. Ils s'intégreront aux myotubes primaires au cours du temps pour donner les myotubes secondaires. Les protéines de type laminine et intégrine jouent un grand rôle dans le recrutement et la fusion des myoblastes aux myotubes primaires (De Recondo and De Recondo, 2001b).

A.3 Myofibrillogenèse et formation des autres structures spécifiques

Les myotubes secondaires vont former les fibres musculaires. Au cours de cette différenciation, les noyaux vont migrer de leur place centrale dans le myotube à la périphérie de la fibre. Ce phénomène est dépendant de la myotubularine. Mrf4, de la famille des MRFs, est impliqué à ce stade dans le maintien des cellules musculaires différenciées. MyoD et la myogénine, entre autres, induisent l'expression des protéines myofibrillaires (actine, myosine), qui formeront les sarcomères. Le sarcomère est l'unité contractile du muscle (De Recondo and De Recondo, 2001b).

B. Sarcomère et contraction musculaire

B.1 Le sarcomère

Dans les muscles striés, les fibres sont formées de multitudes de myofibrilles, qui sont des répétitions de sarcomères. Les sarcomères sont formés principalement d'actine et de myosine. Un sarcomère est défini de chaque côté par une strie ou ligne Z. Les filaments d'actine sont ancrés dans les stries Z de façon à former deux peignes, en face l'un de l'autre. Entre les deux peignes, se trouve la strie ou la ligne M, où sont ancrés les filaments épais de myosine, de façon à être intercalés avec les filaments d'actine.

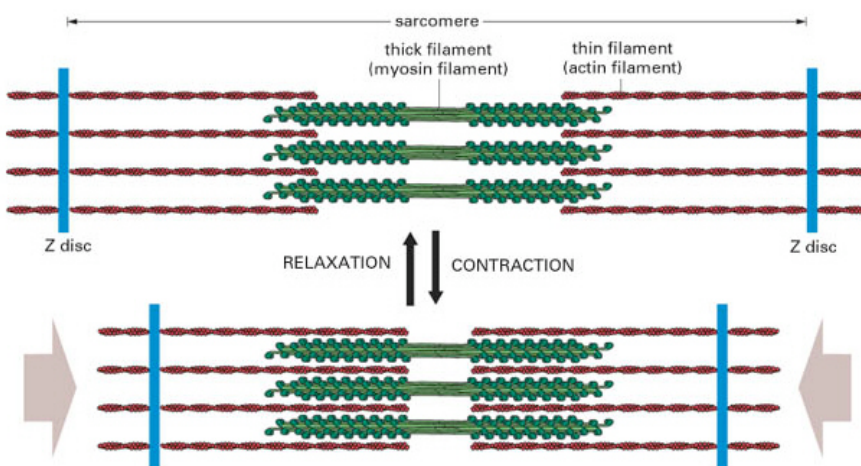


Figure 8 : Le sarcomère

Le sarcomère est constitué de filaments fins d'actine, fixés à la strie Z (*Z disc*), et de filaments épais de myosine.

C'est le glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine qui provoque la contraction du sarcomère.

B.2 Mécanisme de la contraction musculaire

C'est la fixation et le déplacement de la myosine sur l'actine, grâce à l'énergie fournie par l'ATP, qui entraîne la contraction du sarcomère et ainsi la contraction de la myofibrille et de la fibre musculaire. La contraction du sarcomère est dépendante de la concentration de calcium intracellulaire car le site de fixation de la myosine sur l'actine est masqué par un complexe protéique. Le calcium permet de découvrir ce site en se fixant au complexe, permettant ainsi la contraction musculaire (De Recondo and De Recondo, 2001b).

Le calcium intracellulaire augmente lorsque la membrane de la fibre musculaire est dépolarisée, suite à la libération de neurotransmetteurs par le motoneurone.

C. Maintenance et réparation du muscle

C.1 Les voies de signalisation de contrôle de la masse musculaire

La voie de signalisation de l'*insulin-like growth factor 1* (IGF-1), par l'activation des kinases Akt, régule positivement la formation et la maintenance du muscle squelettique, notamment par des actions anti-apoptotique et de promotion de la synthèse protéique (pour revue, voir (Guttridge, 2004)).

La myostatine fait partie de la super famille des TGF β . Cette voie régule négativement la masse musculaire. En absence de myostatine, on constate une augmentation du nombre et de la taille des fibres musculaires. Les études menées jusqu'à présent suggèrent que la myostatine réduit la masse musculaire en inhibant la prolifération et la différenciation des myoblastes, ainsi qu'en baissant la synthèse protéique dans les fibres musculaires matures (pour revue, voir (Guttridge, 2004)).

Le voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor κ B*), qui est connu pour être impliqué dans la réponse immunitaire, intervient dans la myogenèse. Son activité est régulée par I- κ B, qui lui est associé dans le cytoplasme. La dégradation d'I- κ B provoque la translocation de NF- κ B dans le noyau sous sa forme active. L'activation de NF- κ B inhibe notamment la différenciation en réprimant la synthèse de MyoD. Il serait aussi impliqué dans l'inhibition de la réparation, voire la dégradation des fibres musculaires. Son action est notamment dépendante du *tumor necrosis factor α* (TNF- α). Cette voie de contrôle de la masse musculaire n'est pas encore clairement élucidée (pour revue, voir (Guttridge, 2004)).

C.2 Régénération musculaire

Lorsque le muscle subit un dommage et après que le processus inflammatoire ait eu lieu, les fibres musculaires sont reconstituées à partir des cellules satellites. Les cellules satellites sont des cellules engagées dans la détermination myogénique mais qui ne sont pas encore différenciées. Elles se trouvent en périphérie des fibres musculaires et sont aussi appelées « cellules souches musculaires ».

Le processus régénératif commence par la prolifération des cellules satellites. Puis, elles fusionnent aux fibres existantes. Les noyaux nouvellement ajoutés à la fibre migrent par la suite en périphérie. Les MRFs jouent un rôle dans le processus régénératif semblable à celui observé lors de l'embryogenèse (pour revue, voir (Charge and Rudnicki, 2004)).

Chapitre III - Les modèles d'étude animaux et les traitements des myopathies de Duchenne et Becker

A. Les modèles animaux

A.1 Modèles mammifères

Les modèles mammifères ont l'avantage d'être très proches des humains phylogénétiquement. Ils possèdent des homologues de toutes les protéines décrites précédemment..

A.1.1 Chiens GRMD (*Golden Retriever Muscular Dystrophy*)

Il existe plusieurs souches de chiens présentant des mutations dans le gène de la dystrophine. La souche la plus utilisée est celle des chiens GRMD, qui a été décrite pour la première fois en 1986 (Valentine et al., 1986).

Génotype et Phénotype des chiens GRMD

La mutation qui affecte cette souche de chiens est une mutation ponctuelle qui provoque la délétion de l'exon 7, ainsi qu'un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon STOP prématuré dans l'exon 8 (Valentine et al., 1992). Un phénomène d'épissage alternatif permet la production d'une protéine tronquée, de 390kDa, mais en très faible quantité (Schatzberg et al., 1998). Toutes les isoformes courtes sont exprimées.

Les chiots subissent une atteinte musculaire progressive, dès deux mois et jusqu'à leur mort par insuffisance respiratoire ou cardiaque (Valentine et al., 1992). Tout comme les humains, ils développent une cardiomyopathie et des problèmes de motricité, mais ils ne perdent jamais complètement leur mobilité (Valentine et al., 1988). Il existe une forme néonatale qui provoque une mortalité non négligeable des chiots GRMD dans les deux premières semaines de vie. Cette mort prématurée est due à une dégénérescence musculaire généralisée, particulièrement avancée dans le diaphragme (Valentine et al., 1988).

Conclusion

Les lésions des muscles striés squelettiques et du muscle cardiaque sont très similaires à ce qui est observé chez les garçons DMD. Le développement et les signes cliniques sont aussi très similaires. Enfin, la taille de ces animaux, proche de celle des garçons DMD, en fait un modèle de choix pour étudier la faisabilité de la thérapie génique ou cellulaire

(Howell et al., 1997). Récemment un essai de thérapie par oligonucléotides anti-sens a été mené avec succès dans ce modèle (McClorey et al., 2006). De plus, le chien GRMD est le seul animal modèle de la myopathie à présenter une atteinte myocardique semblable à celle observée chez les garçons DMD et à permettre une investigation à ce niveau-là (nombre battements par minute et grosseur du cœur semblables). Cependant, le coût de l'élevage de ces animaux est très élevé et leur utilisation ne peut être qu'occasionnelle. De plus, les portées sont de taille réduite (la forme néonatale les diminue encore), et peu d'animaux atteignent l'âge adulte car ils sont très faibles.

A.1.2 Chats HFMD (*Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy*)

Une souche de chats portant une délétion du promoteur musculaire du gène de la dystrophine a été décrite (Carpenter et al., 1989; Winand et al., 1994). Une très faible quantité de dystrophine est détectée dans leurs muscles.

Ces chats subissent une dégénérescence musculaire mais présentent une hypertrophie et une raideur généralisée. L'hypertrophie est due à l'augmentation de la taille des fibres et non de leur nombre. Un grand nombre de fibres sont calcifiées (accumulation d'ions calcium en cristaux). Les chats développent une cardiomyopathie, mais leurs muscles ne sont pas atteints de fibrose (Gaschen et al., 1999). Le phénotype des chats HFMD est très différent de celui des humains, l'absence de la dystrophine provoque la dégénérescence des fibres musculaires mais l'adaptation à cette situation est différente.

A.1.3 Souris *mdx* (*muscular dystrophy X-linked*)

Souche historique mdxScSn

La souche historique est apparue de façon spontanée dans un élevage (Bulfield et al., 1984). C'est la souche appelée C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx} (Jackson laboratory, <http://jaxmice.jax.org>), que je nommerai *mdxScSn*. Cette souche porte une mutation ponctuelle dans l'exon 23 (sur 79) qui provoque l'apparition d'un codon STOP prématuré (Sicinski et al., 1989). Cette souche de souris ne présente pas de dystrophine dans les muscles et son absence provoque la délocalisation des protéines du DGC (Ohlendieck and Campbell, 1991). Les souris *mdxScSn* développent une forme de myopathie moins sévère que celle observée chez les humains (Bulfield et al., 1984). Le muscle le plus atteint est le diaphragme. C'est aussi celui qui présente l'évolution dystrophique la plus ressemblante à celle observée chez les humains : forte dégénérescence musculaire, faible régénération et fibrose chez les souris âgées (Stedman et al., 1991). On peut observer un épisode dégénératif dans les muscles squelettiques de ces souris durant les deux premiers mois de vie. Ces muscles subissent peu de fibrose. Le début de l'épisode dégénératif reste à

préciser. Quelques études montrent l'apparition de fibres nécrotiques dès 15 jours après la naissance dans le diaphragme et 16 jours dans les muscles des membres (Muntoni et al., 1993; Shavlakadze et al., 2004). Mais la plupart des études ne constatent pas de dégénérescence musculaire avant le 19ème voire le 21ème jour après la naissance (Disatnik et al., 1998; Grounds and Torrisi, 2004; Tanabe et al., 1986).

Le taux de dégénérescence a été estimé à 30% durant les 5 premières semaines dans l'EDL et un peu moins dans le soleus (Carnwath and Shotton, 1987). Cependant, les souris *mdxScSn* ne perdent jamais leur mobilité et ont une durée de vie normale. Ce phénotype myopathique faible est sans doute dû à la forte régénération des fibres musculaires, on peut même observer une hypertrophie chez les souris âgées (Deconinck et al., 1997b). De plus, on observe une surexpression de l'utrophine dans les fibres musculaires, où elle n'est plus située uniquement aux jonctions mais partout sous la membrane (Matsumura et al., 1992). Les souris *mdxScSn* ne montrent pas ou peu d'atteinte myocardique (Coulton et al., 1988).

L'élevage de ces souris est délicat car elles donnent peu de petits.

Autres souches de mdx

Quatre autres souches ont été créées par mutagenèse chimique dans le fond génétique C57BL/6 (Chapman et al., 1989). Ces souches sont appelées B6Ros.Cg-Dmd^{mdx2,3,4,5Cv} (Jackson laboratory, <http://jaxmice.jax.org>), ci-après nommées *mdx2,3,4,5Cv*. Elles présentent moins de fibres révertantes que la souche historique (Danko et al., 1992). Leur phénotype lésionnel est similaire à celui observé chez les *mdxScSn* : dégénérescence dans les premières semaines de vie, régénération importante, hypertrophie en fin de vie et pas d'atteinte myocardique (Chapman et al., 1989; Danko et al., 1992). Elles ont l'avantage de donner plus de petits que les souris *mdxScSn*. La mutation la plus précoce est la *5Cv*, cette souche ne présente pas de dystrophine musculaire mais toutes les autres isoformes sont présentes (Cox et al., 1993; Im et al., 1996). Actuellement, les deux souches utilisées en laboratoire sont la *mdxScSn* et la *mdx5Cv*.

Il existe une souche de souris chez lesquelles l'exon 52 a été spécifiquement enlevé (Araki et al., 1997). Ces souris présentent un phénotype lésionnel identique aux cinq autres souches de *mdx*.

Les autres modèles murins

Les causes probables du phénotype myopathique faible des souris *mdx* sont une régénération accrue et la surexpression de l'utrophine. Par conséquent, certaines équipes ont essayé de créer des souris présentant un phénotype plus proche de celui observé chez les humains en inactivant soit l'utrophine, soit les gènes responsables de la régénération.

Les souris portant des mutations dans le gène de la dystrophine et celui de l'utrophine ont un phénotype plus proche de celui observé chez les humains. Elles présentent un retard de croissance avec perte de masse musculaire et une dégénérescence musculaire qui provoque une mort prématurée (Deconinck et al., 1997a).

MyoD, un facteur de différenciation myogénique de la famille MRF (*Myogenic Regulatory Factor*), a été inactivé dans des souris *mdxScSn*. Ces souris présentent un phénotype myopathique aggravé par rapport aux souris *mdx*, elles ont une espérance de vie fortement diminuée (Megenny et al., 1996). Cette aggravation du phénotype est due à une baisse drastique de la régénération suite à la dégénérescence musculaire (Megenny et al., 1996). C'est le seul modèle murin présentant une atteinte myocardique (Megenny et al., 1999).

Ces deux souches de souris sont difficiles à élever car elles se reproduisent peu du fait de leur phénotype myopathique. De plus, ces souris portant deux mutations, l'interprétation des résultats est plus difficile. Elles sont peu utilisées.

A.1.4 Conclusion

Tous les modèles mammifères de la myopathie de Duchenne subissent une dégénérescence des muscles striés squelettiques suite à l'absence de dystrophine. Pourtant, tous ces modèles ne développent pas les mêmes signes cliniques.

Le chien GRMD est celui qui développe la pathologie la plus proche de la myopathie de Duchenne, avec une évolution histologique semblable, notamment la fibrose des muscles et le développement de troubles cardiaques.

Les chats HFMD et les souris *mdx* ont un phénotype général très différent des humains. Ces deux modèles présentent une hypertrophie musculaire et leurs capacités de locomotion sont pas, ou peu, diminuées.

Les chats présentent une atteinte du muscle cardiaque et décèdent prématurément des suites des atteintes respiratoires. Leurs muscles ne présentent pas de fibrose.

Les souris *mdx* ne développent pas d'atteinte cardiaque, ni respiratoire, et leur durée de vie est inchangée. Leurs muscles ne développent pas de fibrose, à l'exception du diaphragme qui a une évolution histologique proche de celle des muscles des humains.

Ces deux modèles ne reproduisent que partiellement la physiopathologie observée chez les garçons atteints par la myopathie de Duchenne.

L'étude de ces trois modèles mammifères montre deux choses. D'une part, le fait que la fibrose soit quasi inexistante dans les muscles squelettiques des chats HFMD et des souris

mdx et que ces animaux conservent une locomotion normale suggère que la fibrose joue un rôle important dans le développement de l'incapacité motrice observée chez les chiens GRMD et les humains.

D'autre part, ces modèles ne peuvent pas être utilisés pour les mêmes études. Les chats HFMD et les souris *mdx* ne peuvent pas être utilisés comme modèle expérimental pour les thérapies visant l'établissement du phénotype myopathique (fibrose, perte de locomotion). Ils conviennent parfaitement pour les études de thérapie génique, qui s'attaque à la cause de la dégénérescence. Pour les études nécessitant un grand nombre d'animaux, le modèle *mdx* est celui qui prévaut car moins coûteux. Les chiens GRMD conviennent à l'étude des thérapies ciblant aussi bien la dégénérescence musculaire primaire, que l'établissement du phénotype myopathique. Leur utilisation est limitée à quelques essais pré-cliniques par leur coût élevé.

On peut noter qu'il n'existe pas de modèle primate, mais des études visant à améliorer la thérapie par transfert de myoblastes ont déjà été menées chez ces animaux (Skuk and Tremblay, 2000).

A.2 Autres modèles

Les organismes non mammifères, bien que plus éloignés des humains que les modèles mammifères, peuvent constituer une approche complémentaire. Leur relative simplicité par rapport aux mammifères (non redondance génétique, simplicité anatomique), permet d'étudier plus directement certains mécanismes conservés et ils ont l'avantage d'être beaucoup moins coûteux et beaucoup plus rapide à élever (de quelques jours à quelques semaines). Les résultats des études menées chez ces organismes peuvent parfois alimenter les recherches sur les modèles mammifères.

A.2.1 Le poisson zèbre *Danio rerio*

Le poisson zèbre est un vertébré non mammifère qui possède de nombreux muscles striés. Un homologue de la dystrophine a été identifié en 2001 dans son génome (Chambers et al., 2001). La protéine produite se situe dans les muscles, sous la membrane cellulaire. Plusieurs protéines homologues aux protéines associées à la dystrophine chez l'humain ont été mises en évidence. Leurs localisations subcellulaires sont semblables à celles observées chez les humains (Guyon et al., 2003). Les poissons zèbres dont la dystrophine est inactivée (mutants *sap*) présentent de la dégénérescence musculaire, les fibres perdent leur attachement au tendon, se rétractent et disparaissent (Bassett and Currie, 2003). Ce mécanisme n'a jamais été montré chez l'humain, peut-être car les

biopsies sont réalisées dans la masse du muscle, et non vers son attache, pour une question d'homogénéité de fibres.

A.2.2 La mouche *Drosophila melanogaster*

La drosophile est un invertébré qui possède un homologue de la dystrophine, ainsi que des homologues des différents composants du DGC (Greener and Roberts, 2000). Bien que le muscle ne soit pas histologiquement affecté en absence de dystrophine musculaire, on observe une augmentation du relargage de neurotransmetteurs à la synapse (van der Plas et al., 2006). C'est bien l'absence de dystrophine dans les muscles, et non les neurones, qui provoque cette augmentation. Les auteurs suggèrent que l'absence de dystrophine dans le muscle pourrait perturber une voie de rétroinhibition du muscle dépolarisé sur le motoneurone (van der Plas et al., 2006). D'autres investigations sont nécessaires.

A.2.3 Le nématode *Caenorhabditis elegans*

Le nématode *Caenorhabditis elegans* est un invertébré qui est évolutivement éloigné des mammifères. Il possède néanmoins des homologues de la dystrophine et de certaines protéines du DGC (Bessou et al., 1998; Gieseler et al., 2000). Un chapitre est consacré au nématode *C. elegans*, ainsi qu'au modèle *C. elegans* de dégénérescence musculaire avec lequel j'ai travaillé au cours de ma thèse.

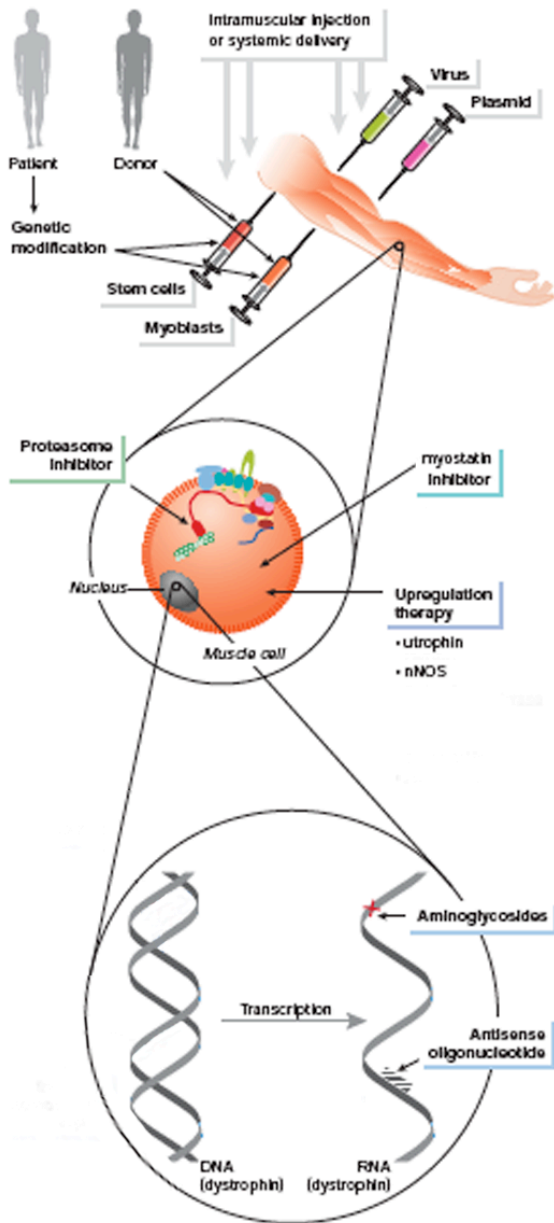


Figure 9 : Schéma des principales thérapies envisagées contre les myopathies de Duchenne et Becker

Une stratégie de thérapie est d'introduire une copie du gène de la dystrophine fonctionnelle, soit *via* des vecteurs viraux ou plasmidiques, soit *via* des cellules souches embryonnaires ou des myoblastes adultes.

On peut essayer de remplacer la dystrophine par l'utrophine, la protéine structurellement la plus proche, en provoquant sa surexpression.

Différents traitements pharmacologiques sont envisagés, avec pour but d'inhiber la dégradation protéique (inhibiteur de protéasome), d'augmenter la régénération (inhibiteur de la myostatine) ou encore de passer les codons stop prématurés (antibiotiques aminoglycosides).

Une autre stratégie vise à réparer l'ARNm en éliminant l'exon ou les exons défectueux en utilisant des oligonucléotides anti-sens.

Schéma adapté de (Nowak and Davies, 2004).

B. Les traitements

La myopathie de Duchenne est caractérisée depuis plus d'un siècle, celle de Becker est connue depuis la moitié du 20ème siècle. Le gène à l'origine de ces deux maladies héréditaires a été identifié depuis presque 20 ans et pourtant il n'existe toujours pas de traitement curatif contre ces maladies.

Les traitements actuellement proposés sont d'ordre palliatif et visent à réduire les conséquences de l'absence de la dystrophine :

- la prednisone, un traitement palliatif médicamenteux qui est discuté plus loin,
- la rééducation pour lutter contre l'affaiblissement musculaire,
- la chirurgie et les appareillages correctifs lors de l'apparition des problèmes moteurs,
- la ventilation et la kinésithérapie respiratoire,
- l'adaptation de la nourriture pour faciliter la déglutition.

Les stratégies thérapeutiques actuellement explorées sont de plusieurs types. La figure 9 les résume.

B.1 Thérapie génique

B.1.1 Transfert d'une copie sauvage du gène de la dystrophine

La réintroduction d'une copie sauvage du gène de la dystrophine dans les muscles est la solution la plus radicale. Le problème n'est pas simple à résoudre car il faut faire entrer le gène dans les fibres musculaires, de préférence toutes. Il faut que le gène s'exprime de façon pérenne et que le vecteur ne soit pas nocif pour le patient. A tous ces problèmes s'ajoute celui de la taille de la dystrophine, son ADN complémentaire (ADNc) fait 14kb, ce qui dépasse les capacités de transport des vecteurs viraux les plus utilisés en thérapie génique.

Injection de plasmides

Les plasmides sont le moyen le plus simple pour faire entrer une séquence d'ADN dans un organisme. Les plasmides ont l'avantage de se produire en grande quantité et de n'être que peu immunogènes. Leur efficacité de transfection dans les fibres musculaires est cependant très basse.

Les premières expériences de transfert étaient basées sur l'injection d'une copie sauvage du gène de la dystrophine directement dans les muscles, chez la souris *mdx* (Acsadi et al., 1991). Par cette méthode, on observait l'expression de la dystrophine que dans 1% des fibres du muscle. Depuis, plusieurs équipes ont montré chez la souris *mdx* que l'injection du gène de la dystrophine dans le système vasculaire peut mener à l'expression de

dystrophine dans 1 à 10% des fibres musculaires de la région ciblée (Liang et al., 2004; Liu et al., 2001; Zhang et al., 2004). Dans ces expériences, non seulement la dystrophine est exprimée, mais elle est localisée sous la membrane et son expression est corrélée avec une baisse de la dégénérescence musculaire. La dystrophine réexprimée par ce biais semble assurer la même fonction que la dystrophine native.

L'expression de la dystrophine perdure jusqu'à 6 mois après l'injection primaire (musculaire ou intravasculaire). Les souris développent des anticorps anti-dystrophine mais pas de réponse immunitaire cellulaire à l'encontre des fibres exprimant la dystrophine. C'est donc une méthode sûre. Elle a d'ailleurs fait l'objet d'un test clinique en 2002 sur 9 patients atteints de la maladie de Duchenne/Becker (Romero et al., 2002). Six des 9 patients ont montré l'expression de la dystrophine dans quelques fibres du muscle, 3 semaines après l'injection (Romero et al., 2004).

Vecteurs viraux

Les virus sont des vecteurs naturels d'ADN ou d'ARN. Ils entrent dans leurs cellules hôtes et y introduisent leur contenu nucléique afin de se répliquer. Ils peuvent servir au transport de gènes d'intérêt. L'utilisation de tels vecteurs présente deux avantages par rapport aux plasmides:

- augmenter l'efficacité de pénétration de l'ADN dans les fibres,
- cibler des types cellulaires spécifiques.

Par contre, ils présentent une pathogénicité accrue même si le virus est inactivé.

Différents vecteurs sont utilisés : les adénovirus ou apparentés, les rétrovirus et les AAV (*adeno associated virus*).

Les adénovirus peuvent être produits en grande quantité et infectent les muscles avec une bonne efficacité (Graham and Prevec, 1991), mais ils sont très immunogènes et ce même lorsque les gènes viraux sont supprimés (DelloRusso et al., 2002).

Les rétrovirus présentent l'avantage de ne pas provoquer de réponse immunitaire exagérée. Cependant, ce sont des virus difficiles à produire en grand nombre, et ils infectent avec une faible efficacité les fibres musculaires (Dunckley et al., 1993). De plus, leur intégration aléatoire au génome et leur éventuelle remobilisation peut engendrer des mutations.

Les AAV présentent l'avantage d'être moins immunogènes que les adénovirus. Ils infectent avec une grande efficacité les fibres musculaires et peuvent persister pendant des années dans ces fibres même s'ils ne s'intègrent pas ; l'expression du transgène est donc assurée pour une longue période (Fisher and Wilson, 1997; Vincent-Lacaze et al., 1999; Xiao and Brandsma, 1996). Cependant leur capacité de transport n'excède pas 4kb.

Pour pallier à la capacité de transport réduite, les recherches se sont tournées vers l'élaboration d'une dystrophine minimale ou minidystrophine, permettant d'empêcher la dégénérescence et de rétablir la fonction musculaire.

Dans certaines formes de la maladie de Becker, c'est une dystrophine tronquée qui est exprimée. En étudiant les patients les moins atteints, il est devenu clair qu'une dystrophine tronquée pouvait suffire à la survie des fibres musculaires (England et al., 1990; Koenig et al., 1989). La troncature est surtout possible dans le grand domaine de répétitions spectrines. Actuellement, la plus petite construction capable de restaurer l'apparence normale des fibres musculaires de souris *mdx* ne comporte que 6 des 24 répétitions spectrines et est codée par un ADNc de seulement 3,6kb (14kb pour le gène entier) (Harper et al., 2002). Il reste à déterminer si cette minidystrophine, ou d'autres formes, sont capables de restaurer la fonction normale de la dystrophine.

B.1.2 Réparation ADN ou ARN

La plupart des mutations affectant le gène de la dystrophine sont des mutations ponctuelles ou de très courtes délétions ou insertions ne concernant qu'un exon. Dès lors, on peut envisager de remplacer la séquence mutée par une séquence sauvage *via* le mécanisme de remplacement homologue de petits fragments d'ADN double brin (Kapsa et al., 2001). Une autre technique consiste à injecter une chimère ARN-ADN de séquence homologue à la région mutée pour stimuler les mécanismes de réparation de l'ADN. Cette technique a été mise en œuvre avec succès dans les précurseurs musculaires de la souris *mdx* avec une efficacité de 2 à 15% de conversion (Bertoni and Rando, 2002).

Plutôt que de réparer l'ADN, certains essaient de réparer l'ARNm de la dystrophine. Il s'agit peut-être de l'avancée la plus prometteuse de ces dernières années. Cette technique repose sur la capacité d'oligonucléotides anti-sens de se fixer aux jonctions exon-intron de l'ARNm de la dystrophine pour empêcher l'épissage des exons défectueux et restaurer le cadre de lecture. La dystrophine est tronquée mais présente. Les oligonucléotides présentent l'avantage de ne pas provoquer de réponse immunitaire. Ce système est connu sous le nom d'*exon-skipping* ou saut d'exon. Chez la souris *mdx*, une injection intramusculaire de ce type d'oligonucléotides mène à plus de 20 à 30% d'expression de dystrophine tronquée pendant 2 mois (Wells et al., 2003). On peut aussi utiliser les AAV pour délivrer un plasmide donnant des oligonucléotides anti-sens. Cette combinaison permet d'augmenter l'efficacité d'entrée du plasmide dans les cellules, ainsi que l'efficacité d'expression. Goyenvallé et coll. ont montré, chez la souris *mdx*, qu'un mois après une injection intra artérielle d'un vecteur permettant l'expression d'oligonucléotides, on observait l'expression de la dystrophine à un taux normal dans quasiment toutes les fibres des muscles perfusés (Goyenvallé et al., 2004).

Récemment, un essai clinique a eu lieu chez un garçon de 10 ans atteint de la maladie de Duchenne. L'injection en intra-veineuse d'oligonucléotides anti-sens a permis de restaurer de façon transitoire l'expression d'une dystrophine tronquée dans les muscles. Le traitement n'a pas engendré d'effets secondaires notables (Takeshima et al., 2006).

B.1.3 Conclusion

Que ce soit par le biais de plasmides, de virus ou d'oligonucléotides, le problème de l'acheminement à tous les muscles n'a pas encore été résolu. Si l'on peut atteindre facilement la plupart des muscles des membres par injection intramusculaire, il n'en va pas de même pour le muscle cardiaque ou le diaphragme. Le système vasculaire sera sans doute la solution, bien que l'on ait pas encore trouvé de compromis satisfaisant entre la spécificité musculaire, la pérennité de l'expression et le franchissement des parois vasculaires (pour revue, voir (Chamberlain, 2002)).

B.2 Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire a le même but que la thérapie génique : permettre la réexpression de dystrophine sauvage ou fonctionnelle dans les fibres musculaires. Le moyen d'introduire une copie sauvage du gène est différent : c'est l'introduction de cellules porteuses d'une copie fonctionnelle du gène de la dystrophine, capables de fusionner avec les fibres musculaires existantes. Leurs noyaux permettent la production de dystrophine qui va idéalement se répandre dans toute la fibre.

Pour l'instant, deux populations de cellules sont utilisées.

B.2.1 Transfert de myoblastes

Les myoblastes ou cellules satellites sont des cellules quiescentes, qui se sont déjà engagées dans la voie de différenciation musculaire. Elles sont situées à la périphérie des fibres musculaires. Ce sont elles qui participent à la régénération du muscle lorsqu'il est endommagé.

Le transfert de myoblastes a été l'une des premières thérapies curatives à être envisagée (Partridge et al., 1989), et depuis, plusieurs études cliniques ont été menées chez les patients atteints de la maladie de Duchenne (Mouly et al., 2005). Beaucoup de problèmes persistent, notamment la faible survie des myoblastes après injection, leur migration limitée autour de la zone d'injection et surtout le rejet de myoblastes du donneur sain par l'organisme du patient (pour revue, voir (Smythe et al., 2001)). L'autogreffe de myoblastes, extraits puis modifiés génétiquement pour comporter une copie fonctionnelle

du gène de la dystrophine, a permis de circonvenir le problème de compatibilité immunitaire (Tremblay and Vilquin, 2001). Il n'en reste pas moins que ces myoblastes ont une faible capacité de prolifération et de migration.

B.2.2 Transfert de cellules souches

L'utilisation de cellules souches, capables de se différencier en différents types cellulaires a été envisagée. Ces cellules pluripotentes présentent deux avantages par rapport aux myoblastes : elles ont une capacité de prolifération bien plus élevée et elles sont capables de migrer du système vasculaire jusque dans les tissus. L'expression de la dystrophine et la régénération des muscles est plus importante suite à l'utilisation de ces cellules (Peng and Huard, 2004).

Il existe plusieurs types de cellules souches qui ont une plus ou moins grande multipotence. Des essais chez la souris *mdx* ont montré que l'on pouvait utiliser des cellules souches de la moelle osseuse avec succès. Malheureusement, le nombre de fibres touchées et le niveau de réexpression de la dystrophine dans ces fibres n'est pas suffisant pour arrêter la dégénérescence (Gussoni et al., 1999). Une étude menée chez un patient atteint de la maladie de Duchenne, qui avait reçu une transplantation de moelle pour immunodéficience sévère, a montré que 1% des fibres musculaires avaient incorporé des cellules du greffon et exprimaient la dystrophine, 13 ans après la transplantation (Gussoni et al., 2002).

L'utilisation des cellules souches est donc prometteuse en termes de persistance de l'expression de la dystrophine et de moyen d'atteindre tous les muscles. Cependant, il faut encore améliorer l'efficacité de fusion de ces cellules, ainsi que le niveau d'expression de la dystrophine. Récemment, des cellules souches infectées par un vecteur viral contenant une microdystrophine ont été utilisées pour améliorer l'expression de la dystrophine (Bachrach et al., 2004). Ce procédé permet d'exprimer le transgène sous contrôle d'un promoteur fort dans les fibres auxquelles se sont incorporées les cellules souches.

B.3 Autres stratégies envisagées

B.3.1 L'utrophine

Parmi les protéines similaires à la dystrophine musculaire, la plus prometteuse en terme de remplacement est l'utrophine. Les isoformes courtes de la dystrophine ne sont pas capables de prévenir la dégénérescence des muscles lorsqu'elles sont exprimées à la place de la dystrophine musculaire (Cox et al., 1994), car il leur manque le côté N terminal. L'utrophine, en raison de sa grande similarité de séquence avec la dystrophine, a très vite été pressentie pour prendre sa place. D'autant plus qu'elle est exprimée dans les muscles à l'âge adulte, mais seulement aux jonctions neuromusculaires et myotendineuses (Khurana et al., 1991; Ohlendieck et al., 1991; Pons et al., 1994; Rivier et al., 1997). Des souris mutées pour la dystrophine et l'utrophine développent d'ailleurs une myopathie rapidement mortelle (Deconinck et al., 1997a). Différentes stratégies ont été envisagées pour surexprimer l'utrophine de telle sorte qu'elle prenne la place (et fonction) de la dystrophine. Une première expérience en 1996 chez la souris *mdx* a montré que la surexpression de l'utrophine dans les muscles était capable de diminuer la nécrose et la fibrose des muscles, ainsi que de restaurer la localisation des protéines du DGC à la membrane (Tinsley et al., 1996). Plusieurs approches pharmacologiques ont été testées. L'héréguline est un facteur de régulation de l'expression de l'utrophine. Chez la souris *mdx*, l'injection d'héréguline augmente l'expression de l'utrophine de deux à trois fois (Gyrd-Hansen et al., 2002). L'injection de L-arginine, substrat de la nNOS, provoque une augmentation de la production de NO, qui à son tour augmente l'expression d'utrophine. Les souris ayant subi ce traitement présentent un phénotype amélioré (Chaubourt et al., 2002).

De façon générale, l'utrophine ne prévient l'état dystrophique que lorsqu'elle est surexprimée très tôt et son effet bénéfique demande un haut niveau de surexpression. C'est une voie prometteuse de traitement palliatif, si ce n'est curatif.

B.3.2 Traitements pharmacologiques

A l'exception des antibiotiques qui permettent de rétablir l'expression de la dystrophine en ignorant les codons STOP ectopiques, les autres traitements pharmacologiques ont principalement pour objectif soit de bloquer la protéolyse et l'inflammation des muscles, soit d'augmenter la régénération des fibres ou la masse musculaire en général.

Prednisone et dérivés

A l'heure actuelle, le seul traitement prescrit en routine aux garçons atteints par la maladie de Duchenne est un glucocorticoïde, la prednisone. Son action est loin d'avoir été élucidée : on lui alloue des propriétés anti-inflammatoires (Gosselin and McCormick, 2004), de promotion de la myogenèse et de la réparation des fibres (Anderson et al., 1996a). Malheureusement, ce traitement génère beaucoup d'effets secondaires, c'est pourquoi les recherches se sont tournées vers ses dérivés comme le déflazacort, qui provoque moins d'effets secondaires indésirables mais qui est aussi moins bénéfique aux muscles (Campbell and Jacob, 2003).

Antibiotiques

Entre 5 et 15% des mutations affectant le gène de la dystrophine sont des codons stop prématurés. Les antibiotiques de la famille des aminoglycosides permettent de passer les codons stop et ainsi de rétablir l'expression de la dystrophine. Les tests chez la souris *mdx* avaient donné des résultats prometteurs qui n'ont malheureusement pas été reproduits chez l'humain (Arakawa et al., 2003; Barton-Davis et al., 1999; Dunant et al., 2003).

Diminution de la dégradation des protéines

Les traitements qui tentent d'empêcher la protéolyse des fibres musculaires sont orientés vers l'inhibition des systèmes de dégradation. Récemment, une étude pilote a montré que la réduction de l'activité des calpaïnes, les protéases calcium-dépendantes, pouvait améliorer la force des muscles chez les garçons DMD (Fowler et al., 2004). Cette amélioration de la force des muscles ne s'accompagne cependant pas d'une amélioration de la mobilité. L'inhibition du protéasome chez les souris *mdx* permet de restaurer l'expression et la localisation à la membrane d'une forme tronquée de la dystrophine et des protéines associées (Bonuccelli et al., 2003). Cependant, la dystrophine des souris *mdx*, à laquelle il manque la partie C terminale, n'est pas fonctionnelle et ne permet pas de restaurer la fonction normale des muscles.

Diminution de la mort cellulaire et de la fibrose

Les traitements spécifiques de la réponse inflammatoire ont pour objectif de réduire la nécrose et la fibrose des muscles. Outre la prednisone et ses dérivés, différentes molécules ont été testées. On retrouve des inhibiteurs du TNF- α , une cytokine qui promeut la réponse inflammatoire, et des traitements visant à augmenter la production de NO, un autre régulateur de la réponse inflammatoire, en rétablissant l'expression de la nNOS dans les muscles (pour revue, voir (Tidball and Wehling-Henricks, 2004)).

Augmentation de la masse musculaire et de la régénération des fibres

Les traitements visant à augmenter la masse musculaire sont basés sur l'utilisation de facteurs de croissance et d'anabolisants. Leur but est d'augmenter la production de muscles pour contrer la perte due à la nécrose. Les anabolisants entraînent plus d'effets secondaires que les facteurs de croissance. Ces derniers semblent constituer un traitement prometteur chez la souris *mdx* (De Luca et al., 2003; Gregorevic et al., 2002).

Enfin les traitements pour augmenter la régénération musculaire sont principalement basés sur l'inhibition de l'action de la myostatine, un inhibiteur de la différenciation et de la prolifération des muscles (McPherron et al., 1997). Cette stratégie est efficace chez la souris *mdx* qui montre une force musculaire accrue et une dégénérescence musculaire plus faible (Bogdanovich et al., 2002).

B.4 Conclusion

Les études de thérapie génique et de traitements pharmacologiques menées jusqu'à présent sont pléthoriques et il est difficile de retirer une vision claire des traitements à fort potentiel. Cela vient en partie du fait que les effets de l'absence de dystrophine sont complexes et non encore clairement élucidés, mais aussi du fait que les études sont souvent menées chez la souris *mdx* qui ne reproduit que partiellement la physiopathologie de la maladie de Duchenne.

Les traitements visant à réintroduire une copie fonctionnelle de la dystrophine, ou à rétablir son expression à partir de la copie endogène, seraient idéaux, mais pour l'instant ils ne s'étendent pas à plus de 10% des muscles. Les traitements qui tentent de pallier à l'absence de la dystrophine, soit en la remplaçant, soit en contrant les effets de son absence sont complexes à réguler, d'autant plus que nous ne comprenons pas encore toute la physiopathologie de cette maladie. Nous avons besoin d'en apprendre plus sur les conséquences de l'absence de la dystrophine, et sur les mécanismes de la dégénérescence musculaire qui s'ensuit.

Chapitre IV - *Cænorhabditis elegans* comme modèle d'étude

A. Présentation générale de *C. elegans*

Cænorhabditis elegans, que l'on nomme plus communément *C. elegans*, est un ver bactériophage, qui vit dans la terre à l'état sauvage. En 1965, Sidney Brenner choisit de l'introduire en laboratoire pour en faire un modèle d'étude des mécanismes du comportement et du développement. Ce choix fut motivé par la simplicité générale de cet organisme, sa facilité d'élevage et les moyens d'investigation scientifique de l'époque (microscopie). Quarante ans après son introduction en laboratoire, c'est l'animal expérimental le plus complètement décrit. Le chapitre qui suit vise à le présenter de façon générale.

A.1 Anatomie et caractéristiques physiologiques

A.1.1 Sexes

Il existe deux sexes chez les nématodes *C. elegans* : les hermaphrodites et les mâles. Les hermaphrodites se reproduisent par autofécondation. La descendance d'un seul hermaphrodite est d'environ 250 individus ayant tous le même génotype. Ceci facilite grandement l'entretien des souches (Riddle et al., 1997; Wood, 1988). Les mâles sont utilisés lors des croisements pour introduire un nouvel allèle.

A.1.2 Développement invariant

Le nématode *C. elegans* a un développement invariant, c'est-à-dire que dès la première division, les cellules filles adoptent une destinée cellulaire précise, qui est toujours la même d'un individu à un autre. Son plan de développement a été entièrement décrit (Sulston et al., 1983). L'hermaphrodite adulte est constitué de 959 cellules somatiques et le mâle adulte de 1031 cellules somatiques (Riddle et al., 1997; Wood, 1988).

A.1.3 Anatomie

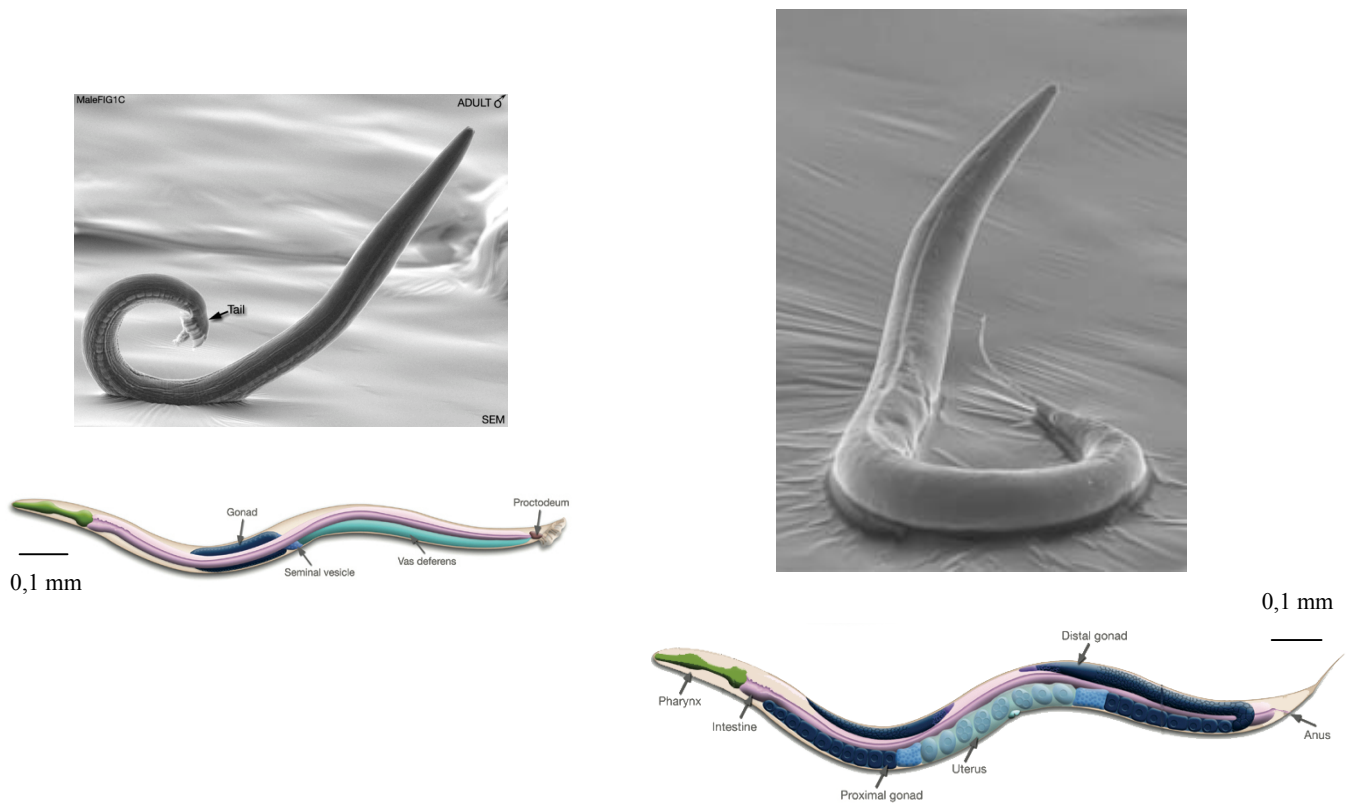
C'est un ver cylindrique, d'environ 1mm de long à l'âge adulte. Le ver est entouré d'une cuticule très résistante, constituée en grande partie de collagène. En dessous, on trouve l'hypoderme qui est l'équivalent de notre peau, les muscles et les

organes internes (Riddle et al., 1997; Wood, 1988). La figure 10, ci-dessous, décrit l'anatomie de l'hermaphrodite et du mâle *C. elegans*.

Figure 10 : Photos et organes d'un mâle et d'un hermaphrodite *C. elegans*

Les nématodes mesurent en moyenne 1mm de longueur. Les mâles sont plus petits que les hermaphrodites. Les organes internes sont sommaires et se composent d'un tube digestif précédé du pharynx, et de l'appareil reproducteur : vésicule séminale, *vas deferens* et appareil copulatoire proprement dit pour les mâles ; gonades distales où se forment les ovocytes, gonades proximales où se trouvent les spermathèques, et uterus chez les hermaphrodites.

Images tirées de <http://www.wormatlas.org/handbook/contents.htm>.



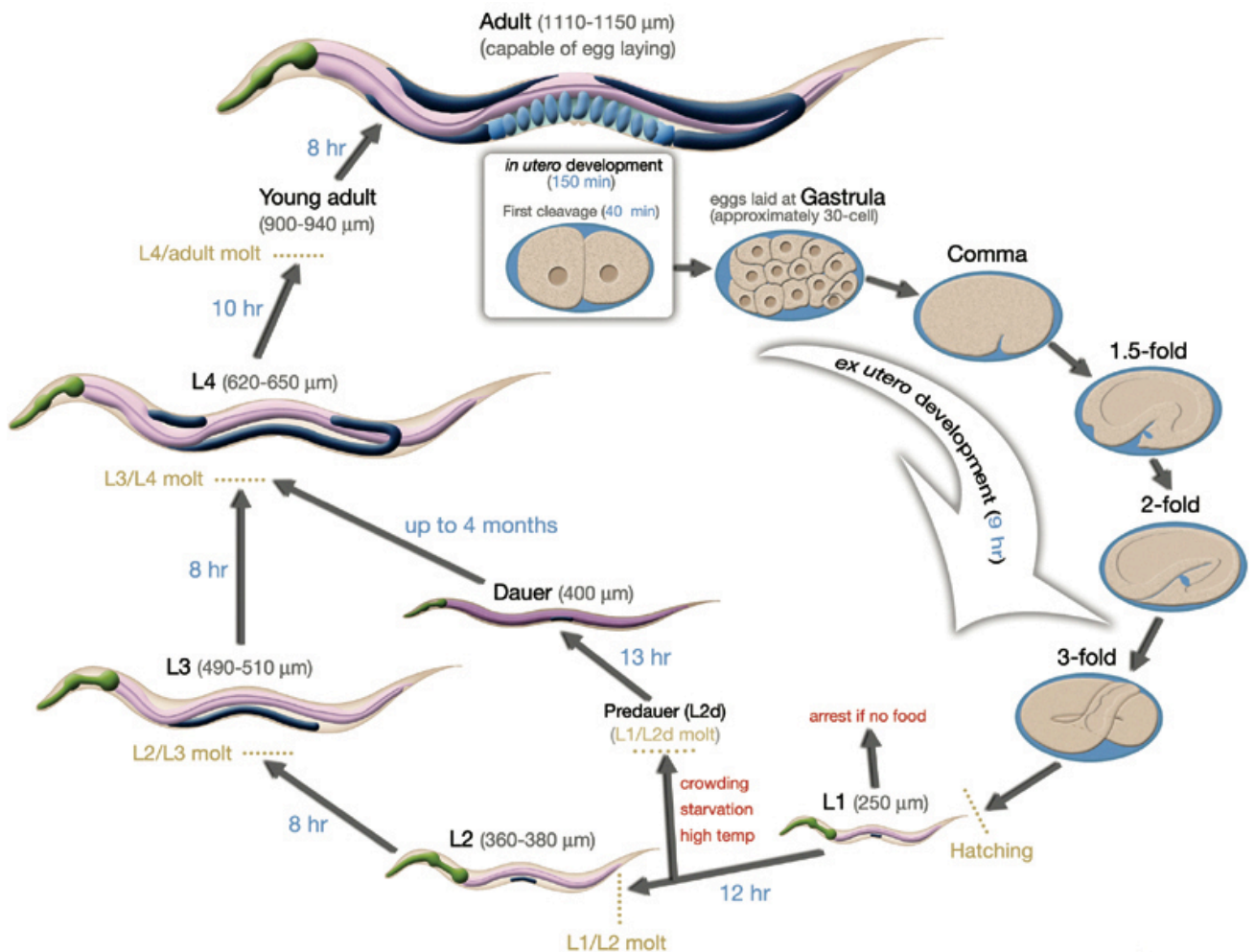
Le système neuronal comporte exactement 302 neurones chez l'hermaphrodite et 383 chez le mâle. Les nématodes n'ont pas de système nerveux élaboré. Leurs neurones se regroupent sous forme de ganglions.

Le système musculaire est constitué de muscles striés et de muscles lisses. Il est décrit un peu plus loin. L'appareil digestif est constitué du pharynx et du tube digestif.

Figure 11 : Représentation du cycle de vie du nématode *Cænorhabditis elegans*

Le développement d'un nématode de l'état d'œuf à l'état adulte prend entre 3 et 5 jours selon la température (23 et 15°C, respectivement). Les nématodes passent par quatre stades larvaires après avoir éclos de l'œuf. Ces stades larvaires sont séparés par un période de mue (*molt*). Si les conditions sont défavorables au bon développement des larves, celles-ci peuvent entrer dans un état proche de l'hibernation, appelé *dauer*. Lorsque les conditions redeviennent favorables ces larves peuvent poursuivre leur croissance. Les nématodes ne deviennent féconds qu'à partir du stade L4.

Image tirée de <http://www.wormatlas.org/handbook/contents.htm>.



Chez les hermaphrodites, l'appareil reproducteur est constitué de deux gonades symétriques. Les ovocytes sont produits dans les ovaires (la gonade distale). Ils passent à travers les spermathèques (gonades proximales), qui font suite aux ovaires, où ils sont fécondés par les spermatozoïdes. Les œufs aboutissent dans l'utérus, au centre du nématode hermaphrodite. Les œufs sont ensuite expulsés par la vulve.

Chez les mâles, il n'existe qu'une gonade qui aboutit par le *vas deferens* et le *protodeum* à la queue du nématode mâle, où se trouve l'appareil copulatoire.

A.1.4 Conditions d'élevage

En laboratoire, les nématodes peuvent être cultivés dans des boîtes de Pétri recouvertes d'une couche de bactéries *Escherichia coli* de la souche OP50 (Brenner, 1974; Sulston and Hodgkin, 1988). Ces bactéries constituent la nourriture des nématodes. On peut aussi les cultiver en milieu liquide, avec des bactéries, à condition de maintenir une bonne oxygénation.

A.1.5 Cycle de vie

C. elegans peut être cultivé à différentes températures. On obtient une nouvelle génération adulte en 3 jours à 23°C, et en 5 jours à 15°C. Après éclosion de l'œuf, le ver passe par quatre stades larvaires avant d'atteindre l'âge adulte : L1, L2, L3 et L4 (L pour *larvæ*). Les stades larvaires sont séparés distinctement par des mues (Riddle et al., 1997; Wood, 1988). A la fin du stade larvaire L2, les larves peuvent soit s'engager dans le développement normal (L3, L4 puis adulte) si les conditions sont favorables, soit entrer dans un stade dit de *dauer* (L2d) si les conditions sont défavorables (trop grande densité de population, pas de nourriture, température défavorable). Les larves *dauer* peuvent attendre ainsi jusqu'à 4 mois que les conditions redeviennent favorables, et rentrer dans le cycle de vie au stade L4 (Riddle et al., 1997; Wood, 1988). La figure 11, ci-contre, résume le cycle de vie d'un hermaphrodite à 23°C.

On peut congeler les larves L1 dans un milieu additionné de glycérol, à -80°C ou dans l'azote liquide. A la décongélation, on récupère environ 10% des animaux congelés (Sulston and Hodgkin, 1988).

A.1.6 Génome

Le génome de *C. elegans* a été entièrement cloné dans des cosmides et des YAC et séquencé (1998). Le génome est constitué de 97Mb et le nombre de gènes est estimé à 17300 (Reboul et al., 2001). Les séquences et les annotations sont accessibles sur

WormBase (<http://www.wormbase.org/>), une base de données qui centralise les connaissances relatives aux gènes de *C. elegans*.

A.2 Ressources et outils d'investigation

A.2.1 Microscopie

C. elegans est un animal transparent tout au long de sa vie, ce qui permet d'observer les organes internes sur animaux entiers et vivants.

A.2.2 La génétique

La séquence complète du génome, ainsi que la vitesse et le mode de reproduction hermaphrodite font de la génétique un grand atout de *C. elegans*. La génétique classique va de l'observation d'un phénotype d'intérêt, jusqu'à l'identification du gène responsable. On peut par exemple étudier différents mutants ayant le même phénotype pour identifier les gènes impliqués. La génétique inverse permet au contraire de partir d'un gène connu et d'étudier les effets de son inactivation.

A.2.3 Les mutants

Le *Cænorhabditis Genetics Center* (CGC) possède une grande collection de mutants et les envoie sur simple demande. On peut créer des mutants par mutagenèse aléatoire, chimique ou aux UV, et cribler la descendance à la recherche de mutations provoquant des phénotypes particuliers (Sulston and Hodgkin, 1988). On peut créer des souches de nématodes portant plusieurs mutations par croisement entre hermaphrodites et mâles. L'entretien de ces souches est facilité par le mode de reproduction hermaphrodite et aussi par la possibilité de les congeler.

A.2.4 La transgénèse

La transgénèse est l'introduction et l'expression d'un gène étranger au génome. On peut la réaliser facilement chez *C. elegans* en injectant le transgène dans les ovaires des hermaphrodites (Fire, 1986). Selon les cas, une plus ou moins grande partie de la descendance sera transgénique. On peut utiliser cette technique pour étudier l'expression d'un gène étiqueté ou pour observer les effets de l'expression d'un gène dans un tissu particulier. La transgénèse est transitoire à moins d'intégrer le vecteur portant le transgène dans le génome.

A.2.5 L'ARN interférence

L'ARN interférence (ARNi) est un phénomène biologique par lequel des ARN double brin (ARNdb) spécifiques d'un gène entraînent l'élimination de l'ARN messenger (ARNm) de ce gène. Le phénomène d'ARN interférence a été découvert chez *Cænorhabditis elegans* (Fire et al., 1998; Guo and Kemphues, 1995). Sa fonction physiologique est de protéger la cellule contre les virus ou les transposons (Vastenhouw and Plasterk, 2004), ou encore de réguler l'expression des gènes de la cellule (Matzke and Birchler, 2005). L'ARN interférence est utilisé de façon expérimentale pour réprimer transitoirement l'expression d'un gène spécifique. Son mécanisme et sa mise en oeuvre chez *C. elegans* sont détaillés dans le chapitre consacré à la recherche de gènes suppresseurs de la dégénérescence musculaire.

A.2.6 Informations et ressources concernant *C. elegans*

Les données des équipes travaillant sur *C. elegans* sont recueillies sur plusieurs sites Internet, tels que :

- Wormbase (<http://www.wormbase.org/>),
- Nematode.net (<http://www.nematode.net/>),
- *Cænorhabditis elegans* WWW server (<http://elegans.swmed.edu/>), et d'autres.

Le *Cænorhabditis Genetics Center*, basé à l'université du Minnesota (Twin Cities, USA), collecte, maintient, crée et distribue les souches de nématodes. Un projet de création de mutants pour chaque gène est en cours en Europe, les informations concernant les souches sont librement accessibles (<http://elegans.imbb.forth.gr/nemagenetag/>), et les souches sont envoyées sur simple demande.

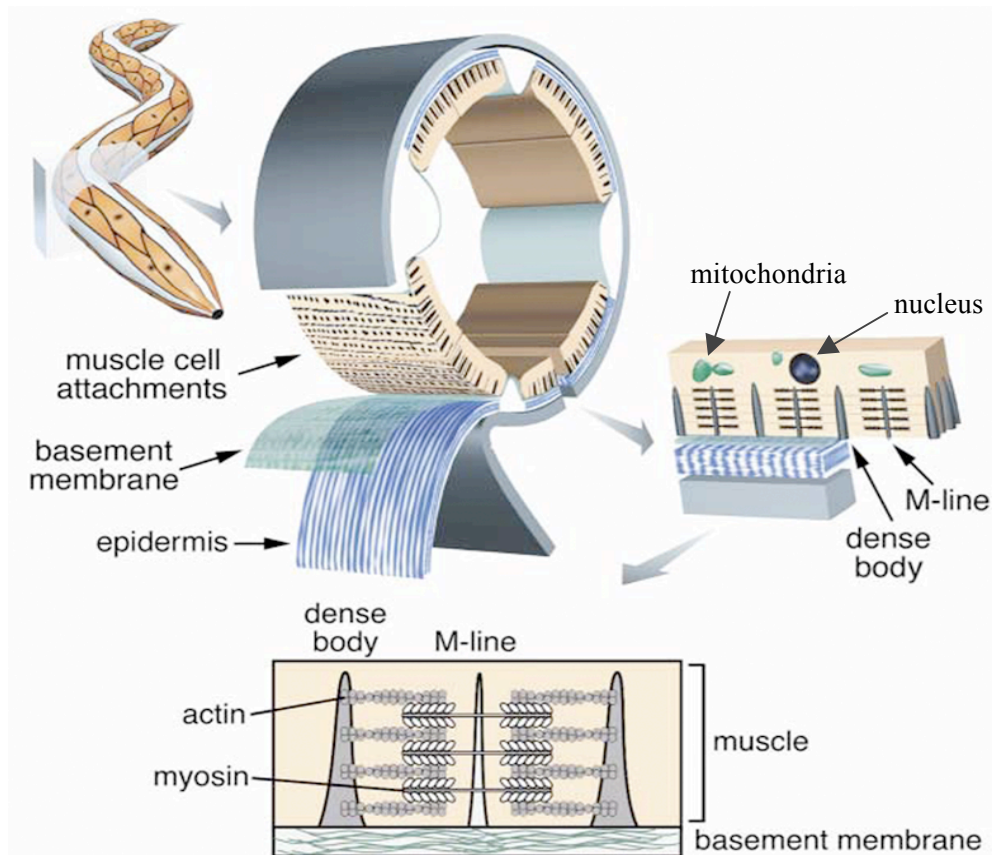
A.3 Conclusion

C. elegans est un organisme pluricellulaire simple. Son développement invariant et sa transparence sont des atouts importants pour l'investigation des fonctions biologiques chez l'animal entier et vivant. Le séquençage du génome et les techniques développées depuis son introduction en laboratoire (transgénèse, ARNi) en font un modèle expérimental particulièrement adapté pour les études génétiques.

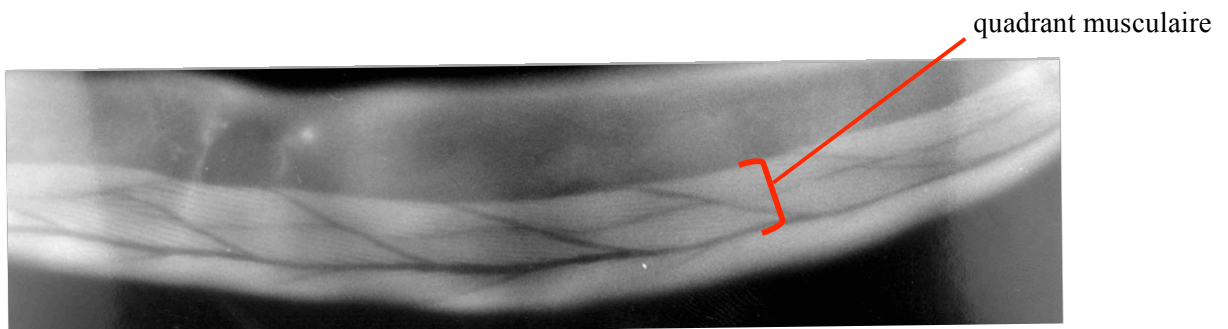
C. elegans est utilisé comme modèle d'étude dans diverses disciplines de la biologie : étude du développement, étude du comportement. Nous l'utilisons comme modèle d'étude de la dégénérescence musculaire en absence de dystrophine, un phénomène qui survient dans la myopathie de Duchenne/Becker.

Figure 12 : Les muscles striés chez *Cænorhabditis elegans*

Les muscles striés de *C. elegans* sont représentés par 95 cellules longitudinales, organisées en quatre tresses le long de l'animal, que l'on appelle aussi des quadrants. Les quatre quadrants se situent sous la cuticule et le derme. Leur structure ressemble à celle des fibres musculaires striées des mammifères, cependant les cellules ne fusionnent pas. L'actine est attachée aux équivalents des stries Z, les *dense bodies* et la myosine est attachée à la ligne M. Représentation schématique adaptée de <http://www.wormbook.org>.



Photographie d'un ver sauvage, coloré à la phalloïdine-rhodamine (qui permet de visualiser l'actine des cellules). On voit la suite de cellules musculaires striées, comme tressées, qui forment le quadrant musculaire.



B. *Caenorhabditis elegans* comme modèle d'étude de la dégénérescence musculaire en absence de dystrophine

B.1 Le Muscle chez *C. elegans*

Les muscles de *C. elegans* sont constitués de cellules mononucléées, on parle de cellule et non de fibre musculaire. Les muscles du pharynx, de l'intestin, de l'anus et de la vulve sont constitués de cellules musculaires lisses. Les muscles striés sont formés par les cellules musculaires longitudinales (figure 12). Elles sont au nombre de 95, réparties en quatre tresses (ou quadrants), le long de l'animal (Waterstone, 1988). Ce sont elles qui permettent le déplacement en sinusoïde des vers. Elles présentent une organisation en sarcomères avec des filaments fins d'actine, liés à l'équivalent de la ligne Z, le *dense body*, et des filaments épais de myosine (Francis and Waterston, 1985). Le *dense body* est l'endroit où le sarcomère est ancré à la membrane. Comme chez les mammifères, c'est le déplacement des filaments fins d'actine sur les filaments épais de myosine qui donne lieu à la contraction.

On peut noter trois différences importantes :

- les cellules musculaires ne fusionnent pas en fibres ;
- ce sont les cellules musculaires qui envoient des extensions jusqu'aux neurones pour former les jonctions neuromusculaires, les plaques motrices sont plus difficile d'accès ;
- et il n'y a pas de cellules satellites dans les muscles de *C. elegans*, et donc pas de régénération possible (Waterstone, 1988).

Les muscles striés de *C. elegans* sont mis en place durant l'embryogenèse. *C. elegans* ne possède qu'un homologue des MRFs : *hlh-1* (ou *CeMyoD*), qui est l'homologue du facteur de transcription myogénique MyoD des mammifères (Krause et al., 1990). HLH-1 est exprimé exclusivement dans les cellules des muscles striés longitudinaux et leurs cellules précurseurs. Son expression commence tôt dans l'œuf, et perdure jusqu'à l'âge adulte (Krause et al., 1990). En absence d'HLH-1, les vers sont paralysés et meurent au stade L1 (Chen et al., 1994). Ces larves comportent cependant des cellules engagées dans la lignée musculaire puisqu'elles expriment la myosine. Ces cellules ont des myofilaments dont l'organisation sarcomérique est anormale. La fonction d'HLH-1 semble donc sensiblement différente de son homologue mammifère, puisqu'il n'est pas requis pour la détermination de la destinée musculaire. D'autres facteurs myogéniques qui restent encore à déterminer doivent intervenir. HLH-1 semble plutôt être requis pour la différenciation terminale des cellules musculaires et peut-être leur maintien à l'âge adulte. De plus, *C. elegans* ne possède pas de cellules satellites permettant la

régénération. HLH-1 ne peut donc pas, comme c'est le cas chez les mammifères, participer à l'activation du processus de régénération.

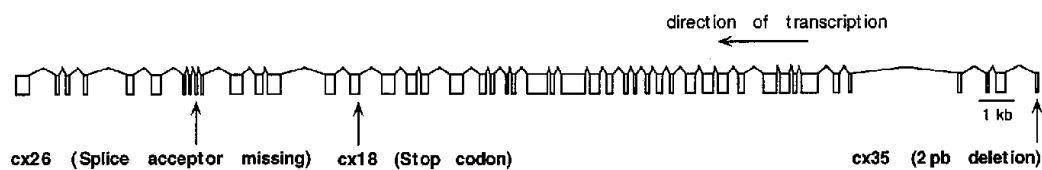
B.2 La Dystrophine chez *C. elegans*

B.2.1 Gène et protéine

Un homologue du gène de la dystrophine humaine, le gène *dys-1*, a été décrit par Bessou et coll. en 1998 (Bessou et al., 1998). Ce gène comporte 46 exons, répartis sur 31 kb. Son inactivation provoque un phénotype d'hyperactivité et d'hypercontraction, mais on n'observe pas de dégénérescence musculaire. L'expression de ce gène est exclusivement musculaire : dans les cellules musculaires longitudinales, dans les cellules lisses de la vulve et du pharynx.

Figure 13 : Mutations dans le gène *dys-1* et expression tissulaire de DYS-1 chez *C. elegans*

Le gène *dys-1* comporte 46 exons. L'allèle *cx35* porte une délétion provoquant un codon STOP au deuxième codon. L'allèle *cx18* porte une mutation ponctuelle introduisant un codon STOP dans l'exon 33. L'allèle *cx26* introduit un codon STOP dans l'exon 39. DYS-1 est exprimé dans les cellules musculaires uniquement. Grâce à un gène rapporteur *dys-1::gfp*, on peut visualiser son expression dans des cellules des muscles lisses du pharynx (flèche en A), dans les cellules musculaires lisses de la vulve (B), et dans les cellules musculaires striées longitudinales (C et têtes de flèche en A) qui forment les quadrants. Figure adaptée de (Bessou et al., 1998).



La protéine DYS-1 présente les mêmes domaines que son homologue mammifère :

- un domaine N-ter de type α -actinine,
- un long domaine de répétitions spectrine,
- un domaine riche en cystéines,
- et un domaine C-ter avec régions *coiled-coil* (Bessou et al., 1998).

DYS-1 est composé de 3674 acides aminés (3685 chez les mammifères). Ce sont les domaines riche en cystéine et C terminal qui présentent le plus d'homologie avec la dystrophine humaine (37%) (Gieseler et al., 1999a), ceux-là même avec lesquels interagissent la β -dystroglycane, la syntrophine et l' α -dystrobrevine chez les mammifères. Il n'existe pas dans le génome de *C. elegans* d'autre gène homologue à la dystrophine, l'utrophine ou DRP2. Ceci indique que la duplication menant aux différentes protéines ressemblant à la dystrophine est certainement postérieure à la séparation des vertébrés et invertébrés (Roberts and Bobrow, 1998).

B.2.2 Mutants *dys-1*

Plusieurs allèles de *dys-1* ont été caractérisés moléculairement (figure 13).

L'allèle *cx18* est une mutation ponctuelle introduisant un codon stop dans l'exon 33. L'allèle *cx26* est aussi une mutation ponctuelle se traduisant par l'apparition d'un codon stop dans l'exon 39. L'allèle *cx35* est une délétion de deux paires de bases introduisant un codon stop au deuxième codon.

Etant donné que la dystrophine des mammifères possède des promoteurs internes permettant l'expression de formes courtes, nous avons choisi de travailler avec l'allèle *cx18* qui est considéré comme un nul. Les mutants *dys-1(cx18)* sont légèrement hypercontractés et hyperactifs, ils penchent notamment leur tête alternativement de chaque côté de façon très rapide (Bessou et al., 1998). D'un point de vue histologique, leurs muscles sont peu affectés par l'absence de DYS-1. Seule une à deux cellules musculaires disparaissent. Par contre, ces mutants sont plus sensibles à l'aldicarb, un inhibiteur d'acétylcholinestérase. Les cellules musculaires striées des *dys-1(cx18)* sont donc plus facilement excitables. Leur phénotype peut être supprimé par l'injection d'un transgène comportant la séquence d'ADN complémentaire de la dystrophine humaine (Bessou et al., 1998). Ceci montre qu'au moins une partie des fonctions de la dystrophine est conservée de *C. elegans* aux humains. Récemment, une étude a été menée sur les gènes exprimés différemment chez les mutants *dys-1(cx18)* et (*cx35*) par rapport aux vers sauvages (Towers et al., 2006). Les groupes de gènes les plus régulés chez *C. elegans*, sont aussi fortement régulés chez les humains, en absence de dystrophine. Ce sont des gènes de signalisation intracellulaire, de communication entre cellules, et des gènes de matrice extracellulaire. A l'inverse, le groupe de gènes participant au niveau énergétique

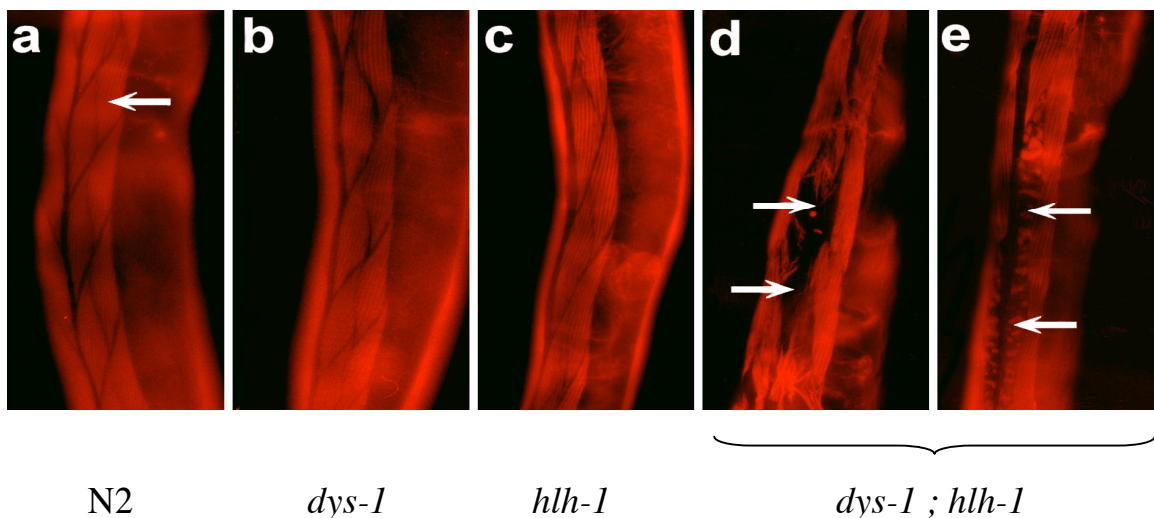
de la cellule, qui est le plus représenté chez les humains, apparaît peu chez *C. elegans*. Les auteurs suggèrent que chez les humains, le processus de régénération peut expliquer la régulation des gènes impliqués dans le niveau énergétique de la cellule, processus qui n'a pas lieu chez *C. elegans* (Towers et al., 2006).

B.3 Notre modèle de dégénérescence

Les mutants *dys-1(cx18)* ne présentent que peu de dégénérescence musculaire. Megeney et coll. ont montré que le facteur myogénique MyoD est nécessaire à la fonction des cellules satellites du muscle chez la souris, en associant la mutation de la dystrophine avec la mutation de MyoD. Cette double mutation aggrave la dégénérescence musculaire par perte du processus régénératif (Megeney et al., 1996). L'inactivation d'HLH-1, l'homologue de MyoD, est létale chez *C. elegans*. En associant une mutation faible et thermosensible d'*hll-1*, l'allèle *cc561ts*, à la mutation *dys-1(cx18)*, l'équipe de Laurent Ségalat a montré qu'il existe une dégénérescence progressive des muscles striés longitudinaux de *C. elegans* (Gieseler et al., 2000) (voir figure 14, ci-dessous).

Figure 14 : Dégénérescence des cellules musculaires striées des vers *dys-1* ; *hll-1*

Les quadrants musculaires des vers sauvages N2 (en a), des vers *dys-1(cx18)* (en b) et des vers *hll-1(cc561ts)* (en c) ne présentent pas de cellules absentes ou abîmées. Les cellules musculaires des vers portant les deux mutations, *dys-1(cx18)* et *hll-1(cc561ts)*, dégénèrent progressivement. L'actine de ces cellules n'est plus organisée en stries. On peut observer des filaments d'actine déchirés en d, et des pelotes d'actine en e. Les cellules disparaissent par la suite. Tiré de (Gieseler et al., 2000).



Le mécanisme par lequel l'association des deux mutations chez *C. elegans* mène à la dégénérescence musculaire est différent de celui impliqué chez les souris, puisque *C. elegans* ne possède pas de cellules satellites. Notre hypothèse est que la mutation faible d'*hll-1* fragilise les cellules musculaires qui deviennent incapables de faire face à l'absence de DYS-1. Elles dégèrent de façon progressive et dépendante de l'activité musculaire. Les doubles mutants *dys-1(cx18) ; hll-1(cc561ts)* sont notre modèle d'étude de la dégénérescence musculaire en absence de dystrophine.

B.4 Le complexe de la dystrophine chez *C. elegans*

Suite à l'identification de DYS-1, l'équipe de Laurent Ségalat a recherché si cette protéine était associée à un complexe protéique semblable à celui des mammifères. Ils ont mis en évidence quatre autres gènes dont l'inactivation mène au même phénotype d'hyperactivité et d'hypercontraction : *dyb-1*, *dyc-1*, *slo-1* et *stn-1*.

B.3.1 Génétique classique

Ils ont adopté une approche de génétique classique en recherchant, après une mutagenèse aléatoire, des mutants présentant le même phénotype que les mutants *dys-1*. *dyb-1* code pour un homologue de l' α -dystrobrevine, DYB-1 (Gieseler et al., 1999a). DYB-1 possède une région C terminale identique à celle des dystrobrevines de mammifères. Elle est exprimée dans toutes les cellules musculaires ainsi que dans certains neurones de *C. elegans* (Gieseler et al., 2001). Elle interagit *in vitro* avec DYS-1 et le produit du gène F30A10.8 (STN-1) (Gieseler et al., 1999a). La surexpression de DYB-1 supprime le phénotype hyperactif des mutants *dys-1* et atténue la dégénérescence musculaire des doubles mutants *dys-1 ; hll-1* (Gieseler et al., 2002). De plus, Grisoni et coll. ont montré que l'interaction entre DYB-1 et DYS-1 était essentielle à la fonction de DYB-1 chez *C. elegans* (Grisoni et al., 2002a). Le gène *dyc-1* code pour une protéine qui dans l'ensemble n'est homologue d'aucune protéine connue, mais qui a deux régions d'homologie avec une protéine de rat appelée CAPON (Gieseler et al., 2000). La surexpression de *dyc-1* supprime partiellement la dégénérescence musculaire des doubles mutants *dys-1 ; hll-1*. Ceci suggère que DYC-1 peut en partie pallier l'absence de DYS-1 et assurer une partie des fonctions de DYS-1 dans le muscle du nématode *C. elegans* (Gieseler et al., 2000). Le gène *slo-1* code pour un canal potassium, dépendant du calcium. Une étude détaillée de ce gène est présentée dans les résultats.

B.3.2 Génétique inverse

D'autre part, l'équipe de Laurent Ségalat a suivi une approche de génétique inverse en recherchant dans le génome de *C. elegans* des homologues de protéines interagissant avec la dystrophine chez les mammifères (Grisoni et al., 2002b). Ils ont retrouvé l'homologue de la dystrobrevine (DYB-1), identifié précédemment par la méthode de génétique classique. En plus, ils ont montré qu'il existe des homologues de la syntrophine, du dystroglycane, de l' α et de la β -sarcoglycane, ainsi qu'une protéine homologue aux δ/γ -sarcoglycanes. Parmi ces protéines, seule l'absence des homologues de la syntrophine et de la dystrobrevine provoque un phénotype similaire à celui observé chez le mutant *dys-1* (Grisoni et al., 2002b). Ceci indique que leur fonction dans la cellule musculaire est très certainement liée à celle de DYS-1. Une étude du gène *stn-1*, l'homologue de la syntrophine, est présentée dans les résultats.

B.5 Conclusion

L'inactivation de *dys-1*, l'homologue de la dystrophine, chez *C. elegans* ne provoque pas de dégénérescence musculaire importante. Cette faible dégénérescence montre que la dystrophine est moins indispensable à la survie des cellules musculaires chez *C. elegans* que chez les mammifères et le *Danio rerio*. Cependant, la dystrophine a conservé au moins une partie des fonctions de DYS-1, puisqu'elle peut lui être substituée. Par ailleurs, on observe que les cellules musculaires de *C. elegans* sont plus excitables en absence de dystrophine, ce qui entraîne un phénotype reconnaissable d'hypercontraction et d'hyperactivité. Ces arguments, et le fait qu'il existe un complexe protéique comparable au DGC chez le nématode (Grisoni et al., 2002b), nous poussent à conclure que l'étude de DYS-1 et des effets de son inactivation, ainsi que l'étude des protéines et gènes qui lui sont liés chez *C. elegans* contribuera à clarifier certaines des fonctions de la dystrophine humaine.

D'autre part, les vers *dys-1 ; hlh-1*, chez qui la dégénérescence musculaire est clairement visible, peuvent aider à identifier des voies d'action sur la dégénérescence musculaire. Le fait que la surexpression de *dyb-1*, l'homologue de la dystrobrevine, atténue cette dégénérescence montre que le complexe de protéines associé à DYS-1 chez *C. elegans* est spécifiquement impliqué dans ce phénomène de dégénérescence (Gieseler et al., 2002). Les études menées sur ce modèle doivent toutefois tenir compte du fait que les effets observés peuvent être dus à la mutation de *dys-1* aussi bien que d'*hlh-1*. D'autre part, on ne s'intéresse ici qu'à l'aspect dégénérescence musculaire et pas aux phénomènes secondaires tel que l'inflammation, la régénération ou la fibrose qui n'ont pas lieu chez *C. elegans*.

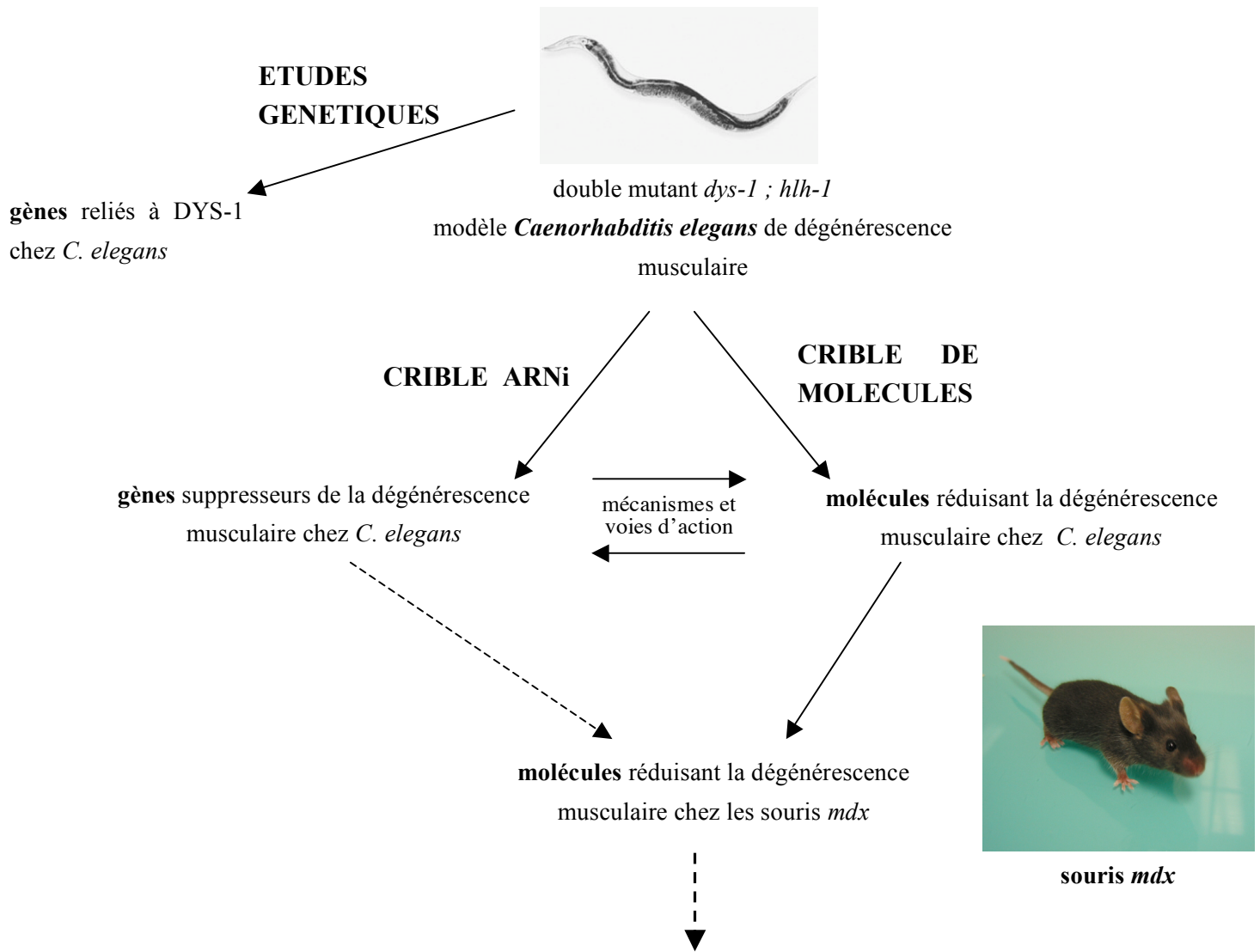
Figure 15 : Stratégie d'étude au laboratoire des mécanismes de la dégénérescence musculaire chez *C. elegans* et chez la souris

Nous voulons découvrir quelles sont les fonctions de la dystrophine et les mécanismes moléculaires impliqués dans la dégénérescence musculaire en son absence. Nous utilisons *C. elegans* pour :

- rechercher et étudier les gènes reliés à *DYS-1*, l'homologue de la dystrophine,
- rechercher des gènes impliqués dans la dégénérescence musculaire (crible ARNi),
- rechercher des molécules capables de réduire cette dégénérescence.

Le but de ces études chez *C. elegans* est d'utiliser la simplicité de cet organisme peu coûteux, et sa non redondance génétique, pour découvrir des mécanismes masqués chez les mammifères. Le crible de molécules se poursuit chez la souris *mdx*, afin de tester si les quelques molécules (parmi plus de 700) ayant montré un effet bénéfique sur la dégénérescence de *C. elegans*, sont aussi bénéfiques chez un modèle mammifère.

Le but final est d'être capable de lutter contre la dégénérescence musculaire progressive qui touche les garçons atteints des myopathies de Duchenne et Becker.



élaboration d'un traitement contre les myopathies de Duchenne et Becker

Chapitre V - Conclusion

Les myopathies de Duchenne et Becker sont caractérisées par une forte dégénérescence des muscles striés squelettiques qui est due à l'absence, ou à la production anormale, de la dystrophine. Depuis son identification en 1987, de nombreuses études ont été menées et l'on sait maintenant que la dystrophine est la clé de voûte d'un complexe protéique, appelé DGC. Le DGC, qui est normalement situé sous la membrane des fibres musculaires, est désorganisé en absence de dystrophine. L'étude des interacteurs des différentes protéines composant le DGC montre que ce complexe est relié à de nombreuses voies de signalisation intracellulaire. Sa, ou ses fonctions, sont d'autant moins faciles à identifier clairement, et, bien que plusieurs hypothèses aient été émises, on ne sait toujours pas pourquoi en absence de dystrophine les muscles dégèrent, ni précisément quels sont les mécanismes de cette dégénérescence. Ceci empêche l'élaboration de thérapies ciblant les conséquences de l'absence de la dystrophine, ainsi la plupart des thérapies envisagées visent à remplacer ou réparer la dystrophine défectueuse dans les muscles des patients atteints de la myopathie de Duchenne. Cette solution idéale n'est pas encore au point. En attendant, l'éventail de soins palliatifs est extrêmement réduit.

Cænorhabditis elegans est un organisme simple, dont le génome a été entièrement séquencé. Il possède de nombreuses protéines homologues à celles des mammifères, mais là où chez les mammifères elles existent en plusieurs exemplaires, *C. elegans* n'en possède souvent qu'un seul exemplaire, ce qui en rend l'étude plus aisée. L'équipe de Laurent Ségalat a montré qu'il existe un homologue de la dystrophine chez *C. elegans*, la protéine DYS-1, ainsi qu'un complexe protéique très similaire au complexe associé à la dystrophine chez les mammifères. La stratégie de notre laboratoire est décrite dans la figure 15, ci-contre. Nous utilisons *C. elegans* pour effectuer de grands cribles, impossibles chez les mammifères, à la recherche de gènes et de molécules capables de freiner la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*, afin d'identifier les voies de signalisation intracellulaire impliquées. Certaines de ces voies sont très conservées entre *C. elegans* et les mammifères. D'autres part, nous utilisons *C. elegans* pour tenter de découvrir quelles sont les fonctions du complexe de protéines liées à la dystrophine. Les molécules efficaces chez *C. elegans* sont testées chez la souris *mdx*, afin de confirmer leurs effets chez un modèle mammifère.

Nous espérons ainsi élargir les connaissances sur les mécanismes de la dégénérescence musculaire en absence de dystrophine, et peut-être permettre l'élaboration de traitements palliatifs médicamenteux.

RÉSULTATS

VUE D'ENSEMBLE

Au début de ma thèse, j'ai terminé l'étude de deux gènes fonctionnellement reliés à la dystrophine, *stn-1* et *slo-1*, qui avaient été partiellement caractérisés au laboratoire. Nos travaux ont donné lieu aux deux articles présentés dans la première partie des résultats.

La technique de l'ARN interférence nous avons permis de réaliser un vaste crible génétique à la recherche de gènes suppresseurs de la dégénérescence musculaire. La nature des gènes issus de ce crible peut nous informer sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la dégénérescence musculaire. Les résultats d'une partie de ce crible sont présentés dans la partie II de mes résultats.

Au cours des années 2002 à 2004, un crible pharmacologique a été mené dans le même but : trouver des molécules capables de réduire la dégénérescence musculaire. L'étude des mécanismes par lesquels ces molécules agissent nous renseigne aussi sur les mécanismes moléculaires de la dégénérescence musculaire.

J'ai participé à l'étude de deux molécules issues de ce crible : la prednisone et la sérotonine. J'ai notamment essayé de savoir par quel(s) récepteur(s) et quelles voies de signalisation la sérotonine agit sur la dégénérescence. Peu de récepteurs sérotoninergiques sont connus chez *C. elegans*, et il est impossible de les identifier avec certitude d'après leur séquence génique. J'ai donc essayé d'établir la liste des récepteurs sérotoninergiques de *C. elegans*. Trois articles concernant la prednisone, la sérotonine et les récepteurs à la sérotonine sont présentés dans la partie III des résultats.

Ce crible pharmacologique a permis d'établir une liste de plus d'une vingtaine de molécules qui réduisent la dégénérescence chez *C. elegans*. J'ai mis en place et supervisé le test de ces molécules sur le modèle murin de la myopathie de Duchenne, la souris *mdx*. Cette partie de mon travail est relatée dans la partie IV des résultats.

Ces 4 parties, bien que pouvant sembler éloignées les unes des autres, ont toutes en commun de répondre à la question :

Quels sont les mécanismes conduisant à la dégénérescence musculaire en absence de dystrophine, et comment les bloquer ?

Cette question a été le fil conducteur de mes travaux de thèse.

Chapitre I - Les gènes fonctionnellement reliés à DYS-1 chez *Caenorhabditis elegans*

Au cours des années qui ont suivi l'identification de DYS-1, l'homologue de la dystrophine chez *C. elegans* (Bessou et al., 1998), l'équipe de Laurent Ségalat a cherché à identifier ses partenaires protéiques, et les gènes fonctionnellement reliés à *dys-1*. En identifiant ces gènes, l'équipe de Laurent Ségalat cherche à identifier quelles sont les fonctions de DYS-1.

Pour cela, ils ont utilisé les techniques de génétique qui sont la grande force de *C. elegans*. La génétique classique permet de remonter du mutant au gène. Au contraire, la génétique inverse part d'un gène connu et étudie les conséquences de son inactivation.

Apport de la génétique classique : le gène *slo-1*

L'un des principes sur lequel s'appuie la génétique classique est que si des mutations dans différents gènes provoquent le même phénotype, il est probable que ces gènes participent à la même fonction.

En recherchant parmi la descendance de vers traités par un mutagène chimique des vers ayant le même phénotype d'hyperactivité et d'hypercontraction que les vers *dys-1*, l'équipe de Laurent Ségalat a identifié 4 autres gènes dont l'inactivation provoque ce phénotype particulier. Parmi ces gènes, j'ai évoqué l'homologue de l' α -dystrobrevine, *dyb-1*, ainsi que *dyc-1*, un gène présentant quelques régions d'homologie avec une protéine de rat, CAPON. Ces deux gènes ont déjà été largement étudiés au sein du laboratoire de Laurent Ségalat (Gieseler et al., 1999a; Gieseler et al., 1999b; Gieseler et al., 2002; Gieseler et al., 2000; Gieseler et al., 2001; Grisoni et al., 2002a). La surexpression de chacun d'entre eux peut supprimer partiellement le phénotype d'hyperactivité des vers *dys-1* et atténuer la dégénérescence musculaire des vers *dys-1*; *hh-1* (Gieseler et al., 2002; Gieseler et al., 2000). Ces deux protéines peuvent donc partiellement pallier l'absence de DYS-1.

L'inactivation du gène *dys-4* provoque aussi un phénotype d'hyperactivité et d'hypercontraction typique de l'absence de DYS-1. Il n'est l'homologue d'aucun gène mammifère, et la protéine prédite ne contient aucun motif reconnaissable.

Le dernier des gènes identifiés au laboratoire, et dont l'inactivation entraîne le même phénotype que celui des vers *dys-1*, est *slo-1*. Ce gène code pour un canal potassique dépendant du calcium, homologue aux canaux potassiques BK des mammifères. Dans l'article qui suit, nous décrivons une relation fonctionnelle entre DYS-1 et SLO-1, dans le muscle strié de *C. elegans*.

Apport de la génétique inverse : le gène *stn-1*

Par une approche de génétique inverse, c'est-à-dire en recherchant dans des bases de données *C. elegans* des protéines présentant des homologies avec les protéines associées à la dystrophine chez les mammifères, l'équipe de Laurent Ségalat a montré qu'il existait des protéines homologues de certains composants du DGC humain chez *C. elegans* (Grisoni et al., 2002b). Grisoni et coll. ont trouvé une protéine homologue des dystroglycanes, plusieurs protéines homologues des différentes sarcoglycanes. Ils ont retrouvé ainsi l'homologue de la dystrobrevine, DYB-1, et ils ont montré qu'il existe une protéine présentant de fortes homologies avec les isoformes $\alpha 1$ et $\beta 1$ de la syntrophine humaine, codée par le gène F30A10.8, subséquemment nommé *stn-1*. L'inactivation par ARN interférence des gènes codant pour ces protéines mène au même phénotype d'hyperactivité et d'hypercontraction que celui observé chez les mutants *dys-1*. L'existence d'homologues des dystroglycanes, sarcoglycanes, dystrobrevines et syntrophines suggère l'existence d'un complexe de protéines associées à la dystrophine chez *C. elegans*, similaire à celui des humains (Grisoni et al., 2002b).

Les deux articles qui suivent décrivent la caractérisation de deux protéines fonctionnellement reliées à DYS-1 :

- SLO-1, un homologue des canaux potassiques BK des mammifères,
- et STN-1, l'homologue des syntrophines $\alpha 1$ et $\beta 1$ des mammifères.

L'étude de ces protéines, et de la littérature qui s'y rapporte, nous permet de formuler des hypothèses quant à leur implication dans les mécanismes de la dégénérescence musculaire en absence de DYS-1 chez *C. elegans*.

A. Le canal potassique SLO-1 est critique pour la fonction des muscles et est impliqué dans la dégénérescence musculaire en absence de dystrophine chez *Cænorhabditis elegans*

Maïté Carre-Pierrat, Karine Grisoni, Kathrin Gieseler, Marie-Christine Mariol, Edwige Martin, Maelle Jospin, Bruno Allard et Laurent Ségalat

Les canaux potassiques à large conductance, ou canaux BK (Big K⁺), des mammifères sont dépendants du calcium et du voltage. Ils permettent le passage des ions potassium lorsque le calcium intracellulaire augmente et/ou lorsque le potentiel électrique de la membrane cellulaire augmente. Ils sont présents principalement dans tous les types de muscles, et dans les neurones. Ils sont impliqués dans plusieurs maladies comme l'hypertension systémique, certaines maladies des muscles lisses ou du muscle cardiaque (pour revue, voir (Calderone, 2002; Korovkina and England, 2002)).

Cænorhabditis elegans possède deux homologues de ces canaux, SLO-1 et SLO-2 (Lim et al., 1999; Wang et al., 2001; Yuan et al., 2000), SLO pour *slowpoke* : qui est lent. SLO-1 et SLO-2 sont présents dans les cellules musculaires et neuronales de *C. elegans*. Les canaux SLO-1 sont impliqués, dans les neurones, dans le relarguage des neurotransmetteurs et dans la réponse à l'éthanol (Davies et al., 2003; Wang et al., 2001). Les mutants *slo-2* ne présentent pas de phénotype connu (<http://www.wormbase.org/>).

L'étude *in situ* des propriétés électriques de ces canaux est problématique du fait de la difficulté de pratiquer l'électrophysiologie sur les cellules musculaires de *C. elegans*. L'équipe de Bruno Allard (CNRS UMR5123, Villeurbanne, France) a réussi pour la première fois à enregistrer, non seulement des courants potassiques totaux, mais aussi des courants provenant de l'activité d'un seul canal à partir de préparation de cellules musculaires longitudinales de *C. elegans* par la technique de patch clamp *in situ*. Ils ont montré qu'après dépolarisation des cellules musculaires longitudinales de *C. elegans*, il existe un fort courant potassique dû aux canaux SLO-2. Après excision du patch, ce courant décroît rapidement et il persiste dans environ 35% des cellules un courant potassique plus faible.

En collaboration avec l'équipe de Bruno Allard, nous avons montré que cette activité résiduelle est due aux canaux SLO-1. *slo-1* fait partie des gènes dont l'inactivation provoque le même phénotype d'hyperactivité et d'hypercontraction que celui observé

chez les mutants *dys-1*. On peut donc supposer que SLO-1 et DYS-1 interagissent dans une même voie de signalisation dans le muscle (DYS-1 n'est détecté que dans le muscle).

Dans l'article qui suit, nous avons montré que *slo-1* est fonctionnellement relié à *dys-1*. Nous avons essayé de déterminer quelle est la nature de la relation entre DYS-1 et SLO-1. Nous décrivons pour la première fois une fonction musculaire des canaux SLO-1 chez *C. elegans*.



The SLO-1 BK Channel of *Caenorhabditis elegans* is Critical for Muscle Function and is Involved in Dystrophin-dependent Muscle Dystrophy

Maité Carre-Pierrat¹, Karine Grisoni¹, Kathrin Gieseler¹
Marie-Christine Mariol¹, Edwige Martin¹, Maelle Jospin²
Bruno Allard² and Laurent Ségalat^{1*}

¹CGMC, CNRS-UMR 5534
Université C. Bernard Lyon-1
69622 Villeurbanne, France

²Physiologie Intégrative
Cellulaire et Moléculaire
CNRS-UMR 5123, Université
C. Bernard Lyon-1, 69622
Villeurbanne, France

The *Caenorhabditis elegans* SLO-1 channel belongs to the family of calcium-activated large conductance BK potassium channels. SLO-1 has been shown to be involved in neurotransmitter release and ethanol response. Here, we report that SLO-1 also has a critical role in muscles. Inactivation of the *slo-1* gene in muscles leads to phenotypes similar to those caused by mutations of the dystrophin homologue *dys-1*. Notably, *slo-1* mutations result in a progressive muscle degeneration when put into a sensitized genetic background. *slo-1* localization was observed by gfp reporter gene in both the M-line and the dense bodies (Z line) of the *C. elegans* body-wall muscles. Using the inside-out configuration of the patch clamp technique on body-wall muscle cells of acutely dissected wild-type worms, we characterized a Ca²⁺-activated K⁺ channel that was identified unambiguously as SLO-1. Since neither the abundance nor the conductance of SLO-1 was changed significantly in *dys-1* mutants compared to wild-type animals, it is likely that the inactivation of *dys-1* causes a misregulation of SLO-1. All in all, these results indicate that SLO-1 function in *C. elegans* muscles is related to the dystrophin homologue DYS-1.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: dystrophin; Duchenne muscular dystrophy; nematode; potassium channel

*Corresponding author

Introduction

BK (Slo) channels are large conductance K⁺ channels activated synergistically by both intracellular calcium and voltage. In *Caenorhabditis elegans*, this family is represented by the SLO-1 and SLO-2 channels, encoded by the *slo-1* and *slo-2* genes.^{1–3} The SLO-1 channel is present in both neurons and muscles of *C. elegans*.¹ SLO-1 regulates neurotransmitter release in *C. elegans* motor neurons. Its removal by genetic inactivation greatly increases the quantal content by lengthening the duration of the release.¹ More recently, SLO-1 was found to be involved in the behavioural response to ethanol in *C. elegans*, which is also a neuronal phenotype.⁴ Although SLO-1 is present also in

muscles,¹ its role in this tissue has not been established.

Although the nematode *C. elegans* is only remotely related to mammals in the evolutionary tree, its striated muscles show a striking resemblance to vertebrate muscles. The sarcomere, the repetitive functional unit of striated muscles, shows a similar architecture in both *C. elegans* and vertebrates, and is composed of the same set of core proteins.^{5,6} *C. elegans* possesses a dystrophin homologue, *dys-1*, which is expressed in muscles and can be complemented, in part, by the human dystrophin.⁷ In humans, mutations of the dystrophin gene lead to a progressive muscle wasting disease called Duchenne muscular dystrophy (DMD). Dystrophin is a large muscle protein linked at one end to the actin cytoskeleton, and at the other end to a complex of membrane-associated proteins called the DAPC (dystrophin-associated protein complex).⁸ Although the dystrophin protein has been studied for many years, its role in wild-type muscles has not been properly elucidated.

Abbreviations used: DMD, Duchenne muscular dystrophy; DAPC, dystrophin-associated protein complex.

E-mail address of the corresponding author: segalat@cgmc.univ-lyon1.fr

In addition, the mechanisms underlying the physiopathology of DMD are poorly understood, and no curative treatment is available for this disease.⁹

Inactivation of the *C. elegans dys-1* gene alone elicits little muscle degeneration,^{7,10} probably because of the short life-span of the animals. However, the absence of *dys-1* leads to an unusual behavioural phenotype: *dys-1* mutant animals are hyperactive, bend their head when they move forward, and tend to hypercontract. A similar phenotype is observed for *C. elegans* DAPC genes.^{10,11}

Here, we report an unexpected functional link between *dys-1* and *slo-1*. *dys-1* and *slo-1* mutations lead to similar phenotypes, both alone and in combination with other mutations. We demonstrate that these phenotypes are due to the absence of SLO-1 in muscles, and not in neurons. These results suggest that the absence of DYS-1 down-regulates the activity of the SLO-1 channel in *C. elegans* muscles. This down-regulation may contribute to the pathogenicity of DYS-1 mutations.

Results

Identification of new *slo-1* mutants

Since genes that participate in a common cellular function often lead to similar phenotypes when mutated, we applied this principle to identify new genes interacting with *dys-1*. The progeny of randomly mutagenized *C. elegans* were screened to detect any individuals showing the behavioural phenotype specific to *dys-1* mutants (hyperactivity, head bending, a tendency to hypercontract). Several new alleles of *dys-1* were recovered in this screen, as well as several other mutants. Two mutants (*cx29* and *cx42*) were mapped in the right arm of chromosome V (approximately ten map units left of *unc-51*). Complementation tests showed that the two mutants were allelic. Further mapping performed on *cx29* mapped it close to the polymorphism marker stP105, where the *slo-1* gene is.¹² Since the *dys-1* phenotype is consistent with muscle

hyperactivity and hypercontraction, the potassium channel *slo-1* gene was a candidate gene. A complementation test performed with a *slo-1* allele (*slo-1(js379)*)¹ showed that *js379* and *cx29* were also allelic. The *slo-1* gene was sequenced and a mutation was detected in each of the new mutants. *cx29* is a 436 base deletion (positions 16634–17070 of Y51A2D) inducing a frameshift in the fourth exon. Its molecular nature suggests that *cx29* is a null allele. *cx42* is a Leu to Trp change at position 840 in the conserved S10 region.¹ The *cx29* and *cx42* alleles are therefore both *slo-1* mutations.

Behavioural phenotype of *slo-1* mutants

The hyperactivity phenotype of *slo-1(cx29)* and *slo-1(cx42)* animals was quantified. Their average speeds of movement under normal conditions were 18.8(±1.0) and 19.2(±0.8) body bends per minute, respectively, which is similar to the values recorded with *dys-1* mutants (20.2(±1.2)), and much higher than those of the wild-type N2 strain (13.8(±0.9)) (Table 1). We then assayed the *slo-1(js379)* allele and obtained a value of 18.5(±0.9) (Table 1). All three *slo-1* alleles tested (including *js379*, which was isolated on a different phenotype) therefore showed a hyperactivity phenotype similar to that of *dys-1* mutants. *slo-2* mutants *nf100* and *nf101* behaved like wild-type animals (data not shown).

We then checked whether the phenotypes of *slo-1* and *dys-1* were additive. A *dys-1(cx18); slo-1(cx29)* double mutant was constructed. Its locomotion was quantified and an average speed of 18.9(±0.9) was recorded (Table 1). This means that *slo-1* and *dys-1* null phenotypes are not additive, which is a further indication that the two genes participate to a common function.

Lack of *slo-1* leads to muscle degeneration in a sensitized background

slo-1 has been reported to be expressed in neurons and in body-wall muscles.¹ We therefore investigated whether *slo-1* mutations may affect the muscle structure and its sarcomeric organization.

Table 1. Phenotypes of *slo-1* mutants

Genotype	Locomotion rate (body bends/ min ± S.E.M.)	Head bending	Hyper- contracted	Muscle degeneration in <i>hlh-1(cc561)</i> background (number of degenerating or missing cells ± S.E.M.) ^a
N2	13.8 ± 0.9	N	N	1.0 ± 0.8
<i>slo-1(cx29)</i>	18.8 ± 1.0 ^b	Y	Y	3.8 ± 0.6
<i>slo-1(cx42)</i>	19.2 ± 0.8 ^b	Y	Y	3.6 ± 0.6
<i>slo-1(js379)</i>	18.5 ± 0.9 ^b			3.5 ± 0.4
<i>dys-1(cx18)</i>	20.2 ± 1.2 ^b	Y	Y	9.6 ± 1.0 ^b
<i>dys-1(cx18); slo-1(cx29)</i>	18.9 ± 0.9 ^b	Y	Y	N.D.
<i>dys-1(cx18); slo-1(ky389)</i>	14.7 ± 0.7	Y	Y	8.5 ± 1.4
<i>dys-1(cx18) + slo-1-gfp</i>	8.2 ± 1.2	N.T.	Y	6.6 ± 0.7 ^c

N.D., not determined; N.T., could not be tested.

^a Determined 72 h after L4 stage.

^b Significantly different from N2 ($p < 0.05$).

^c Significantly different from *dys-1(cx18)* ($p < 0.05$).

We were not able to detect any obvious discrepancies between wild-type, *slo-1(cx29)*, *slo-1(cx42)* and *slo-1(js379)* mutants by optical microscopy, either at the overall muscle structure level or at the subcellular level (Figure 1).

Since *dys-1* mutants show considerable muscle degeneration of the body-wall muscles when set in a sensitized *hlh-1(cc561)* background, we wondered whether this would occur also in *slo-1* mutants. To check this possibility, we constructed *hlh-1(cc561); slo-1(cx29)* and *hlh-1(cc561); slo-1(cx42)* double mutants. Animals were observed by staining with phalloidin, a marker of filamentous actin, three days after they reached the L4 stage. Average rates of $3.8(\pm 0.6)$ and $3.8(\pm 0.7)$ degenerating and missing cells were recorded, respectively, in double mutants as compared with $1.0(\pm 0.8)$ in *hlh-1(cc561)* alone. *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)*, which was used as a positive control in this experiment, gave a value of $9.6(\pm 1.0)$. The muscle defects observed in *hlh-1(cc561); slo-1(cx29)* animals were of the same type as those observed in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* animals.¹³ Fragmentation of phalloidin-marked actin stripes, formation of coils, and the complete disappearance of the pattern were observed in the double mutant (Figure 2). Moreover, as with *dys-1*,¹³ the phenotype was correlated with the age of the animals (not shown). These data show that

inactivation of the *slo-1* potassium channel gene leads to a progressive muscle degeneration that is very similar, although less severe, to that resulting from *dys-1* mutations.

The *dys-1*-like phenotypes of *slo-1* mutants are of muscle origin

Since *slo-1* is expressed in both neurons and muscles,¹ we wondered whether the phenotypes described above were caused by the absence of *slo-1* function in neurons or muscles. To address this question, we produced mosaic animals in which *slo-1* was present only in neurons or muscles. For this purpose, we injected *slo-1(cx29)* animals with *slo-1* transgenes expressed specifically in either neurons (*snb-1:slo-1*) or muscles (*myo-3:slo-1*).¹ Four lines were obtained with the first construct and two with the second construct. None of the four lines carrying the *snb-1:slo-1* was rescued for the behavioural phenotype. In contrast, transgenic animals in each of the two *myo-3:slo-1* lines looked like wild-type animals (Table 2).

When injected into *hlh-1(cc561); slo-1(cx29)* animals, the *myo-3:slo-1* construct also reduced the muscle degeneration significantly, whereas the *snb-1:slo-1* construct did not (Table 2).

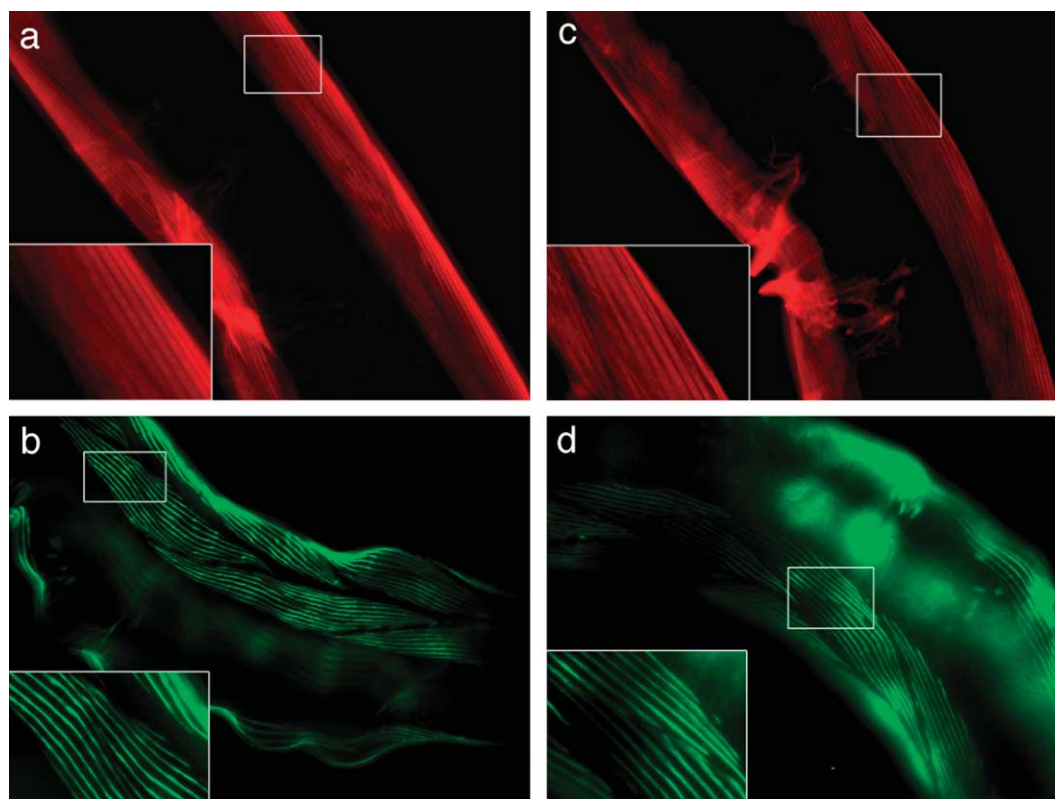


Figure 1. Lack of *slo-1* does not affect muscle structure. Fluorescence microscopy of nematodes body-wall muscles after staining with (a) and (b) phalloidin-rhodamine or (c) and (d) anti-myosin A antibodies. Striated body-wall muscles of (a) and (c) wild-type animal and (b) and (d) *slo-1(cx29)* animals present the same structure: muscle cells are regularly arranged and present the same pattern of striation, indicating that the sarcomeric structure is not altered.

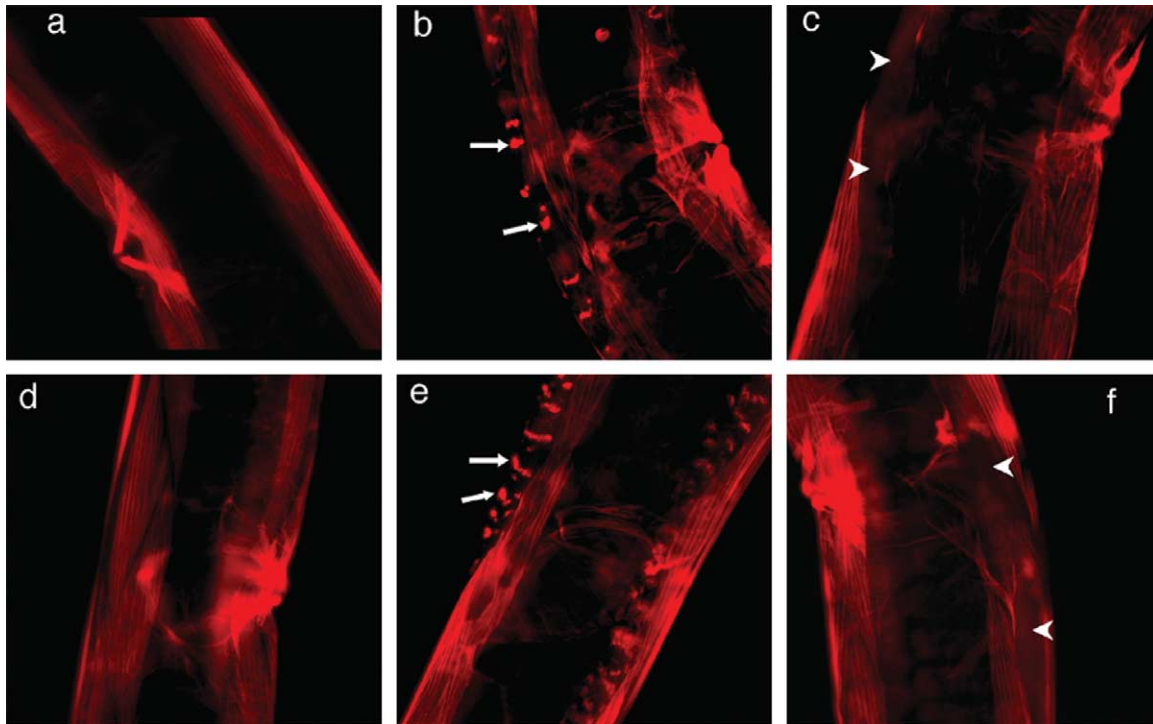


Figure 2. Muscle degeneration in *slo-1*;*hllh-1* animals is similar to that observed in *dys-1*;*hllh-1* animals. Representative fluorescence micrographs of striated body-wall muscles stained with the actin marker phalloidin-rhodamine. (a) Wild-type animals, (d) *hllh-1(cc561)* animals, (b) and (c) *dys-1(cx18)*;*hllh-1(cc561)* animals, and (e) and (f) *slo-1(cx29)*;*hllh-1(cc561)* animals. In wild-type and *hllh-1* animals, a regular pattern of actin filaments is seen. This pattern is altered in (e) and (f) *slo-1(cx29)*;*hllh-1(cc561)* animals as it is in (b) and (c) *dys-1(cx18)*;*hllh-1(cc561)* animals. In some cells, (b) and (e) the pattern of actin is disarranged and forms coils (white arrows); and in other cells (c) and (f) the actin pattern has disappeared (arrowheads).

These results show that the *slo-1* phenotypes described here are of muscle origin.

SLO-1 is located at both the M-line and the dense bodies (Z line) of *C. elegans* body-wall muscles

The subcellular localization of *slo-1* in *C. elegans* body-wall muscles was then investigated.

In our hands, the polyclonal antibody directed against the calcium bowl of the mouse BK channel, which has been used in *C. elegans*,¹ was found to be non-specific. This antibody labelled the same muscle structures in wild-type animals and in the *slo-1* mutants *cx29* and *js379*, which carry premature

stop codons. A *slo-1:slo-1-gfp* construct was therefore used to localize SLO-1 at the subcellular level. In this construct, the *gfp* coding sequence was added to a full-length *slo-1* cDNA, under the control of the *slo-1* promoter.¹ The transgene was injected at various concentrations into *slo-1(cx29)* animals, and the *slo-1* behavioural phenotype could be rescued when injected at a concentration of 2 ng/ μ l. This indicates that this transgene produces a functional SLO-1 protein. A higher concentration (20 ng/ μ l) resulted in sluggishness and egg-laying defects of the transgenic animals. The *gfp* pattern was examined in the transgenic animals. No qualitative difference of the *gfp* pattern was observed between

Table 2. The *dys-1*-like phenotypes of *slo-1* mutants are of muscle origin

Genotype	Head bending	Hypercontracted	Muscle degeneration in <i>hllh-1(cc561)</i> background (number of degenerating or missing cells \pm S.E.M.)
N2	N	N	1.0 \pm 0.8
<i>slo-1(cx29)</i>	Y	Y	3.8 \pm 0.6
<i>slo-1(cx29)</i> + <i>snb-1:slo-1</i> line 1	Y	Y	3.8 \pm 0.6
<i>slo-1(cx29)</i> + <i>snb-1:slo-1</i> line 2	Y	Y	3.8 \pm 0.6
<i>slo-1(cx29)</i> + <i>snb-1:slo-1</i> line 3	Y	Y	N.D.
<i>slo-1(cx29)</i> + <i>snb-1:slo-1</i> line 4	Y	Y	N.D.
<i>slo-1(cx29)</i> + <i>myo-3:slo-1</i> line 1	N	N	1.2 \pm 0.9 ^a
<i>slo-1(cx29)</i> + <i>myo-3:slo-1</i> line 2	N	N	1.9 \pm 0.7 ^a

^a Significantly different from *slo-1(cx29)* ($p < 0.05$).

lines. In the body-wall muscles, a rather faint but reproducible pattern reminiscent of the sarcomeric pattern of muscle organization was visible. No qualitative difference was observed between lines injected at different concentrations.

To determine which sarcomere structures were labelled, transgenic worms were incubated with either anti-vinculin antibodies to mark the dense bodies (corresponding to the vertebrate Z line) or anti-myosin A antibodies to mark the M line. Upon superimposing the gfp and antibody images, the gfp labelling was found to be localized in rows which correspond to the dense bodies and to the M line of the body wall muscles (Figure 3).

slo-1 gene expression levels in *dys-1* mutants

Since *dys-1* and *slo-1* loss-of-function mutants have similar phenotypes, so it is possible that the absence of one of them might affect the abundance of the other. To test this hypothesis, we investigated whether the level of *slo-1* expression was lower in *dys-1* mutants, and *vice versa*. Reverse transcriptase (RT)-PCR experiments did not show any significant decrease in the *slo-1* mRNA levels in *dys-1(cx18)* mutants, nor was any significant difference in the *dys-1* mRNA levels observed in *slo-1(cx29)* mutants (data not shown). We then investigated whether there was any difference in the level of expression at the SLO-1 protein. Since no reliable antibody against *slo-1* is available, we observed the abundance of the SLO-1-GFP protein levels in both wild-type and *dys-1(cx18)* animals. The pattern of gfp fluorescence observed was slightly dimmer in *dys-1(cx18)* than in wild-type animals, but this difference could not be quantified reliably.

Characterization of the SLO-1 channel using the *in situ* patch clamp technique on body-wall muscle cells of wild-type and mutant animals

We next investigated directly whether the *slo-1(cx29)* mutants show any changes in SLO-1 channel activity. Using the inside-out patch clamp configuration, SLO-1 channel activity was recorded at the unitary level in body-wall muscle cells from wild-type and from mutant worms. In wild-type worms, as described,³ upon excision of the pipette and in the presence of an internal solution containing 100 μM Ca^{2+} superfusing the cytosolic face of the patch, voltage and chloride-sensitive Ca^{2+} -activated K^+ channels were activated spontaneously. These channels, which were initially identified as SLO-2,³ were subject to rundown and their openings vanished within a few minutes. After the SLO-2 channels had closed, channels carrying outward currents of a smaller amplitude at 0 mV were detected in nine patches out of 16 tested in wild-type muscle. In all these nine patches, only one opening level was observed. As previously established, these channels were selective for K^+ and their opening was reversibly inhibited by removal of internal Ca^{2+} (Figure 4(a), upper trace). These Ca^{2+} -activated K^+ channels were identified unambiguously as SLO-1, since in the 16 patches tested in *slo-1(cx29)* animal muscles, no Ca^{2+} -activated K^+ channel activity was ever detected. Since *slo-1* and *dys-1* mutants look identical, we then investigated SLO-1 channel activity in *dys-1(cx18)* mutants. SLO-1 channel activity was also found to occur in inside-out patches from *dys-1(cx18)* mutants after the SLO-2 channels had closed (not shown). Among the 13 patches tested in these mutant animals, seven showed SLO-1 channel

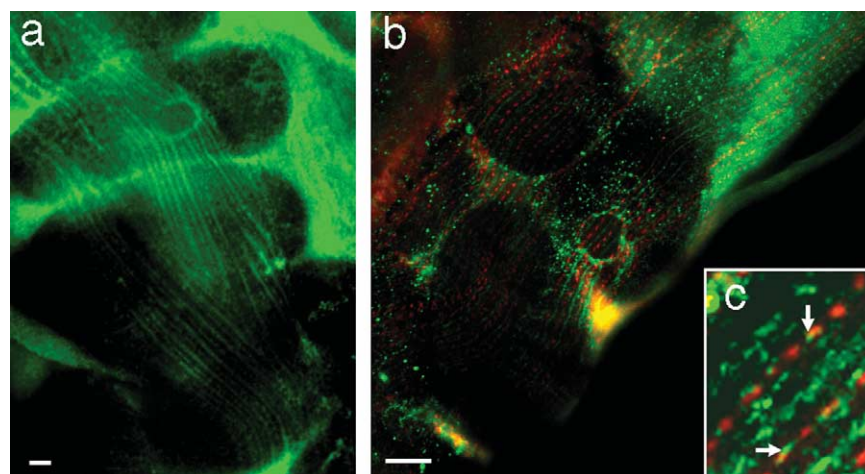


Figure 3. *slo-1* is localized in the dense bodies (Z line) and M line of striated muscles. Body-wall muscles of a *C. elegans* strain producing a functional *slo-1:gfp* protein (green). In (b) and (c), the muscles were counterstained with an anti-vinculin antibody (red) which marks the dense bodies (Z line). At the cell scale, the gfp pattern in (a) is a repetition of almost continuous (arrows) and broken (arrow heads) lines, and resembles that of proteins localized at both dense bodies and the M line. (c) At higher magnification, the gfp pattern is more patchy. The vinculin pattern (red), which marks dense bodies, is intercalated between the almost continuous lines seen in (b). (c) At higher magnification, the *slo-1:gfp* protein and vinculin patterns partly overlap at the level of dense bodies (arrows) (magnification 10 \times). The scale bar represents 2 μm .

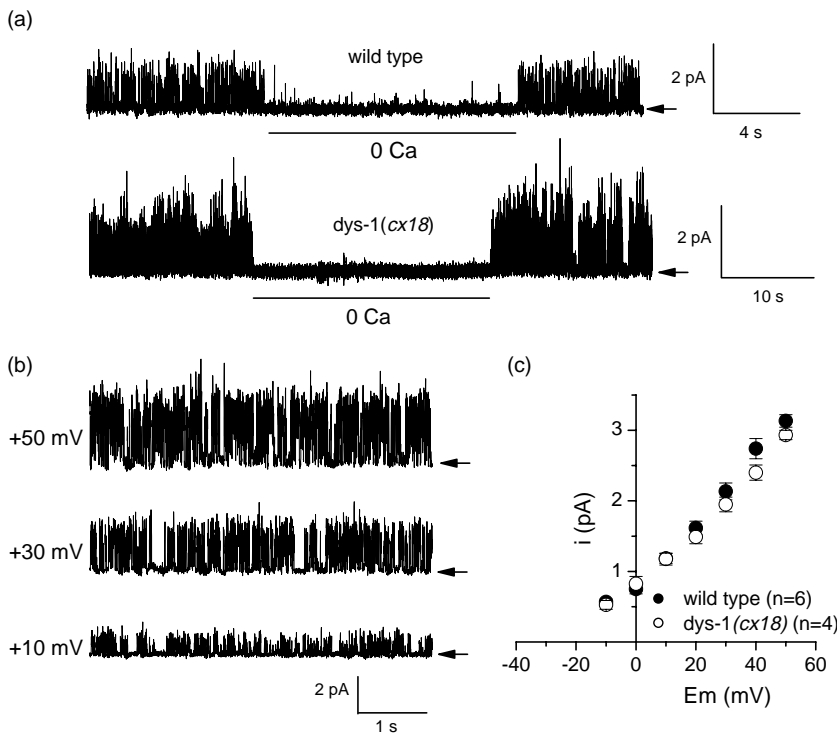


Figure 4. SLO-1 channel activity in wild-type and *dys-1(cx18)* mutant body-wall muscle cells. In (a), channel activity was recorded in an inside-out patch from a wild-type (upper trace) and a *dys-1(cx18)* mutant (lower trace) at 0 mV in the presence of 0.1 mM Ca^{2+} at the internal face of the patch, several minutes after excision. The bar indicates the period during which a Ca-free solution was applied to the internal face of the patch. In (b), single-channel currents were recorded at the various membrane potentials indicated next to each current trace in another inside-out patch. (c) Unitary current-voltage relationships obtained in wild-type and *dys-1(cx18)* animals.

activity that was inhibited reversibly by the removal of internal Ca^{2+} (Figure 4(a), lower trace). One opening level was detected in six patches, and two opening levels in one other patch. Channels showed a slight outward rectification in both wild-type and *dys-1(cx18)* mutants, and the mean unitary current amplitude did not differ significantly between the two types of muscle at any of the membrane potential levels tested (Figure 4(b) and (c)). This electrophysiological study of SLO-1 in wild-type and mutant animals now permits us to distinguish SLO-1 unambiguously from other BK channels.

Discussion

slo-1 belongs to a group of genes functionally related to *dys-1*

Here, we report that *slo-1* mutants have a phenotype similar to that of *dys-1*, the *C. elegans* gene encoding the dystrophin homologue. Although *slo-1* was identified initially as a suppressor of *unc-64* (syntaxin) mutations, a function that requires *slo-1* activity in neurons,¹ the present results show that *slo-1* also has a critical function in muscle.

The *slo-1* mutants described here were found by following the strategy that led us to identify *bona fide* dystrophin partners, such as dystrobrevin and syntrophin, in *C. elegans*.^{10,11} Other genes giving *dys-1*-like phenotypes have been identified recently using methods based on classical genetics¹³ and

reverse genetics,¹⁴ as well as fortuitously.¹⁵ On the basis of their phenotypes, these genes form what we call the *dys-1* group of genes. This group now comprises *dys-1* (dystrophin), *dyb-1* (dystrobrevin), *stn-1* (syntrophin), *sgn-1* (delta/gamma sarcoglycan), *dyc-1* (related to human CAPON), and *snf-6* (acetylcholine transporter). The results reported here lead to the conclusion that *slo-1* must now be added to this list.

All the genes listed above show the same behavioural phenotype as *dys-1* (hyperactivity, head bending, and a tendency to hypercontract), and whenever this was tested (*stn-1*, *dyc-1*, and *slo-1* in this study), their phenotypes were consistently found to be of muscle, rather than neuronal, origin. Moreover, several genes of this group (at least *dyb-1* and *dyc-1*) can compensate partly for the absence of *dys-1* when over-expressed.^{13,16}

The identification of *slo-1* as a new member of this group of genes is interesting because it fits pre-existing data perfectly. First, the *dys-1* behavioural phenotype of hyperactivity and hypercontraction is consistent with an increase of the muscle excitability. Since potassium channels have a relaxing effect on muscle activity, their inactivation leads to the opposite effect. Thus, the finding that a potassium channel belongs to the group of genes producing a *dys-1*-like phenotype fits exactly the earliest description of the *dys-1* phenotype. Moreover, Wang *et al.* reported in their 2001 paper that *slo-1* mutants are hypersensitive to aldicarb, an acetylcholinesterase inhibitor.¹ This trait is shared by *dys-1* mutants and other members of the *dys-1* group.⁷

***slo-1* is expressed weakly in body-wall muscles but can be recorded unambiguously and is crucial to muscle survival**

Several lines of evidence indicate that the endogenous expression of *slo-1* in *C. elegans* body-wall muscles is weak. First, the pattern of *gfp* expression is very faint, which is often the case with weakly expressed genes. Then, in electrophysiological experiments, *slo-1* was detected in only approximately half of the excised patches, which is also a trait typical of low-abundance channels.

The electrophysiological data obtained here show that SLO-1 behaves as a Ca^{2+} -activated K^+ channel in body-wall muscle cells. However, in comparison with the classical BK channels recorded in mammalian skeletal muscles,¹⁷ the *C. elegans* SLO-1 channel recorded in body-wall muscle cells showed a more flickering pattern of activity in the presence of $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} at the cytoplasmic face and a lower single-channel conductance (9 pS in *C. elegans* muscle assuming a K^+ equilibrium potential at -85 mV, as compared with 70 pS under comparable ionic conditions in mammalian muscle). Despite these low levels, *slo-1* function is crucial to muscle survival. In the sensitized genetic background, *hlh-1(cc561)*, *slo-1* mutations lead to muscle degeneration.

Putative model of the *slo-1/dys-1* relationship

The absence of DYS-1 impairs SLO-1 function and thereby puts the cell in a more excitable state, which is deleterious in the long run.

The genetic data presented here indicate strongly that *slo-1* and *dys-1* interact. Whether this interaction is direct or indirect is a matter of speculation at this point. We did not detect any reproducible interactions between the SLO-1 intracellular domain and DYS-1 in two-hybrid assays. The fact that the SLO-1-GFP reporter protein is detected at the level of dense bodies (the *C. elegans* counterparts of the vertebrate Z line) supports the hypothesis that physical interactions may occur between the DYS-1 and SLO-1 proteins. Although the subcellular location of DYS-1 has not been proved in *C. elegans* because there are no anti-*dys-1* antibodies available so far, DYS-1 is believed to be localized in the dense bodies because it binds to the dense body protein vinculin (L.S., unpublished results).

One attractive model linking *dys-1* and *slo-1* function is based on the idea that SLO-1 may be misregulated in the absence of DYS-1 (Figure 5). This model is supported by the literature relating the dystrophin complex to ion channels. Dystrobrevin, a protein binding to dystrophin in vertebrates and *C. elegans*, was initially isolated as a co-purification product of acetylcholine receptors.¹⁸ Syntrophin, another dystrophin-binding protein that exists in *C. elegans*, belongs to a family of proteins known to participate in receptor clustering.¹⁹ The clustering of the Kir4.1 potassium channel in glial cells has been found to depend on

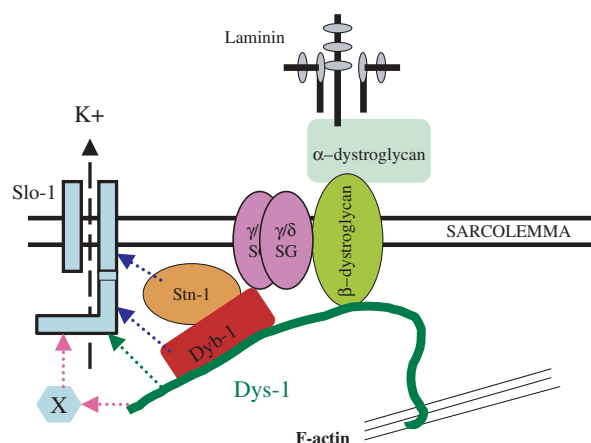


Figure 5. Model of possible interactions between SLO-1 and dystrophin (DYS-1). The data reported here indicate that SLO-1 and DYS-1 interact. No physical interaction was detected in two-hybrid assays between DYS-1 and SLO-1 (green arrow). An intermediate protein, possibly an unidentified auxiliary beta subunit, may mediate this interaction (pink arrow). Alternatively, syntrophin (STN-1) and dystrobrevin (DYB-1) are known to bind to ion channels in other systems and may mediate the DYS-1–SLO-1 interaction (blue arrows). The putative inactivation of SLO-1 function in the absence of DYS-1 may contribute to the pathogenicity of dystrophin mutations.

alpha-syntrophin.²⁰ In dystrophin-deficient mice, the clustering of the Kir4.1 potassium channel was found to be reduced severely.²¹ These observations are in addition to the misregulation of calcium channels and TRPC channels in the absence of dystrophin.^{17,22} SLO channels have a long cytosolic region, which is the site of multiple regulations. Auxiliary beta subunits identified in both *Drosophila* and mammals, which bind to this region, modulate the activity of the channel,^{23,24} and are regulated in turn by calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) phosphorylation.²⁵ These few examples add support to the hypothesis of a physical interaction between *C. elegans* DAPC proteins and the SLO-1 channel.

If SLO-1 activity is reduced when *dys-1* is mutated, as postulated here, one might expect that overexpression (or gain-of-function) of SLO-1 would reduce the muscle degeneration of *dys-1*; *hlh-1* animals. This hypothesis was tested by constructing a *dys-1(cx18)*; *hlh-1(cc561)* *slo-1(ky389)*, in which *ky389* is a gain-of-function allele of *slo-1*,⁴ and by overexpressing a *slo-1:gfp* transgene in the *dys-1(cx18)*; *hlh-1(cc561)* strain. Although there appears to be a slight reduction of the muscle degeneration in both cases (Table 1), these results must be viewed with caution, since these animals are egg-laying defective, and many die before they can be scored.

In conclusion, the simplest model that can be deduced from the results presented here is that the absence of *dys-1* results in a down-regulation of *slo-1*. This down-regulation puts the muscle in

a more excited state, which is in turn deleterious, because it leads to more calcium influx and more contraction, which are known to be aggravating factors. This model is perfectly in line with all the data available in the literature.

Materials and Methods

C. elegans strains

The N2 reference strain and the polymorphic strain RW7000 were obtained from the *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC). *hlh-1(cc561ts)*²⁶ was obtained from A. Fire's laboratory. The *dys-1* alleles have been described.⁷

Mutagenesis and identification of the *slo-1* gene

Mutagenesis of the wild-type reference strain N2 was performed with ethylmethane sulfonate (EMS) using standard procedures.²⁷ Mapping of the mutations on the genetic map using visible markers was performed as described.²⁸ Mapping to polymorphisms was carried out as described.¹² For the candidate gene approach, sequencing of PCR-amplified fragments was done on an Amersham Megabace 1000 sequencer.

Injection of *slo-1* constructs

slo-1 constructs carrying either the endogenous *slo-1* promoter or tissue-specific promoters were as described,¹ and kindly sent to us by the laboratory of origin. *slo-1* constructs carrying the *snb-1* and the *myo-3* promoters were injected at a concentration of 0.1 ng/ μ l with KP13²⁹ as a transformation marker. The *slo-1:slo-1-gfp* construct¹ was injected at concentrations of 0.2 ng/ μ l, 2 ng/ μ l, and 20 ng/ μ l.

Immunodetection

Worms were prepared and immunostaining was performed as described.³⁰ MH24 anti-vinculin and 5.6 anti-myosin A monoclonal antibodies were purchased from the Developmental Study Hybridoma Bank (Iowa City, USA).

Electrophysiological methods

Experiments were performed on ventromedial body-wall muscles. The dissection technique and patch clamp recordings using the inside-out configuration were performed as described.³ Pipettes were filled with 10 mM Hepes (pH 7.2), 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂. The bath solution and the solution superfusing the cytoplasmic face of the patch membrane contained 10 mM Hepes (pH 7.2), 140 mM KCl, 0.1 mM CaCl₂ (or 0 mM CaCl₂ + 1 mM EGTA when mentioned), 5 mM MgCl₂. Values are means \pm S.E.M.

Quantification of locomotion

Locomotion was scored on active well-fed animals as described:²⁹ 20 animals were used to determine each point.

Observation of muscles

Observations of body-wall muscles after staining with phalloidin-rhodamine were performed as described,³¹ using a Zeiss Axioscop microscope. Animals were fixed and stained three days after they had reached the L4 stage. Only the two most visible quadrants of body-wall muscles were quantified in each animal (40 cells/animal). At least 25 animals were scored to determine each value.

Acknowledgements

The authors thank Alan Coulson for sending us numerous cosmids, Theresa Stiernagle and the *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC) for providing various strains used in this study, M. Nonet for sending us strain NM1968, and M. Labouesse for critical reading of the manuscript. M.C.-P. is funded by an Association Française contre les Myopathies (AFM) grant. This work was supported by an Association Française contre les Myopathies (AFM) grant, and by a district (Région Rhône-Alpes) grant to L.S.

References

1. 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.
2. Yuan, A., Dourado, M., Butler, A., Walton, N., Wei, A. & Salkoff, L. (2000). SLO-2, a K⁺ channel with an unusual Cl⁻ dependence. *Nature Neurosci.* **3**, 771–779.
3. Jospin, M., Mariol, M. C., Segalat, L. & Allard, B. (2002). Characterization of K(+) currents using an in situ patch clamp technique in body wall muscle cells from *Caenorhabditis elegans*. *J. Physiol.* **544**, 373–384.
4. Davies, A. G., Pierce-Shimomura, J. T., Kim, H., VanHoven, M. K., Thiele, T. R., Bonci, A. *et al.* (2003). A central role of the BK potassium channel in behavioral responses to ethanol in *C. elegans*. *Cell*, **115**, 655–666.
5. Waterston, R. H. (1988). Muscle. In *The Nematode Caenorhabditis elegans* (Wood, W. B., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
6. Moerman, D. & Fire, A. (1997). Muscle: structure, function, development. In *C. elegans II* (Riddle, D. e. a., ed.), pp. 417–470, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
7. Bessou, C., Giuglia, J.-B., Franks, C. J., Holden-Dye, L. & Ségalat, L. (1998). Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission. *Neurogenetics*, **2**, 61–72.
8. Ahn, A. H. & Kunkel, L. M. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genet.* **3**, 283–291.
9. Dubowitz, V. (2000). What is muscular dystrophy? Forty years of progressive ignorance. *J. Roy. Coll. Physicians*, **34**, 464–468.
10. Grisoni, K., Gieseler, K., Mariol, M., Martin, E., Carre-Pierrat, M., Moulder, G. *et al.* (2003). The *stn-1*

- syntrophin gene of *C. elegans* is functionally related to dystrophin and dystrobrevin. *J. Mol. Biol.* **332**, 1037–1046.
11. Gieseler, K., Bessou, C. & Ségalat, L. (1999). Dystrobrevin- and dystrophin-like mutants display similar phenotypes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurogenetics*, **2**, 87–90.
 12. Williams, B., Schrank, B., Huynh, C., Shownkeen, R. & Waterston, R. (1992). A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics*, **131**, 609–624.
 13. Gieseler, K., Grisoni, K. & Ségalat, L. (2000). Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **10**, 1092–1097.
 14. Grisoni, K., Martin, E., Gieseler, K., Mariol, M. & Segalat, L. (2002). Genetic evidence for a dystrophin-glycoprotein complex (DGC) in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, **294**, 77–86.
 15. Kim, H., Rogers, M. J., Richmond, J. E. & McIntire, S. L. (2004). SNF-6 is an acetylcholine transporter interacting with the dystrophin complex in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **430**, 891–896.
 16. Gieseler, K., Grisoni, K., Mariol, M. & Ségalat, L. (2002). Overexpression of dystrobrevin delays locomotion defects and muscle degeneration in a dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromusc. Disorders*, **12**, 371–377.
 17. Mallouk, N., Jacquemond, V. & Allard, B. (2000). Elevated subsarcolemmal Ca^{2+} in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 4950–4955.
 18. Wagner, K. R., Cohen, J. B. & Haganir, R. L. (1993). The 87K postsynaptic membrane protein from torpedo is a protein-tyrosine kinase substrate homologous to dystrophin. *Neuron*, **10**, 511–522.
 19. Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E. & Blake, D. J. (1997). PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *BioEssays*, **19**, 469–479.
 20. Connors, N. C., Adams, M. E., Froehner, S. C. & Kofuji, P. (2004). The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J. Biol. Chem.* **279**, 28387–28392.
 21. Connors, N. C. & Kofuji, P. (2002). Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells. *J. Neurosci.* **22**, 4321–4327.
 22. Vandebrouck, C., Martin, D., Colson-Van Schoor, M., Debaix, H. & Gailly, P. (2002). Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.* **158**, 1089–1096.
 23. Schopperle, W. M., Holmqvist, M. H., Zhou, Y., Wang, J., Wang, Z., Griffith, L. C. *et al.* (1998). Slob, a novel protein that interacts with the Slowpoke calcium-dependent potassium channel. *Neuron*, **20**, 565–573.
 24. Xia, X., Hirschberg, B., Smolik, S., Forte, M. & Adelman, J. P. (1998). dSLo interacting protein 1, a novel protein that interacts with large-conductance calcium-activated potassium channels. *J. Neurosci.* **18**, 2360–2369.
 25. Zhou, Y., Schopperle, W. M., Murrey, H., Jaramillo, A., Dagan, D., Griffith, L. C. & Levitan, I. B. (1999). A dynamically regulated 14-3-3, Slob, and Slowpoke potassium channel complex in *Drosophila* presynaptic nerve terminals. *Neuron*, **22**, 809–818.
 26. Harfe, B. D., Branda, C. S., Krause, M., Stern, M. J. & Fire, A. (1998). MyoD and the specification of muscle and non-muscle fates during postembryonic development of the *C. elegans* mesoderm. *Development*, **125**, 2479–2488.
 27. Anderson, P. (1995). Mutagenesis. In *Caenorhabditis elegans* (Epstein, H. F. & Shakes, D. C., eds), vol. 48, pp. 31–58, Academic Press, San Diego.
 28. Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **77**, 71–94.
 29. Ségalat, L., Elkes, D. A. & Kaplan, J. M. (1995). Modulation of serotonin-controlled behaviors by Go in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **267**, 1648–1651.
 30. 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.
 31. Waterston, R. H., Hirsh, D. & Lane, T. R. (1984). Dominant mutations affecting muscle structure in *Caenorhabditis elegans* that map near the actin gene cluster. *J. Mol. Biol.* **180**, 473–496.

Edited by J. Karn

(Received 22 December 2005; received in revised form 11 February 2006; accepted 14 February 2006)
Available online 28 February 2006

B. La syntrophine (STN-1) de *Cænorhabditis elegans* est fonctionnellement reliée à la dystrophine (DYS-1) et à la dystrobrévine (DYB-1)

Karine Grisoni, Kathrin Gieseler, Marie-Christine Mariol, Edwige Martin, Maïté Carre-Pierrat, Gary Moulder, Robert Barstead et Laurent Ségalat

Les syntrophines sont des protéines à domaines PDZ connues pour leurs propriétés d'agrégation de récepteurs, et autres molécules du signal, à la membrane, notamment à la membrane post-synaptique de l'appareil électrique de la raie Torpedo (Froehner et al., 1987). Dans les muscles des mammifères, les syntrophines sont des composants du DGC et interagissent avec la dystrophine et la dystrobrévine (Ahn et al., 1996).

C. elegans possède deux homologues de syntrophines :

- STN-1, une protéine homologue des syntrophines α et β , codée par le gène F30A10.8 (ci-après nommé *stn-1*),
- et une protéine homologue des γ - syntrophines, codée par le gène F27D9.8.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à STN-1 car les syntrophines α et β sont situées dans les muscles striés des mammifères, alors que les γ -syntrophines sont neuronales (Ahn et al., 1996; Piluso et al., 2000).

Gieseler et coll. avaient montré que STN-1 interagit in vitro avec DYS-1 et DYB-1, l'homologue de l' α -dystrobrévine (Gieseler et al., 1999a).

L'article qui suit décrit la structure protéique, l'expression tissulaire et les interactions de STN-1 avec DYS-1 et DYB-1.

Nous montrons que STN-1 semble lié à la modulation du calcium intracellulaire. Notre hypothèse est que STN-1 pourrait inhiber de façon directe ou indirecte l'activité d'EGL-19, un canal calcique dépendant du voltage impliqué dans la contraction musculaire, réduisant ainsi le couplage excitation-contraction.

The *stn-1* Syntrophin Gene of *C. elegans* is Functionally Related to Dystrophin and Dystrobrevin

Karine Grisoni¹, Kathrin Gieseler¹, Marie-Christine Mariol¹
Edwige Martin¹, Maité Carre-Pierrat¹, Gary Moulder², Robert Barstead²
and Laurent Ségalat^{1*}

¹CGMC, CNRS-UMR 5534
Université Lyon-1, 43 Bid du
11 Novembre, 69622
Villeurbanne, cedex, France

²Department of Molecular and
Cell Biology, Oklahoma
Medical Research Foundation
Oklahoma City, OK 73104
USA

Syntrophins are a family of PDZ domain-containing adaptor proteins required for receptor localization. Syntrophins are also associated with the dystrophin complex in muscles. We report here the molecular and functional characterization of the *Caenorhabditis elegans* gene *stn-1* (F30A10.8), which encodes a syntrophin with homology to vertebrate alpha and beta-syntrophins. *stn-1* is expressed in neurons and in muscles of *C. elegans*. *stn-1* mutants resemble dystrophin (*dys-1*) and dystrobrevin (*dyb-1*) mutants: they are hyperactive, bend their heads when they move forward, tend to hypercontract, and are hypersensitive to the acetylcholinesterase inhibitor aldicarb. These phenotypes are suppressed when *stn-1* is expressed under the control of a muscular promoter, indicating that they are caused by the absence of *stn-1* in muscles. These results suggest that the role of syntrophin is linked to dystrophin function in *C. elegans*.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Corresponding author

Keywords: syntrophin; dystrophin; dystrobrevin; Duchenne Muscular Dystrophy; nematode

Introduction

Syntrophins are a family of intracellular proteins originally described in the postsynaptic membrane of the Torpedo electric organ.¹ There are five syntrophin genes in mice (α , β 1, β 2, γ 1, γ 2). Syntrophins contain plekstrin homology domains (PH domains) and a PDZ domain. The PDZ domain is a 90 amino acid residues-long motif named after its discovery in several proteins including PSD-95, Discs large, and Z0-1.² The list of PDZ-containing proteins rapidly suggested that the PDZ domain might serve as an addressing signal to deliver functional units to their subcellular sites of action, in particular of cell–cell contacts.² PDZ turned out to be a common protein motif since *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* have 60 and 69 of them, respectively.³ PDZ-containing proteins are involved in the assembly of supramolecular complexes active in signal transduction.³ At synapses, which are highly specialized cell contact regions, the assembly and function of the signalling appar-

atus necessitates the proper clustering and scaffolding of the various components. This process relies heavily on PDZ-containing proteins, which are able to bind to the C-terminal tail of target proteins.³ Different types of synapses are assembled by different PDZ-proteins, which have different binding affinities to target sequences due to variations in the PDZ domain.⁴

Syntrophins appear to play an early role in the formation of the neuromuscular junction. They are concentrated on the postsynaptic side of the nascent neonatal muscle and on the acetylcholine receptor-rich side of the electroplaque.¹ They are also early components of the clusters of nicotinic receptors in cultured muscle.^{1,5} Syntrophins are also linked to sodium channels, in the localization and modulation of which they are involved.^{6,7} Skeletal muscles express highly homologous forms of syntrophin encoded by distinct genes.^{8–10} There appears to be some redundancy in their function, since disruption of α -syntrophin does not prevent muscle contraction despite some histological malformations.^{11,12}

Syntrophins are also part of the protein complex linked to dystrophin, the protein that is absent or abnormal in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). All three skeletal muscle syntrophins (α ,

Abbreviations used: DMD, Duchenne Muscular Dystrophy.

E-mail address of the corresponding author: segalat@cgmc.univ-lyon1.fr

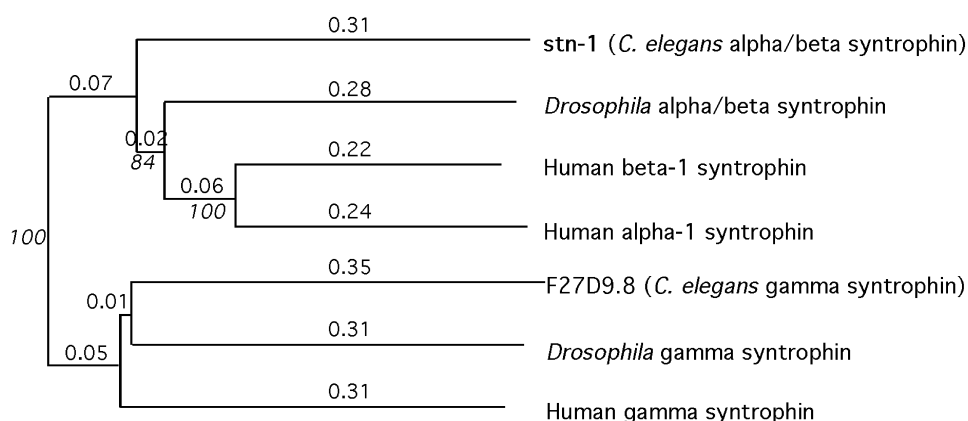


Figure 1. Phylogenetic tree of human and invertebrate syntrophin sequence. The tree shows the relative position of human, *C. elegans* and *Drosophila* syntrophins in evolution. The size of the branches is proportional to the distance, which is indicated by numbers. Bootstrap values are given in italics when relevant. The tree was calculated by the Phylo_win program.

$\beta 1$, $\beta 2$) are able to bind to dystrophin.¹³ Syntrophin binds to the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and to aquaporin-4, which it helps localize properly.¹⁴ In the absence of syntrophin, nNOS is no longer present at the sarcolemma, but instead is distributed through the cytoplasm.^{11,12} Such a mislocalization of nNOS is a hallmark of dystrophin-related muscle degeneration.^{15,16} Syntrophin also binds directly to dystrobrevin, another component of the Dystrophin Glycoprotein Complex (DGC).^{17,18}

The nematode *C. elegans* possesses a syntrophin gene (*stn-1*), the product of which is similar to mammalian muscular syntrophins (α , $\beta 1$, $\beta 2$).¹⁹ We previously showed that inactivation of the *stn-1* gene by RNA interference produces a phenotype of hyperactivity similar to the one occurring in the absence of dystrophin (*dys-1*) and dystrobrevin (*dyb-1*).²⁰ Here, we present a complete characterization of the *stn-1* gene, and of the phenotypes occurring when the gene is mutated. These phenotypes strikingly resemble those of *dys-1* and *dyb-1* mutants,^{21,22} suggesting that the early role of syntrophin in evolution was closely linked to dystrophin function.

Results

The *C. elegans* genome contains two syntrophin-like genes

The search for *C. elegans* homologues of mammalian syntrophins indicated that *C. elegans* possesses an alpha/beta-like syntrophin and a gamma-like syntrophin. A BlastP²³ search of the predicted *C. elegans* proteins database Wormpep using either the human alpha-1 or the human beta-2 sequences pointed to the F30A10.8 gene with *P* scores of 10^{-58} and 10^{-80} , respectively. The reciprocal search, using F30A10.8 to search mammalian databases, pointed to alpha and beta syntrophins, thus confirming the identity of F30A10.8. Another *C. elegans*

syntrophin-related protein (F27D9.8), turned out to be more closely related to gamma syntrophins when compared to mammalian proteins. From this analysis, we conclude that F30A10.8 is an alpha/beta syntrophin, and F27D9.8 a gamma syntrophin. This result was confirmed by a distance analysis run on the program Phylo_Win, which shows that gamma and alpha/beta syntrophin already existed in the ancestor of worms and mammals (Figure 1).

The *stn-1*/F30A10.8 gene and protein

We renamed the F30A10.8 gene *stn-1* (for syntrophin-1). The gene is located on the center of the first chromosome, at genetic position +3.7. EST sequences of the gene reveal at least two isoforms (F30A10.8a and F30A10.8b) of 440 and 423 amino acid residues, respectively, which differ by their C terminus.† We confirmed the exon/intron boundaries of F30A10.8a by sequencing the cDNA yk109h11, kindly provided by Y. Kohara (Figure 2). This sequence is deposited in the Swissprot database as reference Q93646.

The protein sequence similarity of F30A10.8a and F30A10.8b to human alpha and beta syntrophins is of 35% overall.²⁰ It rises to 80% in the PDZ domain (amino acid residues 42–125). Like human syntrophins, F30A10.8a and b also contain a pleckstrin homology (PH) domain (amino acid residues 227–340). This domain does not appear to be of the DH-PH class. The homology to human syntrophins in the PH domain is 58%.

Expression of *stn-1*

We determined the expression of F30A10.8 by reporter gene analysis. For this purpose a first transgene (*stn-1:gfp I*) was constructed, which contained approximately 2 kb of genomic DNA

† www.wormbase.org

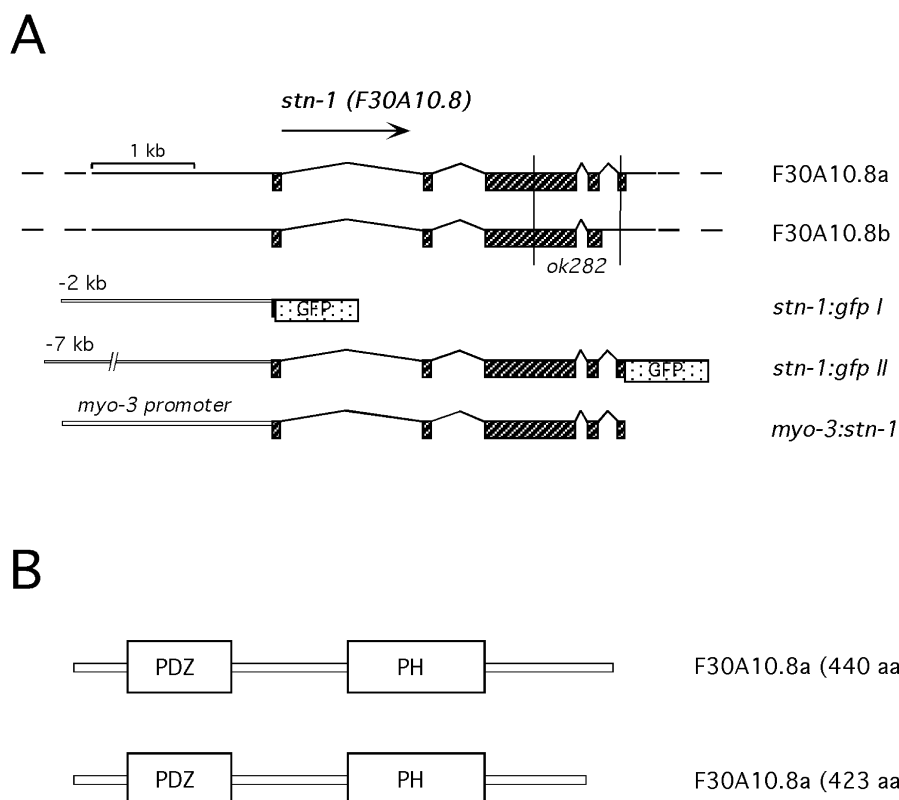


Figure 2. Structure of the *stn-1* gene and proteins. A, Structure of the *stn-1* gene and transgenes used in this study. The *stn-1* gene (F30A10.8) encodes at least two isoforms (F30A10.8a and F30A10.8b), which differ by their 3' end (first two lines). The hatched boxes represent the exons. The breakpoints of the deletion *ok282* are shown by vertical lines. The next three lines show the transgenes used in this study. *stn-1:gfp I* contains approximately 2 kb of *stn-1* promoter sequences fused upstream of the *gfp* gene. *stn-1:gfp II* encodes a chimeric protein composed of the full length syntrophin fused to *gfp*. *myo-3:stn-1* was built to drive *stn-1* expression in *C. elegans* muscles. B, Structure of the F30A10.8a and F30A10.8b proteins. Motif search programs identified a PDZ and a PH domain, which are shown on the Figure. These domains are 80% and 58% similar to those of beta-syntrophin, respectively.

located upstream of the F30A10.8 open reading frame. These promoter sequences were inserted in a vector containing the green fluorescent protein (GFP) coding sequence (Figure 2). Transgenic animals carrying this construct showed a robust fluorescence in neurons and muscles. No expression was observed outside of these tissues. Expression of *stn-1* was detected as early as twofold embryos (Figure 3A). Among the muscles, signal was particularly strong in the body-wall muscles, the head muscles, and the vulva muscles (Figure 3B–E). Neuronal expression was seen in most neurons, although this point has not been investigated in detail. Another transgene (*stn-1:gfp II*) (Figure 2), carrying a longer piece of F30A10.8 upstream sequences and the whole F30A10.8a open reading frame, gave similar results (not shown).

***stn-1* mutants have behavioral phenotypes identical with dystrophin (*dys-1*) mutants**

An *stn-1* mutant was obtained by the *C. elegans* Gene Knockout Consortium at Oklahoma Medical Research Foundation. Sequence analysis of the mutant revealed that it is due to a 852 bp deletion removing nucleotides 32,029–32,870 of F30A10. It

deletes part of exon 3, exon 4 and most of exon 5 of *stn-1* (Figure 2). The predicted Stn-1 protein produced in *stn-1(ok282)* lacks amino acid residues 230–417.

stn-1(ok282) mutants strikingly recapitulate all behavioral phenotypes of dystrophin (*dys-1*) and dystrobrevin (*dyb-1*) mutants,^{21,22,24} including hyperactivity, an exaggerated bending of the head and body when moving forward (overbent), and a tendency to hypercontract when moving backward (Table 1).

We next asked whether *dys-1* and *stn-1* phenotypes were additive by constructing a *stn-1(ok282)* *dys-1(cx18)* double mutant. The phenotypes were not additive, indicating that both genes are likely to be in the same genetic pathway (Table 1).

Like *dys-1* mutants, *stn-1(ok282)* animals have fewer eggs in their uterus than N2 animals do. These phenotype were not additive either (Table 1).

Since *dys-1* mutants have an increased sensitivity to the acetylcholinesterase inhibitor aldicarb,²¹ we tested whether the same would apply to *stn-1* mutants. *stn-1(ok282)* and control wild-type animals were exposed to short-term (two hours) and long-term (16 hours) doses of aldicarb. The number of paralysed and dead animals was scored,

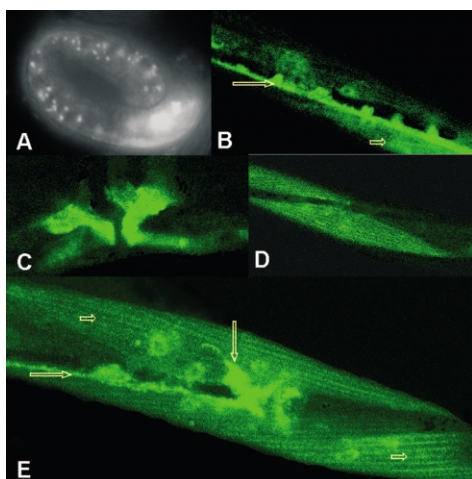


Figure 3. *stn-1* is expressed in muscles and neurons. Expression of *stn-1* was assayed by reporter gene analysis. Fluorescence microscopy images of wild-type animals carrying a *stn-1:gfp* transgene. A, Expression in a twofold embryo seen with a fluorescence microscope (630 \times). GFP fluorescence is detected in the head neurons and muscles. B–E, Expression in an adult hermaphrodite seen with a confocal microscope. B, Projections of series of ventral views (400 \times). Staining is visible in the nerve cord (long arrow) and muscles (short arrow). C, Lateral view of the vulva showing intense staining in the vulva muscles (630 \times). D, Staining of body wall muscle cells (630 \times). E, Projections of series of ventral views (630 \times). Staining is visible in the nerve cord (long arrow), body-wall muscles (short arrow), and vulva muscles (vertical arrow).

respectively. Both assays showed that the *stn-1* were more sensitive than wild-type animals to aldicarb (Table 2). Moreover, the number of paralysed and dead animals was comparable (Table 2).

stn-1 mutations partly suppress calcium channel defects

To further investigate the nature of the hyperactivity observed in *stn-1* mutants, we constructed double mutants with the mutant *egl-19(n582)*, which is a reduction-of-function allele of a major

Table 2. Sensitivity of *stn-1* to aldicarb

Genotype	Paralysis after two hours (percentage of paralysed animals \pm s.d.)	Death after 16 hours (percentage of dead animals \pm s.d.)
N2	18 \pm 4	51 \pm 3
<i>stn-1(ok292)</i>	68 \pm 4 ^a	94 \pm 3 ^a
<i>dys-1(cx18)</i>	58 \pm 3 ^a	88 \pm 2 ^a
<i>stn-1(ok292)</i> + <i>myo-3:stn-1</i>	18 \pm 4	60 \pm 4

Animals were exposed to 200 μ M aldicarb.

^a Different from N2 ($p < 0.05$).

muscular L-type calcium channel of *C. elegans*.^{25–27} As a result of reduced calcium influx, *egl-19(n582)* muscles do not contract properly. Thus, this mutant moves poorly and does not expell eggs out of the uterus (*egl-d* phenotype). The *stn-1(ok292)*; *egl-19(n582)* double mutant showed intermediate phenotypes between those of the single mutants *stn-1(ok292)* and *egl-19(n582)*, indicating that both mutations antagonize each other (Table 1). This effect was seen on both locomotion and egg-laying. Next, a double mutant was constructed with the *egl-19(ad695)* gain-of-function allele. The *stn-1(ok292)*; *egl-19(ad695)* double mutant was not significantly different from *egl-19(ad695)*, which is strongly hyperactive and *egl-c* (egg-laying constitutive).

stn-1 phenotypes are of muscular origin

Since *stn-1* expression was detected in both neurons and muscles, we next asked whether the *stn-1* phenotypes described above were of neuronal or muscular origin. For this purpose, we constructed transgenic lines expressing *stn-1* under the strong muscle-specific *myo-3* promoter (Figure 2, bottom), which is active in body-wall muscles, vulva muscles and intestinal muscles.²⁸ The transgene was injected into *stn-1(ok292)* mutants, thus producing animals expressing *stn-1* only in those muscles. Transgenic animals had a wild-type

Table 1. Phenotypes of *stn-1* and *stn-1* double mutants

Genotype	Locomotion rate (body bends/minute \pm s.e.m.)	Eggs (eggs <i>in utero</i> \pm s.e.m.)	Overbent	Hypercontracted
N2	14.0 \pm 0.9	12.0 \pm 0.4	N	N
<i>stn-1(ok292)</i>	19.8 \pm 1.0 ^a	6.0 \pm 0.4 ^a	Y	Y
<i>dys-1(cx18)</i>	19.5 \pm 0.8 ^a	8.2 \pm 0.5 ^a	Y	Y
<i>stn-1(ok292) dys-1(cx18)</i>	20.4 \pm 1.0 ^a	6.8 \pm 0.8 ^a	Y	Y
<i>egl-19(n582)</i>	4.2 \pm 0.4	41.1 \pm 1.5	N	N
<i>stn-1(ok292); egl-19(n582)</i>	10.0 \pm 0.5	16.6 \pm 1.2	N	N
<i>egl-19(ad695)</i>	17.0 \pm 0.6	3.1 \pm 0.7	N	N
<i>stn-1(ok292); egl-19(ad695)</i>	16.6 \pm 0.5	1.6 \pm 0.1	Y	Y
<i>stn-1(ok292) + myo-3:stn-1</i>	14.0 \pm 0.7	18.5 \pm 0.6	N	N

Locomotion was scored as described in Materials and Methods. Overbent means increased bending of the head and anterior part of the body during locomotion. Hypercontracted means tendency to hypercontract when moving backwards. N, No; Y, Yes.

^a Different from N2 ($p < 0.05$).

appearance, except for an increased number of eggs in the uterus. In these animals, most phenotypes of *stn-1(ok292)* returned to near wild-type levels. Locomotion was similar to wild-type: animals moved more slowly than *stn-1(ok292)* and lost their bended-head appearance and tendency to hypercontract (Table 1). Muscle-specific syntrophin expression also suppressed the hypersensitivity to aldicarb (Table 2). These results show that *stn-1(ok292)* phenotypes, like those of *dys-1* mutants, mainly originate from the absence of the protein in the muscles.

stn-1 mutations do not trigger a massive muscle degeneration

A key feature of *dys-1* mutants is that they trigger a massive muscular degeneration when associated to the mild *hllh-1(cc561)* mutation which fragilizes the body-wall muscles.²⁹ Other *dys-1*-like mutants, including *dyb-1*, share this feature, albeit at a smaller extent²² (our unpublished results). To determine whether *stn-1(ok292)* would behave similarly, we crossed *stn-1(ok292)* into *hllh-1(cc561)*. Although some body-wall muscle cells appeared abnormal or missing in adult *stn-1(ok292); hllh-1(cc561)* animals, the extent of muscle degradation was much lower than in *dys-1(cx18); hllh-1(cc561)* analyzed in the same conditions (Table 3). We counted on average 2.2 missing or abnormal cells in *stn-1(ok292); hllh-1(cc561)*, compared to 11.5 in *dys-1(cx18); hllh-1(cc561)*. As a comparison, the figure for *dyb-1(cx36); hllh-1(cc561)* was 3.3 (Table 3). We next asked whether syntrophin (*stn-1*) and dystrobrevin (*dyb-1*) mutations would have a synergistic effect in the *hllh-1(cc561)* background. For this purpose, we scored muscle degeneration in the triple mutant *dyb-1(cx36) stn-1(ok292); hllh-1(cc561)*. This mutant had an average of 2.0 missing or abnormal cells, which was not significantly different from either *stn-1(ok292); hllh-1(cc561)* or *dyb-1(cx36); hllh-1(cc561)*. Next, we investigated the genetic interactions between

stn-1(ok292) and *egl-19(ad695)*. The *dys-1(cx18)* mutation leads to muscle degeneration in the *egl-19(ad695)* genetic background.³⁰ We looked at muscles of *stn-1(ok292); egl-19(ad695)* animals. The double mutant had the same proportion of abnormal muscle cells as the single *egl-19(ad695)*.

Altogether, these results indicate that, although *dys-1* and *stn-1* mutants share numerous features, their ability to promote muscular degeneration is different. With respect to muscle degeneration, *stn-1* is therefore closer to *dyb-1* than to *dys-1*.

Stn-1 binds to *C. elegans* dystrobrevin, but not to dystrophin in yeast two-hybrid assays

We next assayed whether the Stn-1 protein was able to bind to dystrophin (Dys-1) and dystrobrevin (Dyb-1) in a yeast two-hybrid assay. Dyb-1, but not Dys-1, shows a clear syntrophin consensus site in its sequence.^{21,24,31} The full-length Stn-1 protein was fused to the DNA binding domain of the Gal4 yeast transcription factor, while Dys-1 and Dyb-1 proteins or fragments of them were fused to the activation domain of Gal4. Two Dys-1 fragments were used; they cover amino acid residues 3402–3674, and 2857–3674. Both fragments contain the putative syntrophin-binding domain, which was shown to bind syntrophin *in vitro*.¹⁹ The larger fragment contains the entire C-terminal region of Dys-1. The two Dyb-1 constructs encode amino acid residues 5–590 (clone 31) and 390–543 (clone AN450), respectively.

Yeasts were first transformed with the BD-Stn-1 construct. One strain expressing high levels of BD-Stn-1 fusion protein was selected by Western blotting procedure using a Gal4 DNA-BD monoclonal antibody (data not shown). This strain was further transformed with plasmids encoding the respective AD-Dys-1 and AD-Dyb-1 fusion proteins or empty pACT2 as negative control. Correct expression of these fusion proteins in yeast was checked by Western blotting using a Gal4 AD monoclonal antibody (data not shown).

Interactions between Stn-1 and either Dys-1 or Dyb-1 proteins were checked by transactivation of the *HIS3* reporter gene. For this purpose yeasts were grown on SD medium devoid of histidine. While empty prey vector (pACT-2) fails to transactivate the yeast reporter gene, yeasts carrying both Dyb-1 fragments were able to grow on SD medium devoid of histidine, indicating that Dyb-1 and Stn-1 interact *in levuro* (Figure 4). This interaction is specific since yeasts expressing AD-Dyb-1 but carrying empty pAS2-1 do not grow on media without histidine (Figure 4). The amino acid residues 390–543 of Dyb-1 are enough for its interaction with Stn-1. On the contrary, the Dys-1 constructions were unable to promote growth on SD medium devoid of histidine (data not shown). This result indicates that Stn-1 and the C-terminal end of Dys-1 do not interact *in levuro*.

To confirm these results, we performed a semi-quantitative β -galactosidase assay, in which the

Table 3. Absence of muscle defects in *stn-1* mutants

Genotype	Number of abnormal muscle cells
N2	0 ± 0
<i>stn-1(ok292)</i>	0 ± 0
<i>dys-1(cx18)</i>	0.1 ± 0.1
<i>stn-1(ok292) dys-1(cx18)</i>	0.1 ± 0.1
<i>hllh-1(cc561)</i>	1.1 ± 0.4
<i>stn-1(ok292); hllh-1(cc561)</i>	2.2 ± 0.5
<i>dys-1(cx18); hllh-1(cc561)</i>	11.5 ± 0.8
<i>dyb-1(cx36); hllh-1(cc561)</i>	3.3 ± 0.4
<i>dyb-1(cx36) stn-1(ok292); hllh-1(cc561)</i>	2.0 ± 0.3
<i>egl-19(ad695)</i>	0.1 ± 0.1
<i>stn-1(ok292); egl-19(ad695)</i>	0.1 ± 0.1
<i>dys-1(cx18); egl-19(ad695)</i>	1.7 ± 0.5

Muscle cells were observed after phalloidin staining of animals fixed three days after the L4-stage. Mean ± s.e.m.

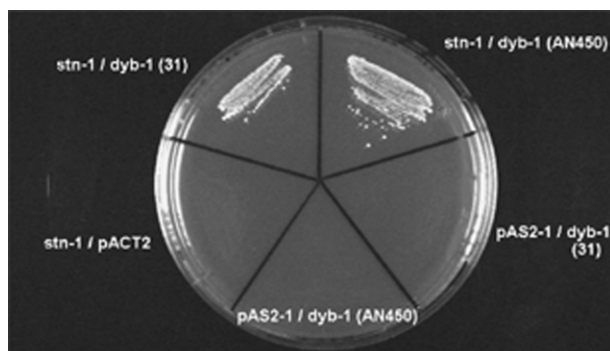


Figure 4. Yeast two-hybrid assay of *stn-1* interactions with *dys-1* and *dyb-1*. Growth in media devoid of histidine can occur only if the bait and the prey interact, which activates the *HIS3* reporter gene. The two *Dyb-1* clones (31 and AN450) tested promoted growth on this assay, indicating that *Dyb-1* and *Stn-1* proteins interact *in vivo* and that the amino acid residues 390–543 are enough for this interaction. Negative control yeasts carrying empty vectors PAS2-1 and pACT-2 did not grow.

level of β -galactosidase is measured enzymatically. In this experiment, yeast strains produce β -galactosidase upon interaction of the bait with the prey. Yeast transformed with both *Stn-1* and *Dyb-1* produced 2.6 units of β -galactosidase, whereas no detectable β -galactosidase was found in yeast transformed with *Stn-1* and *Dys-1*. Yeast transformed with *Dys-1* and *Dyb-1* were used as positive controls and produced ten units of β -galactosidase.

Discussion

Here, we show that the nematode *C. elegans* has two syntrophin genes, one related to the alpha/beta class of mammalian syntrophins, and another one closer to the gamma syntrophins. A similar situation also exists in *Drosophila*, with one alpha/beta gene and one gamma gene. It is likely that the unique alpha/beta syntrophin gene of invertebrates was duplicated later in evolution to give rise to three genes present in mammals. Thus, the *stn-1* gene of *C. elegans* gives an opportunity to study syntrophin function in depth.

In this study, the function of *stn-1* was investigated primarily by analysis of a deletion allele of the gene. The most striking feature of *stn-1(ok292)* mutants is their phenotypic similarity to dystrophin (*dys-1*) and dystrobrevin (*dyb-1*) null mutants. This includes hyperactivity, tendency to hypercontract and hypersensitivity to aldicarb. Whenever tested, the phenotypes of *dys-1* and *stn-1* were not additive, indicating that the two proteins operate in the same physiological function. Such a situation had already been noted for dystrobrevin, which is a dystrophin-binding protein.^{22,24} It is noteworthy that *dys-1*, *dyb-1*, and *stn-1*, all encode proteins of the dystrophin complex.²⁰

Interestingly, *stn-1* and *dys-1* mutants differ on a key point, which is their ability to trigger muscle

degeneration in adult animals in combination with the mild *hllh-1/MyoD* mutation *cc561*. Whereas *dys-1(cx18); hllh-1(cc561)* animals display an average of 11.5 abnormal body wall muscle cells, *stn-1(ok292); hllh-1(cc561)* show only 2.2 abnormal cells, which is not significantly different from *hllh-1(cc561)* alone (1.1). Although we cannot rule out the possibility that *stn-1(ok292)* is not a null allele, we do not favor this hypothesis since the predicted *Stn-1* protein in *stn-1(ok292)* lacks almost half of its amino acids. This discrepancy with dystrophin and other DGC proteins had already been noted previously, albeit in conditions where gene inactivation is known to be partial.²⁰ In combination with *hllh-1(cc561)*, dystrobrevin (*dyb-1*) mutants show an average of only 3.3 abnormal cells, compared to 11.5 for *dys-1*. The severity of the defect is the same in the triple mutant *stn-1(ok292) dyb-1(cx36); hllh-1(cc561)*, indicating that *dyb-1* and *stn-1* are probably part of the same function. These data are of interest since dystrobrevin and syntrophin share a number of features in mammals. They both are cytoplasmic proteins that bind to the C-terminal end of dystrophin.³² *C. elegans* and mammalian dystrobrevin and syntrophin bind to each other *in vitro*.^{19,32} Moreover, mouse knockouts of alpha-dystrobrevin and alpha-syntrophin also have numerous similarities.^{11,12,33} The evolutionary-conserved physical interaction between syntrophin and dystrobrevin is probably related to a common function, which remains to be fully determined. This question has already been examined in mammals, but numerous dystrobrevin isoforms make the situation complex to decipher.³¹

The physical interaction between mammalian syntrophin and dystrophin has been demonstrated by a variety of methods, including overlay assay, *in vitro* binding and immunoprecipitation, and yeast two-hybrid assay.^{17,18,34,35} In contrast, despite earlier evidence that *C. elegans* syntrophin and dystrophin bind to each other in *in vitro* pulldown experiments,¹⁹ we were not able to show any interaction in the yeast two-hybrid assay, which is considered to be closer to the *in vivo* situation than *in vitro* experiments are. The two-hybrid result is in accordance with the absence of a clear syntrophin binding site (as defined by Newey and colleagues³¹) on the *C. elegans* dystrophin sequence. This may indicate that syntrophin is probably linked to the *C. elegans* DGC-like complex *via* dystrobrevin and not through direct binding of dystrophin. Since dystrobrevin must bind to dystrophin to be functional in *C. elegans* muscles,³⁶ one may speculate that *C. elegans* syntrophin is recruited to the dystrophin complex by dystrobrevin. This hypothesis fits well with the fact that, whenever tested, phenotypes associated with dystrobrevin (*dyb-1*) and syntrophin (*stn-1*) mutations are similar.

In the absence of dystrophin, syntrophin, or dystrobrevin, *C. elegans* animals are hyperactive. We demonstrated that the phenotype of syntrophin mutants could be corrected by expressing the

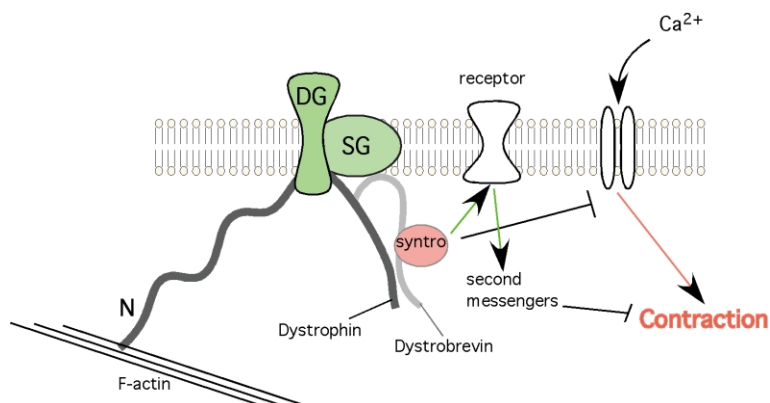


Figure 5. Speculative model of dystrophin/syntrophin action in muscle cells of *C. elegans*. Dystrophin is linked to the intracellular F-actin by its N terminus and to a transmembrane complex of proteins, mainly composed of dystroglycans (DG) and sarcoglycans (SG). Since these proteins are also present in *C. elegans*, it is believed that a similar complex exists in this animal. Syntrophin (syntro) may be linked to dystrophin *via* dystrobrevin. Syntrophin may slow calcium influx and thereby muscle activity by a still unknown mechanism, possibly involving unidentified receptors and second messengers.

protein only in the muscle tissue. Such a demonstration had already been done for dystrophin mutants.²¹ A possibility is that these proteins are responsible for locating components of the post-synaptic membrane that modulate muscle excitation. We showed earlier that the muscles of *dys-1* and *dyb-1* animals are more excitable than those of wild-type animals.^{21,22} There are many ways how this can be achieved. It is unlikely that Stn-1 directly plays a role on the activity of nicotinic receptors, since *stn-1(ok292)* has no effect on the *unc-38(e264)* reduction-of-function allele, which encodes a component of the nicotinic receptors (L.S., unpublished results). Here we show that syntrophin mutations can partly suppress *egl-19* mutations. One may therefore speculate that wild-type syntrophin may act by slowing calcium channel activity *via* a direct or indirect mechanism potentially involving other second messengers as recapitulated in Figure 5. Previous work done in mouse and *C. elegans* showed that the absence of dystrophin probably increases calcium intracellular levels.^{30,37} It is therefore plausible that this modulation may occur through syntrophin action.

Materials and Methods

Databases searches and sequence of the F30A10.8/*stn-1* gene

Searches were run on the Sanger centre† or NCBI sites using the BlastP program.²³ The phylogenetic tree and distance values were obtained with the program Phylo_Win.³⁸ F30A10.8 was renamed *stn-1*, which is approved by the Caenorhabditis Genetic Center (CGC). Motif searches were performed both on the NCBI site and the on Expasy site‡.

Generation and molecular analysis of the *stn-1(ok292)* mutant

stn-1(ok292) was generated by the *C. elegans* Gene

Knockout Consortium at Oklahoma Medical Research Foundation.³⁹ The *stn-1(ok292)* allele was outcrossed four times over the wild-type N2 strain. The breakpoints of the *stn-1(ok292)* deletion were determined by sequencing of PCR fragments amplified from mutant animals.

C. elegans strains

egl-19(n582), *egl-19(ad695)* and *dpy-20(e1282ts)*^{25,26,40} were obtained from the Caenorhabditis Genetic Center (CGC). *hlh-1(cc561ts)*⁴¹ was obtained from B. Harfe and A. Fire (Carnegie, Baltimore). *dys-1* alleles have been described.²¹ *dyb-1* alleles have been described.²⁴

stn-1:gfp constructs and microscopy

Two reporter-gene constructs were made to determine *stn-1* expression. *stn-1:gfp* I contains 2 kb of *stn-1* upstream sequences. A PCR-generated *Sph*I-*Sal*I fragment (nucleotides 27475-29515) of F30A10 was cloned into the *Sph*I-*Sal*I sites of pPD95.77, a GFP-encoding vector.⁴² *stn-1:gfp* II was constructed by cloning a 10.5 kb *Pst*I-*Mlu*I fragment of F30A10 into the *Pst*I-*Sma*I sites of pPD95.79. The *gfp* open reading frame was fused in frame to the last amino acid of *stn-1* (nucleotide 32935 of F30A10). The constructs were injected in N2 wild-type animals at a concentration of 10–50 ng/μl along with marker pRF4 (150 ng/μl) using standard procedures.⁴³ *stn-1:gfp* II was also injected in *stn-1(ok292)* mutants, the phenotypes of which it suppresses. Whole live animals were observed under a fluorescence microscope (Zeiss Axioplan) and a confocal Ar/Kr laser scanning microscope (Zeiss) equipped with X40 and X63 oil inversion objective lenses. Projections of serial z optical sections were obtained by the microscope software.

myo-3:stn-1 construct

myo-3:stn-1 was constructed by inserting a *Bam*HI-*Xho*I fragment of yk109h11 (a *stn-1* cDNA obtained from Y. Kohara) into the *Bam*HI-*Xho*I sites of pPD96.52 (A. Fire), a vector which contains the *myo-3* muscle-specific promoter. It was injected in *stn-1(ok292)* animals at a concentration of 0.1 ng/μl. Three lines were obtained, which showed similar phenotypes. Results are reported for one of the three lines.

† www.sanger.ac.uk

‡ <http://www.expasy.org>

Yeast two-hybrid screens and assays

The syntrophin (Stn-1) open reading frame (encoding aa 9–444) was fused to the DNA binding domain (DNA-BD) of the Gal4 protein. For this purpose, a 1.3 kb *stn-1* cDNA fragment (yk109h11) was amplified by PCR and cloned into the *NcoI/SmaI* sites of the pAS2-1 polylinker (Clontech). The resulting construct was called BD-Stn-1. Dyb-1 and Dys-1 proteins were fused to the activation domain of the Gal4 protein by cloning the respective cDNA fragments into the polylinker of pACT2 (Clontech). We used two different Dyb-1 clones: AD-Dyb-1 clone AN450 (aa 390–543) which has been described,³⁶ and AD-Dyb-1 clone 31 (aa 5–590), which was made by cloning a 1.8 kb cDNA fragment of *dyb-1* in the *SmaI/EcoRI* sites of the pACT2 polylinker. Two different *dys-1* cDNA (yk12c11) fragments were cloned into the *SmaI/BamHI* sites of the pACT2 polylinker: AD-Dys-1 clone NB810 is a 810 bp fragment encoding amino acid residues 3402–3674 (encompassing the putative syntrophin binding domain and the coiled-coil domain of Dys-1); AD-Dys-1 clone E2 is a 2.4 kb *dys-1* cDNA fragment which encodes the C-terminal end of Dys-1 (aa 2857–3674). All DNA constructs were checked by DNA sequencing.

All plasmids were transformed into the yeast strain CG1945 using the LiAc transformation procedure (Clontech, Yeast protocols Handbook, PT 3024-1). Transformants were selected on appropriate media: SD media minus tryptophan for yeasts transformed with BD-Stn-1 or empty pAS2-1; SD media minus tryptophan and leucine for transformants carrying both a bait (BD-Stn-1 or empty pAS2-1) and a prey plasmid (AD-Dyb-1, AD-Dys-1 or empty pACT2). The expression of each fusion protein in yeast was checked by Western blotting as described before³⁶ using Gal4 DNA-BD and Gal4 AD monoclonal antibodies (Clontech), respectively.

Interactions between the BD-Stn-1 protein and the AD-Dys-1 and AD-Dyb-1 fusion proteins were analysed on the basis of transactivation of the *HIS3* reporter gene after three days of growth on SD medium devoid of tryptophan, leucine and histidine. Growth on media devoid of histidine can occur only if Stn-1 interacts with Dys-1 or Dyb-1. Strains carrying empty plasmids were used as a negative controls.

β -Galactosidase semi-quantitative assays were performed with the same clones following the supplier's protocol.[†] One unit is defined as the amount of enzyme that hydrolyses 1 μ mol of ONPG (*p*-nitrophenyl-alpha-D-galactoside)/minute per $A_{600\text{ nm}}$ unit of cells.

Quantification of locomotion and egg laying behaviors

Locomotion was scored on active well-fed animals as described.⁴⁴ For egg laying, gravid (two days after L4 stage) animals were transferred on plates without food, and the number of eggs was scored after two hours. At least 20 animals were used for each point.

Drug assays

Sensitivity to aldicarb (Chem Service, West Chester, PA, USA) was measured by exposure to 200 μ M aldicarb mixed in the agar. Paralysis was defined as inability to

move more than half a body length after prodding. Death was defined as sick appearance combined with insensitivity to harsh prodding. More than 40 animals were used for each point.

Observation of muscles

Observations of body wall muscles after Phalloidin-Rhodamine staining were performed as described⁴⁵ using a Zeiss Axioscop microscope. Animals were fixed and stained three days after they reached the L4 stage. Only the two most visible quadrants of body wall muscles in each animal were quantified (40 cells per animal). At least 25 animals were scored for each point.

Acknowledgements

The authors thank Alan Coulson for the cosmid F30A10, Theresa Stiernagle and the *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC) for providing various strains used in this study, Yuji Kohara for the gift of cDNA clones, and Ludovic Orlando for the help with sequence comparison programs. K.G. was funded by a district (Région Rhône-Alpes) thesis fellowship. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), an ATIPE grant from the French Ministry of Research, and by a district (Région Rhône-Alpes) grant to L.S.

References

1. Froehner, S., Murnane, A., Tobler, M., Peng, H. & Sealock, R. (1987). A postsynaptic Mr 58,000 (58K) protein concentrated at acetylcholine receptor-rich sites in Torpedo electroplaques and skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **104**, 1633–1646.
2. Ponting, C. & Phillips, C. (1995). DHR domains in syntrophins, neuronal NO synthases and other intracellular proteins. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 102–103.
3. Sheng, M. & Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1–29.
4. Garner, C., Nash, J. & Hagan, R. (2000). PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol.* **10**, 274–280.
5. Chen, Q., Sealock, R. & Peng, H. (1990). A protein homologous to the Torpedo postsynaptic 58K protein is present at the myotendinous junction. *J. Cell Biol.* **110**, 2061–2071.
6. Gee, S., Madhavan, R., Levinson, S., Caldwell, J., Sealock, R. & Froehner, S. (1998). Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J. Neurosci.* **18**, 128–137.
7. Ou, Y., Strege, P., Miller, S., Makielski, J., Ackerman, M., Gibbons, S. & Farrugia, G. (2003). Syntrophin gamma 2 regulates SCN5A gating by a PDZ domain-mediated interaction. *J. Biol. Chem.* **278**, 1915–1923.
8. Adams, M., Dwyer, T., Dowler, L., White, R. & Froehner, S. (1995). Mouse alpha 1- and beta 2-syntrophin gene structure, chromosome localization, and homology with a discs large domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 25859–25865.

[†] <http://www.clontech.com>

9. Adams, M., Butler, M., Dwyer, T., Peters, M., Murnane, A. & Froehner, S. (1993). Two forms of mouse syntrophin, a 58 kD dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution. *Neuron*, **11**, 531–540.
10. Ahn, A., Yoshida, M., Anderson, M., Feener, C., Selig, S., Hagiwara, Y. *et al.* (1994). Cloning of human basic A1, a distinct 59-kDa dystrophin-associated protein encoded on chromosome 8q23-24. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 4446–4450.
11. Kameya, S., Miyagoe, Y., Nonaka, I., Ikemoto, T., Endo, M., Hanaoka, K. *et al.* (1999). α 1-Syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. *J. Biol. Chem.* **274**, 2193–2200.
12. Adams, M. E., Kramarcy, N., Krall, S. P., Rossi, S. G., Rotundo, R. L., Sealock, R. & Froehner, S. C. (2000). Absence of alpha-syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin. *J. Cell Biol.* **150**, 1385–1397.
13. Ahn, A., Freener, C., Gussoni, E., Yoshida, M., Ozawa, E. & Kunkel, L. (1996). The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J. Biol. Chem.* **271**, 2724–2730.
14. Adams, M., Mueller, H. & Froehner, S. (2001). *In vivo* requirement of the alpha-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4. *J. Cell Biol.* **155**, 113–122.
15. Brenman, J., Chao, D., Xia, H., Aldape, K. & Bredt, D. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, **82**, 743–752.
16. Wells, K., Torelli, S., Lu, Q., Brown, S., Partridge, T., Muntoni, F. & Wells, D. (2003). Relocalization of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) as a marker for complete restoration of the dystrophin associated protein complex in skeletal muscle. *Neuromuscul. Disord.* **13**, 21–33.
17. Ahn, A. H. & Kunkel, L. M. (1995). Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J. Cell Biol.* **128**, 363–371.
18. Suzuki, A., Yoshida, M. & Ozawa, E. (1995). Mammalian alpha 1- and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus. *J. Cell Biol.* **128**, 373–381.
19. Gieseler, K., Abdel-Dayem, M. & Ségalat, L. (1999). *In vitro* interactions of *Caenorhabditis elegans* dystrophin with dystrobrevin and syntrophin. *FEBS Letters*, **461**, 59–62.
20. Grisoni, K., Martin, E., Gieseler, K., Mariol, M. & Ségalat, L. (2002). Genetic evidence for a dystrophin–glycoprotein complex (DGC) in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, **294**, 77–86.
21. Bessou, C., Giuglia, J.-B., Franks, C. J., Holden-Dye, L. & Ségalat, L. (1998). Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission. *Neurogenetics*, **2**, 61–72.
22. Gieseler, K., Mariol, M., Bessou, C., Migaud, M., Franks, C., Holden-Dye, L. & Ségalat, L. (2001). Molecular, genetic, and physiological characterisation of dystrobrevin-like (*dyb-1*) mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* **307**, 107–117.
23. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
24. Gieseler, K., Bessou, C. & Ségalat, L. (1999). Dystrobrevin- and dystrophin-like mutants display similar phenotypes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurogenetics*, **2**, 87–90.
25. Lee, R. Y., Lobel, L., Hengartner, M., Horvitz, H. R. & Avery, L. (1997). Mutations in the alpha1 subunit of an L-type voltage-activated Ca^{2+} channel cause myotonia in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **16**, 6066–6076.
26. Kerr, R., Lev-Ram, V., Baird, G., Vincent, P., Tsieng, R. Y. & Schafer, W. R. (2000). Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron*, **26**, 583–594.
27. Jospin, M., Jacquemond, V., Mariol, M., Segalat, L. & Allard, B. (2002). The L-type voltage-dependent Ca^{2+} channel EGL-19 controls body wall muscle function in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **159**, 337–348.
28. Ardizzi, J. & Epstein, H. (1987). Immunochemical localization of myosin heavy chain isoforms and paramyosin in developmentally and structurally diverse muscle cell types of *C. elegans*. *J. Cell Biol.* **105**, 2763–2772.
29. Gieseler, K., Grisoni, K. & Ségalat, L. (2000). Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **10**, 1092–1097.
30. Mariol, M. C. & Segalat, L. (2001). Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. *Curr. Biol.* **11**, 1691–1694.
31. Newey, S., Benson, M., Ponting, C., Davies, K. & Blake, D. (2000). Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr. Biol.* **10**, 1295–1298.
32. Sadoulet-Puccio, H. M., Rajala, M. & Kunkel, L. M. (1997). Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 12413–12418.
33. Grady, R. M., Grange, R. W., Lau, K. S., Maimone, M. M., Nichol, M. C., Stull, J. T. & Sanes, J. R. (1999). Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nature Cell Biol.* **1**, 215–220.
34. Yang, B., Jung, D., Rafael, J., Chamberlain, J. & Campbell, K. (1995). Identification of alpha-syntrophin binding to syntrophin triplet, dystrophin, and utrophin. *J. Biol. Chem.* **270**, 4975–4978.
35. Castello, A., Brocheriou, V., Chafey, P., Kahn, A. & Gilgenkrantz, H. (1996). Characterization of the dystrophin–syntrophin interaction using the two-hybrid system in yeast. *FEBS Letters*, **383**, 124–128.
36. Grisoni, K., Gieseler, K. & Ségalat, L. (2002). Dystrobrevin requires a dystrophin-binding domain to function in *Caenorhabditis elegans*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1607–1612.
37. Mallouk, N., Jacquemond, V. & Allard, B. (2000). Elevated subsarcolemmal Ca^{2+} in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 4950–4955.
38. Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. (1996). SEAVIEW PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* **12**, 543–548.
39. Barstead, R. (1999). Reverse genetics. In *C. elegans: A Practical Approach* (Hope, I., ed.), pp. 97–118, Oxford University Press, New York.
40. Hosono, R., Hieahara, K., Kuno, S. & Kurihara, T. (1982). Mutants of *C. elegans* with dumpy and

- rounded head phenotypes. *J. Expt. Zool.* **224**, 135–144.
41. Harfe, B. D., Branda, C. S., Krause, M., Stern, M. J. & Fire, A. (1998). *MyoD* and the specification of muscle and non-muscle fates during postembryonic development of the *C. elegans* mesoderm. *Development*, **125**, 2479–2488.
42. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**, 802–805.
43. Mello, C. & Fire, A. (1995). DNA transformation. *Methods Cell Biol.* **48**, 451–482.
44. Ségalat, L., Elkes, D. A. & Kaplan, J. M. (1995). Modulation of serotonin-controlled behaviors by Go in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **267**, 1648–1651. see comments..
45. Waterston, R. H., Hirsh, D. & Lane, T. R. (1984). Dominant mutations affecting muscle structure in *Caenorhabditis elegans* that map near the actin gene cluster. *J. Mol. Biol.* **180**, 473–496.

Edited by J. Karn

(Received 25 April 2003; received in revised form 5 August 2003; accepted 6 August 2003)

Chapitre II - Recherche de gènes suppresseurs de la dégénérescence musculaire chez *Cænorhabditis elegans*

Afin d'essayer d'identifier quels sont les mécanismes qui provoquent la dégénérescence musculaire en absence de dystrophine, nous avons entrepris de rechercher des gènes suppresseurs de la dégénérescence musculaire provoquée par l'absence de DYS-1 chez *C. elegans*. Un gène suppresseur est un gène qui, quand il est muté, supprime ou réduit un phénotype dû à une autre mutation. Nous espérons ainsi identifier des gènes impliqués dans la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*.

Nous avons choisi une approche sans *a priori* en criblant le génome entier. Nous inactivons un à un chaque gène de *C. elegans* par la technique d'ARN interférence (ARNi) chez les vers modèles de dégénérescence musculaire, : les vers *dys-1*; *h1h-1*. Cette technique permet d'inactiver transitoirement l'expression d'un gène donné en élevant les vers sur des bactéries produisant les ARN double brin (ARNdb) spécifiques de ce gène.

Ce projet a été réalisé par plusieurs personnes au sein de notre équipe, sur une période d'environ 18 mois. J'ai supervisé et participé à la réalisation de ce projet.

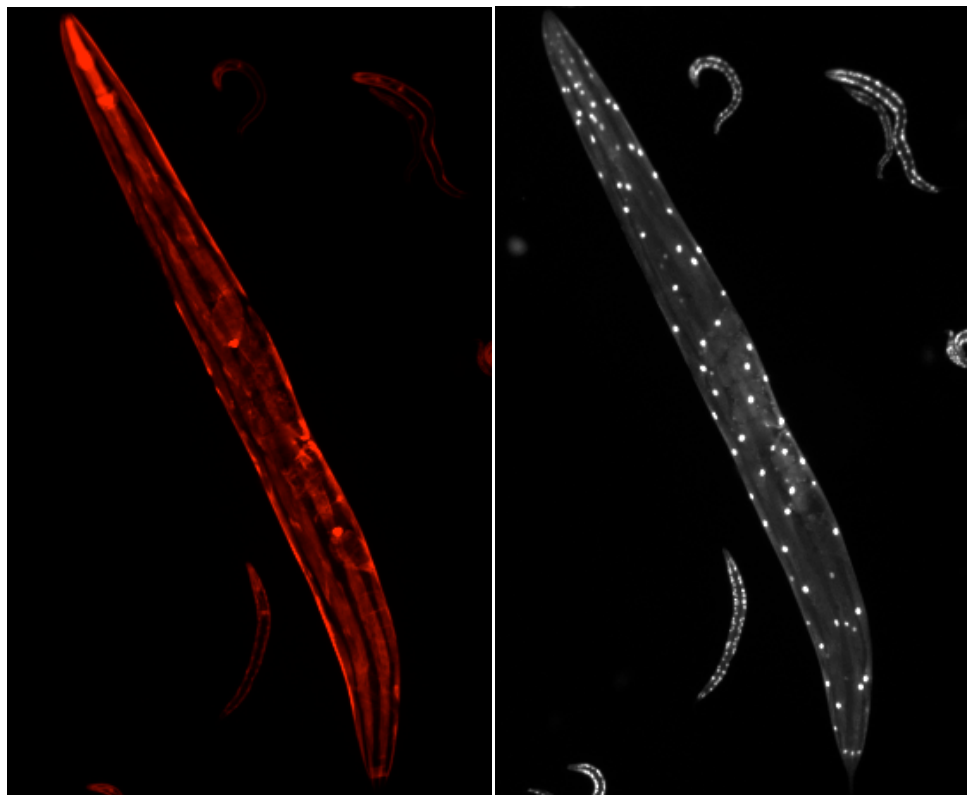
Nous avons testé les 2/3 du génome de *C. elegans* et je présente ici l'analyse partielle des résultats du premier tiers. Je consacre une grande partie de ce chapitre à l'établissement des méthodes d'analyse des données recueillies, car ce point s'est révélé plus ardu qu'il n'y paraissait.

Le but de ce crible est d'aboutir à une liste restreinte de quelques dizaines de gènes suppresseurs de la dégénérescence musculaire des vers *dys-1*; *h1h-1*. Ce nombre limité de gènes nous permettra de les étudier individuellement, afin de déterminer si leur effet est spécifiquement lié à DYS-1. La nature des gènes sélectionnés devrait mettre en lumière les principaux mécanismes mis en jeu dans la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*. Une étude approfondie des voies d'action de ces gènes et de leur degré de conservation au cours de l'évolution, pourrait nous aider à identifier des mécanismes moléculaires impliqués dans la dégénérescence musculaire qui survient dans les myopathies de Duchenne et Becker.

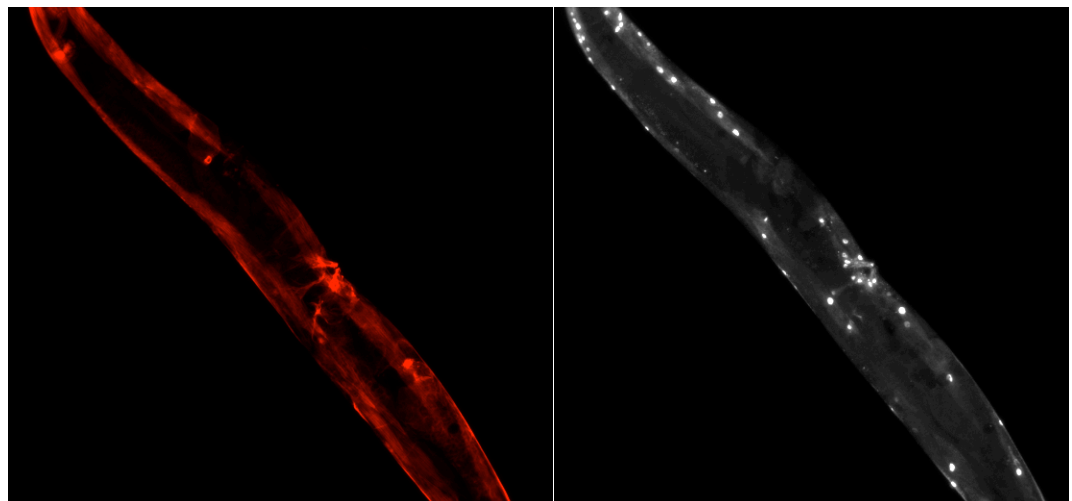
Figure 16 : Photos des cellules musculaires striées et de leurs noyaux chez des vers sains et LS761

Les vers LS761 sont de génotype *dys-1(cx18)* ; *hlh-1(cc561)* ; *myo-3::gfp*. Les vers dits sains ne portent que le transgène *myo-3::gfp*. Le premier marquage, en phalloïdine-rhodamine, permet de visualiser l'actine des cellules musculaires. Le second marquage, la fluorescence *gfp*, permet de visualiser les noyaux des cellules musculaires. On peut voir chez les vers sains deux quadrants musculaires intacts, ainsi que les noyaux des cellules musculaires qui les composent. Chez les vers LS761, de nombreuses cellules musculaires sont absentes et la fluorescence des noyaux correspondants a disparu.

ver sain



ver LS761



A. Matériels et méthodes

Nous recherchons des gènes dont l'inactivation entraîne la suppression, partielle ou totale, de la dégénérescence musculaire. Nous cherchons donc à détecter une amélioration de l'état des vers *dys-1; hhh-1* après traitement par ARNi, tant au niveau de leur mobilité que de l'état de leurs cellules musculaires. Chaque expérience d'ARNi se découpe en trois étapes principales :

- étape 1: élever les vers LS761 sur boîtes de Pétri, sur des bactéries produisant des ARNdb spécifiques du gène à inactiver,
- étape 2 : observer la locomotion des descendants,
- étape 3 : évaluer la dégénérescence musculaire des descendants.

Ce crible étant à l'échelle du génome entier de *C. elegans* (environ 17000 gènes), nous avons cherché à optimiser chaque étape. Ce fut, en grande partie, le travail de Pierre-Emmanuel Imbert, un étudiant de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, qui a réalisé un stage de deux ans (2002-2004) au sein de l'équipe de Laurent Ségalat.

Nous estimons qu'il n'existe que peu de gènes suppresseurs de la dégénérescence musculaire dans le génome de *C. elegans*. Les expériences peuvent donc être témoins les unes des autres au sein de petits groupes, puisque dans la plupart des expériences la dégénérescence ne sera pas modifiée.

A.1 Evaluation de l'état musculaire : la souche LS761

L'observation des muscles peut être réalisée au microscope après une coloration des vers à la phalloïdine-rhodamine qui révèle les filaments d'actine des cellules. Par cette technique habituelle, le projet entier aurait nécessité 17300 colorations et observations au microscope, soit environ 1000 heures d'observation au microscope. Ce n'était pas envisageable, nous avons donc trouvé une alternative : nous utilisons une souche de vers transgéniques, portant non seulement les deux mutations *dys-1(cx18)* et *hhh-1(cc561ts)*, dont l'association provoque la dégénérescence musculaire, mais aussi un transgène intégré dans le génome, qui comporte la séquence de la *gfp* (*green fluorescent protein*) nucléaire sous contrôle du promoteur du gène *myo-3*, qui code la myosine musculaire. Cette souche, nommée LS761, a été construite par P-E Imbert. Les vers LS761 expriment la GFP dans les noyaux et les mitochondries des cellules musculaires longitudinales et de la vulve de *C. elegans*. Leurs cellules musculaires longitudinales dégèrent de façon similaire à celles des doubles mutants *dys-1; hhh-1*. La figure 16 montre un ver portant seulement le transgène *gfp*, présentant des noyaux fluorescents sur toute sa longueur, il est dit sain, et un ver LS761, chez lequel beaucoup de cellules musculaires/noyaux ont disparu, ces vers ont subi une forte dégénérescence musculaire.

Grâce à cette souche, on peut observer l'état de la musculature de vers vivants ou fixés sans coloration supplémentaire. Cette souche nous a permis d'utiliser le robot BIOSORT (union Biometrica), qui est décrit plus loin. L'intérêt de cette machine est qu'elle permet d'obtenir des données quantifiables pour évaluer le niveau de dégénérescence.

A.2 ARN interférence (ARNi)

Ce phénomène consiste en la répression post-transcriptionnelle de l'expression d'un gène suite à l'entrée dans la cellule d'un ARN double brin de séquence homologue à une partie codante de ce gène. Les ARN double brins sont reconnus et coupés en petits ARN double brins, appelés siRNA (pour *small interfering RNA*). Ces siRNA s'hybrident à l'ARN messager (ARNm) du gène de séquence correspondante, l'ARNm est alors clivé à l'endroit de l'hybridation, par des endonucléases. L'ARNm est ensuite entièrement dégradé, l'expression du gène est ainsi réprimée (pour revue, voir (Grishok, 2005)). Il est important pour l'analyse des résultats de noter que le phénomène d'ARNi est connu chez *C. elegans* pour être moins efficace sur les gènes à expression neuronale (Tavernarakis et al., 2000).

Il existe plusieurs moyens de mise en œuvre de l'ARN interférence chez *C. elegans* :

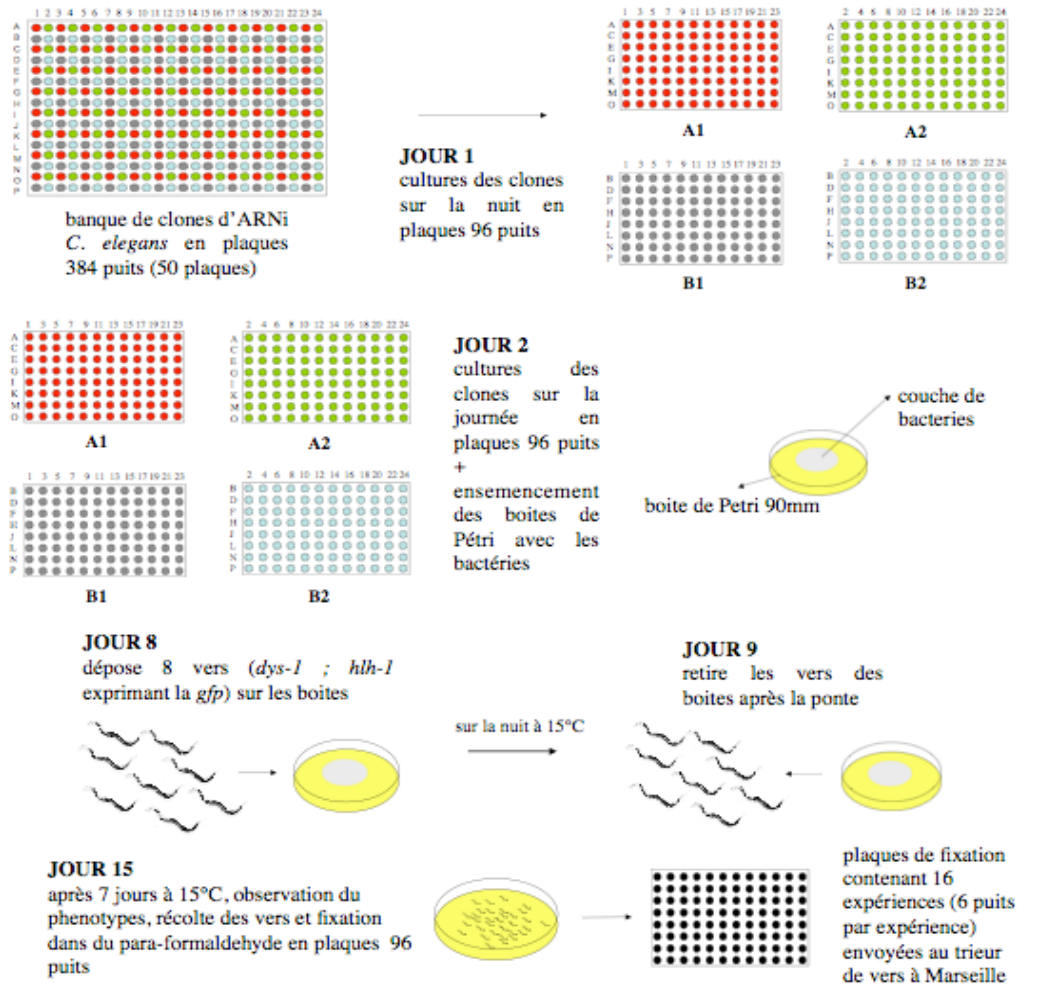
- injection d'une solution concentrée d'ARN double brin dans un oviducte d'adulte (Fire et al., 1998).
- Immersion des vers dans une solution concentrée d'ARN double brin pendant 24 heures (Tabara et al., 1998).
- Injection d'un transgène permettant l'expression in vivo d'ARN double brin (Tavernarakis et al., 2000).
- En nourrissant les vers avec des bactéries produisant des ARN double brin (Timmons and Fire, 1998).

Cette dernière technique permet de traiter beaucoup de vers à la fois et de ne les traiter que pendant un temps déterminé. Une séquence spécifique du gène cible est insérée dans le plasmide L4440. Ce plasmide permet l'expression d'un ARN double brin, la séquence étant insérée entre deux promoteurs antisens dépendants de la T7 polymérase (Timmons and Fire, 1998). Les bactéries transformées par ces vecteurs produisent les ARN double brin. Les vers mangent les bactéries, ils les broient dans leur pharynx et ingèrent le contenu et les débris. Par un mécanisme encore mal connu, les ARN double brin se répandent dans les cellules des vers en y induisant la répression spécifique du gène ciblé.

Figure 17 : Schéma du protocole d'ARNi sur les vers LS761

Les bactéries produisant les ARNdb sont en plaques de 384 puits. Dans la première étape, nous séparons cette plaque en 4 plaques de 96 puits de 2mL afin de permettre aux bactéries de croître sur une nuit jusqu'à saturation. Le matin, nous relançons une culture sur la journée, de sorte que nous ensemençons ces bactéries sur des boîtes de Pétri lorsque les cultures sont en phase exponentielle. Nous laissons les bactéries croître sur les boîtes de Pétri pendant 5 jours, puis nous déposons 8 vers LS761 pour qu'ils pondent sur une nuit (JOUR 8). Le lendemain, nous retirons les vers (JOUR 9) et nous laissons les descendants se développer 7 jours à 15°C. Au jour 15, nous observons la locomotion des descendants, puis nous récoltons les vers, les fixons pendant 1h30 dans du paraformaldéhyde (1,4% final) et les répartissons dans des plaques (plaques d'analyse), qui seront envoyées au CIML à Marseille afin de mesurer la fluorescence des vers et d'ainsi estimer leur dégénérescence musculaire.

ETAPE 1
(jour 1 à 14) :
préparation des boîtes ARNi et traitement des vers LS761 par ARNi sur une génération



ETAPE 2 et 3 (jour 15) :
observation des descendants sous la loupe binoculaire
récolte des vers et préparation en vue de la mesure de fluorescence
qui nous permettra d'estimer la dégénérescence musculaire

L'utilisation de cette technique est rendue encore plus aisée depuis que le laboratoire de Julie Ahringer a inséré une séquence de la plupart des gènes prédits de *C. elegans* (87%) dans des plasmides L4440, transformés ensuite dans des bactéries HT115 (DE3). Cette souche de bactéries est incapable de détruire les ARN double brin, le gène de la RNaseIII ayant été inactivé par l'insertion d'un transposon comportant le gène de résistance à la tétracycline. Elles possèdent, en outre, le gène de la T7 polymérase, dont l'expression est inductible par l'IPTG. Ainsi l'application d'IPTG sur ces bactéries induit l'expression de la T7 polymérase, qui induit la transcription des ARNdb. On peut acquérir cette banque de clones bactériens auprès de la société Geneservice (Cambridge, Royaume-Uni). Elle se présente sous la forme de 50 plaques de 384 puits, où chaque puits contient un clone bactérien spécifique d'un gène.

A.3 Protocole

Etant donné le nombre de gènes testés, l'importance d'identifier correctement chaque expérience pour pouvoir rapprocher cette expérience du nom du gène inactivé, et le fait que plusieurs personnes ont participé à ce projet, nous avons mis en place un protocole d'expérimentation standardisé. Ce protocole est représenté sous la forme d'un schéma dans la figure 17.

ETAPE 1 : production des vers LS761 traités par ARNi

JOUR 1 : préparation de boîtes de Pétri (90mm de diamètre) de NGM contenant de la carbénicilline (25µg/mL final) et de l'IPTG (1mM final).

La carbénicilline est un analogue de l'ampicilline qui sert à sélectionner les bactéries comportant le vecteur L4440, porteur du gène de résistance à l'ampicilline. On l'utilise à la place de l'ampicilline dans les boîtes car elle est plus stable. L'IPTG est l'agent inducteur de l'expression de la T7 polymérase qui permet l'expression des ARN double brin.

JOUR 1: préculture des clones bactériens d'une plaque de la banque (384 clones). Les clones sont répartis dans 4 plaques 96-puits, à l'aide d'un répliqueur 96-pics, dans 1,25mL de Luria-Bertani broth additionné de tétracycline (12,5µg/mL final), ampicilline (100µg/mL final) (LBAT).

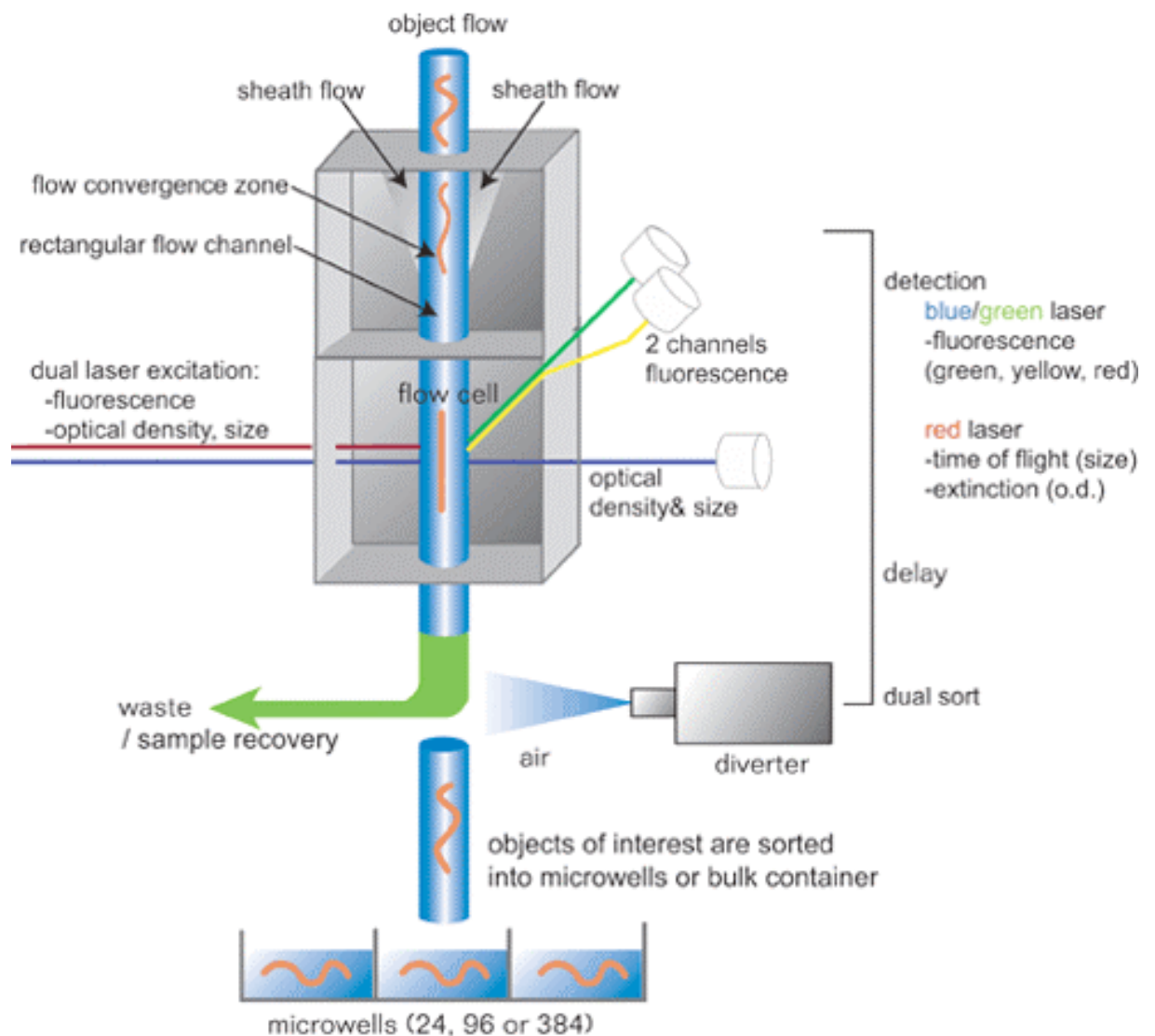
Seules les bactéries HT115 (DE3) comportant un plasmide L4440 peuvent pousser dans un milieu comprenant de l'ampicilline et de la tétracycline.

JOUR 2 : culture sur la journée (minimum 6 heures) des clones bactériens à partir des précultures de la nuit, 300µL de préculture dans 1,25mL de LBA. Ceci afin que les bactéries soient en phase de croissance exponentielle lors de leur dépôt sur boîte. On utilise du LBA car Kamath et coll. ont constaté que la tétracycline réduit l'efficacité de

Figure 18 : Trieur de vers BIOSORT de Union Biometrica

Les vers (traits rouges) passent, un à un, devant une installation de mesure de densité optique et de fluorescence. Les mesures effectuées sont enregistrées par un ordinateur couplé à cette installation (non représenté). Les vers peuvent ensuite être distribués dans des plaques de 24, 96 ou 384 puits d’après les mesures du spectro-fluoromètre.

Image tirée de <http://www.unionbio.com/products/copas2.html>.



l'interférence ARN lorsqu'il est présent dans la phase de nourrissage (Kamath et al., 2001).

Le soir, ensemencement des boîtes de Pétri préalablement préparées (jour 1). On attend ensuite 5 jours afin que les bactéries forment une pellicule épaisse, suffisante pour alimenter les vers pendant plusieurs jours. En outre il faut que les bactéries ne soient plus sous forme liquide car les muscles des vers LS761 dégénèrent plus sur un milieu semi-solide, qu'en liquide.

JOUR 8 : dépôt de vers LS761 (8 vers par boîte), ponte sur la nuit à 15°C.

JOUR 9 : retrait des vers LS761, vérification de la ponte, culture pendant 7 jours à 15°C.

ETAPE 2 : observation de la locomotion des vers LS761 ayant subi l'ARNi

JOUR 15 : observation du phénotype sous loupe binoculaire, élimination des vers présentant un retard de croissance patent ou une létalité embryonnaire ou larvaire, ou encore ceux qui sont stériles car cela interfère avec la dégénérescence musculaire.

ETAPE 3 : récupération des vers et mesure de la dégénérescence musculaire

JOUR 15 : Récupération des vers dans 1,5mL de PBS Waterstone 1X et fixation par addition de 60µL de formaldéhyde 37% (1,4% final), pendant 1h30. Puis rinçages avec du PBS Waterstone 1X.

Les vers sont ensuite répartis dans des plaques 96 puits, qui sont nommées par la suite plaques d'analyse. Une plaque d'analyse contient 16 expériences, 6 puits par expérience, 2 contenant les vers et les 4 suivants contenant un liquide de rinçage pour la tuyauterie du trieur de ver.

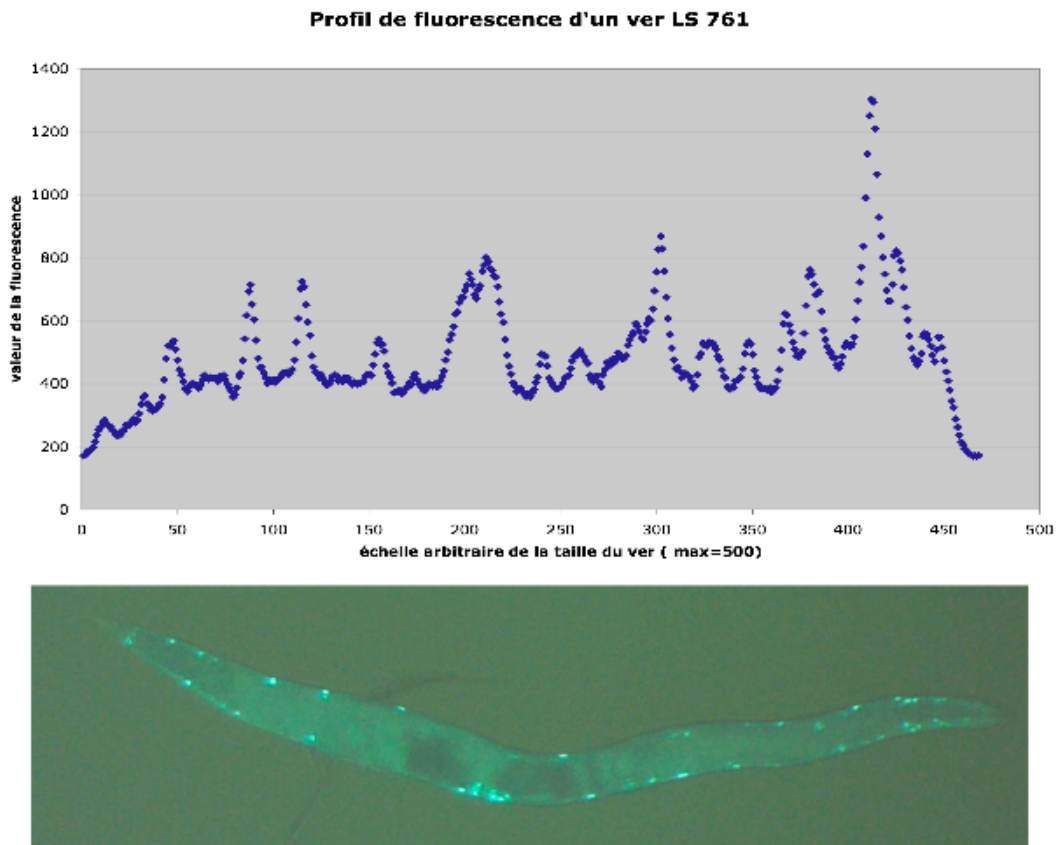
Ce protocole produit en moyenne 100 vers observables pour chaque clone bactérien testé, c'est-à-dire pour chaque gène inactivé.

A.4 Mesure de la fluorescence

Les vers fixés sont envoyés au Centre d'Immunologie Moléculaire de Luminy (CIML) dans l'équipe de Jonathan Ewbank. Cette équipe possède une machine appelée BIOSORT (figure 18), qui est capable de trier les organismes de petites tailles tels que les levures ou les nématodes. Le principe est le même qu'un trieur de cellules. Les vers sont aspirés dans un milieu liquide, ils passent un à un dans un capillaire devant un spectrofluoromètre qui enregistre la fluorescence et la densité optique tout le long du ver. Les vers sont donc traduits en une séquence de 500 mesures de fluorescence au maximum (figure 19). Cette séquence de mesures de fluorescence est ce que nous appelons ci-après un profil de fluorescence.

Figure 19 : Profil de fluorescence d'un ver LS761

Correspondance entre l'apparence d'un ver LS761 en fluorescence GFP et le profil que le BIOSORT enregistre. On peut voir qu'il existe une fluorescence de base (ici d'environ 200). Chaque noyau n'est pas représenté par un pic défini, et parfois deux noyaux peuvent être fondus dans un seul pic. La vulve est marquée par un pic plus large représentant plusieurs noyaux fluorescents proches les uns des autres. Ce pic peut être plus large si le ver retient beaucoup d'œufs dans l'utérus.



Il est important de noter que seules leurs 500 premières valeurs de fluorescence sont enregistrées. Ainsi pour les vers les plus grands, les données sont légèrement tronquées. Grâce à la mesure de la densité optique, nous avons une bonne estimation de la taille des vers. Cette mesure nous permet d'éliminer les vers plus jeunes (et donc plus courts), présentant moins de dégénérescence et qui pourraient biaiser l'analyse. Le BIOSORT enregistre la séquence des mesures de fluorescence et de densité optique de chaque ver et stocke ces données dans des fichiers qui nous sont renvoyés. L'analyse de ces fichiers est détaillée dans les résultats.

A.5 Confirmation des clones positifs

Tous les clones donnant une amélioration significative de la dégénérescence musculaire ont été retestés. Les vers sont élevés et fixés comme précédemment décrit, puis ils sont colorés en phalloïdine-rhodamine (0,5%). Ce marquage permet de visualiser les stries d'actine musculaire. Nous observons les vers au microscope à fluorescence, et l'on quantifie la dégénérescence musculaire d'au moins 20 vers en comptant le nombre de cellules musculaires absentes ou abîmées. Ces retests sont réalisés trois fois pour chaque clone, de manière indépendante. Les lames sont examinées par deux personnes à chaque test.

B. Résultats

B.1 Rendement du protocole d'ARNi à grand échelle

Les résultats que je présente portent sur les gènes des trois premiers chromosomes, moins les 800 premiers gènes du chromosome I qui avaient été testés en coloration phalloïdine-rhodamine par Pierre Emmanuel Imbert lors de son stage de fin d'étude. Ceci représente environ 6400 gènes. Nous n'obtenons pas systématiquement des données de fluorescence pour chaque gène testé, cela pour différentes raisons : les puits de la banque qui sont vides, les clones bactériens qui ne poussent pas, les vers ayant un phénotype incompatible avec l'évaluation de la dégénérescence ou de la locomotion. Ces considérations, plus le fait que nous testons un grand nombre de gènes par semaine (384 gènes par semaine), et le fait que nous sommes plusieurs personnes à réaliser les expériences, nous ont poussé à quantifier le rendement de nos expériences.

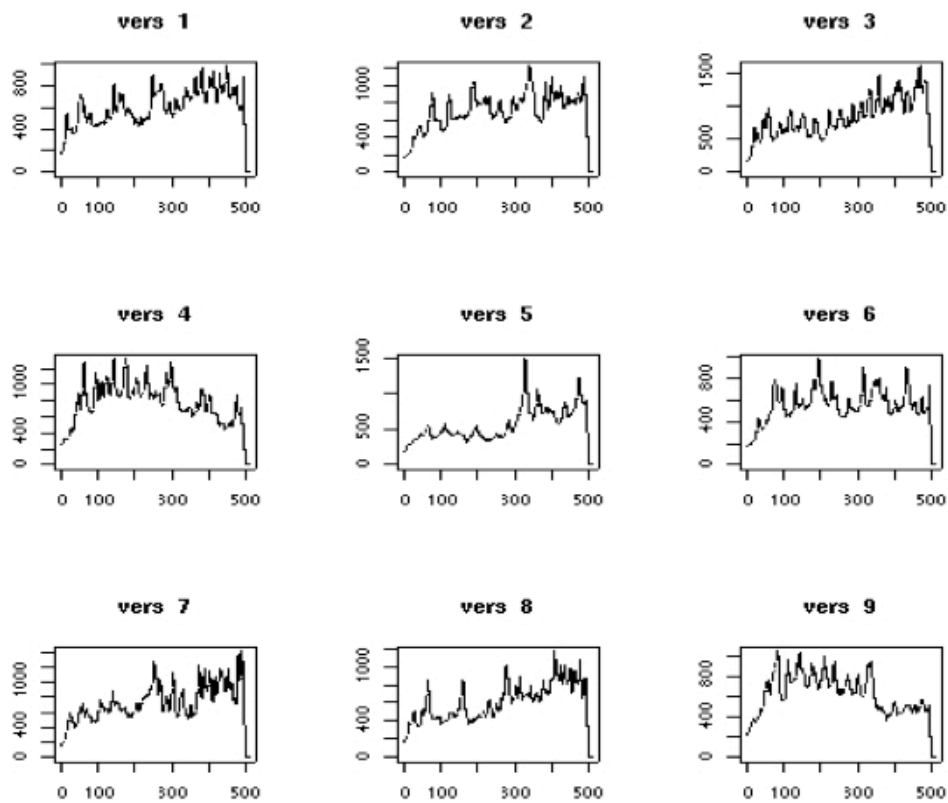
Sur les 6400 test réalisés, environ 6% des clones bactériens n'ont pas poussé lors des pré-cultures et cultures, ce qui représente environ 380 clones. Ces clones seront retestés plus tard.

Après ensemencement des boîtes d'ARNi, dépôt et culture des vers sur ces boîtes, environ 5% des gènes ont provoqué un phénotype tel que nous ne fixons pas les vers. Ces phénotypes sont de trois sortes : létalité embryonnaire ou larvaire, retard de croissance, stérilité. Cela représente environ 350 gènes. Nous sommes particulièrement attentifs aux retard de croissance car la dégénérescence musculaire est dépendante du temps, il est donc important d'observer des vers de même âge biologique. Au bout de sept jours, les vers sont adultes et leur descendance est au stade larves L1 à L2. Le repère d'âge biologique à partir duquel nous fixons les vers est lorsqu'ils ont pondu des œufs. La stérilité aussi est un biais car nous observons la dégénérescence des muscles longitudinaux qui sont plus sollicités lorsque le ver commence à accumuler des œufs dans son ventre. Ce pourcentage de gènes donnant un phénotype est bas comparé à ceux d'autres études qui sont entre 10 et 23% (pour revue, voir (Sugimoto, 2004)). Cette différence peut s'expliquer par le fait que nous ne relevons pas les phénotypes qui n'interfèrent pas avec la dégénérescence.

Au final, nous avons récupéré des données de fluorescence pour 5661 gènes, sur les 6400 que nous avons testés, ce qui représente 88,5% de rendement pour notre protocole expérimental.

Figure 20 : Hétérogénéité des profils de fluorescence des vers LS761

Profils obtenus sur 9 vers pris au hasard dans une expérience contrôlée. On constate que les profils de fluorescence des 9 vers sont très variés. Cela peut s'expliquer par la répartition différente des noyaux absents, si les noyaux se trouvent ou non dans la même tranche de mesure de la fluorescence, si les vers ont beaucoup ou peu de petits dans le ventre, s'ils passent la tête ou la queue en premier.



B.2 Méthodes d'analyse des résultats

L'analyse des profils de fluorescence a demandé une longue mise au point car elle s'est révélée plus difficile que prévu. Dans un premier temps, nous pensions qu'il serait facile d'extraire de chaque profil le nombre de pics, valeur très corrélée au nombre de noyaux de cellules musculaires. Un profil avec peu de pics correspondrait aux témoins LS761 et un profil avec beaucoup de pics seraient celui d'un ver ayant subi peu de dégénérescence musculaire : le gène inactivé par ARNi chez ce ver serait donc un suppresseur. Il s'avère que l'observation seule des profils ne nous permet de déterminer si un ver subit peu ou beaucoup de dégénérescence car en premier lieu, nous n'arrivons pas à établir de profil type, reconnaissable d'un seul coup d'œil, de vers subissant une forte dégénérescence tels que les LS761. On observe une grande hétérogénéité des profils de vers LS761 (figure 20), qui présentent pourtant tous un même niveau de dégénérescence (contrôlé au microscope). Les profils de fluorescence peuvent varier pour plusieurs raisons:

- selon l'orientation du ver, plusieurs noyaux peuvent se trouver dans la même tranche de mesure de fluorescence,
- selon l'emplacement des cellules absentes on peut observer des différences de profil,
- pour certains vers plus grands que les 500 mesures, on ne dispose que d'un profil tronqué,
- on ne sait pas dans quel sens les vers passent devant le fluoromètre (tête devant, queue devant), et cela a une importance quand on a un profil tronqué car les vers ne sont pas symétriques,
- les vers LS761, comme les vers *dys-1*; *hlh-1*, retiennent plus ou moins de petits dans leur utérus, ce qui provoque un plus ou moins fort pic de fluorescence, ce qui perturbe le signal des noyaux des cellules musculaires environnantes.

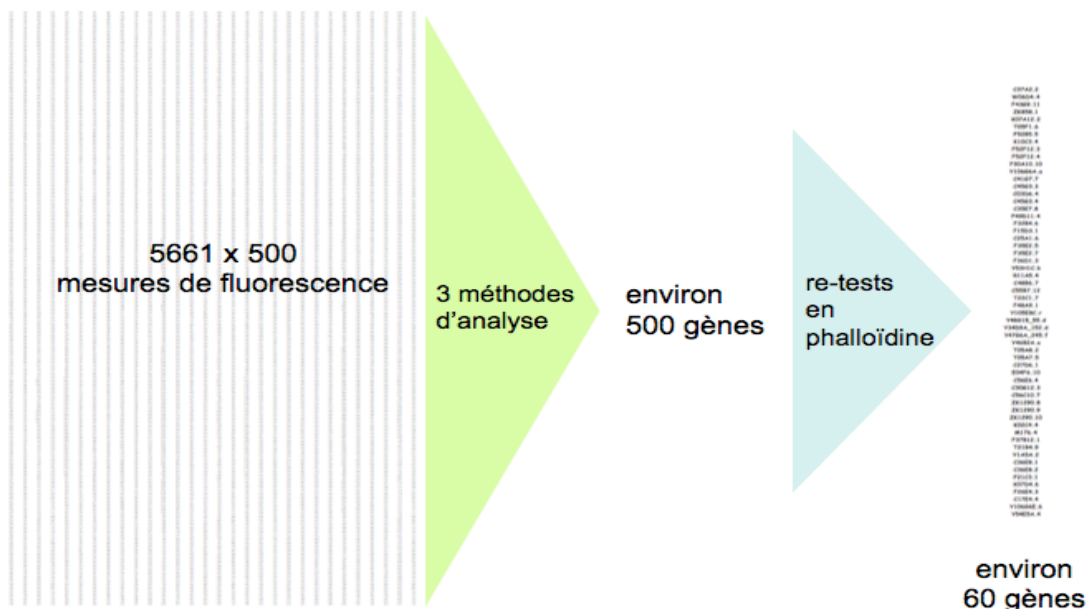
En étudiant de plus près un jeu de données témoins, contenant des profils de vers LS761 et des profils de vers *dys-1*; *hlh-1* sur ARNi *egl-19*, dont Mariol et Ségalat ont montré qu'ils subissent moins de dégénérescence (Mariol and Segalat, 2001), nous avons mis en évidence des paramètres discriminants. Nous avons réalisé nous-même une analyse, basée sur ces paramètres définis de manière empirique. De plus, nous avons développé deux collaborations avec des mathématiciens afin d'aborder ce problème sous un angle un peu moins empirique. Les méthodes d'analyse sont présentées ci-après.

Le but de ce premier niveau d'analyse est de passer de 5661 gènes à quelques centaines, qui sont retestés individuellement en phalloïdine. Après observation au

microscope à fluorescence, nous ne retenons que les gènes dont l'inactivation par ARNi réduit le phénotype de dégénérescence musculaire. Ainsi, par éliminations successives, nous avons abouti à une liste finale d'environ 60 gènes (figure 21).

Figure 21 : Stratégie de sélection des gènes suppresseurs

- On sélectionne les gènes ayant un effet sur la dégénérescence musculaire en deux étapes :
- les trois méthodes d'analyses ont identifié environ 500 gènes dont l'inactivation est bénéfique à la dégénérescence musculaire des vers LS761, parmi les 6400 expériences réalisées ;
 - parmi ces 500 gènes, environ 60 ont réellement un effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire après observation au microscope.



B.2.1 Analyse réalisée au laboratoire

Cette analyse consiste à rechercher des paramètres pertinents, permettant de discriminer les expériences où la dégénérescence musculaire des vers est atténuée par rapport à la grande majorité de celles où ce n'est pas le cas. Nous avons sélectionné les paramètres pertinents après les avoir testés sur notre jeu de données témoins. Cette analyse a été réalisée avec l'aide de deux bio informaticiennes du Pôle Rhône-Alpes de BioInformatique (PRABI) : Aurélie Laugraud et Claudette Ah-Soon.

Tri des vers

Un premier tri est effectué sur la longueur du ver pour éliminer les larves. Nous avons déterminé que les adultes sont les vers de plus de 350 mesures. Puis, nous trions les vers susceptibles de présenter beaucoup de petits dans le ventre, car cela provoque de la dégénérescence musculaire, ce qui pourrait fausser nos analyses. Ces vers sont reconnaissables car ils présentent un pic de fluorescence élargi au niveau du ventre. On peut les éliminer de façon satisfaisante en écartant tous les vers qui présentent plus de 100 mesures consécutives supérieures à la moyenne de fluorescence + 35% (valeur déterminée de façon empirique).

Paramètres pris en compte

Nous avons considéré plusieurs mesures. Tout d'abord nous parlerons beaucoup de pics de fluorescence mais la définition d'un pic n'est pas universelle. Selon la définition que l'on donne d'un pic, il en existe plus ou moins dans un profil de fluorescence. Les pics 2 sont définis par, au minimum 2 mesures consécutives de fluorescence augmentant suivies de 2 mesures qui baissent. Pic 5 : au moins 5 mesures consécutives qui augmentent suivies de 5 mesures qui baissent. Les nombres de pics 2 et 5 ont été calculés pour chaque ver ainsi que leurs moyennes pour chaque expérience.

Une autre façon de voir un pic est de considérer qu'il y a pic dès que les mesures augmentent puis baissent, on peut le mesurer en évaluant combien de fois la courbe de fluorescence change de direction (monte ou descend). En mathématiques, c'est quand la dérivée change de sens.

Pour ces trois critères, nous avons observé que les profils témoins de vers subissant peu de dégénérescence ressortent toujours du lot de façon spécifique et significative: ils présentent plus de pics 5 et moins de pics 2 et leurs courbes de fluorescence présentent moins de changements de dérivée. Il semble donc que ces paramètres soient indicatifs d'une dégénérescence réduite.

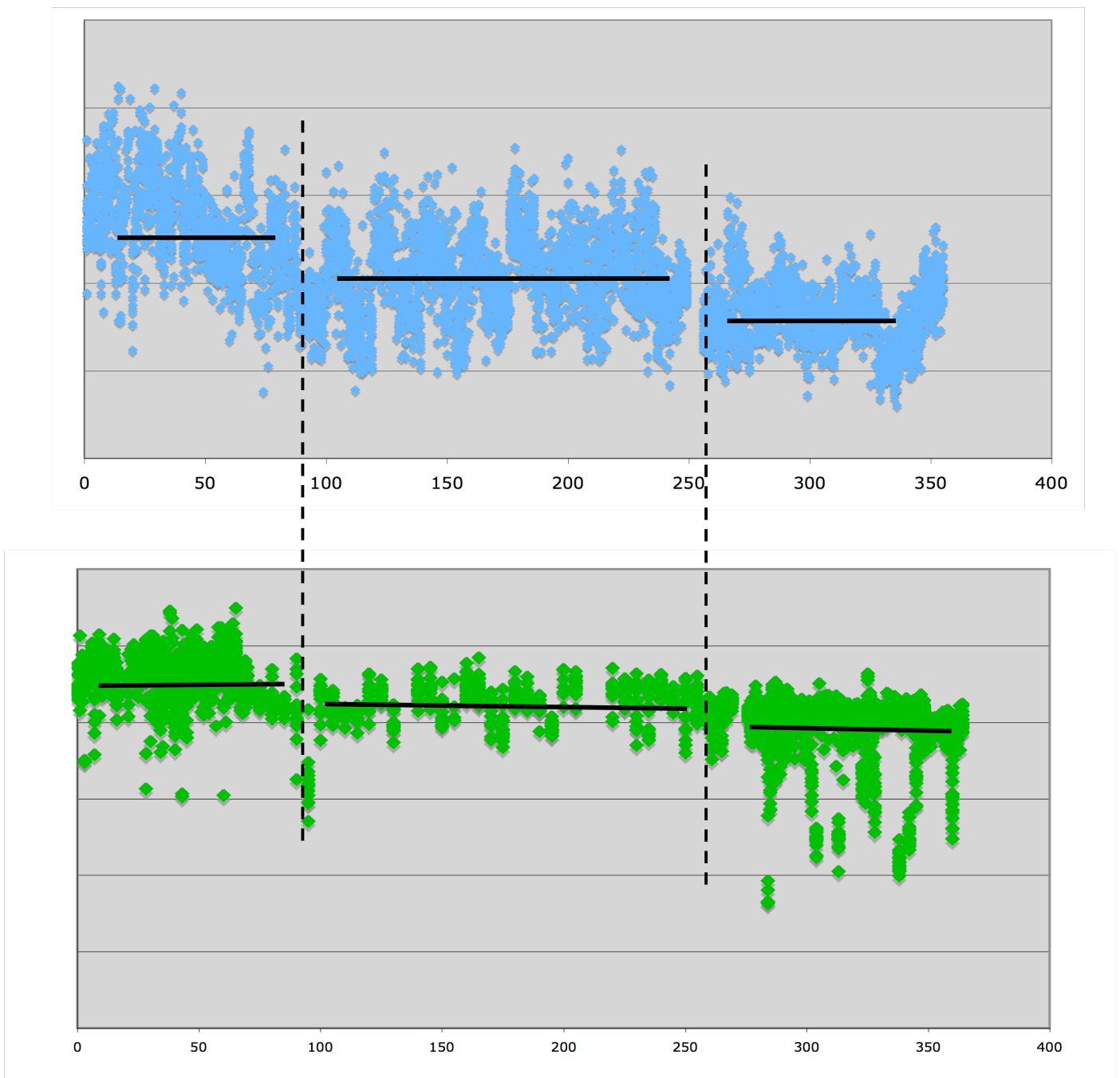
Calcul d'un score

Nous avons créé un score sur la base de ces trois paramètres. Pour chaque expérience, les paramètres ont été normalisés sur une échelle de 0 à 1, puis nous les avons additionnés pour obtenir un score global. Les scores s'échelonnent de 0,3 à 2,13 pour notre meilleur suppresseur.

Initialement, nous pensions sélectionner les 100 meilleurs scores. Cependant, lorsque nous avons tracé le graphe des scores en fonction du numéro de plaque d'analyse, qui correspond à l'ordre chronologique dans lequel les vers ont été analysés par le BIOSORT, deux problèmes se sont posés à nous.

Figure 22 : Variation des scores au cours du temps

Les deux graphes représentent l'évolution des scores des expériences au cours du temps. L'échelle de temps est représentée par les numéros de plaque d'analyse : la plaque 1 et la plaque 360 ont été fixées et analysées à un intervalle d'environ 12 mois. Sur le graphe du haut (en bleu), sont représentés les scores calculés selon notre analyse. Sur le graphe du bas, (en vert) on peut voir les scores calculés selon l'analyse réalisée par Bernard Delyon, de façon indépendante. Les deux analyses montrent deux baisses brutales des scores au cours du temps. On peut supposer que des variations expérimentales sont à l'origine de ces baisses.



Premièrement, on observe que les scores ont tendance à baisser au cours du temps, et cela en trois paliers distincts (voir figure 22). Des variations dans les conditions de réalisation des expériences, qui se sont étalées sur plusieurs mois, ont pu survenir. On peut aussi imaginer que les réglages d'acquisition des données ont pu être modifiés ou que l'intensité du laser a pu baisser. Deuxièmement, superposé à cette tendance globale, nous avons constaté que certaines plaques d'analyse (chacune contenant 16 expériences réalisées et analysées en même temps) ont des scores singulièrement hauts ou bas, ce qui ne peut s'expliquer que par des variations non contrôlées des conditions expérimentales ou d'analyse. Nous avons donc choisi de sélectionner non les 100 meilleurs sur l'ensemble, mais les meilleurs scores à l'intérieur de chaque palier, et de corriger manuellement les plaques ayant des scores anormalement hauts ou bas. Nous avons ainsi constitué une liste de 358 gènes à re-tester en marquage phalloïdine-rhodamine.

B.2.2 Analyse statistique des résultats par mesure des oscillations

Indépendamment de notre analyse, Bernard Delyon (de l'Institut de Recherche Mathématique de Rennes, UMR 6625, Université Rennes I) a effectué une analyse basée sur les oscillations du signal de fluorescence (le fait que la fluorescence ne cesse d'augmenter puis de baisser). Son analyse prend en compte plusieurs paramètres des oscillations comme leur nombre, leur amplitude, leur fréquence. Il a déterminé une combinaison linéaire de ces paramètres telle que les expériences témoins aient toutes un bon score et que les autres aient un score moins bon. Exactement de la même façon que dans notre analyse, on peut observer une baisse par paliers des scores des plaques d'analyse (figure 22). Nous avons choisi les gènes ayant les meilleurs scores dans cette analyse, au sein de chaque palier. Nous avons abouti à une liste de 180 gènes que nous avons retestés individuellement en marquage phalloïdine-rhodamine.

B.2.3 Modélisation mathématique linéaire

Nous avons développé une autre collaboration avec Julien Michel (de l'Unité de Mathématiques Pures et Appliquées-UMR 5559-ENS Lyon) et Katy Paroux (du Laboratoire de Mathématiques de Besançon-UMR 6623-UFR Sciences et Techniques), qui ont créé un modèle mathématique pour analyser les données que nous avons obtenues. Ce modèle utilise un principe différent des deux précédentes méthodes. Il est basé sur la représentation d'un ver comme une droite de longueur variable L . Sur cette droite survient un ensemble d'évènements ponctuels, les noyaux fluorescents. Une équation complexe décrit le nombre (invariant) et la position (aléatoire) des noyaux (pics) dans un ver de longueur L (aléatoire). Pour chaque ver analysé, sont calculés les

paramètres permettant de faire « coller » le ver à l'équation. D'après ces paramètres, on calcule une probabilité pour que le ver considéré (une suite de données de fluorescence) ressemble plus à un ver sain, qu'à un ver LS761.

Les plaques d'analyse contiennent 16 expériences différentes (voir figure 17) qui sont toujours traitées en même temps par le BIOSORT. Nous considérons qu'il est très peu probable qu'il existe deux gènes suppresseurs au sein d'un même lot de 16 expériences. Nous utilisons donc les expériences d'une même plaque comme témoin les unes des autres. Nous avons choisi les 100 meilleurs gènes définis par ce modèle, que nous avons retestés en marquage phalloïdine-rhodamine.

B.2.4 Recoupement des résultats

Comme schématisé sur la figure 23, parmi les 358 clones issus de notre méthode d'analyse, 93 sont retrouvés dans les gènes isolés par la méthode mathématique d'oscillations de Bernard Delyon, et seulement 17 avec la méthode de modélisation linéaire de Julien Michel et Katy Paroux. Huit gènes sont communs aux deux méthodes mathématiques. Notre méthode d'analyse et celle de Bernard Delyon sont basées sur les paramètres discriminants que l'on peut tirer de l'observation des profils de fluorescence. Au contraire, la méthode de Julien Michel et Katy Paroux essaie de faire « coller » les profils de fluorescence au modèle mathématique théorique d'un ver. Le fait que notre méthode et celle de Bernard Delyon se recoupent plus que chacune avec la méthode de modélisation linéaire de J. Michel et K. Paroux n'est donc pas surprenant.

Six gènes sont communs aux trois listes.

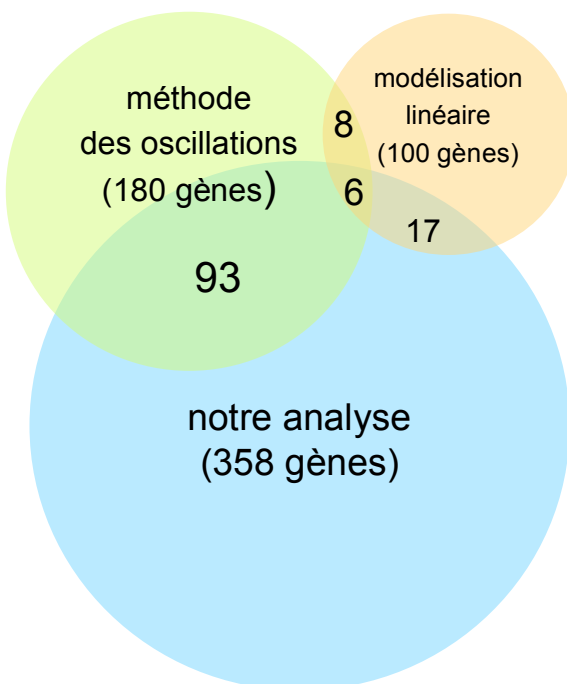


Figure 23 : Représentation graphique du recoupement des méthodes d'analyse

La moitié des gènes trouvés par la méthode des oscillations se retrouvent dans les gènes que nous avons trouvés par notre analyse. Seulement 17 gènes sont communs à notre méthode d'analyse et à celle de modélisation linéaire. 8 gènes sont communs aux deux méthodes mathématiques et 6 gènes sont communs aux trois méthodes d'analyse.

B.2.5 Conclusion

Cette première étape d'analyse des profils de fluorescence ne nous donne pas une réponse définitive. Les différentes méthodes d'analyse ont pour but de produire une liste de quelques centaines de gènes, enrichie en gènes ayant un effet sur la dégénérescence musculaire. Le critère final de sélection des gènes suppresseurs est l'observation de la dégénérescence musculaire au microscope, dans trois expériences indépendantes.

Nous avons retesté les quelques 500 gènes issus des trois méthodes d'analyse. Les résultats préliminaires de ces retests sont présentés ci-après.

Tableau 3, page 1 : Liste des 60 gènes dont l'inactivation réduit la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*.

Ce tableau récapitule les gènes dont l'inactivation réduit la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*. Ils sont classés dans différentes catégories selon leur fonction supposée. Les informations relatives à ces gènes proviennent de Wormbase (<http://www.wormbase.org/>). Les informations en gras correspondent à des informations d'études menées chez *C. elegans*, les autres informations sont tirées de la comparaison des séquences protéiques avec d'autres organismes (BLASTP). La dernière colonne indique par quelles méthodes d'analyse ces gènes ont été choisis.

Nom cosmique/ Nom de gène	Informations provenant de Wormbase	Méthode d'analyse
MUSCLE		
T22C1.7 ou <i>jph-1</i>	junctophiline	B. Delyon + J. Michel/K. Paroux
F09F7.2 ou <i>mlc-3</i>	probable myosin light chain, homologous of the one of humans of skeletal muscles (91%)	J. Michel/K. Paroux
PROTEASOME		
F30A10.10	probable ubiquitin specific protease	B. Delyon + notre analyse
REGULATION APOPTOSE		
Y56A3A.32 ou <i>wah-1</i>	homologous of programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)	B. Delyon
T05F1.6 ou <i>hsr-9</i>	impliqué dans contrôle du cycle cellulaire en réponse à des dommages ADN	notre analyse
C04F12.3 ou <i>ikb-1</i>	BCL-3 homologue	notre analyse
F52B5.5 ou <i>cep-1</i>	homologous of human tumor suppressor p53, promotes DNA-induced apoptosis	notre analyse
F43G9.11 ou <i>ces-1</i>	C2H2-type Zn finger transcription factor, member of the Snail family, gain of function represses programmed cell death	B. Delyon + notre analyse
CANAUX IONIQUES		
F21C3.1 ou <i>twk-1</i>	probable potassium channel	notre analyse
Y1A5A.2	probable potassium/sodium hyperpolarization activated nucleotide gated channel	notre analyse
PROTEINES TRANSMEMBRANAIRES ET RCPG		
Y34D9A_152.d	probable G-protein coupled receptor	RECOUPEMENT ENTRE LES 3 ANALYSES
F36D1.3 ou <i>sru-47</i>	probable G-protein coupled receptor	B. Delyon
T21B4.9 ou <i>srh-70</i>	probable olfactory G-protein coupled receptor	notre analyse
Y105E8C.r ou <i>lev-10</i>	récepteur membranaire impliqué dans les cellules musculaires dans l'aggrégation des récepteurs acétylcholine post-synaptiques	B. Delyon
M176.4	predicted transmembrane protein	notre analyse
KINASES		
Y106G6E.6	probable protein kinase	J. Michel/K. Paroux
Y106G6A.a	probable MEKkinase	notre analyse
F52F12.3 ou <i>mom-4</i>	probable tyrosine kinase, impliqué dans la signalisation de type Wnt/Akt dans l'embryogenèse chez <i>C. elegans</i>	notre analyse
GLYCOPROTEINES		
F35E2.5	probable mucin (proteoglycan)	B. Delyon
K07D4.6	probable mucin (proteoglycan)	J. Michel/K. Paroux
K07D4.6	probable mucin (proteoglycan)	J. Michel/K. Paroux
Y46B2A.a	probable mucin (proteoglycan) precursor	notre analyse
ZK1290.10	probable proteoglycan	B. Delyon
GENES IMPLIQUES DANS LA TRANSCRIPTION ET LA MATURATION DES ARNm		
C25A1.6	probable RiboNucleoProtein complex component	B. Delyon
C36E8.1	probable RNA polymerase initiation factor	B. Delyon + notre analyse
Y75B8A.7	probable RiboNucleoProtein complex component	B. Delyon
Y47G6A_245.f ou <i>rnp-6</i>	protein predicted to be involved in mRNA splicing regulation or transcriptional regulation	B. Delyon + notre analyse

B.3 Clones positifs après une première confirmation

Après retest et observation des vers fixés et colorés en phalloïdine-rhodamine, nous avons sélectionné une soixantaine de gènes dont l'inactivation réduit le nombre de cellules absentes ou abîmées.

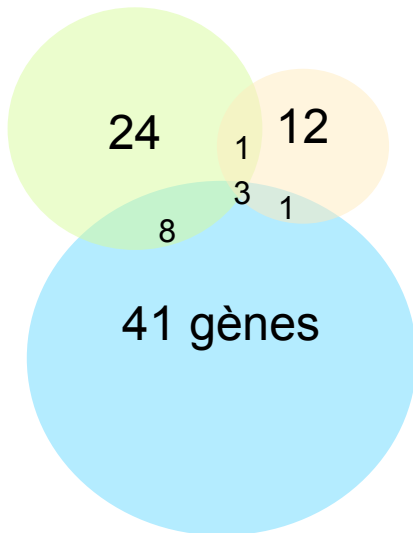


Figure 24 : Répartition des gènes sélectionnés par rapport aux différentes méthodes d'analyse

41 gènes sont issus de notre méthode d'analyse (12%).

24 de celle de Bernard Delyon (13%).

12 de celle de J. Michel/K. Paroux (12%).

8 gènes sont communs à notre méthode d'analyse et à celle de B. Delyon (sur 93).

1 gène est commun à l'analyse de B. Delyon et à celle de J. Michel/K. Paroux. De même, 1 gène est commun à notre analyse et à celle de J. Michel/K. Paroux .

Enfin, 3 des 6 gènes communs aux trois listes, ont été confirmés dans cette expérience.

Une analyse rapide de l'expression de ces gènes montre que 31 gènes sur 61 sont des gènes à expression musculaire. Ceci indique un enrichissement en gènes musculaires, puisque seulement un tiers des gènes de *C. elegans* sont des gènes musculaires. Ceci est en accord avec le fait que l'on cherche des gènes suppresseurs de la dégénérescence musculaire. D'un autre côté, ceci peut traduire le fait que l'ARNi étant moins efficace sur les gènes neuronaux, on récupère plus des autres types de gènes.

La liste des gènes, et des observations relatives à ces gènes issues de Wormbase (<http://www.wormbase.org/>), est reportée dans le tableau 3, ci-contre et ci-après.

Parmi ces gènes, 27 codent pour des protéines ou présentent des homologies avec des gènes qui permettent de les classer selon leur type ou fonction présumée. Ce sont des gènes codant vraisemblablement pour:

- des protéines impliquées dans le fonctionnement du muscle;
- des protéines impliquées dans la voie de dégradation protéique du protéasome;
- des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose;
- des canaux ioniques ;
- des protéines membranaires ou des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ;

Tableau 3, page 2 : Liste des 60 gènes dont l'inactivation réduit la dégénérescence musculaire chez C. elegans.

Ce tableau récapitule les gènes dont l'inactivation réduit la dégénérescence musculaire chez C. elegans. Ils sont classés dans différentes catégories selon leur fonction supposée. Les informations relatives à ces gènes proviennent de Wormbase (<http://www.wormbase.org/>). Les informations en gras correspondent à des informations d'études menées chez C. elegans, les autres informations sont tirées de la comparaison des séquences protéiques avec d'autres organismes (BLASTP). La dernière colonne indique par quelles méthodes d'analyse ces gènes ont été choisis.

Nom cosmidique/ Nom de gène	Informations provenant de Wormbase	Méthode d'analyse
DIVERS		
K07A12.2	leucine-rich repeat-containing protein	notre analyse
Y53H1C.b ou <i>aat-9</i>	amino acid transporter catalytic unit	notre analyse
C55B7.12 ou <i>che-1</i>	C2H2-type transcription factor orthologous of Drosophila GLASS, CHE-1 required for determining the identity of chemosensory neurons	notre analyse
K02C4.4 ou <i>ltd-1</i>	protein with LIM and transglutaminase domains, no known function	notre analyse
C45G3.3 ou <i>gip-2</i>	biotin protein ligase	B. Delyon
ZK1290.9	protein with an F-box, known to mediate protein-protein interactions	B. Delyon
Y54E5A.4 ou <i>npp-4</i>	probable nucleopore complex component	J. Michel/K. Paroux
W06D4.4	probable arginine N-methyltransferase	RECOUPEMENT ENTRE LES 3 ANALYSES
F32B4.6	predicted hydrolase	RECOUPEMENT ENTRE LES 3 ANALYSES
F52F12.4 ou <i>isl-1</i>	Zn finger protein	notre analyse
F35E2.7	predicted membrane O-acetyltransferase	B. Delyon
R06F6.2	probable vacuolar assembly protein	J. Michel/K. Paroux
F49D11.4	predicted peptidase	B. Delyon + notre analyse
Y48G1B_55.d	40% homology with a human CENP kinetochore protein	notre analyse
C37A2.2 ou <i>pqn-20</i>	protein with a prion like domain	notre analyse
F26E4.3	tubulointerstitial nephritis (TIN) antigen related protein	J. Michel/K. Paroux
R11A5.4	probable cytosolic phosphoenolpyruvate carbokinase	notre analyse
ZK858.1	probable DNA polymerase	notre analyse
T05A7.5 ou <i>fut-6</i>	probable fucosyl transferase	notre analyse
NON-CARACTERISES		
T05A8.2	uncharacterized protein	notre analyse
C27D6.1	uncharacterized protein	notre analyse
E04F6.10	uncharacterized protein	notre analyse
C56E6.4	uncharacterized protein	notre analyse
C30G12.3	uncharacterized protein	notre analyse
C56C10.7	uncharacterized protein	notre analyse
ZK1290.8 ou <i>wrt-10</i>	uncharacterized protein	notre analyse
F37B12.1	uncharacterized protein	notre analyse
C17E4.4	uncharacterized protein	notre analyse
C48B6.7	uncharacterized protein	B. Delyon
F48A9.1	uncharacterized protein	B. Delyon
C41G7.7	uncharacterized protein	B. Delyon + notre analyse
C35E7.8	uncharacterized protein	B. Delyon + notre analyse
C36E8.2	uncharacterized protein	B. Delyon + notre analyse
K10C3.4	uncharacterized protein	J. Michel/K. Paroux + notre analyse

- des protéines kinases;
- des glycoprotéines;
- des protéines impliquées dans la transcription ou la maturation des ARNm.

19 gènes codent pour des protéines, ou présentent des homologies avec des protéines, ayant diverses fonctions, ou présentant des domaines protéiques particuliers.

Enfin, pour environ 15 gènes, on ne connaît ni leurs fonctions, ni les protéines pour lesquelles ils codent, et ils ne présentent pas d'homologie parlante.

Ces résultats sont très préliminaires. Nous sommes en train de répéter ces expériences de façon indépendante, afin de confirmer ces résultats. Ensuite, nous vérifierons que l'effet de l'inactivation de ces gènes est spécifique de l'absence de *dys-1*, et pas d'*hllh-1*. Nous ferons pour cela des tests de suppression du phénotype d'hyperactivité des vers *dys-1*.

Des études antérieures ont montré que les suppresseurs d'*hllh-1* sont rares, et, jusqu'à présent, tous les gènes que nous avons testé en ce sens sont suppresseurs de *dys-1* et non d'*hllh-1*.

Ces résultats ne révèlent pas pour l'instant de classe de gènes fortement majoritaire. Néanmoins, on peut voir que parmi les 26 premiers gènes, 8 peuvent intervenir dans la signalisation intracellulaire au sens large : récepteurs transmembranaires (5) et protéines kinases (3). Six autres semblent particulièrement liés à la dégradation protéique et la mort cellulaire : protéines impliquées dans la voie de dégradation protéique du protéasome (1) et protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (5). Ceci est en accord avec le phénotype que nous cherchons à supprimer qui est la dégénérescence des cellules musculaires.

Une première analyse de l'implication de certains de ces résultats est présentée dans la discussion.

Chapitre III - Les molécules freinant la dégénérescence musculaire en absence de *DYS-1* chez *Cænorhabditis elegans*

Parallèlement aux études génétiques, nous avons abordé la question des mécanismes impliqués dans la dégénérescence musculaire par une approche pharmacologique. Nous avons réalisé un crible à la recherche de molécules ayant un effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire de *C. elegans*. Nous avons testé l'effet de plus de 700 molécules sur les vers *dys-1; hlh-1*.

Le but de ce crible était double.

1. Effectuer un premier tri afin d'obtenir une liste réduite de molécules ayant un effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire de *C. elegans*, que nous pourrions par la suite tester chez la souris *mdx*. Le crible d'un tel nombre de molécules n'est pas envisageable chez la souris car trop coûteux (coût des souris, des molécules et de l'analyse), et trop lent.

2. Nous renseigner sur les voies de signalisation impliquées dans la dégénérescence musculaire chez le ver, à l'instar des approches génétiques décrites auparavant.

Les molécules testées proviennent d'une collection commercialisée par Prestwick Chemicals (Strasbourg, France). Elles sont, pour la plupart, déjà utilisées comme médicament chez l'humain, et couvrent un large éventail d'indications thérapeutiques. Ce travail a été réalisé en deux ans, entre 2002-2004, principalement par Aurélie Gaud et Lucie Chambonnier. Le crible entier a permis de mettre en évidence une vingtaine de molécules ayant un effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire de *C. elegans*. J'ai participé à l'étude de deux molécules issues de ce crible : la prednisone et la sérotonine. La prednisone et ses dérivés, sont actuellement les seules molécules prescrites dans la myopathie de Duchenne. Le fait de la retrouver parmi les molécules bénéfiques aux vers *dys-1; hlh-1*, indique que les mécanismes de la dégénérescence musculaire sont probablement en partie conservés entre les mammifères et *C. elegans*, ce qui présage favorablement de la pertinence de ce crible.

La sérotonine est un neuromédiateur aux multiples effets, conservé dans tout le règne animal. J'ai prolongé l'étude de la sérotonine, par l'étude de ses récepteurs chez *C. elegans* afin de découvrir par quelle(s) voie(s) de signalisation passe son effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire.

A. La prednisone réduit la dégénérescence musculaire dépendante de la dystrophine chez *Cænorhabditis elegans*

Aurélie Gaud, Jean-Marc Simon, Thomas Witzel, Maïté Carre-Pierrat, Camille G. Wermuth et Laurent Ségalat.

et

B. La sérotonine bloque la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*

Maïté Carre-Pierrat, Marie-Christine Mariol, Lucie Chambonnier, Aurélie Laugraud, Fabienne Heskia, Jean Giacomotto et Laurent Ségalat

Grâce à son cycle de vie court et à son coût peu élevé, *C. elegans* nous a permis de réaliser un crible de plusieurs centaines de molécules, en deux ans. Plus de 700 molécules ont été testées sur les vers *dys-1*; *h1h-1*, à la recherche de celles ayant un effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire. Les vers ont été élevés sur un milieu gélosé contenant la dose maximale de molécule tolérée, sans entraîner de retard de croissance ou de défaut de ponte. Nous ne connaissons qu'approximativement la quantité de molécules qui passe dans les vers. Ce point est discuté dans l'article concernant la sérotonine.

Dans le premier article, nous avons montré que la prednisone réduit la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*. La prednisone est un glucocorticoïde prescrit dans la myopathie de Duchenne, dont l'action n'est pas clairement connue. Elle est décrite pour ralentir le phénomène inflammatoire, et activer la réparation des fibres musculaires (Anderson et al., 1996a; Gosselin and McCormick, 2004). Cependant, *C. elegans* ne possède ni système immunitaire, ni cellules satellites permettant le renouvellement du muscle en cas de lésion. Il est probable que la prednisone agisse sur l'état des cellules musculaires de *C. elegans* par un mécanisme méconnu.

Ce résultat nous laisse penser qu'au moins une partie des mécanismes de la dégénérescence musculaire en absence de dystrophine est conservée chez *C. elegans*, ce qui valide notre approche pharmacologique chez ce modèle animal.

Le second article décrit comment grâce à ce crible, nous avons montré que la sérotonine supprime partiellement la dégénérescence musculaire des doubles mutants *dys-1; hhh-1*. L'effet observé est plus fort que celui provoqué par la prednisone.

La sérotonine est un neuromédiateur, qui agit comme une neurohormone, sur le système entier, ou comme un neurotransmetteur, à la synapse. En tant que neurotransmetteur, elle est libérée dans l'espace synaptique où elle agit sur des récepteurs, puis elle est recaptée par un mécanisme actif dans le neurone présynaptique. Il existe des molécules qui permettent d'inhiber cette recapture : les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (IRS). Nous avons montré que ces molécules, qui augmentent artificiellement le taux de sérotonine dans l'espace synaptique, ont le même effet que la sérotonine exogène sur la dégénérescence musculaire.

A l'inverse, l'absence de sérotonine dans les vers *hhh-1(cc561ts)* est délétère au muscle. Ceci, et le fait que l'absence de sérotonine ne perturbe pas les muscles des vers *dys-1*, semble indiquer que l'absence de DYS-1 perturbe la signalisation sérotoninergique. L'inactivation de la voie sérotoninergique connue dans les neurones de *C. elegans* ne provoque pourtant pas de dégénérescence. Il semble donc probable que la sérotonine agisse directement sur les cellules musculaires de *C. elegans*.



PERGAMON

Neuromuscular Disorders 14 (2004) 365–370



www.elsevier.com/locate/nmd

Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*

Aurélie Gaud^a, Jean-Marc Simon^b, Thomas Witzel^b, Maité Carre-Pierrat^a,
Camille G. Wermuth^b, Laurent Ségalat^{a,*}

^aCGMC, CNRS-UMR 5534, Université Lyon1, 43 bld du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne cedex, France

^bPrestwick Chemical Inc., rue Tobias Stimmer, 67400 Illkirch, France

Received 10 November 2003; received in revised form 12 February 2004; accepted 20 February 2004

Abstract

Duchenne muscular dystrophy is a degenerative muscular disease caused by mutations in the dystrophin gene. There is no curative treatment against Duchenne muscular dystrophy. In several countries, the steroid prednisone (or analogs) is prescribed as a palliative treatment. In the model animal *Caenorhabditis elegans*, mutations of the *dys-1* dystrophin-like gene lead to a muscular degenerative phenotype when they are associated with a mild *MyoD* mutation. This cheap and fast-growing model of dystrophinopathy may be used to screen for molecules able to slow muscle degeneration. In a blind screen of approximately 100 compounds covering a wide spectrum of targets, we found that prednisone is beneficial to the *C. elegans* dystrophin-deficient muscles. Prednisone reduces by 40% the number of degenerating cells in this animal. This result is a proof-of-principle for the use of *C. elegans* as a tool in the search for molecules active against the effects of dystrophin-deficiency. Moreover, since *C. elegans* is not susceptible to inflammation, this suggests that prednisone exerts a direct effect on muscle survival.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Dystrophin; Duchenne muscular dystrophy; Nematode

1. Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) and Becker muscular dystrophy are progressive skeletal and cardiac myopathies caused by mutations in the dystrophin gene (reviewed in Ref. [1]). Although the gene was identified more than 15 years ago [2], there is still no efficient treatment against these diseases (reviewed in Ref. [3,4]).

Design of efficient treatments against DMD has been hampered by several factors: (1) despite of a wealth of biochemical studies on dystrophin and associated proteins within the DGC, there is still some uncertainty about the mechanisms underlying chronic muscle waste in absence of dystrophin. (2) The mouse model of the disease (*mdx*) is less affected than humans, thus complicating the analysis of its phenotypes with respect to the disease. In addition, because mice are of high unitary cost, random screen of thousands of compounds on the *mdx* mouse model requires large budgets

uneasy to assemble. (3) There is still no in vitro model of the disease which would recapitulate enough properties of the disease to be used in high-throughput screens. (4) Over-expression of the closely related protein utrophin, a relatively simple therapeutic approach [5,6], has not led to approved drugs yet.

Although gene and cell therapy raise high hopes for the treatment of DMD, there will still be many years before their application. Analogs of prednisone are prescribed to DMD boys in some countries because this treatment delays the loss of ambulation [7]. The mode of action of prednisone (and analogs) on DMD remains a matter for conjecture at this point.

Invertebrates models such as *Caenorhabditis elegans* are complementary models to the mouse and canine because they are cheap, grow rapidly, and are amenable to large genetic studies. *C. elegans* possesses a dystrophin-like gene (*dys-1*) encoding a protein displaying the same structural features as human dystrophin [8,9]. When in a sensitized *MyoD* genetic background, *dys-1* mutations lead to a progressive impairment of locomotion [10]. Examination

* Corresponding author. Tel.: +33-4-72-43-29-51; fax: +33-4-72-44-05-55.
E-mail address: segalat@cgmc.univ-lyon1.fr (L. Ségalat).

of the musculature of these animals reveals a widespread degeneration of the body-wall muscles which are responsible for the animal locomotion [10]. These muscles have a sarcomeric structure and protein composition closely related to mammalian striated muscles [11]. However, *C. elegans* striated muscles are different from those of mammals on two aspects: muscle cells do not fuse, and they are not able to regenerate. The *C. elegans* model has already been used to identify genes which can counteract the absence of dystrophin when their expression is changed [10,12,13].

In this paper, we propose to take advantage of the *C. elegans* model to screen for chemical compounds able to reduce the muscular degeneration. In a pilot experiment, approximately 100 compounds were tested in a blind assay. We were able to pick prednisone as a molecule beneficial to *C. elegans* dystrophin-deficient animals in this assay. This result further demonstrates the similarities existing between *C. elegans* and mammalian muscles, and provides a proof-of-principle for the further use of this model in random compound screens.

2. Materials and methods

2.1. Strains

C. elegans was grown on plates of NGM solid medium [14]. Worms used in this study were of *dys-1(cx18); CeMyoD(cc561)* genotype (strain name LS587) [10]. (The *CeMyoD* gene is also called *h1h-1*). Animals were grown at 15 °C excepted otherwise mentioned.

2.2. Drug administration

Drugs were administered by mixing them with the medium at a concentration of 1 mg/ml when possible, or at the highest possible concentration. Water soluble drugs were dissolved in water. Other drugs were dissolved in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (45% w/vol), ethanol, methanol, or DMSO. *C. elegans* tolerates ethanol, methanol, and DMSO up to a final concentration of 2% vol/vol. Control plates containing water only and solvent only were included in each series. Adult animals of *dys-1(cx18); CeMyoD(cc561)* genotype were allowed to lay eggs for one night and then removed. Descendants were then grown at 15 °C in presence of food for 7 days (one generation) before examination (Fig. 1). It is admitted that drugs penetrate the animals both by diffusion through the cuticle and ingestion [15]. This mode of administration allows the continuous exposure of animals to the drug. When drugs produced deleterious effects (lethality, growth reduction, morphological defects) at the initial concentration, serial dilutions were made to define the highest possible dose exempt of deleterious effect.

2.3. Observation of phenotypes

Drug effect was assayed by (1) looking at animals locomotion; this is a fast and qualitative test, but not sensitive and (2) quantification of the muscle degeneration. For this purpose, a rhodamine-phalloidin staining was performed as in Ref. [16]. Briefly, whole animals were fixed in formaldehyde, permeabilized with acetone, incubated with rhodamine-phalloidin, and mounted on a microscope slide. Quantification of the number of body-wall muscle cells displaying an abnormal staining pattern (degenerating) was done under the microscope on the most visible side of the animal (i.e. 40 cells) as previously described [10]. The tests were done in a blind way, drugs being only coded by numbers at this stage. At least 20 animals were scored for each point. Data were compared by a Student's *t*-test. Drugs showing a significant reduction in the number of abnormal cells were retested at various concentrations.

3. Results

3.1. No drug was able to significantly reduce the locomotion defect

As part of a pilot experiment intended to assay the feasibility of using *C. elegans* mutants to search for chemical compounds active against DMD, we screened approximately 100 compounds which are part of the Prestwick Chemical Library (Prestwick Chemical, Strasbourg, France). Most of the compounds in this library are marketed drugs covering a large spectrum of clinical applications. Compounds tested in this work included antibiotics, antivirals, anti-diabetics, anti-hypertensive, antipyretics, antidepressors, and anti-inflammatory drugs. (The complete list of drugs used, and the drug-by-drug results obtained in this study (including toxicity) will be reported in a separate paper.)

We expected that drugs able to strongly reduce muscle degeneration in *C. elegans* would reverse the impaired locomotion phenotype. In the best case scenario, this assay would be a first criteria, and muscle examination would be performed only for drugs selected by this criteria. However, none of the drugs tested in this set of compounds reduced the impairment of locomotion enough to be reproducibly recognized by the experimentators. This means that none of the drugs tested was able to reduce muscle degeneration under the threshold allowing restored locomotion, and it does not preclude that such drugs will not be found in the future.

3.2. In the quantitative assay, prednisone was the most effective drug

The most active drug in the quantitative assay was prednisone. Since prednisone is poorly soluble in water,

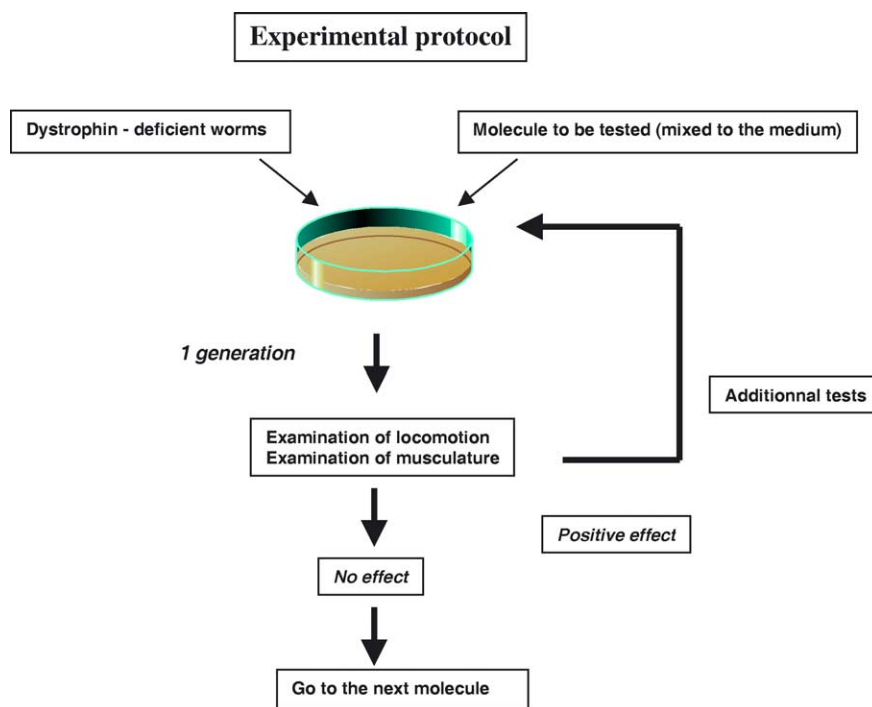


Fig. 1. Protocol used to assay drug effect on *C. elegans*. Dystrophin-deficient animals (genotype *dys-1(cx18) CeMyoD(cc561)*) were put on plates containing the molecule to be tested during one generation (7 days) at a dose of 1 mg/ml. Putative improvements of the phenotype were determined by observing the extent of paralysis (qualitative assay) and the number of degenerating muscle cells (quantitative assay). Molecules showing an improvement of the phenotype were retested at various concentrations.

a stock solution of 20 mg/ml in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (45% w/vol) was made. Prednisone treatment reduced the number of degenerating cells (Fig. 2). Its effect was observed from 0.1 to 1 mg/ml (0.28–2.8 mM) (Fig. 2).

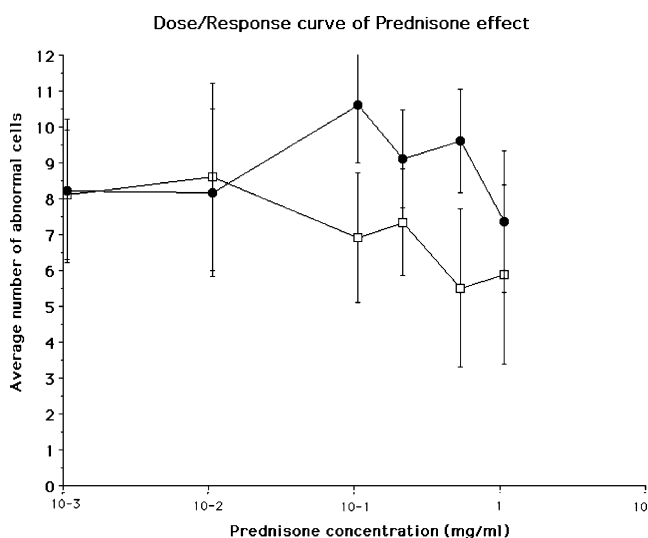


Fig. 2. Effect of prednisone on *C. elegans* muscles. Dose–response curve of the number of abnormal (degenerative) body-wall muscle cells at different prednisone concentration. Squares represent prednisone treatments, circles represent equal volume of solvent (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine). The abscise value represents the prednisone concentration in the plate. Vertical lines show the standard deviation of each point. Prednisone treatment at 10⁻¹ mg/ml and above reduced significantly the number of abnormal cells ($P < 0.05$).

The strongest effect is observed at a concentration of 0.5 mg/ml (1.4 mM), where prednisone reduces almost by half the number of abnormal cells ($m = 5.4$ vs 9.4 in control). Although the number of abnormal cells remains low at higher concentrations (1 mg/ml), the effect is masked by that of the solvent cyclodextrine, which also diminishes the number of abnormal cells at concentrations higher than 2.25% (w/vol) (Fig. 1). The large standard deviation is due to strong variations from animal to animal, a property of this strain that was already reported [10,12]. However, despite of inter-animal variations, results were statistically significant at $P < 0.05$ for all concentrations tested from 0.1 to 1 mg/ml (0.28–2.8 mM). A representative example of the musculature of prednisone-treated and control animals is shown on Fig. 3.

3.3. Prednisone seems to be active on the dystrophin mutation rather than on the *MyoD* mutation

Since the model used in this study combines a null mutation in the dystrophin-like gene *dys-1* and a mild mutation in the *MyoD* gene *CeMyoD*, one might wonder which of the two mutations prednisone acts upon. As *dys-1(cx18)* animals suffer very little muscle degeneration, the effect of prednisone can not be tested directly on these animals. *CeMyoD(cc561)* animals have a complex phenotype. At 15 °C (the temperature used in this study), they are essentially wild-type excepted for 5% of animals which have growth defects and do not reach the proper adult size.

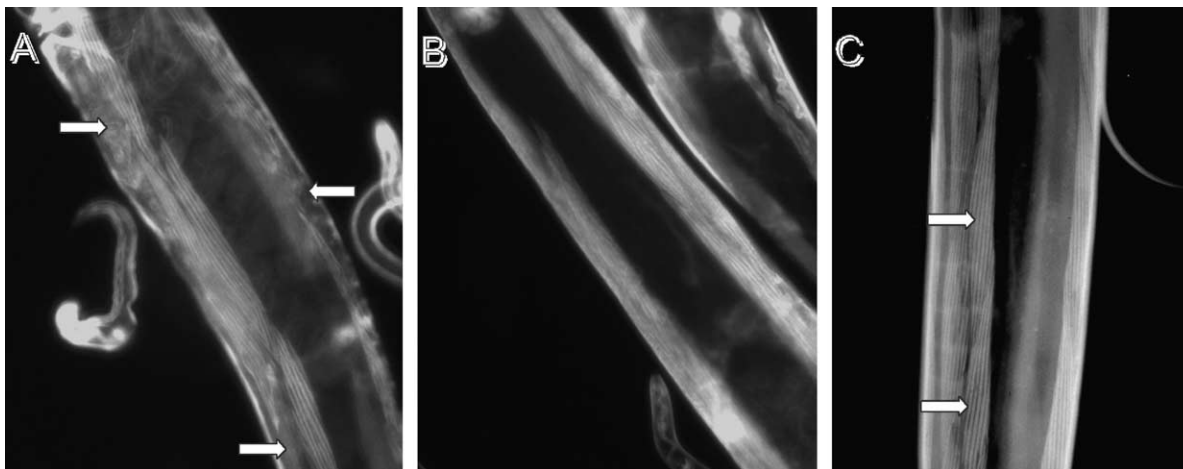


Fig. 3. Representative examples of *C. elegans* muscles in absence and in presence of prednisone. Striated body-wall muscles of dystrophin-deficient animals (genotype *dys-1(cx18) CeMyoD(cc561)*) shown after fixation and phalloidin-rhodamine incubation to visualize the actin fibers. Body-wall muscle cells have a diamond-like shape and contain 8–12 sarcomeres visible as white stripes. Non-treated animals (A) show a higher number of degenerating cells (arrows) than animals treated with prednisone at 0.5 mg/ml (B). Wild-type animals are shown in C. Note the regular arrangement of actin fibers (arrows in C). Images are approximately $200 \times 200 \mu\text{m}^2$.

At 23 °C, the mutation is sublethal (50% of the animals die, and 50% grow slowly to sterile, poorly shaped, sick animals). Prednisone treatment did not change any of these phenotypes or the growth times, either at 15 or 23 °C, thus indicating that prednisone has no visible effect on the *CeMyoD(cc561)* mutation. Conversely, the *dys-1(cx18)* mutation can be exacerbated by gain-of-function mutations in the *egl-19* gene, which encodes a voltage-dependent calcium channel [12]. Prednisone had a beneficial effect on these animals, which carry wild-type alleles of *CeMyoD* (data not shown). Therefore, altogether, we believe that prednisone acts on the *dys-1* mutation.

3.4. Short exposure to prednisone is sufficient to be beneficial to the muscle

We next tested when and how long prednisone should be administered to produce an effect on *C. elegans*. To do this, animals were transferred from prednisone-containing plates to solvent-containing plates at various stages of their development (Fig. 4). The reciprocal experiment was done in parallel. The number of abnormal cells was determined when animals were 7-day-old, like in the dose/response experiment (Fig. 2). In the first experiment (prednisone to solvent), our results shows that exposure from 0 to 2 days of age is sufficient to provide the beneficial effect of prednisone (Fig. 5, top). In the reverse experiment, exposure of animals to prednisone from days 5 to 7 is sufficient to reduce the number of degenerating cells (Fig. 5, bottom). Exposure to prednisone for periods of time beginning before day 5 was also beneficial. When animals were shifted as late as day 6—which is when the peak of degeneration occurs—a small effect was also visible, albeit not statistically significant from animals grown on solvent for the whole period. Altogether, this set of experiments

indicates that a limited exposure to prednisone, either during the early stages, during the period of active degeneration, is beneficial to the muscles of dystrophin-deficient *C. elegans*.

4. Discussion

4.1. *C. elegans* as a model

The work presented here is a preliminary step toward larger experiments intended to screen the existing pharmacopeia for drugs able to combat genetic diseases. Our work has focused on muscle diseases for several years because we believe that the structural and protein analogies between

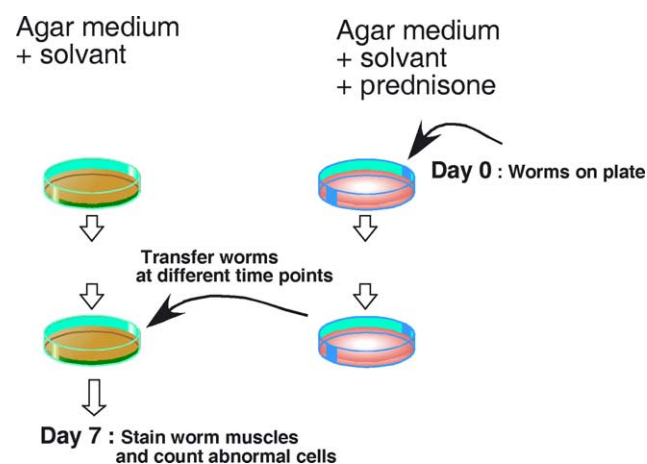


Fig. 4. Protocol used to assay the critical period of prednisone treatment. Worms were grown on plates with prednisone and transferred to control plates at various days. In the reciprocal experiment, worms were first grown on control plates and then transferred to prednisone plates. The length of the experiment was the same in all cases. The results of the experiments are shown on Fig. 5.

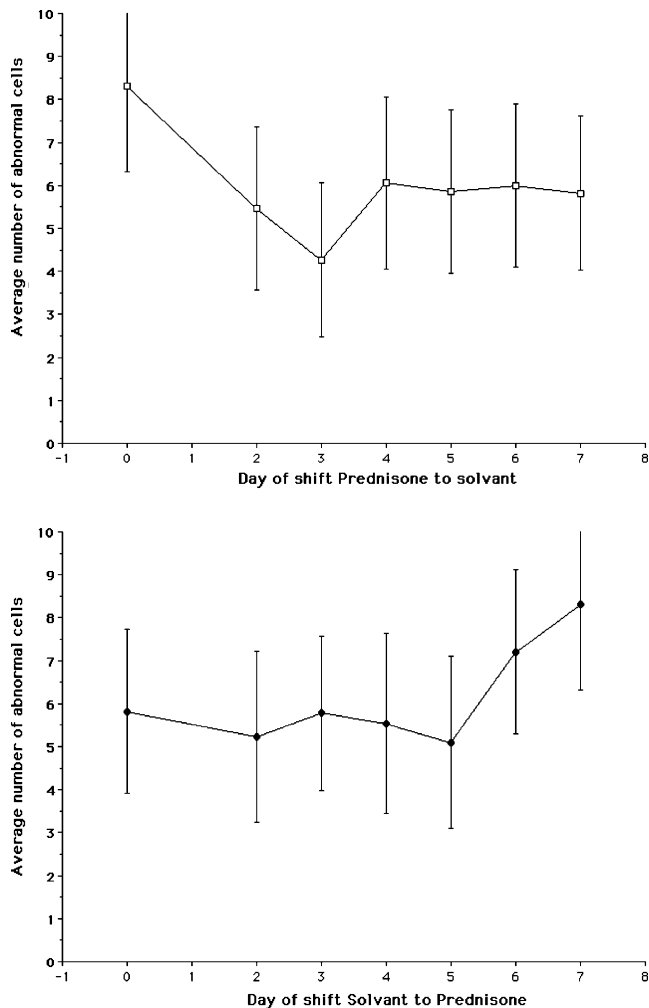


Fig. 5. Time of action of prednisone. Number of abnormal (degenerative) body-wall muscle cells observed at day 7, after animals had been exposed to prednisone during various periods of time. The abscise value represents the day animals were transferred from prednisone-containing plates to solvent-containing plates (top panel) or the opposite (bottom panel). Standard deviation is indicated by the vertical lines. Concentration of prednisone was 1 mg/ml. In non-treated animals, extensive muscle degeneration occurs between days 5 and 7 under these growth conditions.

C. elegans and mammalian muscles make this animal a relevant model for such studies. Moreover, *C. elegans* has a dystrophin-like gene and homologues of the DGC proteins [8,17].

Since *C. elegans* striated muscles are devoid of satellite cells and are unable to regenerate, the effect of degenerative processes such as the absence of dystrophin can be monitored directly by counting the number of degenerating cells. In the case of the mutant animals used in this study, we showed previously that this process is time-dependent, with the burst of degeneration occurring when animals become adult (day 5 at 15 °C) [10].

The identification of prednisone as a hit in our low-scale screen is a proof-of-principle for *C. elegans*-based screens. Not only does it demonstrates that mechanisms underlying muscle survival are conserved through evolution, but also

that our screen is sensitive enough to pick already known molecules, even if these molecules have limited action in humans. Conversely, the screen was selective, since most drugs tested did not produced any effect on the muscular degeneration.

A limitation of the screening method is that drug concentrations inside of the animals are not known. However, we think that, at this early step, quantitative issues are not important. In our view, *C. elegans* screens are only intended at identifying therapeutic clues to be investigated further in mammalian models, and should not be considered as preclinical trials. A related limitation comes from the large amount of compound required for each test. Work intended to reduce the total volume of the assay (including liquid-based assays) will be conducted to address this problem.

4.2. Action of steroids on muscles

This work may also bring some useful data about the mechanism of action of steroids in mammals.

On one hand, the fact that *C. elegans* has no inflammation-like process may seem a further limitation of the model. On the other hand, it provides an opportunity to test the effect of drugs directly on muscles. Since steroids have a variety of targets in human physiology, it is often difficult to sort out their effects. In particular, the question remains as to whether the beneficial effect of steroids observed on DMD boys is caused by a better survival of steroid-exposed skeletal muscles fibers, or if the effect is indirect, for instance by limiting the inflammatory response [7]. Few experiments have addressed the effect of steroids directly on muscle cell cultures. It has been shown that steroids reduce calcium influx into C2C12 myotubes, and this is expected to be beneficial in the case of DMD [18,19]. However, given the many targets of steroids in the whole organism, it is difficult to ascertain that this mechanism is the one underlying the therapeutical effect of steroids in DMD treatment. Since *C. elegans* has no vertebrate-like immune system, and no inflammation, the most likely explanation for the beneficial effect of prednisone in that model is that of a direct effect on striated muscles.

5. Conclusion

We believe that the results reported in this paper demonstrate that, despite obvious limitations of the *C. elegans* model, it is both feasible and informative to perform large compound screens on this low-cost animal model. Such large screens are not possible on the mouse model because of their cost. The main purpose of screens conducted on *C. elegans* is to serve as a first pass, in order to select a few dozens compounds out of thousands, and to eventually test these selected items on the *mdx* mouse.

Acknowledgements

We thank Marie-Christine Mariol and Kathrin Gieseler for critical reading of the manuscript. This work was supported by an ACI grant from the French Ministry of Research, by a Rhône-Alpes district grant, and by an Association Française contre les Myopathies (AFM) grant to L.S.

References

- [1] Ahn AH, Kunkel LM. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* 1993;3:283–91.
- [2] Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50:509–17.
- [3] Dubowitz V. What is muscular dystrophy? Forty years of progressive ignorance. *J R Coll Phys Lond* 2000;34:464–8.
- [4] O'Brien K, Kunkel L. Dystrophin and muscular dystrophy: past, present, and future. *Mol Genet Metab* 2001;74:75–88.
- [5] Perkins K, Davies K. The role of utrophin in the potential therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2002;12: S78–S89.
- [6] Briguet A, Bleckmann D, Bettan M, Mermod N, Meier T. Transcriptional activation of the utrophin promoter B by a constitutively active Ets-transcription factor. *Neuromuscul Disord* 2003;13:143–50.
- [7] Wong B, Christopher C. Corticosteroids in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal. *J Child Neurol* 2002;17:183–90.
- [8] Bessou C, Giuglia J-B, Franks CJ, Holden-Dye L, Ségalat L. Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission. *Neurogenetics* 1998;2:61–72.
- [9] Roberts RG, Bobrow M. Dystrophins in vertebrates and invertebrates. *Hum Mol Genet* 1998;7:589–95.
- [10] Gieseler K, Grisoni K, Ségalat L. Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 2000;10:1092–7.
- [11] Moerman D, Fire A. Muscle: structure, function, development. In: Riddle D, Blumenthal T, Meyer B, Priess J, editors. *The nematode C. elegans II*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. p. 417–70.
- [12] Mariol MC, Segalat L. Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. *Curr Biol* 2001;11: 1691–4.
- [13] Gieseler K, Grisoni K, Mariol M, Ségalat L. Overexpression of dystrobrevin delays locomotion defects and muscle degeneration in a dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul Disord* 2002;12:371–7.
- [14] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974; 77:71–94.
- [15] Rand J, Johnston C. Genetic pharmacology: interactions between drugs and gene products. In: Epstein H, Shakes D, editors. *C. elegans: modern biological analysis of an organism*. San Diego: Academic Press; 1995. p. 187–204.
- [16] Waterston RH, Hirsh D, Lane TR. Dominant mutations affecting muscle structure in *Caenorhabditis elegans* that map near the actin gene cluster. *J Mol Biol* 1984;180:473–96.
- [17] Grisoni K, Martin E, Gieseler K, Mariol M, Ségalat L. Genetic evidence for a dystrophinglycoprotein complex (DGC) in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 2002;294:77–86.
- [18] Metzinger L, Passaquin A, Leijendekker W, Poindron P, Ruegg U. Modulation by prednisolone of calcium handling in skeletal muscle cells. *Br J Pharmacol* 1995;116:2811–6.
- [19] Passaquin A, Lhote P, Ruegg U. Calcium influx inhibition by steroids and analogs in C2C12 skeletal muscle cells. *Br J Pharmacol* 1998;124: 1751–9.

Blocking of striated muscle degeneration by serotonin in *C. elegans*

Maité Carre-Pierrat · Marie-Christine Mariol · Lucie Chambonnier · Aurélie Laugraud · Fabienne Heskia · Jean Giacomotto · Laurent Ségalat

Received: 22 December 2005 / Accepted: 30 April 2006 / Published online: 22 June 2006
© Springer Science+Business Media B.V. 2006

Abstract Prevention of muscle fiber degeneration is a key issue in the treatment of muscular dystrophies such as Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). It is widely postulated that existing pharmaceutical compounds might potentially be beneficial to DMD patients, but tools to identify them are lacking. Here, by using a *Caenorhabditis elegans* model of dystrophin-dependent muscular dystrophy, we show that the neurohormone serotonin and some of its agonists are potent suppressors of muscle degeneration. Inhibitors of serotonin reuptake transporters, which prolong the action of endogenous serotonin, have a similar effect. Moreover, reduction of serotonin levels leads to degeneration of non-dystrophic muscles. Our results demonstrate that serotonin is critical to *C. elegans* striated muscles. These findings reveal a new function of serotonin in striated muscles.

Keywords Serotonin · *C. elegans* · Muscular dystrophy · Striated muscles · Dystrophin

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a progressive disorder affecting striated and cardiac muscles. It is caused by mutations in the dystrophin gene, and there is still no efficient treatment

against this disease (Koenig et al. 1987; Ahn and Kunkel 1993; Dubowitz 2000; Khurana and Davies 2003). Alongside gene therapy and other novel approaches, random screens of bioactive molecules still represent a serious therapeutic option for the treatment of DMD. To conduct such large screens, the invertebrate model *Caenorhabditis elegans* is an appealing system, since it has striated muscles (Waterston 1988), a dystrophin-like gene (*dys-1*) (Bessou et al. 1998), and can be grown at low cost. Moreover, since *C. elegans* is unable to regenerate lost muscle cells, muscle cell survival can be quantitated rapidly and unambiguously (Gieseler et al. 2000).

Although null mutations of the *C. elegans dys-1* gene occasionally lead to muscle cell death in aging animals (Grisoni et al. 2003), such a low penetrance phenotype offers only a limited window for the search of suppressing effects. To circumvent this problem, we combine a null *dys-1* mutation with a weak and almost silent mutation of the *CeMyoD/hlh-1* gene (encoding a transcription factor involved in the development of muscles), which fragilizes the muscles (Gieseler et al. 2000). In the double mutant, the synergistic effect of the two mutations results in a progressive muscle degeneration affecting up to 30% of the body wall muscle cells responsible for locomotion (Gieseler et al. 2000). *dys-1*; *CeMyoD* mutant animals are therefore severely paralysed as they age (Gieseler et al. 2000). We are making use of this phenotype to screen random molecules that may be active against DMD. By following this approach, we found that, quite unexpectedly, the neuro-hormone serotonin is a potent blocker of striated muscle degeneration.

M. Carre-Pierrat · M.-C. Mariol · L. Chambonnier · A. Laugraud · F. Heskia · J. Giacomotto · L. Ségalat (✉)
CGMC, CNRS-UMR 5534, Université Lyon 1, 43 bld du 11
Novembre, 69622 Villeurbanne Cedex, France
e-mail: segalat@cgmc.univ-lyon1.fr

Materials and methods

Strains and culture conditions

C. elegans strains were cultured at 15°C on 6 cm Petri dishes containing NGM agar and a lawn of *E. coli* OP50 unless stated otherwise. The *dys-1(cx18)*; *CeMyoD(cc561)* strain was grown at 15°C, which is the permissive temperature for the *ts* mutation *CeMyoD(cc561)* (Gieseler et al. 2000). All subsequent strains carrying *CeMyoD(cc561)* were also grown at 15°C. The wild-type N2 strain and other mutant strains were obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center.

Pharmacological compounds

All pharmacological compounds were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Concentrated solutions of each drug were prepared by dissolving compounds in water (M9 medium for serotonin). Compounds were added to liquid NGM that had been autoclaved and cooled to 55°C, and the media was immediately dispensed into Petri dishes. Drugs used in this study were: serotonin creatinine sulfate (4 mg/ml); serotonin hydrochloride (2 mg/ml); Fluoxetine hydrochloride (0.05 mg/ml); Imipramine hydrochloride (0.1 mg/ml); Trimipramine maleate (0.1 mg/ml); *m*-chlorophenyl piperazine (0.05 mg/ml); CGS12066A (0.012 mg/ml); α -methyl-5-hydroxytryptamine maleate (0.2 mg/ml); *N*-methyl quipazine (0.2 mg/ml); *m*-chlorophenyl biguanide (0.5 mg/ml); 2-methyl-5-hydroxytryptamine (0.3 mg/ml). These concentrations were chosen because they were the highest concentration obtainable on plates which does not slow worm development. 5–7 adult gravid worms were put on plates in the presence of the drug for one night and removed, so as the progeny were exposed to drug from hatching to fixation. L4 larvae were picked to a new drug containing plate, allowed to develop into adults, and fixed 72 h later.

Dosing of serotonin inside the animals

To dose serotonin levels inside the serotonin-treated animals, we measured the serotonin concentration by HPLC. After overnight exposure to 10 mM serotonin in liquid, animals were quickly washed with water, and an extract was made by three passes through a French Press (12,000 psi). The supernatant (3000 g, 5 mn) was injected into a C18 liquid chromatography column, 18 cm, 3.9 × 150 mm, and serotonin was detected by fluorometry as in Yamada et al. (1983). The column

was previously calibrated with serial dilutions of serotonin creatinine sulfate (Sigma H-7752).

Muscle observation and analysis

Muscle observation was performed by rhodamine coupled-phalloidin staining, a marker of filamentous actin. Staining was done according to Waterston et al. (1984). Slides were observed on a Zeiss Axioplan microscope. A body wall muscle cell is considered degenerating when its actin fibers are fragmented or destroyed (Gieseler et al. 2000). Only the 2 most visible muscle quadrants of each animal were scored (40 cells per animal). Numbers were compared by a Student's *t*-test.

Results

We exploited the *C. elegans* model of dystrophin-dependent muscle degeneration in a large screen of hundreds of bioactive molecules to identify potential blockers of muscle degeneration. The relevance of such a screen has been previously demonstrated (Gaud et al. 2004). During this screen, we observed by visual inspection that adult animals grown on 10 mM serotonin plates moved better than non-treated animals, suggesting that the function of body wall muscles in these animals was partially restored. Serotonin was active both as a creatinine-sulfate salt and a hydrochloride salt. A dose-response experiment showed that the effect of serotonin was qualitatively visible down to 2.5 mM. Examination of the musculature of *dys-1*; *CeMyoD* animals by phalloidin staining, which labels actin fibers, revealed a dramatic reduction of muscle degeneration in treated animals (Fig. 1). The number of missing or degenerating cells was significantly reduced from 12.3 ± 3.8 per animal to 2.5 ± 1.2 (Table 1). Visualization of muscles with anti-myosin antibodies (Miller et al. 1983) confirmed this finding (data not shown). Since the animal model analysed contains both a null mutation of *dys-1* and a mild mutation of *CeMyoD*, which act synergistically to produce muscle degeneration, we needed to determine on which of the two mutations serotonin was active. *dys-1(cx18)* animals could not be tested directly because muscle degeneration is not enough penetrant in these animals. Instead, we used *dys-1(cx18)*; *egl-19(ad695)* animals, which are subject to a limited muscular degradation when they age (Mariol and Segalat 2001). This degradation was completely suppressed by the serotonin treatment (0.7 ± 0.2 down to 0.1 ± 0.1 ; Table 1), demonstrating that serotonin is

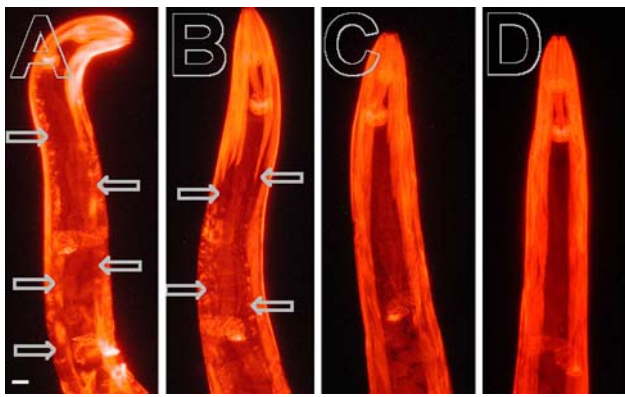


Fig. 1 Representative examples of *C. elegans* muscles in absence and in presence of serotonin. Striated body-wall muscles of dystrophin-deficient animals (genotype *dys-1(cx18); CeMyoD(cc561)*) shown after fixation and phalloidin-rhodamine incubation to visualize the actin fibers. Body-wall muscles appear as 2 stripes of diamond-shaped cells on each side of the animal. Non-treated animals (**A, B**) show a high number of degenerating cells (arrows) rarely seen in animals treated with serotonin at 4 mg/ml (**C, D**). Animals were grown in constant presence of food at 15°C and fixed 3 days after the L4-stage. Images are approximately 300 × 100 micrometers. Bar in **A** is 10 micrometers

beneficial to dystrophin-deficient animals independently of the CeMyoD mutation. In the reciprocal experiment, we tested the response of *CeMyoD(cc561)* animals to serotonin. Muscle degeneration was also slightly reduced from 0.8 ± 0.1 to 0.3 ± 0.1 , indicating

that serotonin is also beneficial to muscles with impaired *MyoD* function.

To confirm the action of serotonin, we hypothesized that drugs known to increase endogenous serotonin levels should produce results similar to serotonin. Endogenous serotonin levels can be increased by drugs inhibiting the reuptake of serotonin. We tested the effect of three molecules of this class: Fluoxetine (Prozac), Imipramine and Trimipramine. All three drugs also significantly reduced muscle degeneration, albeit less significantly than serotonin (Table 1). Other amines (Dopamine and Octopamine) showed no effect (data not shown).

Along the same lines, we applied to *dys-1; CeMyoD* animals various serotonin agonists representative of the major serotonin receptor types. Only m-chlorophenyl piperazine and N-methyl quipazine significantly reduced the muscular degeneration (Table 1). However, their effect was lower than that of serotonin, suggesting that serotonin might act through several pathways in parallel to protect *C. elegans* muscles from degeneration. In mammals, m-chlorophenyl piperazine, and N-methyl quipazine are 5-HT1 and 5-HT3 agonists respectively. Since the typology of 5-HT agonists is probably different in *C. elegans*, it is difficult to infer at this point which serotonin receptor type is involved in the response to serotonin. We attempted to block the serotonin response by inhibiting the expression of all known serotonin receptors (Olde and

Table 1 Effect of serotonin and related compounds on the muscle of dystrophin-deficient mutants

Compound (concentration in medium)	Class	Number of missing or degenerating muscle cells per animal ± s.e.m. <i>dys-1(cx18); CeMyoD(cc561)</i> animals	Number of missing or degenerating muscle cells per animal ± s.e.m. <i>dys-1(cx18); egl-19(ad695)</i> animals
Control (water)		12.3 ± 0.7 (30)	0.7 ± 0.2 (30)
Serotonin (creatinine, 10 mM)		2.5 ± 0.2* (40)	0.1 ± 0.1* (30)
Serotonin (hydrochloride, 10 mM)		2.7 ± 0.2* (40)	N.D.
Fluoxetine (150 µM)	Reuptake blocker	4.6 ± 0.5* (20)	N.D.
Imipramine (300 µM)	Reuptake blocker	6.2 ± 0.6* (20)	N.D.
Trimipramine (250 µM)	Reuptake blocker	4.5 ± 0.3* (20)	N.D.
m-chlorophenyl piperazine (250 µM)	5HT1 agonist	3.9 ± 0.5* (20)	N.D.
CGS12066A (26 µM)	5HT1B agonist	10.1 ± 0.7 (20)	N.D.
a-methyl-5-hydroxytryptamine (650 µM)	5HT2 agonist	7.8 ± 0.6 (20)	N.D.
N-methyl quipazine (400 µM)	5HT3 agonist	4.5 ± 0.4* (20)	N.D.
m-chlorophenyl biguanide (2 mM)	5HT3 agonist	9.1 ± 0.5 (20)	N.D.
2-methyl-5-hydroxytryptamine (1 mM)	5HT3 agonist	9.5 ± 0.5 (20)	N.D.

Drugs were mixed with the medium at the concentration indicated. Drugs were dissolved in water, excepted for serotonin which was dissolved in M9. Muscle cells were observed after phalloidin staining of animals fixed 3 days after the L4-stage. Animals were grown in constant presence of food and drugs at 15 °C

Mean ± s. e. m.: * different from control at $p < 0.05$. N.D.: not determined. The number in parentheses is the number of scored animals

McCombie 1997; Hamdan et al. 1999; Hobson et al. 2003; Ranganathan et al. 2000). These experiments gave only modest results with respect to serotonin response inhibition (data not shown). Thus, our current interpretation is that serotonin blocks muscle degeneration either by acting through several receptors simultaneously or by acting through a so far uncharacterized receptor.

Short-term exposure to serotonin is known to result in reduced locomotor activity in *C. elegans* (17). Therefore, one could wonder whether the protective effect of serotonin and agonists observed in this study is caused by a reduction of muscle activity. Two strong arguments rule out this hypothesis. First, modulation of locomotion by serotonin in *C. elegans* is subject to habituation after a few hours, a negligible time period compared to the length of the experiments presented here. Second, dystrophic animals treated with serotonin actually did move better than control animals (4.5 ± 1 vs. 0.5 ± 0.4 body bends per minute). Therefore, the action of serotonin on *C. elegans* muscles is not a general property of antagonists of muscle function.

We next wondered what is the critical period for serotonin treatment. To address that question we transferred a synchronized culture of animals from control plates to serotonin plates at various time points. Animals were fixed and examined at day 7, after having spent 0, 1, 2, 3, 4, 5, or 7 days on serotonin containing plates. Serotonin was active in reducing muscle degeneration in animals that had been exposed for as little as 1 day (i.e. transferred at day 6) (Fig. 2). Day 6 corresponds to the peak of degeneration in absence of treatment (Gieseler et al. 2000). The reciprocal experiment, in which animals were transferred from serotonin plates to control plates, was carried out in parallel. Interestingly, animals exposed to serotonin for only the first four days of their life and then cultured on control plates were protected (Fig. 2), despite the fact that degeneration begins only at day 5 in this model (Gieseler et al. 2000). Since serotonin is probably metabolized rapidly in *C. elegans*, this result suggests either that serotonin induces a protective mechanism that lasts several days, or that dystrophin-dependent muscle degeneration in *C. elegans* is determined during larval stages although it occurs only later in adulthood.

Since increasing serotonin levels is beneficial to *C. elegans* striated muscles in the absence of DYS-1, we wondered whether reduced serotonin levels would have a deleterious effect on the same muscles. To test this hypothesis, we looked at the muscles of *tph-1(mg280)* animals, which have reduced serotonin levels due to a mutation in the serotonin biosynthetic pathway

(Sze et al. 2000). No muscle degeneration was observed in *tph-1(mg280)* animals. However, when placed in the sensitized background *CeMyoD(cc561)*, the *tph-1* mutation resulted in a severe muscle degradation (Table 2). Thus, the negative effect of the *tph-1* mutation on *C. elegans* muscles was revealed in the *CeMyoD(cc561)* background. As we previously observed for the *dys-1* mutations, the muscle degradation caused by *tph-1(mg280)* was time-dependent. Since serotonin is a negative regulator of locomotion in *C. elegans* (Horvitz et al. 1982; Ségalat et al. 1995), *tph-1* mutants are hyperactive (Sze et al. 2000). To determine whether *tph-1(mg280); CeMyoD(cc561)* animals displayed muscle degradation because of the reduction of serotonin *per se*, or only as a consequence of hyperactivity, we constructed a *goa-1(n1134); CeMyoD(cc561)* strain. *goa-1* mutants are amongst the most hyperactive mutants known in *C. elegans* (Ségalat et al. 1995). The level of muscle degeneration in *goa-1(n1134); CeMyoD(cc561)* animals was no different from that of *CeMyoD(cc561)*, indicating that hyperactivity by itself was not the cause of muscle degeneration in *tph-1(mg280); CeMyoD(cc561)* animals (Table 2). Therefore, we conclude that muscle degeneration occurring in *tph-1(mg280); CeMyoD(cc561)* is the result of reduced serotonin levels. Altogether these

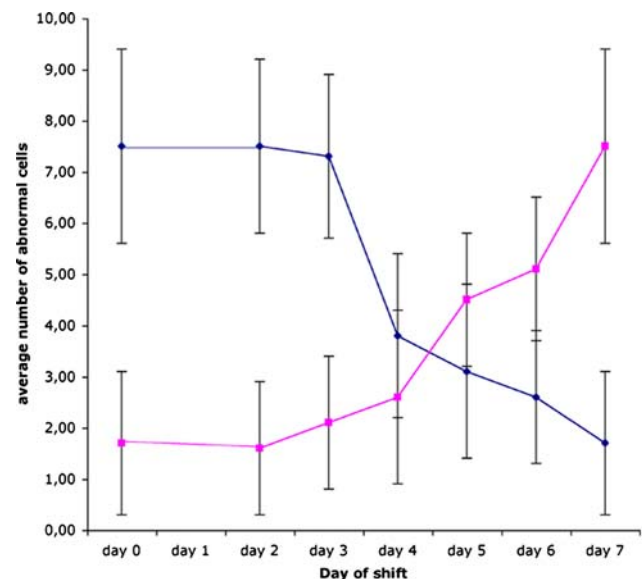


Fig. 2 Kinetics of serotonin action. Number of missing or degenerating body-wall muscle cells observed at day 7, after animals had been exposed to serotonin during various periods of time. The abscissa value represents the day animals were transferred from solvent-containing plates to serotonin-containing plates (pink squares), or the opposite (blue diamonds). Standard deviation is indicated by the vertical lines. Concentration of serotonin was 4 mg/ml. In non-treated animals, extensive muscle degeneration occurs between days 5 and 7 under these growth conditions

Table 2 Muscle defects in mutants with altered serotonin metabolism

Genotype	Number of missing or degenerating muscle cells per animal \pm s.e.m.
N2	0 \pm 0 (40)
<i>dys-1(cx18)</i>	0.1 \pm 0.05 (40)
<i>CeMyoD(cc561)</i>	0.8 \pm 0.1 (40)
<i>dys-1(cx18); CeMyoD(cc561)</i>	12.3 \pm 0.6* (40)
<i>tph-1(mg280)</i>	0.0 \pm 0.0 (40)
<i>dys-1(cx18); tph-1(mg280)</i>	0.5 \pm 0.1 (20)
<i>tph-1(mg280); CeMyoD(cc561)</i>	5.2 \pm 0.3* (20)
<i>goa-1(I134)</i>	0.0 \pm 0.0 (40)
<i>goa-1(n1134); CeMyoD(cc561)</i>	1.3 \pm 0.2 (20)

Muscle cells were observed after phalloidin staining of animals fixed 3 days after the L4-stage

Animals were grown in constant presence of food without drugs at 15°C

Mean \pm s. e. m. *different from *CeMyoD(cc561)* at $P < 0.05$. The number in parentheses is the number of scored animals

results show that serotonin facilitates striated muscle survival in *C. elegans*, and that reduction of serotonin levels leads to muscle degeneration in a sensitized background.

Discussion

In this paper we show that serotonin and compounds increasing serotonin levels block muscle degeneration in *C. elegans*. Our findings also shed light on a muscle signaling mechanism that has likely been overlooked. We previously demonstrated that prednisone, a steroid used as a palliative treatment against DMD, can also reduce dystrophin-dependent muscle degeneration in *C. elegans* (Gaud et al. 2004). Serotonin and molecules described in this paper are much more efficient than prednisone in blocking the muscle degeneration. An active concentration of 2–10 mM serotonin might seem high, but one has to keep in mind that this is the concentration in the semi-solid agar medium, and only a small fraction of the molecules diffuse through the cuticle of the animals. This serotonin concentration range is usual in *C. elegans* studies (Dempsey et al. 2005; Chao et al. 2004). We determined by HPLC that the concentration of 5-HT in whole animal is approximately 0.5 mM. This is a global estimate since it is not possible to dissect tissues from adult *C. elegans*. 5-HT concentration within the cells is probably lower than this. Other non-related compounds active on the nematode model of myopathy, such as prednisone, also work at high concentrations in the agar medium (Gaud et al. 2004; and unpub. results). However, 5-HT agonists and fluoxetine-like molecules are active at a much lower concentration. Given the variety of molecules used, we believe that the effect we observe is specific.

Do *dys-1* mutations alter serotonin signaling in *C. elegans* muscles? Only circumstantial evidence can

support this hypothesis at the moment. First, *dys-1* mutants are hyperactive (Bessou et al. 1998), a trait shared by mutants in which serotonin signaling or metabolism is affected (Sze et al. 2000; Ségalat et al. 1995). Second, the muscles of *dys-1(cx18); tph-1(mg280)* double mutants do not degenerate more than those of *dys-1(cx18)* (Table 2). Such an absence of a cumulative effect is often the consequence of mutations affecting a common biological pathway. There is no indication so far that *dys-1* mutations affect the activity of *C. elegans* serotonin receptors. However, it is possible that the absence of a functional DYS-1 protein affects components of the signaling machinery downstream of serotonin receptors, since dystrophin mutations in vertebrates destabilize the membrane and lead to mislocalization of signaling proteins (Brenman et al. 1995; Blake et al. 2002). Some genetic suppressors of *dys-1(cx18); CeMyoD(cc561)* muscle degeneration are known components of metabotropic receptor signaling in other systems (L.S., unpub. observations).

Although the effect of serotonin on vertebrate smooth muscles has been largely documented, little is known about serotonin action on skeletal muscles. Serotonin receptors have been detected in skeletal muscles of mouse embryos and adult rats, but their function in these tissues remains unknown (Lauder et al. 2000; Hajduch et al. 1999). The presence of serotonin receptors on the surface of *C. elegans* body wall muscles remains to be investigated. Injections of serotonin and imipramine at high concentration were once used to produce myopathy in rat skeletal muscles (Mendell et al. 1976). Although this might seem contradictory with the results presented here, these data indicate nonetheless that skeletal muscles are indeed responsive to serotonin. Our results are the first report that serotonin is beneficial to striated muscles and reduces dystrophy.

Acknowledgements The authors thank Theresa Stiernagle and the *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) for providing strains used in this study. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), by the french ministry of Research, and by a district (Région Rhône-Alpes) grant to L.S.

References

- Ahn AH, Kunkel LM (1993) The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* 3:283–291
- Bessou C, Giugia J-B, Franks CJ, Holden-Dye L et al (1998) Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission. *Neurogenetics* 2:61–72
- Blake D, Weir A, Newey S, Davies K (2002) Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 82:291–329
- Brennan J, Chao D, Xia H, Aldape K et al (1995) Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82:743–752
- Chao MY, Komatsu H, Fukuto HS, Dionne HM et al (2004) Feeding status and serotonin rapidly and reversibly modulate a *Caenorhabditis elegans* chemosensory circuit. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15512–15517
- Dempsey CM, Mackenzie SM, Gargus A, Blanco G et al (2005) Serotonin (5HT), fluoxetine, imipramine and dopamine target distinct 5HT receptor signaling to modulate *Caenorhabditis elegans* egg-laying behavior. *Genetics* 169:1425–1436
- Dubowitz V (2000) What is muscular dystrophy? Forty years of progressive ignorance. *J R Coll Physicians Lond* 34:464–468
- Gaud A, Simon J, Witzel T, Carre-Pierrat M et al (2004) Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul Disord* 14:365–370
- Gieseler K, Grisoni K, Ségalat L (2000) Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 10:1092–1097
- Grisoni K, Gieseler K, Mariol M, Martin E et al (2003) The *stm-1* syntrophin gene of *C. elegans* is functionally related to dystrophin and dystrobrevin. *J Mol Biol* 332:1037–1046
- Hajdúch E, Dombrowski L, Darakhshan F, Rencurel F et al (1999) Biochemical localisation of the 5-HT_{2A} (serotonin) receptor in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 257:369–372
- Hamdan F, Ungrin M, Abramovitz M, Ribeiro P (1999) Characterization of a novel serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*: cloning and expression of two splice variants. *J Neurochem* 72:1372–1383
- Hobson R, Geng J, Gray A, Komuniecki R (2003) SER-7b, a constitutively active Galphas coupled 5-HT₇-like receptor expressed in the *Caenorhabditis elegans* M4 pharyngeal motorneuron. *J Neurochem* 87:22–29
- Horvitz H, Chalfie M, Trent C, Sulston J et al (1982) Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 216:1012–1014
- Khurana T, Davies K (2003) Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat Rev Drug Discov* 2:379–390
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP et al (1987) Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50:509–517
- Lauder J, Wilkie M, Wu C, Singh S (2000) Expression of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in the mouse embryo. *Int J Dev Neurosci* 18:653–662
- Mariol MC, Segalat L (2001) Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. *Curr Biol* 11:1691–1694
- Mendell J, Silverman L, Verrill H, Parker J et al (1976) Imipramine-serotonin induced myopathy. *Neurology* 26:968–974
- Miller D, Ortiz I, Berliner G, Epstein H (1983) Differential localization of two myosins within nematode thick filaments. *Cell* 34:477–490
- Olde B, McCombie W (1997) Molecular cloning and functional expression of a serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Neurosci* 8:53–62
- Ranganathan R, Cannon S, Horvitz H (2000) MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature* 408:470–475
- Sze J, Victor M, Loer C, Shi Y et al (2000) Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature* 403:560–564
- Ségalat L, Elkes DA, Kaplan JM (1995) Modulation of serotonin-controlled behaviors by Go in *Caenorhabditis elegans* [see comments]. *Science* 267:1648–1651
- Waterston RH (1988) Muscle. In: Wood WB (eds) The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Waterston RH, Hirsh D, Lane TR (1984) Dominant mutations affecting muscle structure in *Caenorhabditis elegans* that map near the actin gene cluster. *J Mol Biol* 180:473–496
- Yamada J, Sugimoto Y, Horisaka K (1983) Simultaneous determination of tryptophan and its metabolites in mouse brain by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Anal Biochem* 129:460–463

C. Caractérisation des récepteurs à la sérotonine couplés aux protéines G de *C. elegans*

Maïté Carre-Pierrat, David Baillie, Robert Johnsen, Rhonda Hyde, Anne Hart, Laure Granger et Laurent Ségalat.

Article accepté dans *Invertebrate Neuroscience* (Springer Berlin Heidelberg)

Nous avons observé que la sérotonine réduit la dégénérescence musculaire des doubles mutants *dys-1; hlh-1* (article présenté ci-dessus). La question qui se pose est de savoir par quel(s) récepteur(s), et quelle(s) voie(s) de signalisation, passe cet effet ?

En 2003, quatre récepteurs à la sérotonine étaient connus chez *C. elegans*. SER-1, SER-4 et SER-7, qui sont 3 récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, et un récepteur canal chlore, MOD-1 (Hamdan et al., 1999; Hobson et al., 2003; Olde and McCombie, 1997; Ranganathan et al., 2000). Nous avons inactivé chacun de ces récepteurs chez les vers *dys-1; hlh-1*, afin d'observer si l'effet bénéfique de la sérotonine était diminué en leur absence. Seule l'inactivation de SER-4 a quelque peu diminué l'effet bénéfique de la sérotonine sur la dégénérescence, suggérant que la plus grande partie de cet effet passe par un ou plusieurs autres récepteurs, qui ne sont pas encore identifiés chez *C. elegans*.

Nous avons entrepris la recherche de nouveaux récepteurs à la sérotonine chez *C. elegans*, ainsi que leur caractérisation. Chez les mammifères, on connaît 7 types de récepteurs à la sérotonine : un récepteur canal ionique, et 6 types de récepteurs à 7 domaines transmembranaires, couplés aux protéines G. Nous avons choisi de nous intéresser aux récepteurs couplés aux protéines G car la littérature montre qu'ils sont reliés à de très nombreuses voies de signalisation, et car leurs gènes sont facilement identifiables. Nous avons recherché les gènes de récepteurs à 7 domaines transmembranaires dans le génome de *C. elegans*, puis par comparaison phylogénétique nous avons identifié 8 récepteurs putatifs à la sérotonine. Parmi ces 8 gènes, nous avons retrouvé les 3 gènes déjà connus : *ser-1*, *ser-4* et *ser-7*.

Chez *C. elegans*, la sérotonine contrôle plusieurs comportements, comme la ponte ou la locomotion. Nous avons étudié l'implication des 3 récepteurs à la sérotonine connus et des 5 présumés, dans chacun de ces comportements. Notre étude suggère qu'il existe une redondance fonctionnelle entre les différents récepteurs à la sérotonine chez *C. elegans*.

Cet article résume et complète les connaissances sur l'expression tissulaire et les fonctions biologiques dans lesquelles sont impliqués les 3 récepteurs à la sérotonine couplés aux protéines G déjà connus, et caractérise 5 nouveaux gènes de récepteurs couplés aux protéines G possiblement spécifiques de la sérotonine.

Characterization of the *Caenorhabditis elegans* G protein-coupled serotonin receptors

Maité Carre-Pierrat · David Baillie · Robert Johnsen · Rhonda Hyde · Anne Hart · Laure Granger · Laurent Ségalat

Received: 31 August 2006 / Accepted: 4 October 2006 / Published online: 3 November 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract Serotonin (5-HT) regulates a wide range of behaviors in *Caenorhabditis elegans*, including egg laying, male mating, locomotion and pharyngeal pumping. So far, four serotonin receptors have been described in the nematode *C. elegans*, three of which are G protein-coupled receptors (GPCR), (SER-1, SER-4 and SER-7), and one is an ion channel (MOD-1). By searching the *C. elegans* genome for additional 5-HT GPCR genes, we identified five further genes which encode putative 5-HT receptors, based on sequence similarities to 5-HT receptors from other species. Using loss-of-function mutants and RNAi, we performed a systematic study of the role of the eight GPCR genes in serotonin-modulated behaviors of *C. elegans* (F59C12.2, Y22D7AR.13, K02F2.6, C09B7.1, M03F4.3, F16D3.7, T02E9.3, C24A8.1). We also examined their expression patterns. Finally, we tested whether the most likely candidate receptors

were able to modulate adenylate cyclase activity in transfected cells in a 5-HT-dependent manner. This paper is the first comprehensive study of G protein-coupled serotonin receptors of *C. elegans*. It provides a direct comparison of the expression patterns and functional roles for 5-HT receptors in *C. elegans*.

Introduction

Serotonin (5-HT) is a neurotransmitter present in most of the animal kingdom. In mammals, serotonin controls a wide range of responses and behaviors, including temperature regulation, pain perception, sleep, aggression and feeding (for review, see Weiger 1997). Serotonin signaling is also involved in diseases such as depression, anorexia, and autism (Schloss and Williams 1998). In mammals, 5-HT acts either as a neurotransmitter or as a neurohormone, through seven classes of serotonin receptors (5-HT₁₋₇). Six of them are seven transmembrane domains, G protein-coupled receptors (GPCR) (for review, see Hartig 1997). The 5-HT₁ receptor class is subdivided into five subtypes: A, B, C, D and E, all of which can attenuate adenylate cyclase activity through G_{i/o} protein signaling. Another 5-HT receptor type, 5-HT₅, attenuates adenylate cyclase activity through G_s signaling (Amlaiky et al. 1992; Maroteaux et al. 1992; Plassat et al. 1992). In contrast, adenylate cyclase activity is activated via G_s protein signaling in 5-HT₄, 5-HT₆, and 5-HT₇ receptor types (Gerald et al. 1995; Meyerhof et al. 1993; Monsma et al. 1993). The 5-HT₂ receptor class consists of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} which couple to G_{q/11} to increase phospholipase C activity, thus increasing

Electronic supplementary material Supplementary material is available in the online version of this article at <http://dx.doi.org/10.1007/s10158-006-0033-z> and is accessible for authorized users.

M. Carre-Pierrat · L. Granger · L. Ségalat (✉)
CGMC, CNRS-UMR 5534, Université Claude Bernard
Lyon-1, Université Lyon-1, 43 bld du 11 Novembre 1918,
69622 Villeurbanne cedex, France
e-mail: segalat@cgmc.univ-lyon1.fr

D. Baillie · R. Johnsen
Department of Molecular Biology and Biochemistry,
Simon Fraser University, 8888 University Drive,
Burnaby, BC, Canada V5A 1S6

R. Hyde · A. Hart
Department of Pathology, Massachusetts General Hospital,
Center for Cancer Research and Harvard Medical School,
149-7202 13th Street, Charlestown, MA 02129, USA

inositol phosphate hydrolysis and elevating cytosolic Ca^{2+} (Foguet et al. 1992a, b; Pritchett et al. 1988). The 5-HT₃ receptor is a ligand-gated non selective cation channel (Dubin et al. 1999; Hanna et al. 2000).

The first 5-HT invertebrate receptor to be molecularly identified was the *Drosophila* 5-HT-dro1 receptor (Witz et al. 1990). It shares most similarity with the 5-HT₇ human receptor (Bard et al. 1993). Like its human counterpart, it is able to activate adenylate cyclase activity in transfected cells when stimulated by 5-HT (Bard et al. 1993; Saudou et al. 1992). Saudou et al. (1992) identified two additional 5-HT_{1A}-like receptors in *Drosophila*: 5-HT_{1ADro} and 5-HT_{1BDro}. When expressed in mammalian cells, they inhibit adenylate cyclase activity and activate phospholipase C, similar to the 5-HT₁ mammalian receptor (Gerhardt et al. 1996). These two receptors are expressed in the central nervous system of late embryos and adult flies where they are believed to play roles in motor control. A fourth *Drosophila* receptor, 5-HT_{2Dro}, is related in structure and pharmacology to mammalian 5-HT₂ receptors (Colas et al. 1995). It is expressed during early embryogenesis where it is thought to function first as a patterning gene, and later in the central nervous system of adult flies (Colas et al. 1995). Lastly, a 5-HT₁-like receptor from the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*, was cloned and found to inhibit adenylate cyclase activity when expressed in mammalian cells (Chen et al. 2004).

Several molluscan 5-HT receptors are known, two from the pond snail *Lymnea stagnalis* (Gerhardt et al. 1996; Sugamori et al. 1993), and three from *Aplysia californica* (Angers et al. 1998; Li et al. 1995). The two receptors from *L. stagnalis*, 5-HT_{1Lym} and 5-HT_{2Lym}, are related to 5-HT₁ and 5-HT₂ mammalian receptors respectively. The *A. californica* Ap5-HT_{B1} and Ap5-HT_{B2} receptors activate phospholipase C (Li et al. 1995), linking them to 5-HT₂ mammalian receptors, but their molecular structure do not resemble this class of receptors. A third *A. californica* receptor, 5-HT_{1Ap}, shares molecular features with 5-HT₁ mammalian receptors (Angers et al. 1998). Moreover, when expressed in mammalian cells, 5-HT_{1Ap} was able to inhibit adenylate cyclase activity. 5-HT receptors have also been described in the parasitic nematode *Ascaris suum* (Huang et al. 1999).

Thus, numerous receptors have been identified in invertebrates. Their type classification with respect to mammalian classes is often uneasy because numerous mammalian receptor agonists have a different spectrum in invertebrates. To our knowledge, no study has characterized the full list of 5-HT receptors in a single organism.

5-HT is also present in the nematode *Caenorhabditis elegans* (Horvitz et al. 1982) where it regulates basic behaviors including locomotion, pharyngeal pumping, egg laying and male mating (Horvitz et al. 1982; Loer and Kenyon 1993; Sze et al. 2000). More complex behaviors of the worm are also modulated by serotonin (Chao et al. 2004; Sawin et al. 2000; Zhang et al. 2005). In the past few years, four 5-HT receptors have been identified in *C. elegans*: Three are G protein-coupled receptors: SER-4, which resemble the 5-HT₁ receptors of other species (Olde and McCombie 1997), SER-1, a 5-HT₂-like receptor (Hamdan et al. 1999), and SER-7, which presents some homology to the 5-HT₇ mammalian receptor (Hobson et al. 2003). The fourth serotonin receptor is a 5-HT gated chloride channel called MOD-1 (Ranganathan et al. 2000).

Since the *C. elegans* genome is fully sequenced, since *C. elegans* is amenable to genetic studies and has several simple 5-HT-modulated behaviors, it was therefore possible to perform a comprehensive study of all of the 5-HT receptors of *C. elegans* and of their involvement in the animal behaviors.

In this study, we first tried to establish the complete list of the *C. elegans* 5-HT GPCRs. Then, we systematically described their expression patterns and their involvement in 5-HT-modulated behaviors. We also tried to determine whether the most likely candidates could modulate adenylate cyclase activity in transfected mammalian cells.

This is the first comprehensive study of proven and putative 5-HT receptors in *C. elegans*.

Materials and methods

C. elegans strains

The wild-type strain used was the Bristol N2 strain. Mutant strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center (Minnesota) and are RB745: Y22D7AR.13/*ser-4(ok512)* which is a deletion of 1,336 bp, DA1774: K02F2.6/*ser-3(ad1774)* which is a deletion of 1,560 bp, and DA1814: F59C12.2/*ser-1(ok345)* which is a putative null allele (Carnell et al. 2005). *C. elegans* strains were grown on NGM plates seeded with *E. coli* (OP50). *C. elegans* strains were grown at 15°C except for RNAi assays.

RNA interference

RNA interference was performed by feeding N2 worms with HT115 *E. coli* transformed with the

appropriate plasmid (Timmons et al. 2001). The N2 strain was preferred to the RNAi-hypersensitive *rrf-3* strain to avoid the appearance of synthetic phenotypes. The bacteria were seeded on NGM plates containing carbenicillin (25 µg/ml) and IPTG (1 mM) to induce expression of double-stranded (ds) RNA targeting the gene of interest. Control worms were grown on plates seeded with HT115 transformed with the empty vector, pL4440. Plates were used 5 days after seeding to allow bacterial growth. Animals were grown at 23°C and were exposed from hatching to adulthood to the dsRNA-producing bacteria.

Tissue expression

The expression patterns were determined by using *gfp* reporter gene fused with the promoter region of each of the gene of interest. The strains are BC10137 for M03F4.3, BC10143 for F16D3.7, BC10186 for C09B7.1/*ser-7b*, BC10208 for T02E9.3, BC10206 for F59C12.2/*ser-1* and BC13771 for C24A8.1. GFP-constructs were created by a modification of the Hobert technique (Hobert 2002; McKay et al. 2003). Promoter::GFP fusions were stitched together and then co-injected with wild-type *dpy-5* plasmid (pCeh-361) into *dpy-5(e907)* animals (Thacker et al. 2006). To isolate promoter containing regions for PCR-stitching we selected the most probable ATG start codon and used the Primer 3 program (http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) to generate appropriate primer sequences. We normally designed a 'B' primer close to the start codon (within 100 bp) or to cross the start site (in which case we mutated the start codon's ATG sequence). An 'A' primer was designed to abut against the next upstream gene, unless that gene was more than 3,000 bp away in which case we designed the 'A' primer to be approximately 3,000 bp upstream. In order to eliminate false positive PCR products we designed a nested primer (A*) immediately downstream from the 'A' primer. List of primers used (5' to 3'): M03F4.3-A GGGTCTTGAGAAAATGTGCAG, M03F4.3-A* ATTCACAAGGGACCGTTTTT, M03F4.3-B AGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTTCAACCCACGATAAGAAAATTG; F16D3.7-A CCCCTACTTTTTGCAGGACA, F16D3.7-A* CAGGACATCTTCGGACCTCA, F16D3.7-B AGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTGAAAGATGACGGCGATGAC, C09B7.1-A ATGTTTCGGCGAAGTCGATA, C09B7.1-A* TCGCGAAGTCGATAAAATC, C09B7.1-B AGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCAGGCTGTGTCTGACTGCT, T02E9.3-A TTTCTTTGATTGGGAAACA, T02E9.3-A* CTTTGATTGGGAAAACATG, T02E9.3-B AGTCGACCTGCAGGCATGCA

AGCTAGATGTTTTGTCGTCGTGGT, F59C12.-A CGCAGAAATATTTTTCAACTGAC, F59C12.-A* CAACTGACTGTTCTATTT, F59C12.-B AGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTAGGAGTGCACCTCTGAAACAA, C24A8.1-A GGCACAATTTCGGTTGAAGTT, C24A8.1-A* AACATGGTTTTTGAAGTGGAAAGT, C24A8.1-B AGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTATTTCCGATTTCGTTGATCAGT.

We used pPD95.67 variant S65C (kindly provided by A. Fire) for our marker. It contains a GFP-cassette and a region that has sequence overlap with the B primer thus allowing for PCR stitching of a promoter containing region to the GFP-cassette to make a promoter::GFP fusion. For observations, adult worms were mounted on 2% agarose pads containing 0.1% sodium azide, and were observed under a Zeiss Axiovert fluorescence microscope.

Brood size

For each gene, 12 young adult hermaphrodites were picked on a single plate. Each worm was transferred to a new NGM plate with OP50 bacteria every day for 4 days. Two days later, the number of progeny was counted on each plate and summed up for each worm. The mean and SEM values of each experiment were calculated. The means were compared by a Student's *t* test.

Eggs in utero

Synchronized gravid adults were put on 0.1% sodium azide pads and the number of eggs in utero was observed under a Zeiss microscope. Twenty worms were counted for each experiment. The mean and SEM values of each experiment were calculated. The means were compared by a Student's *t* test.

Behavioral assays

For behavioral assays, 20–30 well fed adults were washed thoroughly in M9 buffer. They were put on NGM plates without food, with or without 10 mM 5-HT (creatinine sulfate salt, 4 mg/ml, Sigma). Animals were assayed for the serotonin-dependent behaviors after 2 h at room temperature (22°C). Controls were the N2 strain for mutants and empty RNAi vector for RNAi experiments. Since not all the experiments were performed simultaneously, results were normalized to the control value of each experiment.

Egg laying The number of eggs laid in two hours was observed on plates and was divided by the number of animals on the plate.

Pharyngeal pumping The pharyngeal pumping of at least 20 animals per experiment was observed during 30-s periods. The mean and SEM values were calculated. The means were compared by a Student's *t* test.

Locomotion The number of body bends/minute was observed for at least 20 animals per experiment. The mean and SEM values were calculated. The means were compared by a Student's *t* test.

Male mating At least 20 *him-8* adult males were picked onto fresh plates without food, with or without 5-HT (4 mg/ml). After 2 h, the proportion of males displaying a mating behavior, i.e. curling ventrally their tail, was counted at four different time points separated by 2 min.

All assays were scored by an observer blind as to treatment and genotype.

cAMP assays

To express the receptors in COS-7 cells, we cloned their coding sequence into the pEGFP-N1 expression vector. The N-terminal gfp tag was used to monitor receptor expression and localization after transfection. The *gfp* construction for C09B7.1/*ser-7* was made from the yk1036g04 cDNA provided by Yuji Kohara (Mishima, Japan) inserted in pEGFP-N1 in order to couple *gfp* expression to the expression of C09B7.1/*ser-7*. The M03F4.3-*gfp* construct was made in the same way from the yk1339e08 cDNA provided by Yuji Kohara. Since no cDNA was available for F16D3.7-*gfp*, an artificial cDNA was constructed by PCR-amplifying the DNA corresponding to the exons predicted by Wormbase, and inserted in pEGFP-N1 vector. COS-7 cells were transiently transfected with 1 µg of these constructs using the FuGENE6™ (Roche, Indianapolis, IN, USA), in 12-well plates. Twenty-four hours after transfection, 1 ml of Dulbecco's modified Eagle-medium (DMEM) with 10% serum was added. 48 h after transfection, *gfp* expression was controlled under microscope. Then, the medium was aspirated the reaction mix containing 300 µM 3-isobutyl-L-methylxanthine (IBMX), 10 µM pargyline HCl with or without the tested ligand in DMEM with 10% serum was added to the cells and incubated for 15 min at 37°C. The biogenic amine tested were: 5-HT, 1 µM; dopamine, 1 µM; tyramine, 1 µM and octopamine, 1 µM, obtained from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). Reactions were terminated by aspiration of media and addition of 300 µl 0.1 M HCl. Then, intracellular cAMP levels were determined by spectrophotometry using the

Amersham cAMP Biotrak EnzymeImmunoAssay System (Indianapolis, IN, USA), in 12-well plates. Protein concentrations were determined by the method of Bradford (1976).

Results and discussion

Established and putative 5-HT G protein-coupled receptors of *C. elegans*

Defining the list of known and putative C. elegans receptors

Three bona fide *C. elegans* 5-HT GPCR receptors are already known: F59C12.2/*ser-1* (Hamdan et al. 1999), Y22D7AR.13/*ser-4* (Olde and McCombie 1997), and C09B7.1/*ser-7* (Hobson et al. 2003).

To identify additional putative 5-HT receptors of *C. elegans*, we used a multistep procedure. First, we screened the *C. elegans* genome for predicted GPCR showing homologies to human 5-HT1A and 5-HT2 receptors. The genes giving the best 50 Blast scores were selected. Then, a phylogenetic tree comprising the 50 candidates and human 5-HT and non-5-HT receptors was built by the parsimony method (not shown). Since their position in the tree was closed to human 5-HT receptors, 16 *C. elegans* GPCRs were considered as putative candidate 5-HT receptors after this first round of analysis (Y22D7AR.13, C09B7.1, M03F4.3, T02E9.3, F59C12.2, F16D3.7, K02F2.6, C52B11.3, C24A8.1, T14E8.3, F14D12.6, K09G1.4, C02D4.2, F01E11.5, F15A8.5 and Y40H4A.1). This list coincides with the *C. elegans* list of biogenic amine receptors established by Tsalik et al. (2003). A second round of analysis led to the exclusion of the last six genes from this list because their sequence revealed strong similarities with octopamine, dopamine, tyramine, or muscarinic receptors. In addition, C52B11.3 and T14E8.3 were excluded when they were functionally demonstrated to be dopamine receptors (Sugiura et al. 2005). Our final list of putative 5-HT receptors based on sequence analysis and functional data is therefore composed of eight genes, which are shown in Table 1. Our search method is validated by the fact that the three receptors already shown to be bona fide 5-HT receptors, F59C12.2/*ser-1*, Y22D7AR.13/*ser-4*, and C09B7.1/*ser-7* are included in this list. A partial alignment of the sequences is shown in Fig. 1. The full peptide alignment of the *C. elegans* 5-HT receptors is given in Fig. S1 (supplementary materials).

Table 1 Nomenclature

Gene name (cosmid)	Gene name (3 letters)	Receptor type	Functional characterisation in
F59C12.2	<i>ser-1</i>	5-HT ₂	Hamdan et al. (1999)
Y22D7AR.13	<i>ser-4</i>	5-HT ₁	Olde et al. (1997)
K02F2.6	<i>ser-3</i>	–	–
C09B7.1	<i>ser-7</i>	5-HT ₇	Hobson et al. (2003)
M03F4.3	–	–	–
F16D3.7	–	–	–
T02E9.3	–	–	–
C24A8.1	–	–	–

Classification of C. elegans receptors with respect to mammalian receptor types

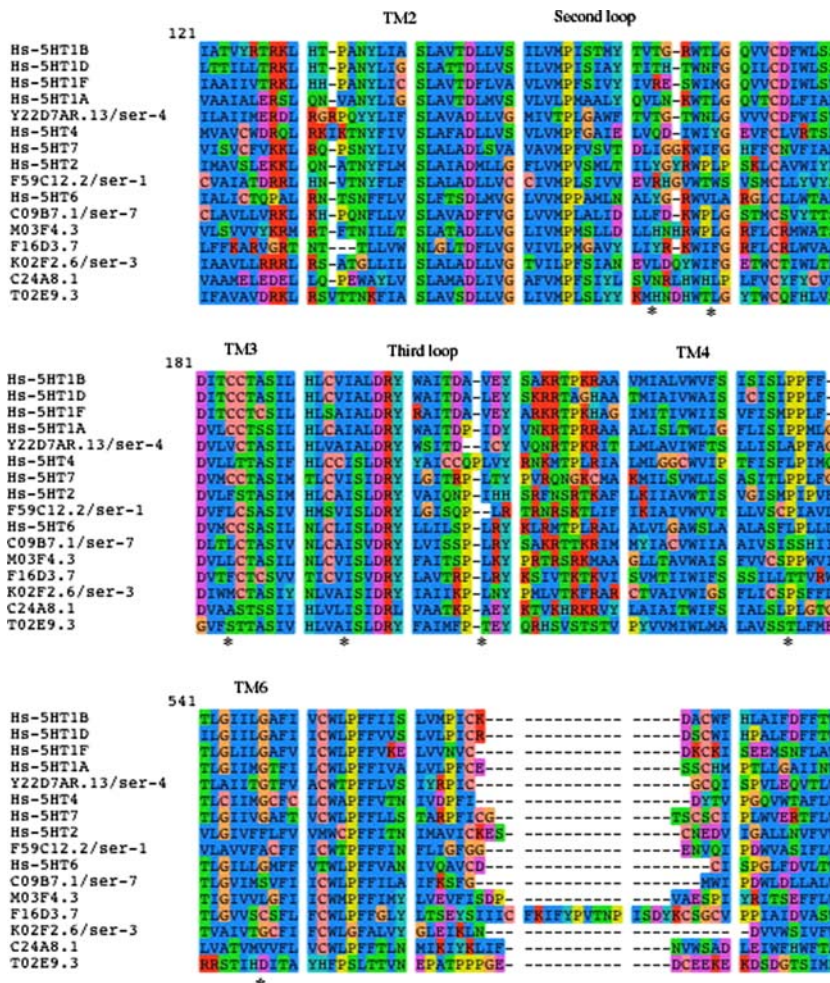
Functional data obtained on the three established receptors (F59C12.2/*ser-1*, Y22D7AR.13/*ser-4*, C09B7.1/*ser-7*) have led to the following classification: F59C12.2/*ser-1* is of 5-HT₂ type (Hamdan et al. 1999), Y22D7AR.13/*ser-4* is of 5-HT₁ type (Olde and

McCombie 1997), and C09B7.1/*ser-7* is of 5-HT₇ type (Hobson et al. 2003).

In order to gain insight into the 5-HT type of the remaining five receptors, the eight receptors have been tentatively put on a phylogenetic tree (parsimony method) with human 5-HT GPCRs of various types (Fig. 2). The first observation arising from this tree is that the bootstrap values are small; this can be explained by the high divergence between human and *C. elegans* receptors. In this tree, the three established receptors have positions which are in accordance with their known functional properties. This validates the classification appearing on the tree despite of the small bootstrap values. Positioning the remaining five receptors with respect to human 5-HT is more difficult and the results given here are only speculative at this point.

K02F2.6/*ser-3* may be of the 5-HT₄ type. This is supported by the fact that (1) it is closer to this type than to any other type on the tree, (2) some key residues are consistent with this: in the second loop, K02F2.6/*ser-3* has an aspartic acid which is common to

Fig. 1 Partial alignment of the peptide sequence of the *C. elegans* 5-HT GPCR and of the major types of human 5-HT GPCR showing type-specific residues. Only the regions of the sequences used to infer the receptor types are shown in this figure. The full alignment can be found in Fig. S1. The color code corresponds to the different amino acids classes. *Hs* Homo sapiens. The human receptor accession number is as follows: 5HT1A:NP_000515, 5HT1B:NP_000854, 5HT1D:NP_000855, 5HT1F:NP_000857, 5HT2:NP_000859, 5HT4:NP_000861, 5HT6:NP_000862, 5HT7:NP_000863. The sequence of the *C. elegans* receptors can be found on wormbase (<http://www.wormbase.org>). The numbering is with respect to the M03F4.3 sequence. Stars indicate residues positions discussed in the text. *TM* transmembrane segment



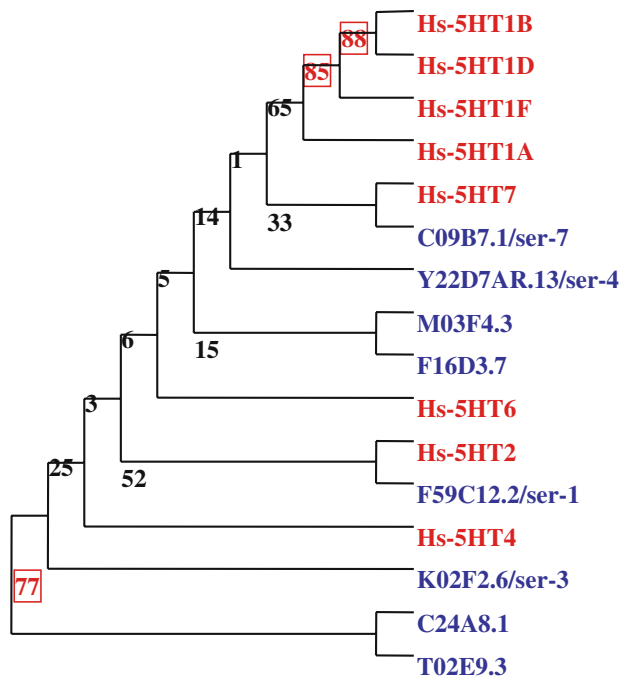


Fig. 2 Phylogenetic tree showing the position of the *C. elegans* 5-HT GPCR with respect to the human receptors. The tree was built by the maximum parsimony method. Bootstrap value are indicated at *branchpoints*

only 5-HT₄ among human receptors. Similarly, in the sixth loop, K02F2.6/*ser-3* has a serine which is close to the threonine specific of 5-HT₄ at this position. In the

sixth transmembrane segment, K02F2.6/*ser-3* and 5-HT₄ both have a cysteine, which is also rare amongst 5-HT GPCRs (Fig. 1).

C24A8.1 may be of 5-HT₂ type because it shares a number of specific residues with human 5-HT₂, which are not found in the other types: a proline in the second loop instead of a conserved glycine, a serine in the third transmembrane segment instead of a conserved cysteine, a 5-HT₂ specific leucine/isoleucine in the fourth transmembrane segment and a 5-HT₂ specific leucine in the fifth transmembrane segment (Fig. 1).

T02E9.3, although closer to C24A8.1 than to any other *C. elegans* GPCR, only shares the last two of the four residues mentioned above. It is therefore more difficult to predict its type.

M03F4.3 and F16D3.7 are even more difficult to assign to a receptor type. Their most distinctive feature is a positively charged residue in the third loop, which is unique to 5-HT₆ among human receptors, the other ones carrying a negatively charged or neutral residue at this position.

These observations are summarized in Table 2.

Tissue and stage expression

Overview

We investigated the stage and tissue expression of the eight receptors. For that purpose, we first constructed

Table 2 Receptor classification and signalling pathways

Gene	5-HT receptor type	Specificity	Pathway
F59C12.2/ <i>ser-1</i>	5-HT ₂ ^b	Mixed 5-HT ₁ and 5-HT ₂ properties ^b , low affinity for 5-HT ^e , α -methyl-5HT as an agonist ^f , mianserin as an agonist ^g	Coupled to Ca ²⁺ signaling ^b
Y22D7AR.13/ <i>ser-4</i>	5-HT ₁ ^c	Low affinity for 5-HT, overall 5-HT ₁ properties ^c	Attenuate adenylate cyclase activity ^c
K02F2.6/ <i>ser-3</i>	5-HT ₄ ?	ND	ND
C09B7.1/ <i>ser-7</i>	5-HT ₇ ^d	High affinity for 5-HT and tryptamine, no high affinity for 5-CT ^d	Activate adenylate cyclase activity ^{a,d}
M03F4.3	?	ND	Independent of adenylate cyclase activity ^a
F16D3.7	?	ND	Independent of adenylate cyclase activity ^a
T02E9.3	?	ND	ND
C24A8.1	5-HT ₂ ?	ND	ND

^a Our data

^b Hamdan et al. 1999

^c Olde et al. 1997

^d Hobson et al. 2003

^e Xie et al. 2005

^f Carnell et al. 2005

^g Dempsey et al. 2005

gfp lines carrying promoter regions of the genes. The results are given in Table 3 and are illustrated in Fig. 3.

We also matched our results with expression data obtained by different means. The first one is based on transcriptome data analysis performed on DNA microarrays (Kim et al. 2001). Clustering programs group together genes which have resembling transcriptome profiles across a large set of experimental conditions. Genes are associated together by such programs in clusters (or mountains). These clusters often contain genes which are expressed and functionally relevant to the same tissue. The 19,000 *C. elegans* genes can be grouped in 43 mountains (Kim et al. 2001). We looked on <http://www.wormbase.org> at the mountain associated with each of the eight genes of interest. This analysis showed that five of the eight genes (K02F2.6/*ser-3*, C24A8.1, M03F4.3, F16D3.7,

T02E9.3) belong either to mountain 1 (which is enriched in neuronal and muscle genes) or to mountain 13 (neuronal genes). Two other genes (F59C12.2/*ser-1* and C09B7.1/*ser-7*) belong to mountains 0 and 10, which are less specific. The mountain data for Y22D7AR.13/*ser-4* were not available (Table 3).

Another useful dataset to follow gene expression comes from serial analysis of gene expression (SAGE), which is a direct way of measuring the abundance of a gene transcript in a tissue. SAGE *C. elegans* libraries are made either from total animals at a given developmental stage, or from cell-sorted dissociated embryonic cells of a given lineage (McKay et al. 2003). Data relative to the eight genes of this study were collected on <http://www.elegans.bcgsc.bc.ca/home/> and are shown in Table 3. (A more detailed version of this Table can be found in supplementary materials, Table S1).

Table 3 Time and tissue expression

Gene	Microarray data ^a		SAGE data ^b	Gfp expression
	Mountain#	Functional group		
F59C12.2/ <i>ser-1</i>	10	ND	Young adults	Head neurons ^c , pharyngeal muscles, pharyngeal nerve ring ^d , vulval muscles, many neurons ^g , neurons of the head and the tail, motoneurons of the ventral cord, vulva muscles, uterine cells, plus in male-specific diagonal muscles ^h
Y22D7AR.13/ <i>ser-4</i>	ND		Pharynx	Head neurons ^c , RIB and RIS head interneuron classes, pharyngeal neuron, a pair of sublateral inter- or motorneurons, pair of neurons in the retrovesicular ganglion, the PVT tail neuron and either the DVA or DVC tail interneuron ^d
K02F2.6/ <i>ser-3</i>	1	Muscle and neuronal genes	Muscle cells pan-neuronal cells pharynx	Head and tail neurons ^d
C09B7.1/ <i>ser-7</i>	0	ND	Larvae neuronal and pharynx cells	M4 pharyngeal neuron ^e , MCs, M4, I2s, I3, M5, M3s, I4, I6 and M2s pharyngeal neurons, vulval muscles ^f , head and tail neurons ^{c,d}
C24A8.1	1	Muscle and neuronal genes	Neuronal cells	No expression detected ^c
M03F4.3	13	Neuronal genes	Embryos, larvae muscle and neuronal cells	Head neurons (anterior deirid, cephalic sensilla), vulva ^c , head and tail neurons ^d
F16D3.7	1	Muscle and neuronal genes	L1 larvae and young adults neuronal and pharynx cells	Body-wall muscle cells, vulva muscle cells, neurons in the head ^c
T02E9.3	13	Neuronal genes	L3 larvae	Head and tail neurons ^d no expression detected ^c

^a Data extracted from <http://www.wormbase.org>

^b Data extracted from <http://www.elegans.bcgsc.bc.ca/home/>

^c Our data

^d Tsalik et al. (2003)

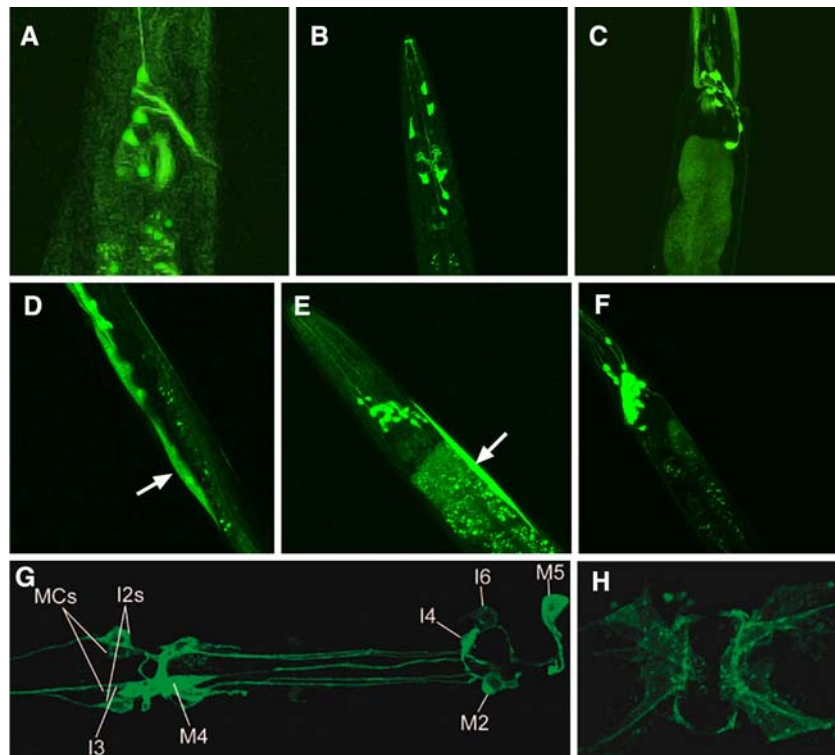
^e Hobson et al. (2003)

^f Hobson et al. (2006)

^g Dempsey et al. (2005)

^h Carnell et al. (2005)

Fig. 3 Tissue expression of *C. elegans* 5-HT GPCRs. Expression was determined by *gfp* reporter gene in *C. elegans* transgenic animals. **a** F59C12.2/*ser-1*, *gfp* expression is seen in head and pharynx neurons, as well as in pharyngeal muscles. **b** Y22D7AR.13/*ser-4*, *gfp* expression is seen in a few head and pharynx neurons. **c** M03F4.3, *gfp* is seen in head neurons. **d–f** F16D3.7, *gfp* is seen in head and tail neurons, as well as in body wall muscles (*arrows*). **g, h** C09B7.1/*ser-7*, expression is seen pharynx and head neurons, pharyngeal muscles and vulva muscles (reproduced from Hobson et al. 2006 with permission). For a complete description of *gfp* patterns, see main text and Table 3. No *gfp* staining was detected for the other genes



Two major observations arise from the SAGE data about the eight 5-HT GPCR genes studied here. First, the level of expression is weak. Four of eight genes have only 0 or 1 occurrences across the nine SAGE libraries considered. The remaining four genes have at most three occurrences in a given library, and are present in only a few of the stage-specific libraries. Second, SAGE patterns vary from gene to gene, confirming the *gfp* observations that the genes have overlapping but distinct spatial expressions.

Tissue expression of individual genes

F59C12.2/*ser-1* was reported to be expressed in most pharyngeal muscles and possibly in pharyngeal neurons by a *gfp* construct by Tsalik et al. (2003). Using a larger piece of the upstream sequences (4.9 kb instead of 1.7 kb), Dempsey et al. (2005) observed the expression of F59C12.2/*ser-1* in vulva muscles, in the ventral neural cord, in several neurons and interneurons in the head and in the PVT neuron in the tail in addition to pharyngeal muscles. By using a *gfp* transgene including a 8 kb promoter region, Carnell et al. (2005) showed additional expression of F59C12.2/*ser-1* in motoneurons of the ventral cord from L1 to adulthood, in adults vulval muscles, in adults uterine cells and a faint expression in posterior intestine cells of adult worms (Carnell et al. 2005; Dempsey et al. 2005; Tsalik et al.

2003). Our *gfp* strains also showed head neuron expression. The discrepancies in expression patterns may be due to the fact that F59C12.2/*ser-1* encodes 2 isoforms with different 5' ends. It is to be noted that F59C12.2/*ser-1* was never detected in either the HSNs neurons or the VC neuron, which are known to regulate egg-laying (Trent et al. 1983; Waggoner et al. 1998).

Y22D7AR.13/*ser-4* expression is restricted to neurons. Tsalik et al. (2003) used a reporter gene with a promoter region including 4.1 kb upstream of the predicted ATG of Y22D7AR.13/*ser-4*. They saw *gfp* expression in the RIB and RIS head interneuron classes and a fainter expression in a pharyngeal neuron, a pair of sublateral inter- or motorneurons. They also reported rare observations of expression in a pair of neurons in the retrovesicular ganglion, the PVT tail neuron and either the DVA or DVC tail interneuron. We also observed Y22D7AR.13/*ser-4* expression in head neurons which have not been identified.

Tsalik et al. (2003) used a reporter gene comprising 4.1 kb upstream of the predicted start codon of K02F2.6/*ser-3* (middle of exon 2) fused to *gfp*. They observed an expression pattern restricted to a subset of head and tail neurons but did not described it further.

C09B7.1/*ser-7* was first reported to be expressed in a restricted subset of head and tail neurons (Tsalik et al. 2003). With a slightly different *gfp* construct, Hobson

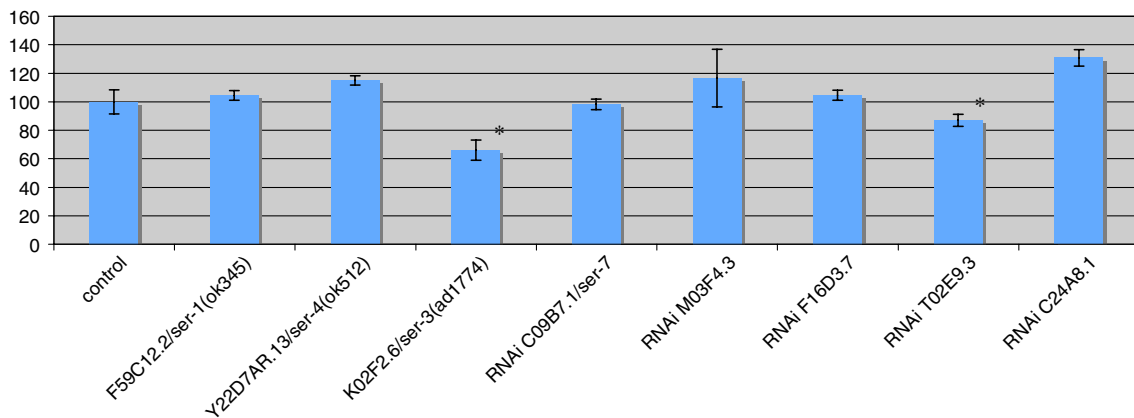


Fig. 4 Brood size. Bars indicate the number of live offspring obtained from mutant lines of genotype F59C12.2/ser-1(ok345), Y22D7AR.13/ser-4(ok512), K02F2.6/ser-3(ad1774), or from N2 animals in which the receptor genes have been inactivated by

RNAi. Since not all the experiments were performed simultaneously, the results are normalized to the control value of each experiment. *Significantly lower than control value ($P < 0.05$)

et al. (2003) reported the expression of C09B7.1/ser-7 exclusively in the M4 pharyngeal neuron from L1 to adulthood. The same group later described a more precise expression pattern with a full length functional C09B7.1/ser-7 construct, in which the *gfp* coding sequence was included in the third exon (predicted third intra-cellular loop of the receptor) (Hobson et al. 2006). Expression was observed in the MCs, M4, I2s, I3, M5 pharyngeal neurons and occasionally in the M3s, I4, I6 and M2s pharyngeal neurons. They also observed a strong fluorescence in the vulval muscles. However the transgenic strains did not carry very well, possibly because of an adverse effect. Injected at lower concentrations, their construct produced a fainter fluorescence pattern but it was sufficient to rescue the pumping phenotype (Hobson et al. 2006). We also detected *gfp* expression in unidentified head and tail neurons.

We did not detect *gfp* fluorescence in C24A8.1:*gfp* transgenic animals.

Tsalik et al. (2003) observed the expression in unidentified head and tail neurons. We observed M03F4.3 expression in some head neurons and in the vulva.

We saw F16D3.7 reporter gene expression in body-wall muscle cells, in vulva muscles and in some neurons in the head.

Tsalik et al. (2003) observed the expression of the gene in unidentified head and tail neurons. We did not detect any fluorescence with our *gfp* construct.

In summary, with the exception of C24A8.1, gene expression could be detected by *gfp* for each gene. The most striking feature of the eight genes studied here is their low expression level, as was already seen with the

SAGE data. Expression appears to be mostly in neurons, and less often in muscles. Neuron expression is a common feature of the genes, although the neurons expressing the receptors differ from gene to gene. The three well characterized 5-HT receptors of *C. elegans* (F59C12.2/ser-1, Y22D7AR.13/ser-4, and C09B7.1/ser-7) are present in the pharynx (muscles and neurons), and 4/8 receptors are expressed in the vulva muscles. The expression profile which can be inferred from the SAGE data is in line with the role played by some of the receptors in the 5-HT modulation of pharyngeal pumping and egg-laying (see below).

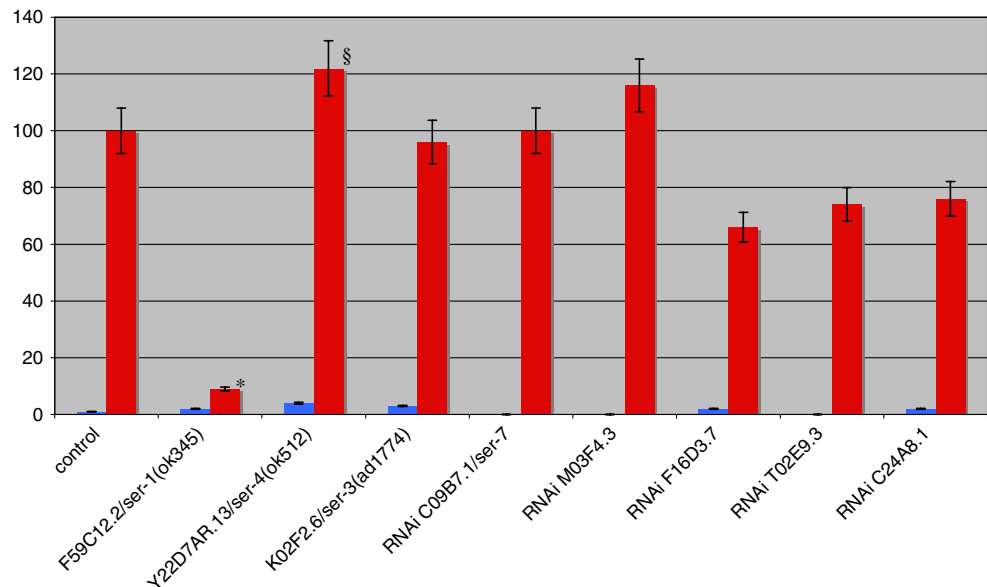
Role of 5-HT GPCR in *C. elegans* growth and behaviors

To determine the involvement of the eight receptors in the physiology and behaviors of *C. elegans*, we quantitated the brood size, as well as 5-HT modulated behaviors, in animals where the target genes had been inactivated by mutations or RNAi.

Brood size

The brood size was significantly lower for two out of the eight receptors tested (K02F2.6/ser-3, and T02E9.3) when compared to the wild-type N2 strain. A reduction of brood size upon inactivation had not been reported before for these genes. We did not investigate further the cause of the brood size reduction. Although these mutants have been backcrossed, one cannot rule out the possibility that the reduction of brood size observed here results from another mutation genetically linked to the receptor. Inactivation of

Fig. 5 Egg-laying rate. Bars indicate the number of eggs laid in a 2-h period by animals of genotype F59C12.2/*ser-1(ok345)*, Y22D7AR.13/*ser-4(ok512)*, K02F2.6/*ser-3(ad1774)*, or by N2 animals in which the receptor genes have been inactivated by RNAi. Blue bars without 5-HT, red bars with 4 mg/ml 5-HT. Since not all the experiments were performed simultaneously, the results are normalized to the control value of each experiment. *Significantly lower than control value ($P < 0.05$); §Significantly higher than control value ($P < 0.05$)



the other genes did not significantly affect the brood size (Fig. 4).

Serotonin-modulated behaviors characterized in this study

5-HT modulates numerous behaviors of *C. elegans*. Notably, it depresses locomotion, stimulates pharyngeal pumping, stimulates egg-laying (Horvitz et al. 1982), and stimulates the male mating behavior (Loer and Kenyon 1993). We characterized the response to 5-HT of animals in which the receptors had been inactivated.

Egg laying and eggs in utero

Results obtained from this study The involvement of 5-HT receptors in the egg laying behavior was quantitated in two ways. First, the egg laying rate was determined in presence and in absence of 5-HT. Secondly, the number of eggs in the uterus of non-stimulated animals was quantitated.

For the egg-laying behavior, the basic rate (in absence of food and 5-HT) of all mutants and RNAi treated animals was not different from controls. In stimulated animals (4 mg/ml 5-HT) F59C12.2/*ser-1* and Y22D7AR.13/*ser-4* responded differently from controls. F59C12.2/*ser-1* mutants were almost insensitive to 5-HT, whereas Y22D7AR.13/*ser-4* mutants appeared hypersensitive (Fig. 5).

The number of egg in the uterus of well-fed animals on NGM plates is also a good indicator of 5-HT signalling in the vulva (Trent et al. 1983). F59C12.2/*ser-1* mutants had more eggs in utero than wild-type (Fig. 6),

which correlated with its poor sensitivity to exogenous 5-HT and reveals a defect in 5-HT signalling. Conversely, Y22D7AR.13/*ser-4* animals had fewer eggs in utero, indicating that they might be slightly egg-laying constitutive (*egl-c* phenotype). K02F2.6/*ser-3* mutants had even fewer eggs in utero. However, since these animals have a reduced brood size, it is unclear whether the reduced number of eggs in utero is caused by an *egl-c* phenotype, or by a reduced fertility.

Comparison to results obtained by others The resistance to 5-HT of F59C12.2/*ser-1* mutants has already been noted by others (Carnell et al. 2005; Dempsey et al. 2005; Komuniecki et al. 2004). Dempsey et al. (2005) showed a total rescue of the 5-HT dependent egg-laying response when F59C12.2/*ser-1* is re-expressed in muscle cells whereas Carnell et al. (2005) showed only partial rescue of that response. However, Dempsey et al. (2005) also showed that re-expression of F59C12.2/*ser-1* in neurons could partially restore the egg-laying response to 5-HT. Thus, it is still unclear whether F59C12.2/*ser-1* is required in neurons or muscles or both.

Regarding Y22D7AR.13/*ser-4*, our results are similar to those of others who also observed an hypersensitivity of mutants to 5-HT (Hobson et al. 2006; Komuniecki et al. 2004). Dempsey et al. (2005) did not observe this effect. Hobson et al. (2006) found that C09B7.1/*ser-7(tm1325)* and C09B7.1/*ser-7(tm1728)* mutants were no longer sensitive to 5-HT-induced egg-laying. We did not observe such an effect. The discrepancy might come from the fact that we used RNAi inactivation.

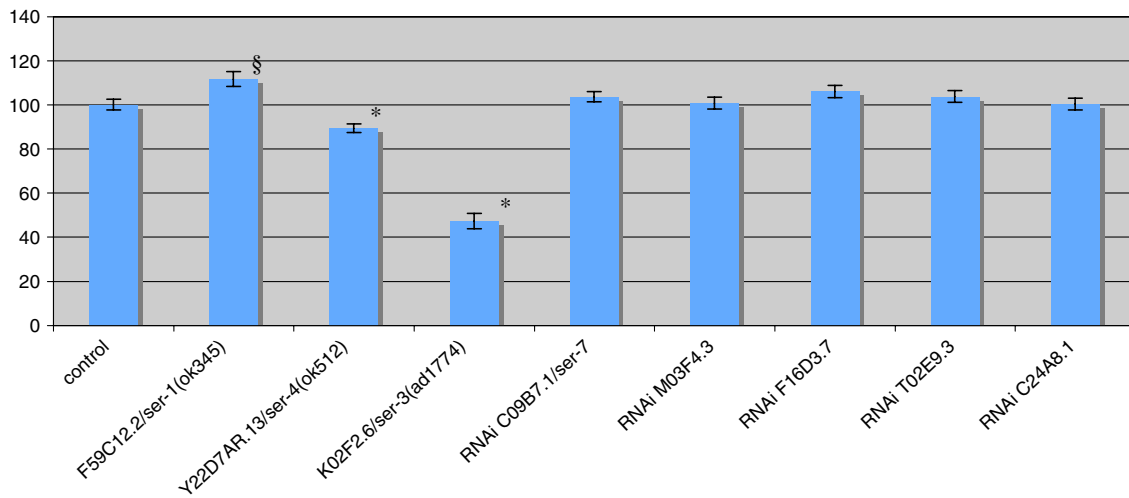


Fig. 6 Eggs in utero. Bars indicate the number of eggs present in the uterus of synchronized gravid adults of genotype F59C12.2/ser-1(ok345), Y22D7AR.13/ser-4(ok512), K02F2.6/ser-3(ad1774), or of N2 animals in which the receptor genes have been inactivated by RNAi. Since not all the experiments

were performed simultaneously, the results are normalized to the control value of each experiment. *Significantly lower than control value ($P < 0.05$); §Significantly higher than control value ($P < 0.05$)

Pharyngeal pumping

Results obtained from this study Like egg-laying, pharyngeal pumping was assayed in absence and in presence of exogenous 5-HT. On NGM plates, three genes (K02F2.6/ser-3, C09B7.1, and T02E9.3) led to a reduced pumping rate when inactivated (Fig. 7, Table 4). On 5-HT, two genes (F59C12.2/ser-1 and K02F2.6/ser-3) showed a slightly reduced pumping rate (Fig. 7). These four genes are expressed in pharyngeal neurons, or in head neurons which have not been identified precisely but which are likely to be pharyngeal neurons by their position. It is to be noted however, that the reduction of the pumping rate is small. This suggests that the regulation of pumping in response to 5-HT may be modulated by a redundant mechanism.

Comparison to results obtained by others Komuniecki et al. (2004) did not observe a significant difference of the pumping rate between the F59C12.2/ser-1(ok345) worms and the N2 worms on 5-HT. However, although not statistically significant, they observed a 10% reduction of the pumping rate compared to N2 (Komuniecki et al. 2004). The amplitude of the variation is similar to our observations.

Our results regarding Y22D7AR.13/ser-4 are in line with those of others (Hobson et al. 2006; Komuniecki et al. 2004). Using mutants of C09B7.1/ser-7, Hobson et al. (2006) observed a reduced rate of pumping on 5-HT. In our hands, it was the basal rate which was slightly reduced, and not the response to 5-HT.

Locomotion

Results obtained from this study Next, locomotion was assayed in absence and in presence of exogenous 5-HT. 5-HT is a strong modulator of the locomotion rate. Animals deficient in 5-HT signalling (like *goa-1*) (Segalat et al. 1995), are spontaneously hyperactive. Three genes (Y22D7AR.13/ser-4, K02F2.6/ser-3, and M03F4.3) led to hyperactive locomotion when inactivated (Fig. 8, Table 4). They are therefore supposed to be involved in the 5-HT modulation of locomotion. Surprisingly, on 5-HT, none of the genes tested led to an hyperactive locomotion. On the contrary, RNAi inactivated K02F2.6/ser-3 animals were more sluggish than controls, as if these animals were hypersensitive to 5-HT. It is to be noted that F16D3.7, the only genes on the list to be expressed in body wall muscles, was not different from control, indicating again that locomotion may be modulated by 5-HT at the level of the neurons, not the muscles.

Comparison to results obtained by others Similar to our findings, Komuniecki et al. (2004) did not observe any difference in the locomotion rate of F59C12.2/ser-1(ok345) mutants worms compared to N2, with or without 5-HT. Contrarily to our findings, Keating et al. (2003) did not observe any difference between locomotion rates of RNAi induced M03F4.3 worms and N2. Komuniecki et al. (2004) reported a partial resistance of Y22D7AR.13/ser-4 mutants in the presence of 5-HT whereas we found a more pronounced effect on

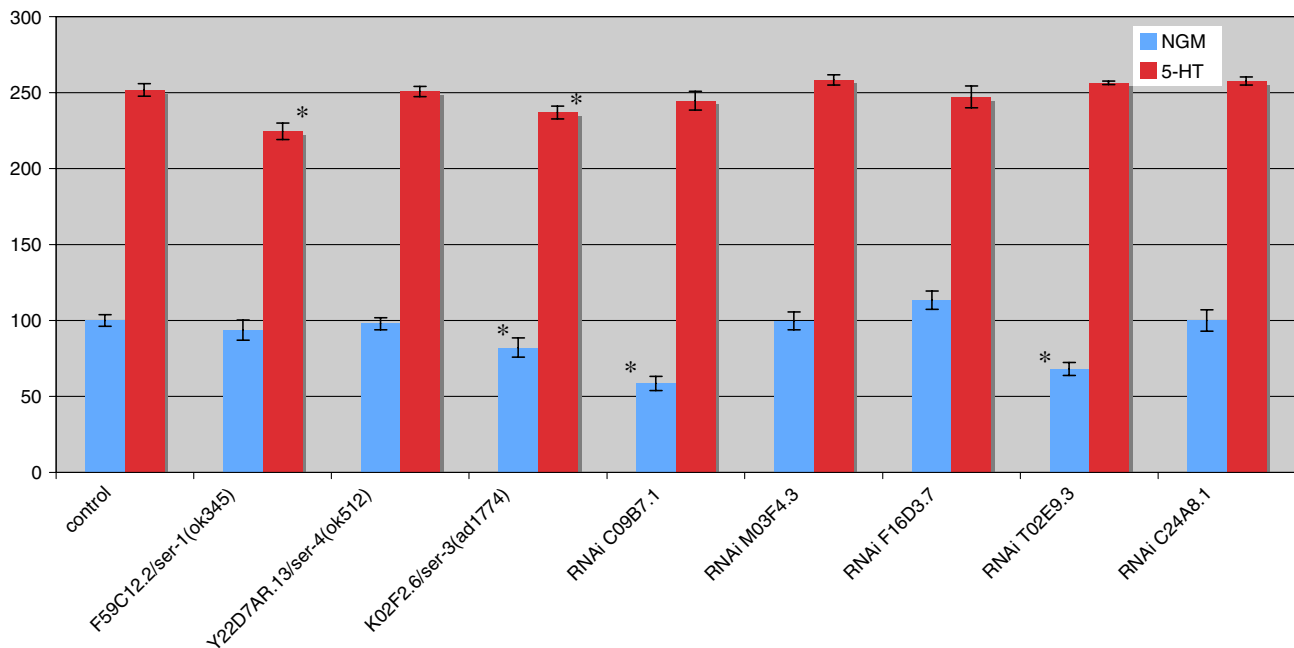


Fig. 7 Pharyngeal pumping. Bars indicate the pumping rate adults of genotype F59C12.2/ser-1(ok345), Y22D7AR.13/ser-4(ok512), K02F2.6/ser-3(ad1774), or of N2 animals in which the receptor genes have been inactivated by RNAi. Blue bars without

5-HT, red bars with 4 mg/ml 5-HT. Since not all the experiments were performed simultaneously, the results are normalized to the control value of each experiment. *Significantly lower than control value ($P < 0.05$)

the basal level. This difference might be explained by the way body bends are counted, or by the time animals are left on the 5-HT plates before they are scored.

Male mating

Results obtained from this study Finally we looked at male tail curling, a male-specific mating behavior also modulated by 5-HT (Loer and Kenyon 1993). Like previous 5-HT-dependent behaviors, male tail curling was assayed in absence and in presence of exogenous 5-HT. On regular NGM plates, no statistically significant difference could be detected between mutants and controls (Fig. 9). On 5-HT, two genes (Y22D7AR.13/ser-4 and T02E9.3) showed a clearly reduced response to 5-HT. These two genes are expressed in tail neurons. K02F2.6/ser-3 animals were significantly more active on 5-HT than controls, suggesting that these animals were hypersensitive to 5-HT.

Comparison to results obtained by others Carnell et al. (2005) found that F59C12.2/ser-1(ok345) mutants are partly resistant to 5-HT. Although our results were not statistically significant, we observed a similar tendency. This effect on male mating is consistent with the expression of the gene in the male-specific diagonal muscles (Carnell et al. 2005).

Activation of adenylate cyclase by *C. elegans* 5-HT GPCRs

Several classes of vertebrate and invertebrate 5-HT receptors activate adenylate cyclase, thereby increasing intracellular cAMP levels (Hartig 1997). Demonstration of such an activity upon 5-HT binding is a definitive proof that a candidate 5-HT receptor is a 5-HT receptor. In an attempt to demonstrate that F16D3.7, M03F4.3, and T02E9.3 were bona fide 5-HT receptors, we set out to measure their cAMP levels in response to 5-HT.

Results obtained from this study

We tested whether the putative receptors were able to stimulate adenylate cyclase activity in response to 5-HT in transfected mammalian cells. This work was performed only on C09B7.1/ser-7 which served as a positive control, F16D3.7, and M03F4.3. Attempts to clone a T02E9.3 cDNA in the expression vector were unsuccessful. cAMP level were measured in transfected cells after stimulation by 5-HT. In order to assess the ligand specificity of the receptors, the response to dopamine, tyramine, and octopamine was measured in parallel. After 5-HT stimulation, cells transfected with C09B7.1/ser-7 showed a 34 fold increase of cAMP concentration over cells transfected with the empty

Table 4 Behaviors of mutant and RNAi-treated animals

Gene	Brood size	Eggs in utero	Egg laying	Pharyngeal pumping	Locomotion	Male mating
F59C12.2/ <i>ser-1</i>	No difference ^a	More than N2 ^{a,c,d} , no difference ^b	Resistant to 5-HT ^{a,c,d,e}	Lower than N2 on 5-HT ^a , no difference ^c	No difference ^{a,e}	No difference ^a , partially resistant to 5-HT ^d
Y22D7AR.13/ <i>ser-4</i>	No difference ^a	Fewer than N2 ^{a,b} , no difference ^c	Hypersensitive to 5-HT ^{a,b,c} , no difference ^c	No difference ^{a,b,e}	Higher than N2 on control medium ^a , partially resistant to 5-HT ^e	Resistant to 5-HT ^a
K02F2.6/ <i>ser-3</i>	Smaller than N2 ^a	Fewer than N2 ^a	No difference ^a	Lower than N2 on control medium and on 5-HT ^a	Higher than N2 on control medium and partially resistant to 5-HT ^a	Hypersensitive to 5-HT ^a
C09B7.1/ <i>ser-7</i>	No difference ^a	No difference ^{a,b}	No difference ^a resistant to 5-HT ^b	Lower than N2 on control medium ^a , lower than N2 on 5-HT ^b	No difference ^a	No difference ^a
M03F4.3	No difference ^a	No difference ^a	No difference ^a	No difference ^a	Higher than N2 on control medium ^a , no difference ^f	No difference ^a
F16D3.7	No difference ^a	No difference ^a	No difference ^a	No difference ^a	No difference ^a	No difference ^a
T02E9.3	Smaller than N2 ^a	No difference ^a	No difference ^a	Lower than N2 on control medium ^a	No difference ^a	Partially resistant to 5-HT ^a
C24A8.1	No difference ^a	No difference ^a	No difference ^a	No difference ^a	No difference ^a	No difference ^a

^a Our data^b Hobson et al. (2006)^c Dempsey et al. (2005)^d Carnell et al. (2005)^e Komuniecki et al. (2004)^f Keating et al. (2003)

vector (Table 5). In addition to 5-HT, C09B7.1/*ser-7* was also responsive to dopamine, albeit to a lesser extent. 5-HT-stimulated cells transfected with F16D3.7 and M03F4.3 did not show any significant increase in cAMP levels (Table 5). These two receptors were also insensitive to the other ligands (Table 5).

These results indicate that (1) C09B7.1/*ser-7* is a *bona fide* 5-HT receptor activating adenylate cyclase, and (2) F16D3.7 and M03F4.3, if 5-HT receptors, are coupled to a signalling pathway independent of adenylate cyclase.

Comparison to results obtained by others

F59C12.2/*ser-1* was shown in COS-7 cells to have mixed 5-HT₁ and 5-HT₂ ligand binding properties. It did not respond to dopamine or octopamine (Hamdan et al. 1999). Xie et al. (2005) showed that SER-1 display a low affinity for its ligand, 5-HT ($K_i = 9.7 \mu\text{M}$). Antagonist of mammalian 5-HT₂ receptors, mianserin,

was shown to be effective to block SER-1 dependent egg-laying response to 5-HT (Dempsey et al. 2005). SER-1 appears to be coupled to a Ca²⁺ mediated signalling pathway and is likely to be coupled to a G_{αq} protein (Bastiani et al. 2003; Hamdan et al. 1999).

SER-4 exhibits low affinity for 5-HT (16 μM) (Olde and McCombie 1997). When expressed in Ltk mammalian cells and stimulated by serotonin, SER-4 was able to lower cAMP levels, showing that SER-4 can attenuate adenylate cyclase activity (Olde and McCombie 1997). The authors suggested that SER-4 might be coupled to a protein G similar to a mammalian protein G_{αi}.

When expressed in COS-7 cells, SER-7 exhibited high affinity for 5-HT and tryptamine but not the other biogenic amines (Hobson et al. 2003). SER-7 pharmacology differ from that of the 5-HT₇ mammalian receptor, to which it is closely related since it presents low affinity for many of the specific agonists of the 5-HT₇ mammalian receptor (Hobson et al. 2006).

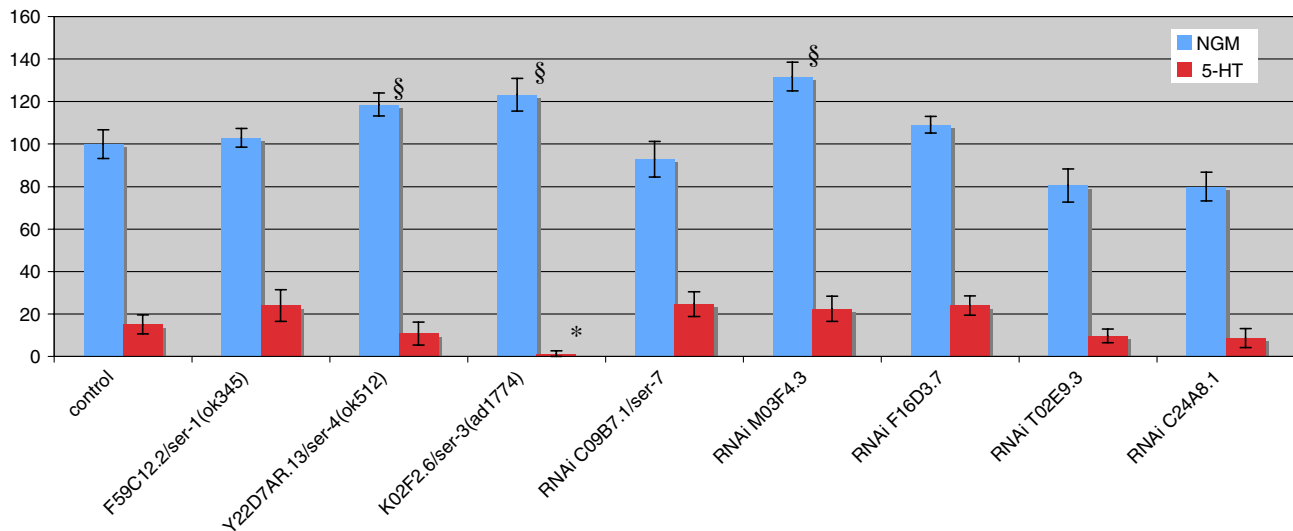
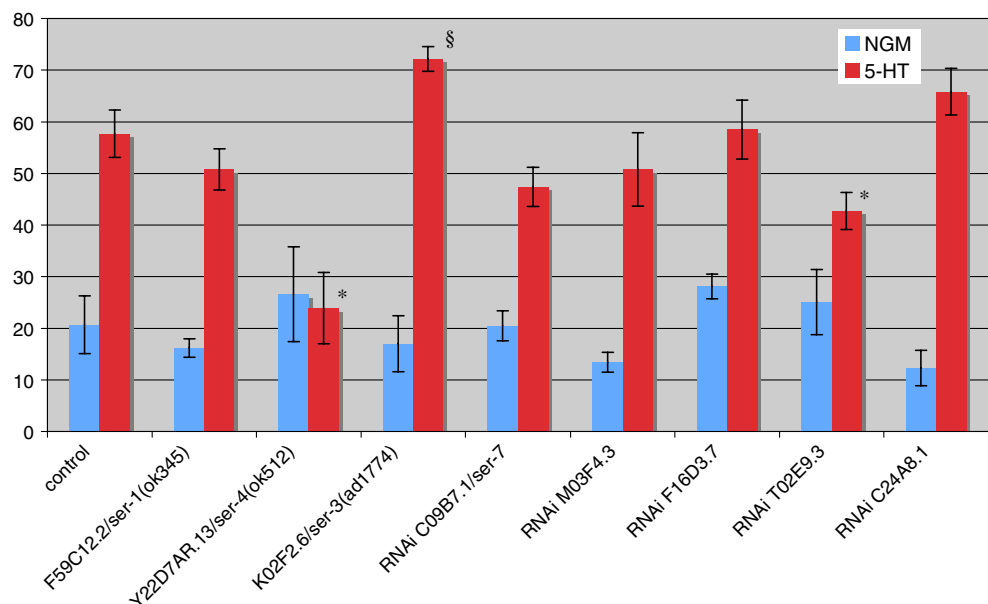


Fig. 8 Locomotion. Bars indicate the locomotion rate adults of genotype F59C12.2/ser-1(ok345), Y22D7AR.13/ser-4(ok512), K02F2.6/ser-3(ad1774), or of N2 animals in which the receptor genes have been inactivated by RNAi. Blue bars without 5-HT, red bars, with 4 mg/ml 5-HT. Since not all the experiments were

performed simultaneously, the results are normalized to the control value of each experiment. *Significantly lower than control value ($P < 0.05$), §Significantly higher than control value ($P < 0.05$)

Fig. 9 Male mating. Bars indicate the percentage of adult males displaying a male mating behavior. Blue bars without 5-HT, red bars with 4 mg/ml 5-HT. *Significantly lower than control value ($P < 0.05$), §Significantly higher than control value ($P < 0.05$)



However, such differences in the pharmacological profile of invertebrate 5-HT GPCRs are frequent and are explained by the protein sequence divergence between mammalian and worm counterparts (Tierney 2001).

Conclusion

The purpose of this study was to set the list of existing and putative *C. elegans* 5-HT GPCRs; and to charac-

terize (1) their expression, (2) their involvement in 5-HT-modulated behaviors, (3) their signalling pathways.

The basal information regarding *C. elegans* 5-HT GPCRs has been up to now fragmented in numerous papers, most of them focused on a single gene or a single behaviors, thus making comparisons uneasy. In this paper, despite the limitation of the RNAi technique which produces only partial gene inactivation for some genes tested, we have attempted to provide a comprehensive study of the receptors, reassembling

Table 5 cAMP level determination in COS-7 cells expressing known and putative 5-HT GPCR genes

Gene	cAMP levels compared to control				
	Basal	5-HT	Dopamine	Tyramine	Octopamine
Control	1.00 ± 0.05	0.99 ± 0.02	1.33 ± 0.08	1.45 ± 0.05	1.45 ± 0.05
C09B7.1/ser-7	8.97 ± 3.60*	34.00 ± 0.60*	6.35 ± 0.20*	ND	ND
F16D3.7	0.78 ± 0.19	0.58 ± 0.12	0.81 ± 0.08	1.20 ± 0.05	0.92 ± 0.10
M03F4.3	0.65 ± 0.02	0.89 ± 0.10	1.17 ± 0.30	ND	ND

Values are given in arbitrary units ± SEM

ND not determined

*Significantly different from control ($P < 0.05$). The cAMP levels are normalized to the control ($n = 4$)

both new data obtained in standardized experiments and preexisting published information.

The main conclusions of this study are:

- There are between three and eight 5-HT GPCRs in *C. elegans*.
- The *C. elegans* 5-HT GPCRs have a predominantly neuronal expression.
- Inactivation of the 5-HT GPCRs leads to behavioral profiles which differ from gene to gene, indicating a level of specificity among the receptors functions.
- Inactivation of a given 5-HT GPCRs did not totally impair any of the major 5-HT-modulated behaviors, indicating a level of redundancy among 5-HT GPCRs.
- Inactivation of at least one demonstrated and one putative 5-HT receptors lead to hypersensitivity of 5-HT, suggesting that some 5-HT receptors might act antagonistically to others.
- F16D3.7 and M03F4.3, if 5-HT receptors, are coupled to a signalling pathway independent of adenylate cyclase.

Acknowledgments The authors thank Theresa Stiernagle and the *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC) for providing various strains used in this study, and J. Starck, G. Mouchiroud and F. Morlé for technical advice. The authors thank P.O. Barome, P. Vernier, D. Rognan, and F. Bonneton for phylogenetic analysis. This work was supported by grants from the Association Française contre les Myopathies (AFM) and the European Community (MYORES) to L.S., and grants from Genome Canada and Genome BC, NSERC, and a CRC Chair to D.L.B.

References

- Amlaiky N, Ramboz S, Boschert U, Plassat JL, Hen R (1992) Isolation of a mouse “5HT1E-like” serotonin receptor expressed predominantly in hippocampus. *J Biol Chem* 267:19761–19764
- Angers A, Storozhuk MV, Duchaine T, Castellucci VF, DesGroseillers L (1998) Cloning and functional expression of an *Aplysia* 5-HT receptor negatively coupled to adenylate cyclase. *J Neurosci* 18:5586–5593
- Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL (1993) Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem* 268:23422–23426
- Bastiani CA, Gharib S, Simon MI, Sternberg PW (2003) *Caenorhabditis elegans* Galphaq regulates egg-laying behavior via a PLCbeta-independent and serotonin-dependent signaling pathway and likely functions both in the nervous system and in muscle. *Genetics* 165:1805–1822
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Carnell L, Illi J, Hong SW, McIntire SL (2005) The G-protein-coupled serotonin receptor SER-1 regulates egg laying and male mating behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 25:10671–10681
- Chao MY, Komatsu H, Fukuto HS, Dionne HM, Hart AC (2004) Feeding status and serotonin rapidly and reversibly modulate a *Caenorhabditis elegans* chemosensory circuit. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15512–15517
- Chen A, Holmes SP, Pietrantonio PV (2004) Molecular cloning and functional expression of a serotonin receptor from the Southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Mol Biol* 13:45–54
- Colas JF, Launay JM, Kellermann O, Rosay P, Maroteaux L (1995) *Drosophila* 5-HT2 serotonin receptor: coexpression with fushi-tarazu during segmentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5441–5445
- Dempsey CM, Mackenzie SM, Gargus A, Blanco G, Sze JY (2005) Serotonin (5HT), fluoxetine, imipramine and dopamine target distinct 5HT receptor signaling to modulate *Caenorhabditis elegans* egg-laying behavior. *Genetics* 169:1425–1436
- Dubin AE, Huvar R, D’Andrea MR, Pyati J, Zhu JY, Joy KC, Wilson SJ, Galindo JE, Glass CA, Luo L, Jackson MR, Lovenberg TW, Erlander MG (1999) The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT(3A) receptor are specifically modified by a 5-HT(3B) receptor subunit. *J Biol Chem* 274:30799–30810
- Foguet M, Hoyer D, Pardo LA, Parekh A, Kluxen FW, Kalkman HO, Stuhmer W, Lubbert H (1992a) Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus serotonin receptor. *Embo J* 11:3481–3487
- Foguet M, Nguyen H, Le H, Lubbert H (1992b) Structure of the mouse 5-HT1C, 5-HT2 and stomach fundus serotonin receptor genes. *Neuroreport* 3:345–348
- Gerald C, Adham N, Kao HT, Olsen MA, Laz TM, Schechter LE, Bard JA, Vaysse PJ, Hartig PR, Branchek TA et al

- (1995) The 5-HT₄ receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *Embo J* 14:2806–2815
- Gerhardt CC, Leysen JE, Planta RJ, Vreugdenhil E, Van Heerikhuizen H (1996) Functional characterisation of a 5-HT₂ receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *Eur J Pharmacol* 311:249–258
- Hamdan FF, Ungrin MD, Abramovitz M, Ribeiro P (1999) Characterization of a novel serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*: cloning and expression of two splice variants. *J Neurochem* 72:1372–1383
- Hanna MC, Davies PA, Hales TG, Kirkness EF (2000) Evidence for expression of heteromeric serotonin 5-HT₃ receptors in rodents. *J Neurochem* 75:240–247
- Hartig P (1997) Molecular biology and transductional characteristics of 5-HT receptors. In: Baumgarten H (eds) Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 175–212
- Hobert O (2002) PCR fusion-based approach to create reporter gene constructs for expression analysis in transgenic *C. elegans*. *Biotechniques* 32:728–730
- Hobson RJ, Geng J, Gray AD, Komuniecki RW (2003) SER-7b, a constitutively active Galphas coupled 5-HT₇-like receptor expressed in the *Caenorhabditis elegans* M4 pharyngeal motoneuron. *J Neurochem* 87:22–29
- Hobson RJ, Hapiak VM, Xiao H, Buehrer KL, Komuniecki PR, Komuniecki RW (2006) SER-7, a *Caenorhabditis elegans* 5-HT₇-like receptor, is essential for the 5-HT stimulation of pharyngeal pumping and egg laying. *Genetics* 172:159–169
- Horvitz HR, Chalfie M, Trent C, Sulston JE, Evans PD (1982) Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 216:1012–1014
- Huang X, Duran E, Diaz F, Xiao H, Messer WS Jr, Komuniecki R (1999) Alternative-splicing of serotonin receptor isoforms in the pharynx and muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Mol Biochem Parasitol* 101:95–106
- Keating CD, Kriek N, Daniels M, Ashcroft NR, Hopper NA, Siney EJ, Holden-Dye L, Burke JF (2003) Whole-genome analysis of 60 G protein-coupled receptors in *Caenorhabditis elegans* by gene knockout with RNAi. *Curr Biol* 13:1715–1720
- Kim SK, Lund J, Kiraly M, Duke K, Jiang M, Stuart JM, Eizinger A, Wylie BN, Davidson GS (2001) A gene expression map for *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293:2087–2092
- Komuniecki RW, Hobson RJ, Rex EB, Hapiak VM, Komuniecki PR (2004) Biogenic amine receptors in parasitic nematodes: what can be learned from *Caenorhabditis elegans*? *Mol Biochem Parasitol* 137:1–11
- Li XC, Giot JF, Kuhl D, Hen R, Kandel ER (1995) Cloning and characterization of two related serotonergic receptors from the brain and the reproductive system of *Aplysia* that activate phospholipase C. *J Neurosci* 15:7585–7591
- Loer CM, Kenyon CJ (1993) Serotonin-deficient mutants and male mating behavior in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 13:5407–5417
- Maroteaux L, Saudou F, Amlaiky N, Boschert U, Plassat JL, Hen R (1992) Mouse 5HT_{1B} serotonin receptor: cloning, functional expression, and localization in motor control centers. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3020–3024
- McKay SJ, Johnsen R, Khattra J, Asano J, Baillie DL, Chan S, Dube N, Fang L, Goszczynski B, Ha E, Halfnight E, Hollebakk R, Huang P, Hung K, Jensen V, Jones SJ, Kai H, Li D, Mah A, Marra M, McGhee J, Newbury R, Pouzyrev A, Riddle DL, Sonhammer E, Tian H, Tu D, Tyson JR, Vatcher G, Warner A, Wong K, Zhao Z, Moerman DG (2003) Gene expression profiling of cells, tissues, and developmental stages of the nematode *C. elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 68:159–169
- Meyerhof W, Obermuller F, Fehr S, Richter D (1993) A novel rat serotonin receptor: primary structure, pharmacology, and expression pattern in distinct brain regions. *DNA Cell Biol* 12:401–409
- Monsma FJ Jr, Shen Y, Ward RP, Hamblin MW, Sibley DR (1993) Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Mol Pharmacol* 43:320–327
- Olde B, McCombie WR (1997) Molecular cloning and functional expression of a serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Neurosci* 8:53–62
- Plassat JL, Boschert U, Amlaiky N, Hen R (1992) The mouse 5HT₅ receptor reveals a remarkable heterogeneity within the 5HT_{1D} receptor family. *Embo J* 11:4779–4786
- Pritchett DB, Bach AW, Wozny M, Taleb O, Dal Toso R, Shih JC, Seeburg PH (1988) Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5HT₂ receptor. *Embo J* 7:4135–4140
- Ranganathan R, Cannon SC, Horvitz HR (2000) MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature* 408:470–475
- Saudou F, Boschert U, Amlaiky N, Plassat JL, Hen R (1992) A family of Drosophila serotonin receptors with distinct intracellular signalling properties and expression patterns. *Embo J* 11:7–17
- Sawin ER, Ranganathan R, Horvitz HR (2000) *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. *Neuron* 26:619–631
- Schloss P, Williams DC (1998) The serotonin transporter: a primary target for antidepressant drugs. *J Psychopharmacol* 12:115–121
- Segalat L, Elkes DA, Kaplan JM (1995) Modulation of serotonin-controlled behaviors by Go in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 267:1648–1651
- Sugamori KS, Sunahara RK, Guan HC, Bulloch AG, Tensen CP, Seeman P, Niznik HB, Van Tol HH (1993) Serotonin receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11–15
- Sugiura M, Fuke S, Suo S, Sasagawa N, Van Tol HH, Ishiura S (2005) Characterization of a novel D₂-like dopamine receptor with a truncated splice variant and a D₁-like dopamine receptor unique to invertebrates from *Caenorhabditis elegans*. *J Neurochem* 94:1146–1157
- Sze JY, Victor M, Loer C, Shi Y, Ruvkun G (2000) Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature* 403:560–564
- Thacker C, Sheps JA, Rose AM (2006) *Caenorhabditis elegans* dpy-5 is a cuticle procollagen processed by a proprotein convertase. *Cell Mol Life Sci* 63:1193–204
- Tierney AJ (2001) Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comp Biochem Physiol A* 128:791–804
- Timmons L, Court DL, Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263:103–112
- Trent C, Tsung N, Horvitz HR (1983) Egg-laying defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 104:619–647
- Tsalik EL, Niacaris T, Wenick AS, Pau K, Avery L, Hobert O (2003) LIM homeobox gene-dependent expression of biogenic amine receptors in restricted regions of the *C. elegans* nervous system. *Dev Biol* 263:81–102

- Waggoner LE, Zhou GT, Schafer RW, Schafer WR (1998) Control of alternative behavioral states by serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* 21:203–214
- Weiger WA (1997) Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. *Biol Rev Camb Philos Soc* 72:61–95
- Witz P, Amlaiky N, Plassat JL, Maroteaux L, Borrelli E, Hen R (1990) Cloning and characterization of a *Drosophila* serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8940–8944
- Xie J, Dernovici S, Ribeiro P (2005) Mutagenesis analysis of the serotonin 5-HT_{2C} receptor and a *Caenorhabditis elegans* 5-HT₂ homologue: conserved residues of helix 4 and helix 7 contribute to agonist-dependent activation of 5-HT₂ receptors. *J Neurochem* 92:375–387
- Zhang Y, Lu H, Bargmann CI (2005) Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 438:179–184

Tableau 4, page 1 : Liste des molécules réduisant la dégénérescence chez *C. elegans*.

Les molécules réduisant la dégénérescence musculaire chez *C. elegans* sont classées par classe pharmaceutique, action principale ou indication principale chez les humains. Les actions secondaires de certaines molécules sont précisées lorsqu'elles sont connues et/ou lorsqu'elles me semblent pertinentes.

Ces informations sont tirées de <http://www.biam2.org/www/Isup.html>.

Nom	Classe pharmaceutique, action principale ou indication thérapeutique	Action secondaire
MOLECULES AGISSANT SUR LA VOIE SEROTONINERGIQUE		
Sérotinine	Neuromédiateur qui peut agir comme une neurohormone ou un neurotransmetteur	–
Imipramine chlorhydrate	Antidépresseur Inhibiteur central du recaptage de la sérotonine et de l'adrénaline	Anticholinergique central et périphérique
Trimipramine maleate	Antidépresseur Inhibiteur recaptage sérotonine et adrénaline Antihistaminique Anticholinergique central et périphérique	–
Desipramine chlorhydrate	Antidépresseur tricyclique/ Inhibiteur de la recapture de la sérotonine	Anticholinergique central
Amitryptiline chlorhydrate	Antidépresseur Inhibition recapture sérotonine, antihistaminique puissant	Anticholinergique central
Methotrimeprazine maleate	Psycholeptique Indiqué dans la psychose aiguë	Antisérotonine
Trimeprazine tartrate	Antidépresseur Antihistaminique Inhibiteur recapture sérotonine	Anticholinergique central et périphérique
Chlorprothixene chlorhydrate	Psycholeptique Indiqué dans la psychose aiguë	Anticholinergique central Antihistaminique Antisérotonine
RELAXANTS MUSCULAIRES		
Orphenadrine chlorhydrate	Relaxant musculaire Anticholinergique central Indiquée dans la maladie de Parkinson	Antihistaminique
Cyclobenzaprine chlorhydrate	Relaxant musculaire	–
Carisoprodol	Relaxant musculaire Action centrale, pas d'effets connus sur jonction neuromusculaire, ni sur fibre musculaire	–
Chlorphenesine carbamate	Relaxant musculaire	–
Chlormezanone	Relaxant musculaire par action centrale	Action périphérique : inhibition jonction neuromusculaire

D. Vue d'ensemble des molécules ayant un effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*.

Parmi les centaines de molécules testées sur les vers *dys-1; hhh-1*, plus d'une vingtaine réduisent la dégénérescence musculaire de façon significative et reproductible. Nous avons choisi de retenir les molécules réduisant la dégénérescence de plus de 30%.

Le tableau 4, ci-contre et ci-après, résume la liste des molécules et leur classe pharmaceutique. Leur action principale et les indications thérapeutiques sont indiquées par donner une idée plus précise de leur action chez les humains. Une ou plusieurs actions secondaires sont indiquées dans la dernière colonne, lorsqu'elles me semblent pertinentes. Ces informations proviennent de la Banque de données Informatique Automatisée des Médicaments (<http://www.biam2.org/www/Isub.html>).

Sur 26 molécules, 8 sont impliquées dans la voie sérotoninergique. On trouve notamment la sérotonine et beaucoup d'inhibiteur de sa recapture à la synapse, qui miment une augmentation du signal sérotoninergique.

5 molécules sont des relaxants musculaires. L'émergence de cette classe pharmaceutique était attendue, car la dégénérescence musculaire des vers *dys-1; hhh-1* est dépendante de l'activité des vers. Ceci indique probablement que les cibles des relaxants musculaires chez les mammifères sont en partie conservées chez *C. elegans*.

On peut remarquer que les molécules de la voie sérotoninergique sont plus nombreuses que les relaxants musculaires. Cependant, l'Imipramine, le Desipramine, l'Amitryptilline, la Trimeprazine et le Chlorprotixene ont pour action secondaire un effet anticholinergique. Ces molécules peuvent donc baisser la stimulation musculaire.

4 molécules sont des vasodilatateurs, qui, pour certains, sont connus pour agir sur des canaux ioniques.

2 sont des inhibiteurs d'anhydrase carbonique, et 2 des antibiotiques antibactériens.

Les 5 restantes, dont la prednisone fait partie, ont divers effets. On peut noter particulièrement le Danazol, un anabolisant, qui participe à l'augmentation de la masse musculaire.

La figure 26, ci-après, montre l'effet bénéfique de ces molécules, en pourcentage de diminution de la dégénérescence musculaire des vers *dys-1; hhh-1*. La prednisone (en rose), fait partie des molécules ayant l'effet le plus faible.

Tableau 4, page 2 : Liste des molécules réduisant la dégénérescence chez *C. elegans*.

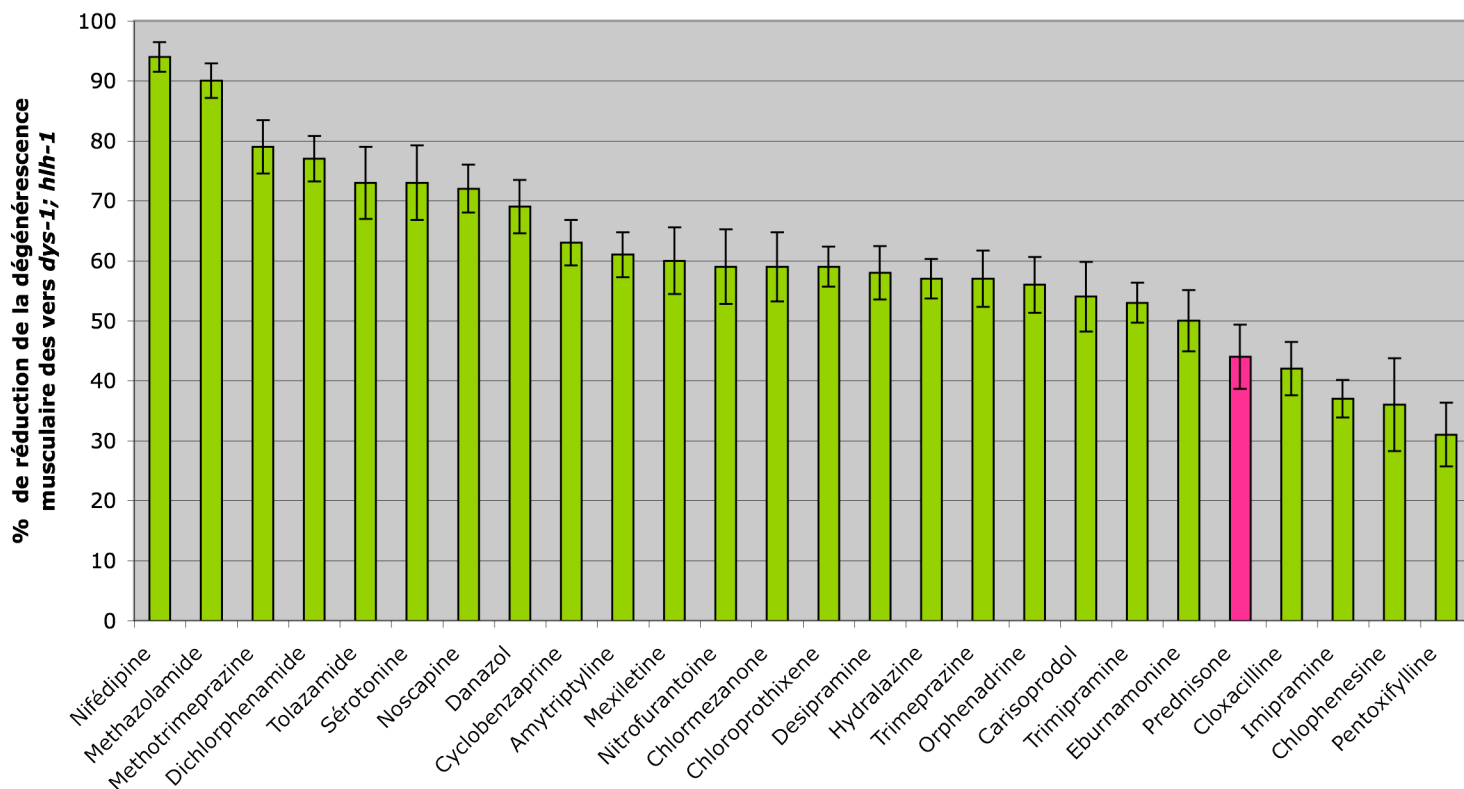
Les molécules réduisant la dégénérescence musculaire chez *C. elegans* sont classées par classe pharmaceutique, action principale ou indication principale chez les humains. Les actions secondaires de certaines molécules sont précisées lorsqu'elles sont connues et/ou lorsqu'elles me semblent pertinentes.

Ces informations sont tirées de <http://www.biam2.org/www/Isup.html>.

Nom	Classe pharmaceutique, action principale ou indication thérapeutique	Action secondaire
MOLECULES AGISSANT SUR LES CANAUX IONIQUES ET VASODILATATEURS		
Nifedipine	Vasodilatateur Inhibiteur canaux calciques dépendants du voltage	-
Hydralazine chlorhydrate	Anti-hypertenseur et Vasodilatateur périphérique par inhibition des récepteurs adrénergiques	-
Pentoxifylline	Vasodilatateur périphérique Inhibition phosphodiésterase	Stimulant du système nerveux central, entraînerait baisse TNFalpha
Eburnamonine	Vasodilatateur cerebral par des mécanismes mal connus	-
INHIBITEUR D'ANHYDRASE CARBONIQUE		
Dichlorphenamide	Inhibiteur d'anhydrase carbonique Indiqué comme diurétique	Action sur le SNC mal connue
Methazolamide	Inhibiteur d'anhydrase carbonique Indiqué comme diurétique	-
ANTIBIOTIQUES		
Cloxacilline sodique	Antibiotique antibactérien Provoque notamment la mort cellulaire	-
Nitrofurantoïne	Antibiotique antibactérien Provoque inhibition de la synthèse protéique	-
DIVERS		
Mexiletine chlorhydrate	Indiquée dans l'arythmie cardiaque pour son action de baisse de la vitesse de dépolarisation, baisse de la vitesse de conduction et prolongement du potentiel d'action	-
Noscapine	Antitussif Anti-mitotique et bloqueur d'assemblage des microtubules	Action spasmolytique sur fibres lisses
Danazol	Anabolisant Inhibition de la synthèse des hormones gonadotropes	-
Prednisone	Glucocorticoïde Indiqué dans la myopathie de Duchenne Utilisé pour ses propriétés antiinflammatoires, immunosuppresseur et antiallergique	-
Tolazamide	Indiquée dans le diabète non insulino dépendant car participe à la baisse de la glycémie	-

Figure 25 : Représentation de l'effet des molécules réduisant la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*

L'effet bénéfique des molécules réduisant la dégénérescence musculaire de *C. elegans* est représenté en pourcentage de diminution de la dégénérescence. La Nifédipine, par exemple, réduit la dégénérescence musculaire des vers *dys-1; hhh-1* de plus de 90%. Les barres d'erreur représentent la S. E. M., qui porte sur l'ensemble des tests effectués pour chaque molécule.



Chapitre IV - Les molécules freinant la dégénérescence musculaire chez les souris *mdx*

Le crible de plus de 700 molécules, réalisé chez *C. elegans*, nous a permis d'établir une liste de 26 molécules ayant un effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire. Le crible avait pour double objectif de nous renseigner sur les voies de signalisation impliquées dans la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*, et de réduire le nombre de molécules à tester chez la souris *mdx*.

Les 26 molécules et leur classe pharmaceutique sont décrites et commentées dans le chapitre III-D, « Vue d'ensemble des molécules ayant un effet bénéfique chez *C. elegans* ». On peut noter que parmi ces molécules, nous avons trouvé que la prednisone, le seul médicament palliatif prescrit aux malades atteints de la myopathie de Duchenne, avait un effet bénéfique sur la dégénérescence des cellules musculaires de *C. elegans*. Il est vraisemblable qu'une partie des mécanismes impliqués dans la dégénérescence musculaire en absence de dystrophine soit conservée chez *C. elegans*. De plus, une des classes de molécules la plus représentée est celle des relaxants musculaires, et nous savons que la dégénérescence musculaire de *C. elegans* est dépendante de l'activité musculaire. Ceci nous indique que les relaxants musculaires agissent probablement sur des cibles conservées entre *C. elegans* et les mammifères.

J'ai mis en place et effectué les premiers tests de ces molécules chez la souris *mdx* avec l'aide de Lucie Chambonnier. Par la suite, j'ai supervisé leur réalisation par Lucie Chambonnier et Guillaume Tanniou. Nous avons choisi la souris *mdx* car c'est le modèle mammifère le plus couramment utilisé, bien qu'il ne reproduise pas totalement la physiopathologie de la myopathie de Duchenne. Les souris *mdx* et leur caractéristiques physiopathologiques sont décrites dans l'introduction bibliographique.

N'étant pas un laboratoire de physiologie, et ne pratiquant pas l'histologie couramment, nous sommes allés nous former dans le laboratoire de Dominique Daegelen (Institut Cochin, Paris) aux techniques d'histologie et à l'observation de coupes histologiques de muscles de souris. Pour l'établissement d'un protocole de test des molécules, ainsi que pour l'établissement de la grille d'évaluation de l'effet des molécules, nous avons pris conseil auprès de Judy Anderson et d'Urs Rugg, dont les laboratoires pratiquent couramment des tests similaires (Archer et al., 2006; Dorchies et al., 2006).

Les effets des traitements pharmacologiques sur la dégénérescence musculaire des souris *mdx* sont évalués de nombreuses manières dans la littérature, aucun test n'étant utilisé de

façon unanime. D'après la littérature, et sur les conseils de Judy Anderson et d'Urs Ruegg, nous avons choisis trois tests discriminants, faciles à mettre en œuvre et permettant une analyse rapide. Le choix de ces tests est argumenté en même temps qu'ils sont présentés dans la partie « Matériels et Méthodes ».

L'idée directrice de ces tests de molécules chez la souris est de mettre en évidence rapidement quelques molécules parmi les 26 susceptibles d'être étudiées plus complètement. Nous avons développé des collaborations avec les laboratoires d'Isabelle Richard (Généthon, Evry), de Corinne Huchet-Cadiou (Nantes) et d'Hanns Lochmüller (Munich) afin de réaliser des tests fonctionnels poussés pour les quelques molécules qui, lors de la première série de tests, montrent un effet bénéfique sur les muscles des souris *mdx*.

A. Matériels et méthodes

A.1 Souche de souris

Nous utilisons les souris de la souche B6Ros.Cg-Dmd^{*mdx-5Cv*}, que nous nommerons *mdx-5Cv* dans le reste du manuscrit. Nous avons préféré cette souche à la souche historique C57BL/10ScSn-Dmd^{*mdx*} car, tout en présentant le même phénotype lésionnel, elles ont moins de fibres révertantes et donnent plus de petits (Danko et al., 1992; Im et al., 1996).

Cette souche de souris est de fond génétique C57BL/6Ros. Nous utilisons comme contrôle les souris de souche C57BL/6J, dont le fond génétique est similaire.

La mutation que porte la souche *mdx-5Cv* est une substitution d'une adénine (A) par une thymine (T) en position 1325 du gène de la dystrophine, dans l'exon 10. Cette substitution fait apparaître un site donneur d'épissage ectopique. Ceci entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon STOP prématuré. Cette mutation aboutit à la perte des isoformes longues (dont la forme musculaire) de la dystrophine mais pas les isoformes issues des promoteurs internes.

A.2 Molécules et voie d'administration

Les molécules testées ont été achetées chez Sigma-Aldrich (L'Isles d'Abeau, France). Ces molécules sont déjà utilisées comme médicament chez les humains et sont administrées par voie orale. Nous appliquons le même mode d'administration chez la souris, les molécules sont mélangées à leur nourriture mécaniquement par la société Provimi-Kliba (Suisse).

Nous testons deux doses pour chaque molécule : 5 fois et 20 fois la dose humaine en mg/kg/jour (5 et 20X). Ces doses ont été déterminées par rapport à la littérature qui montre que les souris ont un métabolisme plus rapide que les humains et qu'il faut donc administrer plus de molécules pour provoquer le même effet. Pour chaque dose nous testons un minimum de 5 souris.

Les souris consomment environ 15% de leur poids en nourriture par jour. Nous nous sommes basés sur cette valeur pour déterminer la concentration en molécule de nos granulés, afin que les souris en absorbant 15% de leur poids en nourriture absorbe la quantité de molécule que nous avons déterminée.

Figure 26 : Photo d'une souris en train d'effectuer le test d'endurance ou « wire test »

Les souris sont accrochées par les pattes avant à un fil de métal. On compte le nombre de chutes en 3min. Si elles tombent plus de 10 fois elles ont un score de 0, et si elles ne tombent pas elles ont un score de 10. L'opération est répétée trois fois à 1 minute d'intervalle. Le score final est l'addition des scores des trois tests de 3 minutes. Une souris sauvage a un score proche de 30 et une souris *mdx-5Cv* a un score proche de 0.



A.3 Période de traitement

Nous traitons les souris de la fin de leur deuxième semaine de vie (14^{ème} jour), à la fin de leur sixième semaine de vie (42^{ème} jour). C'est la période d'intense dégénérescence musculaire. La date de début de la dégénérescence musculaire est sujette à controverse puisque certains groupes observent des signes de dégénérescence dès le 14^{ème} jour (fibres en cours de nécrose qui sont positives avec le marquage au Bleu Evans, infiltration du muscle par des cellules mononucléées) alors que d'autres n'observent les premiers signes de dégénérescence que vers le 20^{ème} jour (Disatnik et al., 1998; Shavlakadze et al., 2004). Nous-même n'avons observé qu'à partir du 19^{ème} jour quelques fibres musculaires dégénératives dans l'*Extensor Digitorum Longus* (EDL) et le diaphragme des souris *mdx-5Cv*. Nous traitons nos souris dès le 14^{ème} jour afin que le traitement commence avant ou en même temps que l'épisode dégénératif. Cependant, du 14^{ème} au 21^{ème} jour environ les souriceaux sont traités en présence d'une mère allaitante car ils ne sont pas sevrés totalement. Ils se nourrissent en partie de lait et en partie des granulés que nous mettons dans la cage afin qu'ils puissent les atteindre. Nous ne pouvons pas contrôler quelle est leur prise de molécule journalière pendant cette période, et pour la plupart des molécules nous ne savons pas si elles passent dans le lait maternel. Vers le 21^{ème} jour nous enlevons les mères allaitantes, les petits se nourrissent seuls jusqu'à la fin du traitement. A partir de ce moment, nous pouvons contrôler approximativement quelle est la prise journalière moyenne de molécule pour les souris d'une même cage. Nous pesons la quantité de granulés consommée tous les 3 jours et nous la ramenons à une quantité moyenne de granulés absorbés par jour et par souris. Par ce système, nous estimons la prise de nourriture journalière à 14 à 17% du poids de la souris, selon l'âge.

A.4 Tests pratiqués

Les tests que nous pratiquons visent à déterminer si le traitement a eu un effet sur la dégénérescence musculaire. Ces tests ont été mis au point d'après la littérature et les conseils que nous avons pris auprès de J. Anderson (Winnipeg) et U. Ruegg (Lausanne).

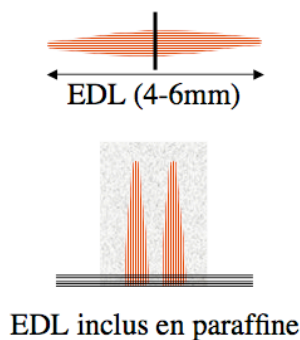
A.4.1 Test d'endurance pratiqué *in vivo*

Contrairement aux humains, les souris *mdx* (*mdx-5Cv* ou autres) ne perdent pas leur mobilité. Par contre, l'épisode de dégénérescence des premières semaines entraîne une baisse de la force et de la résistance à l'effort de leurs membres .

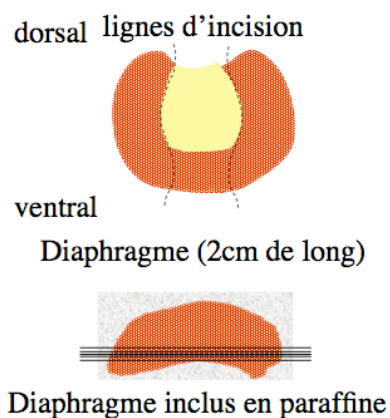
Afin d'évaluer la résistance à l'effort de leurs pattes avant, nous avons mis au point un test sur la base du « wire test » décrit par Raymackers et coll. (Raymackers et al., 2003).

Figure 27 : Schéma représentant l'inclusion et la coupe de l'EDL droit et du diaphragme

Une fois le muscle retiré de la patte et fixé au paraformaldéhyde 10% pendant 24 heures, on coupe l'EDL en son milieu pour avoir accès plus rapidement au cœur du muscle. Des coupes de 3 μ sont réalisées comme indiqué par les barres horizontales, tous les 100 μ . Leur orientation est transversale par rapport aux fibres musculaires.



Le diaphragme, après fixation dans les mêmes conditions que l'EDL, est débarrassé de sa partie tendineuse (en jaune) et l'inclusion sur la tranche intérieure permettent d'avoir accès à la partie du muscle où les fibres sont orientées de telle manière qu'en réalisant les coupes comme indiqué par les barres horizontales, on réalise des coupes transversales (coupes de 3 μ , tous les 100 μ).



Les souris sont amenées à s'accrocher avec les pattes avant à une barre métallique d'environ 2mm de diamètre (figure 26). Nous comptons le nombre de chutes qui surviennent en 3 minutes de test. Nous attribuons un score à chaque test en retirant 1 point par chute sur un total de 10 points, si la souris tombe plus de dix fois nous arrêtons le test et nous lui attribuons un score de 0. Nous testons les souris 3 fois 3 minutes avec 1 minute de repos entre chaque test. Ce test a été mis au point par rapport à la résistance des souris sauvages. Les souris C57BL/6J ne tombent pas ou très peu et ont donc un score final proche de 30, les souris *mdx-5Cv* tombent très souvent plus de dix fois dans les trois test et ont donc un score proche de 0.

Nous nous attendons à observer un déplacement de ce score vers 30 pour les traitements améliorant la résistance musculaire.

A.4.2 Tests histologiques

Prélèvement et préparation des muscles

Après le test d'endurance, les souris sont tuées par dislocation cervicale, puis disséquées. On prélève deux muscles : le diaphragme, car c'est celui qui présente l'évolution la plus proche de la pathologie humaine (Stedman et al., 1991) et l'*Extensor Digitorum Longus* (EDL), un muscle à fibres rapides, car chez l'humain ce sont les fibres rapides qui sont préférentiellement touchées par la dégénérescence musculaire due à l'absence de dystrophine (Webster et al., 1988).

On prélève le diaphragme en découpant les côtes sur lesquelles il est accroché. Il est fixé au paraformaldéhyde 10% pendant 24 heures, en 3 bains successifs. On prélève chacun des EDL, le droit et le gauche. Le gauche est fixé au paraformaldéhyde 10% pendant 24 heures minimum, en 3 bains successifs. Le droit est fixé dans du paraformaldéhyde 4% pendant 24 heures en 3 bains, et sera congelé par la suite.

Une fois fixés, les muscles sont rincés en plusieurs bains de PBS 1X. Les diaphragmes, détachés de leurs côtes, et les EDL gauches sont envoyés à Anipath (hôpital Laënnec, Lyon, France), une plateforme d'histologie qui réalise les coupes et la coloration. Les EDL droits sont congelés. Après le rinçage, ils sont imbibés de sucrose 30% sur la nuit puis inclus dans du milieu de congélation appelé TissueTek (O.C.T. Sakura, Europe). La congélation se fait par immersion du muscle dans le Tissue Tek dans de l'isopentane refroidi à -35°C. Les échantillons sont gardés au congélateur (-80°C) pour des utilisations ultérieures, notamment de l'immunomarquage.

5 coupes de diaphragme et d'EDL droit sont réalisées comme indiqué sur la figure 27. Ce sont des coupes de 3µm, tous les 100µm. Ces coupes sont colorées à l'éosine et l'hématoxyline, une coloration classique qui permet d'observer le cytoplasme des fibres en rose et leurs noyaux en violet.

Analyses histologiques

D'un point de vue histologique, les souris *mdx* ont un phénotype qui se rapproche de ce qui est observé chez les humains dans la phase dégénérative: les fibres musculaires dégèrent à partir de la fin de la deuxième semaine (Sicinski et al., 1989), et leur nécrose est accompagnée d'une réaction inflammatoire avec infiltration de cellules mononucléées dans le tissu musculaire. Par la suite, les fibres régèrent à partir de cellules souches. La régénérescence chez les souris *mdx* (5Cv et autres) est beaucoup plus importante que chez les humains, excepté dans le diaphragme.

☞ Les nouvelles fibres sont reconnaissables car leurs noyaux sont centraux, contrairement aux fibres natives dont les noyaux sont périphériques. Cette caractéristique nous permet d'évaluer la dégénérescence subie par le muscle en observant la **proportion de fibres à noyaux centraux** dans l'EDL et le diaphragme.

☞ D'autre part, après la dégénérescence, on observe un étalement des diamètres des fibres musculaires. L'intervalle normal est de 20 à 70 micromètres de diamètre, après la dégénérescence, on passe à moins de 10 à plus de 140 micromètres de diamètre, pour les muscles des membres (Louboutin et al., 1993). Nous estimons le **diamètre moyen de 200 fibres de EDL ainsi que leur variance** (unité arbitraire), avec le logiciel Image J, sur des coupes numérisées. Le diamètre des fibres est estimé à partir du plus grand cercle inscrit dans la fibre, une mesure dont Briguet et coll. ont montré qu'elle est la plus représentative du diamètre réel d'une fibre musculaire qui n'est pas parfaitement cylindrique (Briguet et al., 2004).

☞ Enfin nous observons le **nombre de fibres nécrotiques dans le diaphragme**. Elles apparaissent sous la forme de fibres parfaitement cylindriques et de couleur rouge uniforme (alors que les fibres saines sont roses avec un noyau et une membrane plus foncés).

Le diaphragme est observé au microscope, au grossissement 200 fois. Pour chaque champ de vision, on attribue un score pour les fibres à noyaux centraux et un score pour les fibres nécrotiques :

- 0 si aucune fibre (nécrotique ou à noyaux centraux) n'est observée ;
- 1, moins de 5 fibres ;
- 2, de 5 à 20 fibres ;
- 3, plus de 20 fibres ;
- 4, plus de 50% des fibres du champ.

On calcule un score moyen sur les coupes droite et gauche du même diaphragme.

Tableau 5 : Liste des molécules testées chez la souris *mdx-5Cv*

Jusqu'à présent, nous avons testé l'effet de 13 des 26 molécules bénéfiques à la dégénérescence musculaire de *C. elegans*, chez la souris *mdx*. Nous avons analysé les résultats de la Prednisone, l'Imipramine, la Trimipramine, l'Orphénadrine, la Cyclobenzaprine, l'Hydralazine, l'Eburnamonine, le Dichlorphenamide et la Methazolamide (en couleur). Nous n'avons pas fini d'analyser les résultats de l'Amitryptiline, du Chlorprothixene, du Carisoprodol et de la Nifédipine.

Nom	Classe pharmaceutique, action principale ou indication thérapeutique	Action secondaire
DIVERS		
Prednisone	Glucocorticoïde Indiqué dans la myopathie de Duchenne Utilisé pour ses propriétés antiinflammatoires, immunosuppresseur et antiallergique	–
MOLECULES AGISSANT SUR LA VOIE SEROTONINERGIQUE		
Imipramine chlorhydrate	Antidépresseur Inhibiteur central du recaptage de la sérotonine et de l'adrénaline	Anticholinergique central et périphérique
Trimipramine maleate	Antidépresseur Inhibiteur recaptage sérotonine et adrénaline Antihistaminique Anticholinergique central et périphérique	–
Amitryptiline chlorhydrate	Antidépresseur Inhibition recapture sérotonine, antihistaminique puissant	Anticholinergique central
Chlorprothixene chlorhydrate	Psycholeptique Indiqué dans la psychose aiguë	Anticholinergique central Antihistaminique Antisérotonine
RELAXANTS MUSCULAIRES		
Orphenadrine chlorhydrate	Relaxant musculaire Anticholinergique central Indiquée dans la maladie de Parkinson	Antihistaminique
Cyclobenzaprine chlorhydrate	Relaxant musculaire	–
Carisoprodol	Relaxant musculaire Action centrale, pas d'effets connus sur jonction neuromusculaire, ni sur fibre musculaire	–
MOLECULES AGISSANT SUR LES CANAUX IONIQUES ET VASODILATATEURS		
Nifedipine	Vasodilatateur Inhibiteur canaux calciques dépendants du voltage	–
Hydralazine chlorhydrate	Anti-hypertenseur et Vasodilatateur périphérique par inhibition des récepteurs adrénergiques	–
Eburnamonine	Vasodilatateur cerebral par des mécanismes mal connus	–
INHIBITEUR D'ANHYDRASE CARBONIQUE		
Dichlorphenamide	Inhibiteur d'anhydrase carbonique Indiqué comme diurétique	Action sur le SNC mal connue
Methazolamide	Inhibiteur d'anhydrase carbonique Indiqué comme diurétique	–

B. Résultats

Jusqu'à présent, nous avons testé 13 molécules sur les 26 identifiées comme bénéfiques chez *C. elegans*. Nous avons analysé les résultats de 9 d'entre elles :

- la Prednisone,
- l'Imipramine,
- la Trimipramine,
- l'Orphénadrine,
- la Cyclobenzaprine,
- l'Hydralazine,
- l'Eburnamonine,
- le Dichlorphenamide,
- et la Methazolamide.

Le tableau 5, ci-contre, dresse la liste des molécules testées et de leur classe pharmaceutique. Nous avons choisi de tester les molécules des classes pharmaceutiques prépondérantes en premier, telles que les molécules agissant dans la voie sérotoninergique ou les relaxants musculaires.

Afin d'évaluer l'état de dégénérescence des muscles de souris traitées nous avons mis en place un graphe de décision (figure 28) qui repose sur les quatre tests décrits auparavant :

- score de test d'endurance,
- pourcentage de fibres à noyaux centraux de l'EDL gauche,
- variance du diamètre de ces fibres,
- et score global du diaphragme pour les fibres nécrotiques et à noyaux centraux.

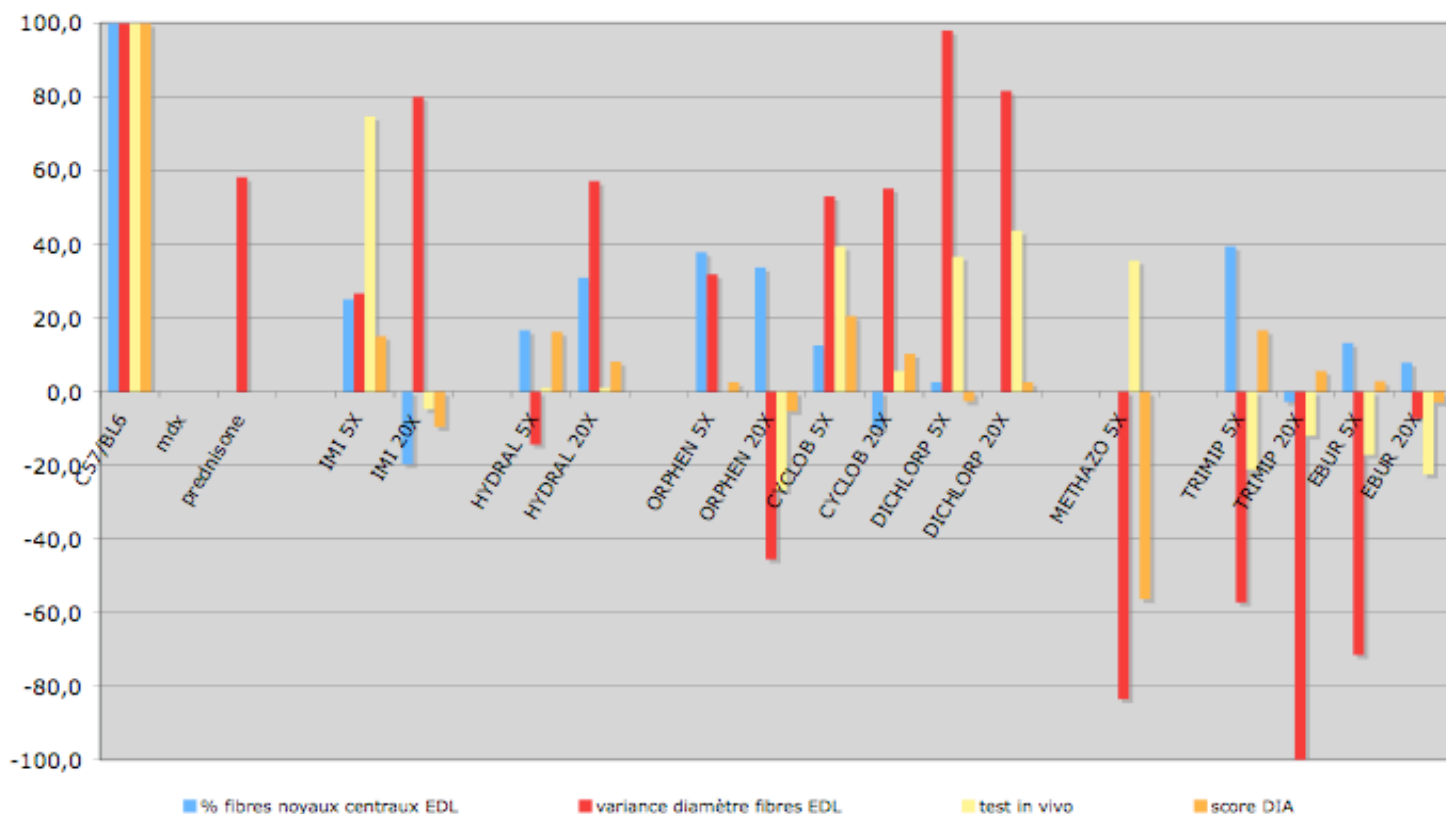
Ces quatre critères ont été normalisés par rapport aux souris sauvages (C57BL/6J) d'une part, qui représentent l'état musculaire normal et ont une valeur arbitraire de 100, et par rapport aux souris *mdx-5Cv* témoins de chaque expérience, qui ont une valeur de 0. Cette représentation permet de voir rapidement si les souris testées se rapprochent des valeurs des souris sauvages (vers le haut du graphe), ou plutôt des souris *mdx-5Cv* (ligne des abscisses), voire ont un état musculaire encore plus dégradé que les *mdx-5Cv* (vers le bas du graphe). Ce graphique nous sert d'indicateur de tendance. Si la tendance est à l'amélioration, nous recommençons les tests sur un plus grand nombre de souris (10 à 15 souris par groupe), afin de confirmer cette tendance. D'autre part, nous faisons pratiquer des tests physiologiques plus poussés sur les souris traitées :

- force développée par un muscle entier, dans des conditions normales ou après une fatigue,
- propriétés électrophysiologiques de fibres musculaires isolées, *etc.*

Figure 28 : Graphique d'évaluation de la dégénérescence musculaire des souris *mdx5Cv* après traitement

Les souris sauvages (notées ici C57BL6) sont à 100 pour ces 4 mesures. Les souris *mdx5Cv* (notées ici *mdx*) sont à 0. Les mesures des souris traitées sont rapportées relativement à cette échelle.

Le pourcentage des fibres à noyaux centraux de l'EDL est représenté en bleu. En rouge, la variance de diamètre des fibres de l'EDL. En jaune, le score du test d'endurance, et en orange, le score du diaphragme.



IMI : Imipramine

HYDRAL : Hydralazine

ORPHEN : Orphenadrine

CYCLOB : Cyclobenzaprine

DICHLORP : Dichlorphenamide

METHAZO : Methazolamide

TRIMIP : Trimipramine

EBUR : Eburnamonine

La figure 28 représente notre graphe de décision pour les neuf molécules dont nous avons terminé les analyses. On peut voir clairement que les traitements à :

- l'Imipramine 5X,
- l'Hydralazine 20X,
- la Cyclobenzaprine 5X, et dans une moindre mesure 20X,
- et au Dichlorphénamide 5 et 20X,

tendent à rapprocher les résultats des souris traitées de ceux des souris sauvages d'une façon générale.

Nous avons testé la Prednisone en tout premier. Nous l'avons testé en injections sous-cutanées, à 1mg par kg par jour. Nous n'avons pas encore mis en place le test d'endurance, ni les scores du diaphragme à ce moment-là. Les souris traitées à la Prednisone présentent une moins grande variance du diamètre des fibres musculaires de l'EDL, ce critère les rapproche des souris sauvages. Par contre, le nombre de fibres à noyaux centraux est le même que chez les souris *mdx-5Cv*.

Le traitement à l'Hydralazine 20X améliore l'état de l'EDL, et dans une moindre mesure du diaphragme. Cette amélioration d'un point de vue histologique ne semble pas accompagnée d'une amélioration fonctionnelle. Pour l'instant, nous n'avons pas poussé les expériences plus loin concernant cette molécule,.

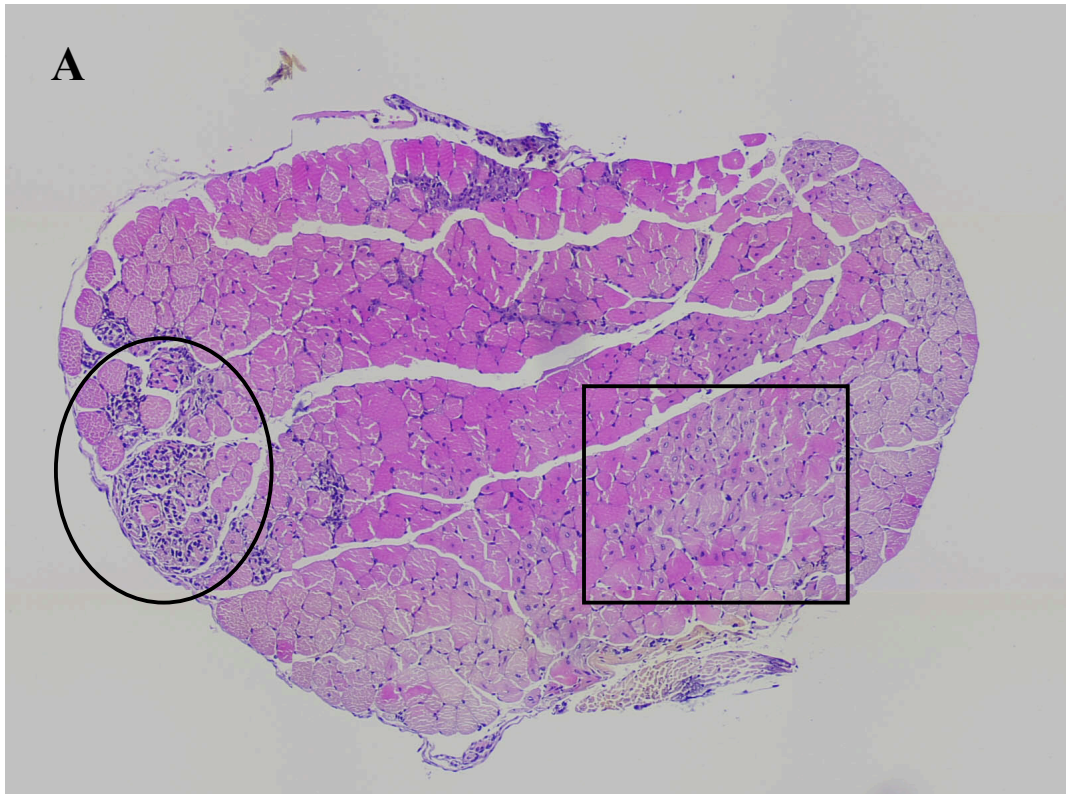
Le traitement à la Cyclobenzaprine 5X semble apporter une amélioration histologique et fonctionnelle des muscles des souris *mdx-5Cv*. Les tests réalisés par Alexandra Divet, dans le laboratoire de Corinne Huchet-Cadiou à Nantes, ne confirment pas l'amélioration fonctionnelle : les souris n'ont pas de meilleurs scores pour les tests *in vivo* de mesure de la force et de la résistance à l'effort des membres supérieurs. Cependant, les tests physiologiques montrent que les fibres musculaires de souris traitées à la Cyclobenzaprine 5X développent une tension maximale supérieure à celle des fibres de souris *mdx5Cv* contrôles, et qui se rapproche de celle des fibres des souris sauvages.

Nous avons recommencé le traitement à la Cyclobenzaprine 5X sur 15 souris *mdx-5Cv*. Le test est terminé, mais pas encore analysé.

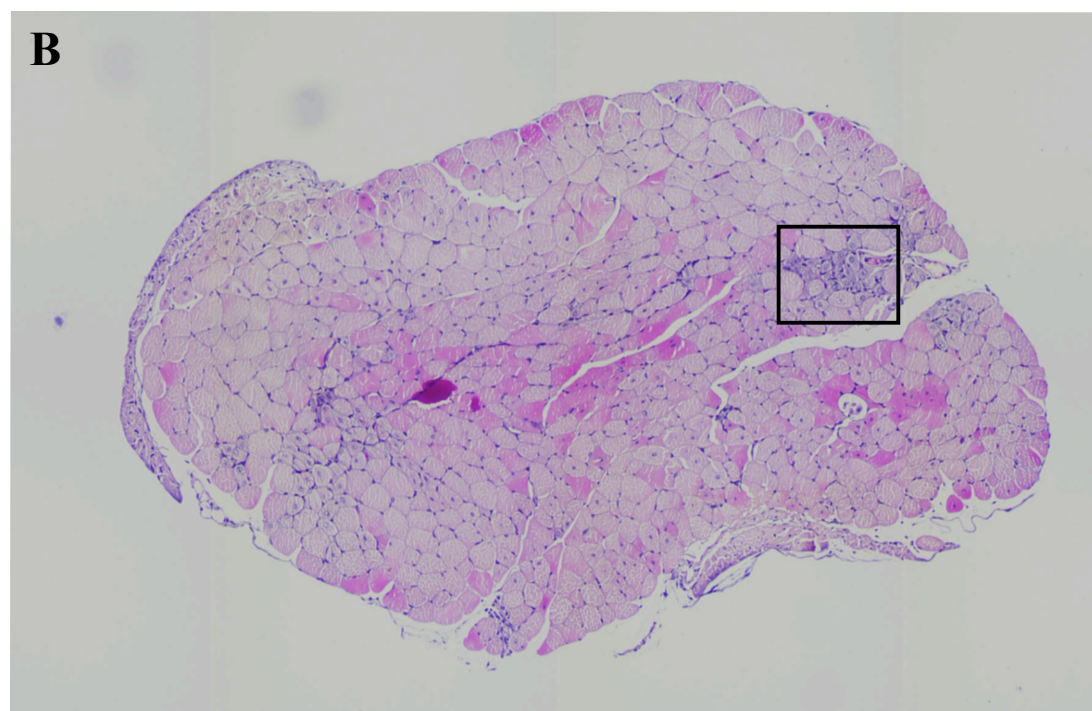
Les traitements à la Dichlorphénamide 5 et 20 X montrent tous les deux une tendance à l'amélioration pour la variance des diamètres de l'EDL et le test d'endurance. On ne constate pas d'amélioration en ce qui concerne le pourcentage de fibres à noyaux centraux, ni en ce qui concerne l'état du diaphragme.

Figure 29 : Photos de coupe d'*Extensor Digitorum Longus* (EDL) de souris *mdx* traitée à l'Imipramine 5X et contrôle

Les coupes ont été réalisées sur des EDL fixés et inclus en paraffine par N. Gadot (Anipath, Laënnec, Lyon). Ce sont des coupes transversales de 3 microns, réalisées au centre de l'EDL gauche des souris. Ces coupes ont été numérisées au grossissement 40 fois.



A Coupe de l'EDL d'une souris *mdx5Cv* témoin de l'expérience Imipramine (femelle 3). L'encadré souligne une zone de fibres à noyaux centraux. D'autres fibres de ce type sont visibles dans l'EDL. Le cercle souligne une zone d'infiltration par des cellules mononucléées. Cet EDL a subi une forte dégénérescence, et subissait probablement le phénomène inflammatoire au moment de la coupe suite à la nécrose des fibres.



B Coupe de l'EDL d'une souris *mdx5Cv* traitée à l'Imipramine 5X, J14 à J 42 (femelle 2). Sur cette coupe on remarque moins de fibres à noyaux centraux et pas ou très peu d'infiltration de cellules mononucléées. Cet EDL a vraisemblablement subi moins de dégénérescence.

Nous avons recommencé un test de traitement à la Dichlorphénamide 5X sur 15 souris. Les test est terminé, mais pas analysé.

Les souris traitées à l'Imipramine 5X se rapprochent des souris sauvages pour les quatre critères : elles présentent moins de fibres à noyaux centraux et la variance du diamètre de ces fibres est moins élevée, ce qui indique probablement que leur EDL gauche a subi moins de dégénérescence. Elles résistent beaucoup mieux que les souris *mdx-5Cv* au test d'endurance, ce que nous interprétons par un gain fonctionnel. Leur diaphragme semble être en meilleur état que celui des souris *mdx-5Cv*. De façon globale, ces souris vont mieux, tant au niveau histologique, qu'au niveau fonctionnel.

Les tests réalisés par Alexandra Divet montrent que le gain fonctionnel est réel, et que les fibres musculaires des souris traitées développent une tension maximale plus proche de celle des fibres de souris sauvages.

Le traitement à l'Imipramine 20X ne procure pas les mêmes bénéfices, seule la variance des diamètres des fibres de l'EDL est améliorée. Nous avons recommencé des traitements à l'Imipramine à des doses moins fortes (0,4X et 2X) pour voir si l'action bénéfique de cette molécule est conservée à une dose moins forte, voire améliorée.

La figure 29 montre des images de coupes transversales d'EDL de souris *mdx-5Cv* témoins et traitées à l'imipramine 5X. Dans la partie droite de la coupe de l'EDL de souris *mdx-5Cv* non traitée (partie encadrée), on peut voir un foyer étendu de fibres à noyaux centraux. On voit aussi l'infiltration de petites cellules mononucléées dans la partie gauche de la coupe, certainement des cellules du phénomène inflammatoire.

Au contraire, sur la coupe de l'EDL d'une souris *mdx-5Cv* traitée à l'imipramine 5X, on ne voit pas d'infiltration de cellules mononucléées et on voit moins de fibres à noyaux centraux.

Cette figure illustre le fait que les souris *mdx5Cv* traitées à l'Imipramine 5X ont vraisemblablement subi moins de dégénérescence.

Jusqu'à présent nous avons testé et analysé les résultats de 9 molécules sur les 26 issues du crible pharmacologique chez *C. elegans*. Nous avons jugé bon de continuer l'étude de la Cyclobenzaprine et de l'Imipramine par des tests de physiologie du muscle. Seul le traitement à l'Imipramine 5X procure une amélioration histologique corrélée avec une amélioration de l'endurance des muscles, et de la tension maximale développée par les fibres musculaires.

DISCUSSION

La myopathie de Duchenne et la myopathie de Becker sont deux maladies héréditaires, qui se caractérisent principalement par une dégénérescence progressive des muscles squelettiques. Le gène responsable de ces maladies a été identifié il y a presque 20 ans : c'est le gène de la dystrophine. Dès la découverte de ce gène et jusqu'à aujourd'hui, de très nombreuses études ont permis d'en apprendre plus sur la dystrophine : les mutations touchant son gène et leur fréquence, sa localisation dans les fibres musculaires et ailleurs, ainsi que les protéines qui lui sont liées. Parallèlement, de non moins nombreuses études ont été menées afin de trouver des thérapies permettant de freiner la progression de ces maladies, voire d'éviter leur apparition en remplaçant le gène défectueux par une copie saine : ce sont les thérapies géniques et cellulaires. Bien que prometteuses, ces thérapies ne sont pas encore au point. D'un autre côté, les traitements pharmacologiques dont nous disposons actuellement, Prednisone et Déflazacort, ne permettent de freiner l'avancée de la dégénérescence que très légèrement, et engendrent de nombreux effets indésirables. A ce jour, il n'existe toujours pas de traitement efficace contre ces maladies, et ceci en partie parce que nous ne savons pas précisément comment l'absence de la dystrophine provoque la dégénérescence des fibres musculaires.

Mes travaux de thèse visent tous à répondre à la question :

Quels sont les mécanismes de la dégénérescence musculaire due à l'absence de la dystrophine ?

Nous avons tenté de répondre à cette question en étudiant le problème sous différents aspects, dans deux modèles animaux (figure 15).

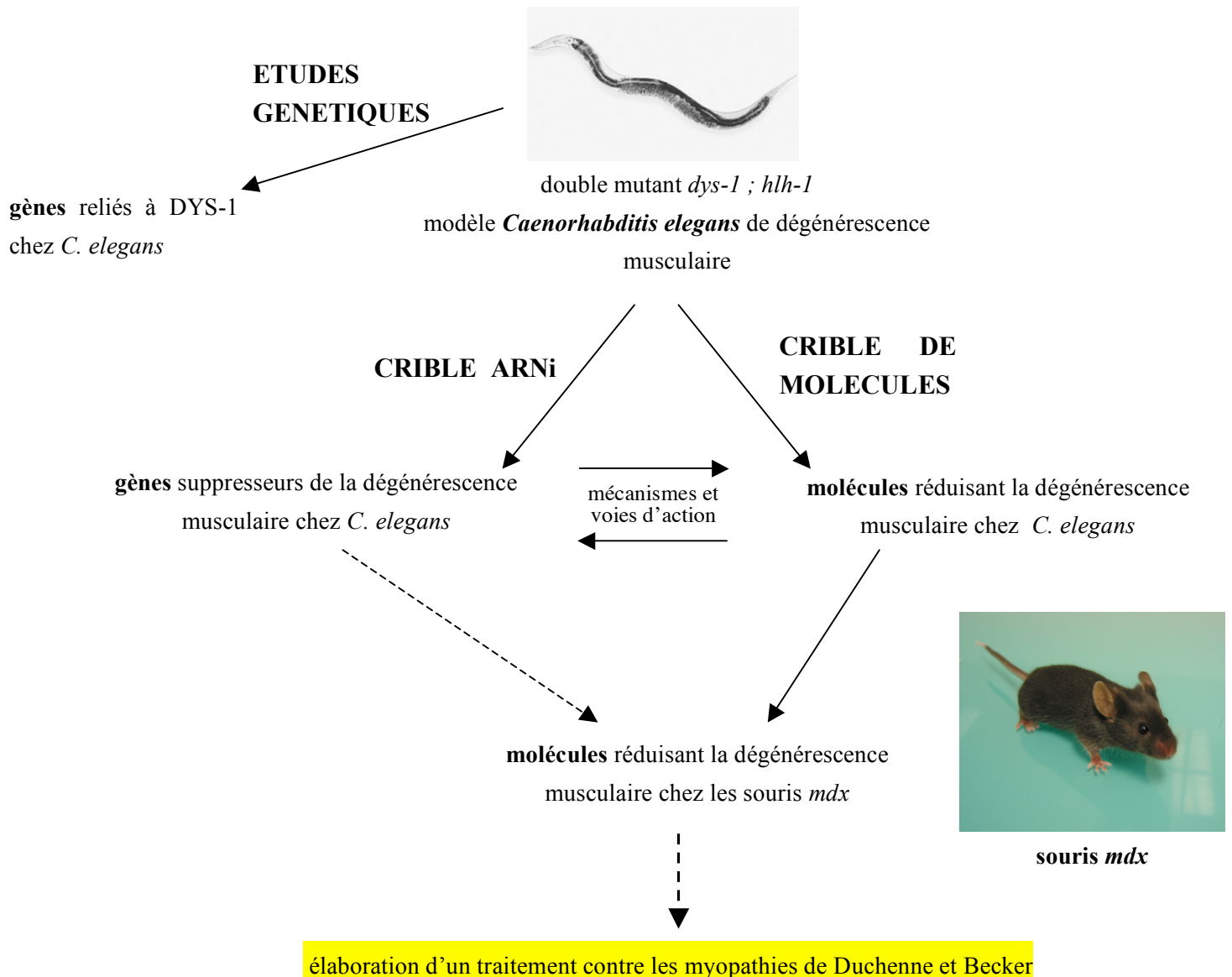
Figure 15 : Stratégie d'étude au laboratoire des mécanismes de la dégénérescence musculaire chez *C. elegans* et chez la souris

Nous voulons découvrir quelles sont les fonctions de la dystrophine, et les mécanismes moléculaires impliqués dans la dégénérescence musculaire en son absence. Nous utilisons *C. elegans* pour :

- rechercher et étudier les gènes reliés à DYS-1, l'homologue de la dystrophine,
- rechercher des gènes impliqués dans la dégénérescence musculaire (crible ARNi),
- rechercher des molécules capables de réduire cette dégénérescence.

Le but de ces études chez *C. elegans* est d'utiliser la simplicité de cet organisme peu coûteux, et sa non redondance génétique, pour découvrir des mécanismes masqués chez les mammifères. Le crible de molécules se poursuit chez la souris *mdx*, afin de tester si les quelques molécules (parmi plus de 700) ayant montré un effet bénéfique sur la dégénérescence de *C. elegans*, sont aussi bénéfiques chez un modèle mammifère.

Le but final est d'être capable de lutter contre la dégénérescence musculaire progressive qui touche les garçons atteints des myopathies de Duchenne et Becker.



Nous utilisons *C. elegans* pour étudier les mécanismes de la dégénérescence musculaire en absence de l'homologue de la dystrophine, DYS-1.

☞ Nous avons cherché à connaître les **gènes et protéines reliés à DYS-1**, afin de mettre en lumière les fonctions de DYS-1 et du complexe de protéines associées, chez *C. elegans*. Au cours de ma thèse, nous avons montré que l'homologue de la syntrophine, STN-1, est lié indirectement à DYS-1, et que son absence provoque les mêmes phénotypes que l'absence de DYS-1 : hyperactivité, hypercontraction, et dégénérescence musculaire dans un contexte *hlh-1(cc561ts)*. A travers STN-1, le complexe de protéines similaire au DGC chez *C. elegans*, semble lié au canal calcique EGL-19, qui participe à l'initiation de la contraction musculaire. Nous avons aussi décrit une relation entre DYS-1 et SLO-1, un canal potassique, homologue des canaux BK des mammifères. Son absence provoque aussi les mêmes phénotypes que l'absence de DYS-1. Ce canal est impliqué dans la repolarisation de la cellule musculaire et pourrait intervenir dans la régulation du calcium intracellulaire au cours de la contraction. L'intégration de résultats d'études récentes à ces travaux me permet de proposer une relation entre SLO-1, STN-1, et le couplage excitation-contraction.

☞ J'ai supervisé la réalisation d'un crible génétique sur le génome entier de *C. elegans*, à la recherche de gènes dont l'inactivation freine la dégénérescence musculaire. Après avoir testé un tiers du génome, nous avons sélectionné une soixantaine de **gènes impliqués dans la dégénérescence musculaire de *C. elegans***. La nature des protéines codées par ces gènes et les voies cellulaires dans lesquelles elles sont impliquées nous donnent une idée des mécanismes mis en jeu dans la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*.

☞ J'ai participé à un crible de **molécules freinant la dégénérescence musculaire chez *C. elegans***. Nous avons sélectionné une vingtaine de molécules capables de freiner la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*. Nous avons notamment montré que la Prednisone et la Sérotonine sont capables de réduire le nombre de cellules musculaires absentes. En parallèle, j'ai réalisé une étude approfondie des récepteurs sérotoninergiques de *C. elegans* pour tenter de définir par quel(s) récepteur(s) passe cet effet bénéfique.

Le crible de molécules chez *C. elegans* avait aussi pour but de produire une liste restreinte de molécules ayant un effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire. L'objectif était ensuite de tester ces molécules sur la souris *mdx*.

☞ Avec l'aide d'une technicienne, j'ai mis en place des tests de force musculaire et des tests histologiques afin d'évaluer les **effets de ces molécules sur la dégénérescence musculaire des souris *mdx***. Jusqu'à présent, nous avons testé une dizaine de molécules. Parmi celles-ci, les molécules en rapport avec la voie sérotoninergique semblent avoir un effet bénéfique. Nous développons maintenant des collaborations avec d'autres laboratoires (C. Huchet-Cadiou, Nantes ; I. Richard, Evry ; H. Lochmüller, Munich) afin de réaliser des tests plus poussés, qui nous permettront de confirmer ces résultats.

Les résultats issus des approches génétiques et pharmacologiques chez *C. elegans*, nous permettent d'avancer dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la dégénérescence musculaire en absence de *DYS-1*, et nous donnent des pistes quant aux mécanismes mis en jeu chez les mammifères. Les molécules testées chez la souris *mdx* ont d'abord été sélectionnées pour leur efficacité contre la dégénérescence musculaire de *C. elegans*. La probable conservation d'une partie des mécanismes de la dégénérescence musculaire entre *C. elegans* et les mammifères nous permet de penser que l'étude de l'effet de ces molécules chez les souris *mdx* sera une avancée de plus vers la compréhension des mécanismes impliqués dans la dégénérescence musculaire qui survient dans les myopathies de Duchenne et Becker.

LES GÈNES FONCTIONNELLEMENT LIÉS À *dys-1*

Depuis la découverte d'un homologue de la dystrophine chez *Cænorhabditis elegans*, le gène *dys-1*, sept autres gènes ont été identifiés comme ayant une relation fonctionnelle avec celui-ci. On définit ici qu'un gène est fonctionnellement relié à un autre lorsque que leurs mutations respectives produisent le même phénotype.

L'équipe de Laurent Ségalat a montré, grâce à la génétique classique, que l'inactivation des gènes *dyb-1*, *dyc-1*, *dys-4* et *slo-1* mène au même phénotype que la mutation de *dys-1* (Segalat, 2002). Ceci indique que les produits de ces gènes participent probablement à la même fonction que la protéine DYS-1. Le gène *dyb-1*, qui code pour un homologue de la dystrobrevine, et le gène *dyc-1*, qui code pour une protéine présentant deux régions d'homologie avec CAPON, ont été largement étudiés (Gieseler et al., 1999b; Gieseler et al., 2002; Gieseler et al., 2001; Grisoni et al., 2002a). Le gène *dys-4*, dont le produit protéique ne ressemble à aucune protéine connue, n'a pas été étudié plus avant pour l'instant.

Par génétique inverse, l'équipe de Laurent Ségalat a montré qu'il existe dans le génome de *C. elegans* deux autres gènes fonctionnellement reliés à *dys-1* : *sgn-1*, un homologue des δ/γ -sarcoglycanes, et *stn-1*, un homologue des syntrophines (Grisoni et al., 2002b). Ils ont aussi retrouvé de cette manière le gène *dyb-1*. L'inactivation de chacun de ces gènes provoque le même phénotype que l'inactivation de *dys-1*.

Ces observations ont mené Laurent Ségalat et son équipe à proposer, par analogie, l'existence d'un complexe de protéines associé à DYS-1, similaire au DGC des mammifères (Grisoni et al., 2002b).

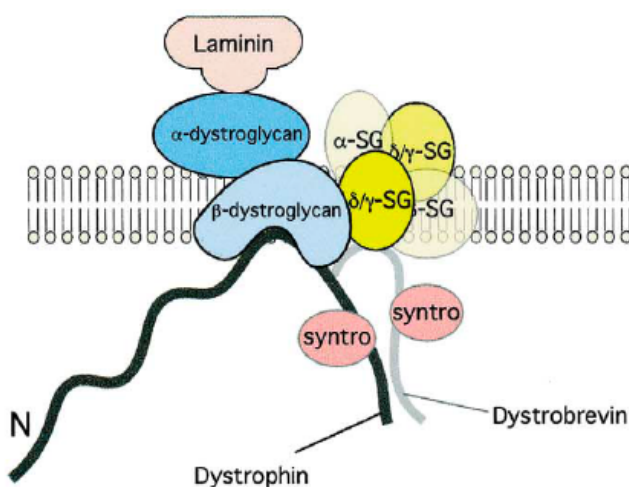


Figure 30 : Représentation du complexe de protéines liées à l'homologue de la dystrophine chez *C. elegans*

Sur ce schéma, sont représentées les protéines homologues des dystroglycanes, de la syntrophine, de la dystrobrevine et des sarcoglycanes (SG) de *C. elegans* et leurs interactions supposées avec l'homologue de la dystrophine, en 2002. Ce complexe est très similaire au DGC des mammifères. Schéma tiré de (Grisoni et al., 2002b).

Le modèle présenté ci-dessus (figure 30), n'intègre ni DYS-4, qui ne ressemble à aucune autre protéine ; ni DYC-1, qui est lié à ce complexe de manière indirecte (données non publiées) ; ni SLO-1 dont on ne savait pas à ce moment-là comment il était relié à ce complexe (Grisoni et al., 2002b).

SNF-6 (pour *Sodium:Neurotransmitter symporter Family-6*) est un homologue d'un transporteur d'acétylcholine qui participe à l'arrêt de l'excitation. Kim et coll. ont montré que l'absence de SNF-6, spécifiquement dans les muscles, provoque le phénotype d'hypercontraction et d'hyperactivité typique des animaux *dys-1* (Kim et al., 2004). Ceci montre que l'absence de dystrophine est bien liée à la transmission cholinergique dans sa partie post-synaptique (musculaire), comme l'avait déjà suggéré l'équipe de Laurent Ségalat dès l'identification du gène *dys-1* (Bessou et al., 1998).

Toutes ces études montrent qu'il existe un complexe de protéines associé à la dystrophine chez *C. elegans*, qui est très certainement désorganisé en absence de DYS-1 (Grisoni et al., 2002a). De plus, il semble que l'absence de DYS-1 et/ou la désorganisation du complexe provoque(nt) des perturbations de la transmission cholinergique à la synapse.

i) STN-1 et SLO-1

Les syntrophines sont des protéines musculaires et neuronales, qui contiennent des motifs PH. Ces motifs sont retrouvés dans de nombreuses protéines de signalisation intracellulaire, souvent impliquées dans l'adressage à la membrane de leurs interacteurs (pour revue, voir (Cozier et al., 2004)). D'autre part, les protéines à motif PDZ, comme les syntrophines, sont souvent impliquées dans l'adressage en des endroits sub-cellulaires précis des protéines avec lesquelles elles interagissent (Ponting and Phillips, 1995).

Nous avons montré que STN-1 est l'homologue des syntrophines α et β humaines (les syntrophines musculaires), et présente une homologie de séquence de plus de 80% dans le motif PDZ, et 60% dans le motif PH avec les syntrophines humaines. STN-1 est exprimé dans les neurones et les muscles de *C. elegans*. Sa disparition dans les muscles provoque des phénotypes similaires aux phénotypes observés chez les vers *dys-1*.

On sait que dans les cellules gliales de la rétine, l' α -syntrophine localise le canal potassique Kir4.1 à proximité du DGC par son domaine PDZ (Connors et al., 2004). Nous avons montré que SLO-1 semble être co-localisé avec DYS-1 aux *dense bodies* (équivalents des lignes Z des mammifères) dans les cellules musculaires de *C. elegans*. On peut imaginer que c'est STN-1 qui permet de localiser SLO-1 près de DYS-1. De plus, les canaux Slo des mammifères sont connus pour avoir des sites de régulation par la calmoduline dans leur queue intracellulaire (Schubert and Nelson, 2001), et les

syntrophines sont, elles, connues pour interagir avec la calmoduline (Schultz et al., 1998). Sur cette base, on peut imaginer que STN-1 permet de rapprocher la calmoduline de SLO-1. L'absence de DYS-1 pourrait entraîner la perte de ce type d'interactions, et peut-être la dérégulation de SLO-1, en désorganisant le complexe de protéines qui lui est associé, comme on l'observe chez les mammifères.

ii) SLO-1 et le couplage excitation-contraction

SLO-1 est un canal potassique dépendant du niveau de calcium intracellulaire et du voltage, homologue des canaux BK des mammifères (Wang et al., 2001). Ces canaux laissent sortir les ions potassium (K^+) de la cellule, selon leur gradient électrochimique, lorsque le taux de calcium intracellulaire est élevé et/ou lorsque la membrane est dépolarisée. En permettant aux ions potassium de sortir de la cellule, ces canaux provoquent une hyperpolarisation de la membrane qui la rend moins excitable.

Comme les mutants *dys-1*, les mutants *slo-1* sont hyperactifs, c'est-à-dire qu'ils bougent plus que des animaux sauvages. Ils sont aussi hypercontractés et hypersensibles à l'aldicarb, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, qui mime une augmentation de la transmission cholinergique. On peut expliquer ce phénotype par un état plus excitable des cellules musculaires, dû à l'absence des canaux SLO-1, qui sont hyperpolarisants. Comme c'est le cas pour *dys-1*, l'inactivation de *slo-1* dans un fond génétique *hh-1* est capable d'induire la dégénérescence progressive des cellules musculaires striées de *C. elegans*, mais dans une moindre mesure.

L'hypothèse la plus simple pour expliquer que les mutants *dys-1* et les mutants *slo-1* présentent le même phénotype est que l'absence de DYS-1 provoque une baisse de l'expression ou de l'activité de SLO-1, rendant la cellule plus excitable et favorisant ainsi l'hyperactivité et l'hypercontraction. Nos expériences n'ont pas montré de modification du niveau d'expression des canaux SLO-1 chez les mutants *dys-1*, et l'étude de leurs propriétés électrophysiologiques, notamment leur conductance à différents potentiels de membrane, n'a pas révélé de différence entre les vers sauvages et les mutants *dys-1*. Cependant, ces études électrophysiologiques ont été menées sur des excisions de patch, éliminant ainsi tous les éléments de régulation cytosoliques qui pourraient réguler l'activité de SLO-1 en agissant notamment sur sa queue intracellulaire.

L'étude de la localisation de ces canaux par l'intermédiaire d'une protéine fusion GFP montre que le marquage semble plus flou en absence de DYS-1, mais la faiblesse du marquage ne nous permet pas de conclure définitivement.

Dans les cellules musculaires de *C. elegans*, il existe plusieurs types de canaux potassiques différents. Deux sont prédominants en ce qui concerne le courant potassique sortant dans des conditions physiologiques normales, ce sont des homologues des canaux Kv1/Shaker et Kv4/Shal (Santi et al., 2003), des canaux potassiques dépendants du voltage. SLO-2, l'autre homologue des canaux de type BK (Lim et al., 1999), est le plus exprimé et semble intervenir dans le courant potassique engendré lorsque les niveaux de calcium et de chlore sont élevés tel que c'est le cas pendant l'hypoxie (Santi et al., 2003). SLO-1 engendre un courant potassique faible comparé aux autres canaux potassiques présents dans la cellule musculaire. Comment expliquer alors que son absence soit délétère pour les muscles dans un contexte *hlh-1* ?

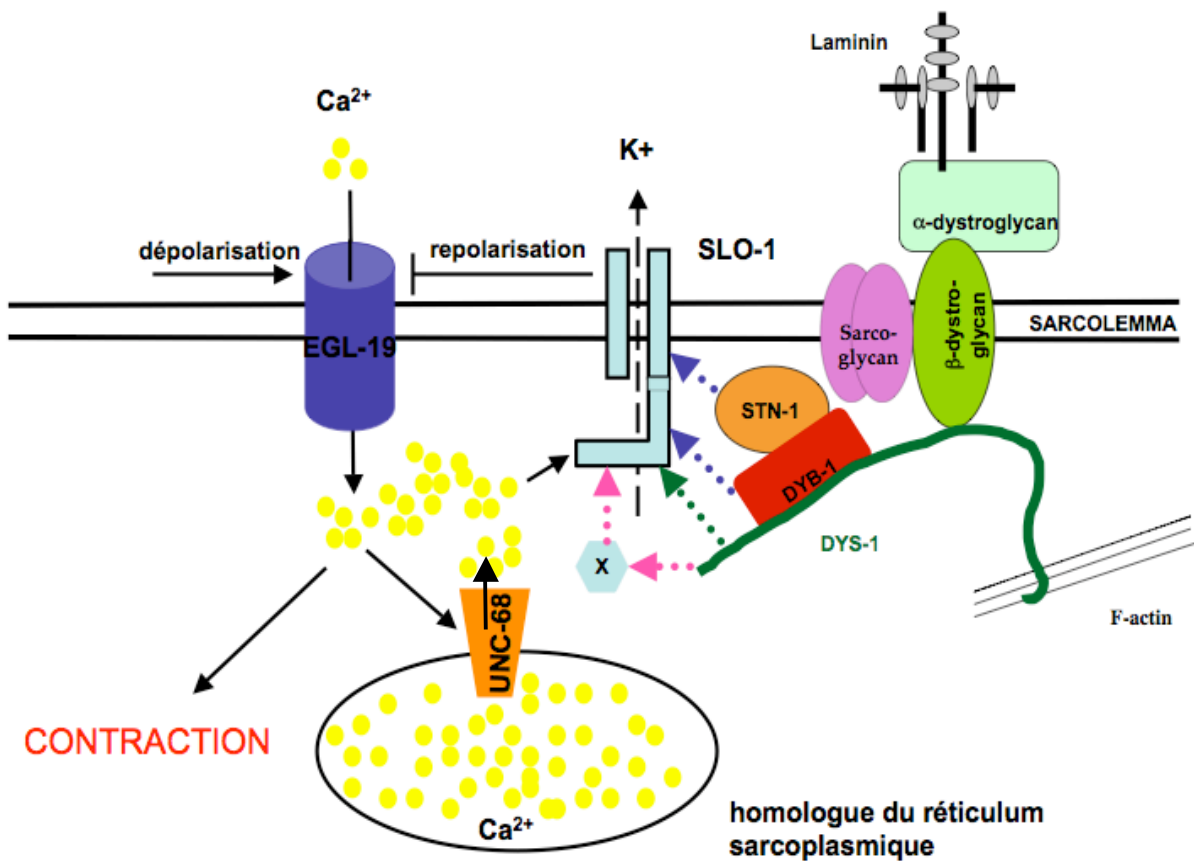
Dans les muscles striés des mammifères, le couplage excitation-contraction se fait *via* l'activation des récepteurs à la ryanodine (RyR) du réticulum sarcoplasmique, par des récepteurs membranaires dépendants du voltage (Catterall, 1991). La dépolarisation de la membrane provoque un changement de conformation de ces récepteurs qui activent les RyR, qui, eux, laissent sortir en masse le calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique. La contraction des myofilaments est possible grâce à cette masse d'ions calcium. Jacquemond et Allard ont montré que lors de la dépolarisation prolongée d'une fibre musculaire de souris, les canaux potassiques dépendant du calcium sont activés spécifiquement par le relargage du calcium du réticulum sarcoplasmique (Jacquemond and Allard, 1998). L'augmentation de calcium intracellulaire globale n'étant pas assez forte pour permettre l'ouverture de ce type de canaux, les auteurs suggèrent donc que le lieu de relargage du calcium par le réticulum sarcoplasmique et la membrane où sont localisés les canaux BK sont proches, créant ainsi un microdomaine où le calcium est très concentré. Récemment, Beurg et coll. ont montré dans les cellules des cils auditifs du cochon d'inde, que les RyR sont localisés sous la membrane, à des endroits de regroupement de canaux potassiques de type BK (Beurg et al., 2005). D'autres groupes avaient déjà montré que les canaux de type BK de cellules musculaires lisses de cochon d'Inde sont activés par des augmentations localisées de calcium, que les RyR et les canaux BK semblaient être colocalisés, et que l'application de ryanodine, qui se fixe aux RyR en empêchant le calcium de sortir, abolit l'activité des canaux BK (Herrera and Nelson, 2002; Ohi et al., 2001). Dans les systèmes décrits ici, les canaux de type BK sont donc activés notamment suite au relargage de calcium, à proximité, par le réticulum sarcoplasmique.

Chez *C. elegans*, il n'existe qu'un homologue des canaux RyR, UNC-68, qui est exprimé dans des vésicules chargées de calcium qui sont les homologues du réticulum sarcoplasmique des mammifères (Maryon et al., 1998).

Figure 31 : Représentation du rôle putatif de SLO-1 dans la contraction musculaire

Lors de la contraction, SLO-1 est rapidement activé par le relargage de calcium *via* UNC-68, et probablement par l'entrée de calcium *via* EGL-19. Cela provoque la repolarisation de la membrane, ce qui antagonise la dépolarisation à laquelle répond EGL-19 en laissant entrer du calcium. C'est une boucle de rétro inhibition de SLO-1 sur EGL-19.

En absence de DYS-1, la désorganisation probable du complexe délocalise SLO-1 et perturbe probablement sa régulation par divers composants du DGC et par des facteurs cytosoliques, tel que la calmoduline (régulations possibles représentées par les flèches en pointillées). La boucle de rétro inhibition est rompue, les cellules musculaires sont plus excitables et les animaux sont hypercontractés et hyperactifs.



L'étude de la localisation d'UNC-68 montre que ces récepteurs, et donc les vésicules de calcium, sont situés entre les *dense bodies* dans les cellules musculaires de *C. elegans* (Maryon et al., 1998). Nous avons montré que SLO-1 est localisé aux *dense bodies* et entre les *dense bodies*, à la ligne M.

On peut imaginer, sur la base de ce qui est suggéré dans les articles cités ci-dessus, que SLO-1 est particulièrement important du fait de sa localisation, car il pourrait être activé rapidement par le relargage du calcium par UNC-68 au cours de la contraction, ce qui provoquerait une repolarisation de la membrane, qui mettrait fin à l'excitation. Dans cette hypothèse, l'activation des canaux SLO-1 engendrerait une boucle de rétro inhibition rapide, qui limiterait significativement l'amplitude et/ou la durée des contractions musculaires. L'absence de DYS-1, et la désorganisation probable du complexe associé, pourrait perturber ce processus en provoquant soit la délocalisation de SLO-1, soit une dérégulation de SLO-1, comme suggérer dans le paragraphe précédent. Ces canaux ne seraient alors plus capables d'activer la boucle de rétro inhibition aussi rapidement.

Cependant, l'étude de Maryon et coll. montre aussi que UNC-68 n'est pas indispensable au couplage excitation-contraction chez *C. elegans*. Dans les cellules musculaires de *C. elegans*, la première source de calcium dans la contraction musculaire est le calcium extracellulaire, qui entre par le canal calcique EGL-19 lors de la dépolarisation des cellules (Jospin et al., 2002). On peut aussi imaginer que l'entrée de calcium *via* EGL-19, active directement SLO-1. Dans ce cas, il faut supposer une proximité particulière entre les canaux SLO-1 et les canaux EGL-19, pour expliquer l'effet de l'absence de SLO-1 sur l'état musculaire.

La figure 31 récapitule les interactions possibles entre SLO-1 et la signalisation calcique dans les cellules musculaires de *C. elegans* sur la base des arguments présentés ci-dessus.

iii) STN-1 et la transmission cholinergique

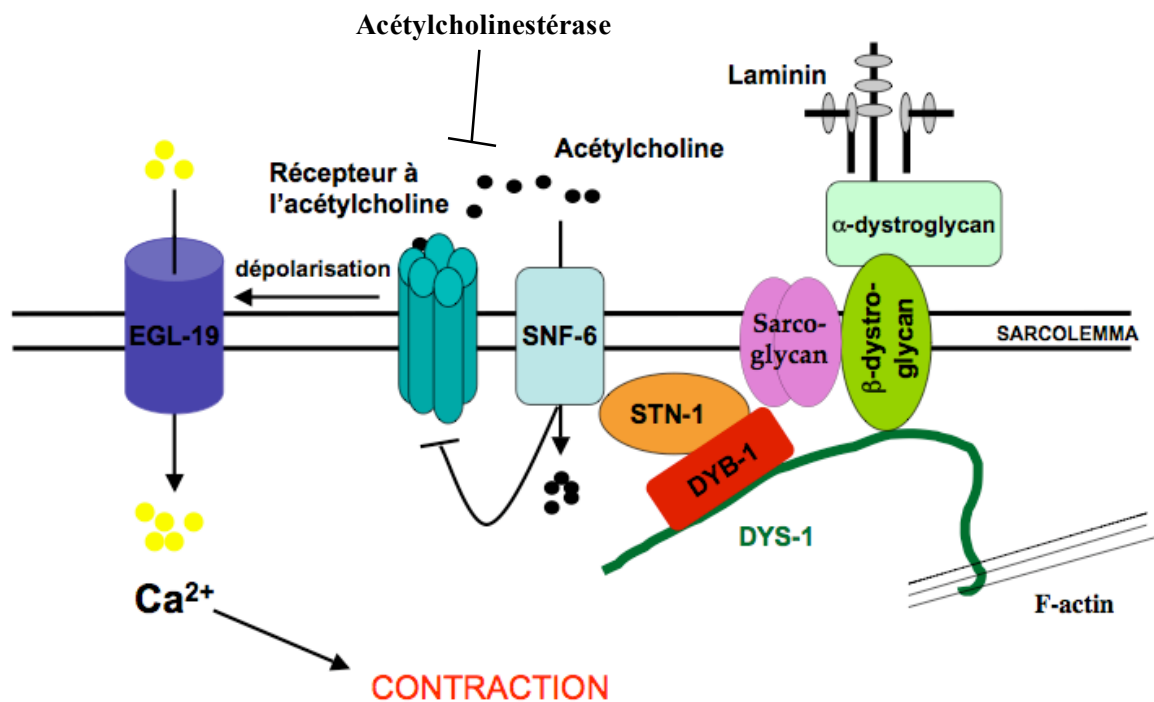
STN-1, l'homologue des syntrophines α et β , a été identifié par génétique inverse dans le génome de *C. elegans* (Grisoni et al., 2002b).

Dans l'article présenté ici, nous avons montré que STN-1 est fonctionnellement relié à l'homologue de la dystrophine, DYS-1, dans les muscles de *C. elegans*. Contrairement à ces homologues mammifères, STN-1 ne semble pas interagir directement avec DYS-1. Il serait vraisemblablement lié au complexe de protéines associées à DYS-1 *via* son interaction avec DYB-1, l'homologue de la dystrobrevine. STN-1 présente comme ses homologues mammifères un domaine PDZ et un domaine PH. Nous avons montré que l'inactivation de *stn-1* supprime partiellement le phénotype des mutants *egl-19*, un canal calcium dépendant du voltage.

Figure 32 : Hypothèse d'un rôle de STN-1 à la jonction neuromusculaire

En conditions normales, STN-1 localise SNF-6 à la jonction neuromusculaire. SNF-6 internalise l'acétylcholine (boules noires), et les acétylcholinestérases la dégradent, arrêtant ainsi l'activation du récepteur cholinergique, ce qui diminue la dépolarisation membranaire. Du fait de la diminution de la dépolarisation membranaire, EGL-19 laisse entrer moins de calcium (boules jaunes), ce qui diminue la longévité/force de la contraction.

En absence de DYS-1, le complexe de protéines est probablement désorganisé, et STN-1 ne localise plus SNF-6 aux jonctions neuromusculaires. L'absence de SNF-6 provoque une hausse de la dépolarisation membranaire lors du relargage de l'acétylcholine par le motoneurone, donc une hausse de l'entrée de calcium dans la cellule musculaire par EGL-19, ce qui augmente la longévité/force de la contraction.



STN-1 à la jonction neuromusculaire

Ceci suggère que STN-1 régule négativement l'activité d'EGL-19 et, ainsi, la charge calcique de la cellule et donc la contraction.

Mariol et Ségalat ont montré que l'inactivation du canal calcium dépendant du voltage, EGL-19, supprime le phénotype d'hyperactivité des mutants *dys-1*, et la dégénérescence musculaire des doubles mutants *dys-1 ; hhh-1* (Mariol and Segalat, 2001). A l'inverse, une augmentation de l'activité de ce canal provoque la dégénérescence des cellules musculaires striées des animaux *dys-1*. La dégénérescence musculaire liée à l'absence de DYS-1 est donc directement corrélée à l'activité de ce canal calcium, qui participe au couplage entre l'excitation et la contraction musculaire.

Nos résultats montrent que la liaison entre DYS-1 et l'activité d'EGL-19 serait en partie assurée par STN-1. On peut imaginer qu'en temps normal, DYS-1 localise DYB-1 et STN-1, qui lui est lié, à la membrane, où STN-1 inhibe l'activité d'EGL-19 de façon directe ou indirecte, rendant ainsi la cellule moins excitable.

Récemment, Kim et coll ont identifié SNF-6, un transporteur d'acétylcholine présent dans les muscles et quelques neurones de *C. elegans* (Kim et al., 2004) où il recapte l'acétylcholine, contribuant ainsi la fin de l'excitation cholinergique avec les acétylcholinestérases qui, elles, dégradent l'acétylcholine. Son absence dans les cellules musculaires provoque le même phénotype que l'inactivation de *dys-1*. Un point important est que l'inactivation de *snf-6* en même temps qu'un quelconque autre gène relié à *dys-1* n'amplifie pas le phénotype. Les produits de ces gènes interagissent donc probablement dans la même fonction biologique qui, quand elle est perturbée, mène au phénotype d'hypercontraction et d'hyperactivité. Kim et coll. ont montré que SNF-6 et STN-1 interagissent, certainement *via* le domaine PDZ de STN-1, et que l'absence de DYS-1 ou de STN-1 provoque une baisse de l'expression de SNF-6, ainsi que sa délocalisation de la jonction neuromusculaire (Kim et al., 2004). Il est possible que la localisation de SNF-6 par STN-1 soit un moyen indirect d'inhibition de l'activité d'EGL-19 à la jonction neuromusculaire. Notre hypothèse concernant la liaison entre STN-1 et l'activité d'EGL-19 pourrait être résumée comme montré dans la figure 32.

Conclusion

Depuis 2002, notre vision du complexe de protéines liées à DYS-1 s'est étoffée. Nous savons maintenant que STN-1 est indirectement lié à DYS-1 par son interaction avec la dystrobrevine. Nous savons que SLO-1 semble être colocalisé avec DYS-1, dans les cellules musculaires. Nos résultats indiquent que l'équivalent du DGC chez *C. elegans* semble lié à la signalisation calcique, par STN-1. On peut imaginer ce complexe comme point d'attache de protéines capables de réguler le couplage de l'excitation à la contraction (SNF-6, EGL-19, SLO-1).

LES SUPPRESSEURS DE LA DÉGÉNÉRESCENCE MUSCULAIRE CHEZ *C. elegans*

Afin d'essayer d'identifier les mécanismes mis en jeu lors de la dégénérescence musculaire en absence de la dystrophine chez les mammifères, nous avons entrepris un crible génétique à la recherche de gènes dont l'inactivation a un effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire due à l'absence de DYS-1 chez *C. elegans*. Nous réalisons ce crible de façon non dirigée, sur l'intégralité du génome de *C. elegans*. Le but est d'identifier des gènes, et des voies de signalisation, impliqués dans la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*. Selon le degré de conservation de ces voies chez les mammifères, ces résultats pourraient nous permettre d'identifier des mécanismes moléculaires responsables de la dégénérescence musculaires dans les myopathies de Duchenne et Becker.

Jusqu'à présent, nous avons criblé environ 12000 gènes (les deux tiers du génome). Nous avons analysé les résultats d'environ 6400 gènes et, en procédant en plusieurs étapes, nous avons établi une liste d'environ 60 gènes dont l'inactivation réduit significativement la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*. La majeure partie de ces gènes sont pas ou peu étudiés, et leur fonction est rarement connue. L'analyse de ces gènes n'en est qu'à ses débuts et il serait périlleux de préjuger de sa conclusion. Néanmoins, certains gènes clairement reliés à l'état du muscle montrent que ce crible nous permet de sélectionner des gènes ayant un impact sur l'état musculaire. Leur présence dans les résultats renforce notre confiance dans les gènes dont la relation avec la dégénérescence musculaire est moins évidente de prime abord.

Deux gènes sont clairement reliés à l'activité musculaire : *lev-10* et *jph-1*.

lev-10 code pour une protéine transmembranaire, dont Gally et coll. ont montré qu'elle est indispensable à l'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine à la membrane des cellules musculaires, aux jonctions neuromusculaires (Gally et al., 2004). En son absence, les récepteurs n'y sont plus localisés et la transmission cholinergique est réduite. Son absence est donc vraisemblablement bénéfique à la dégénérescence musculaire par diminution de la transmission cholinergique.

jph-1 code pour une protéine membranaire identifiée par Yoshida et coll. (Yoshida et al., 2001). Elle est exprimée dans toutes les cellules musculaires de *C. elegans* mais aussi dans quelques neurones de la tête. Son absence provoque une hypolocomotion. Chez la souris, Ito et coll. ont montré qu'en absence de junctophiline il y a une réduction de la formation des triades (Ito et al., 2001). Les triades sont composées d'un tubule T, qui est une invagination de la membrane des fibres musculaires, et de deux poches de réticulum

sarcoplasmique accolées de part et d'autre de cette invagination. C'est l'endroit où se fait le couplage excitation-contraction, notamment par l'intermédiaire du couplage entre les récepteurs aux dihydropyridines (sensibles au voltage) et les récepteurs à la ryanodine, provoquant ainsi la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique et la contraction musculaire. Chez *C. elegans*, Yoshida et coll. suggèrent que l'hypolocomotion observée en absence JPH-1 serait vraisemblablement due à un découplage entre l'excitation des cellules musculaires par les motoneurones et la contraction. On peut imaginer que, comme cela se passe chez la souris, JPH-1 favorise le rapprochement entre les sites d'entrée du calcium (canaux EGL-19) et les vésicules équivalentes au réticulum sarcoplasmique, permettant ainsi le relargage du calcium contenu dans ces vésicules lors de l'excitation par le phénomène de « *calcium-induced calcium release* », et favorisant ainsi la contraction. En absence de JPH-1, ces structures ne seraient pas suffisamment proches pour permettre ce phénomène, les cellules musculaires se contracteraient moins et dégèneraient donc moins.

unc-89, qui code pour une protéine structurale du sarcomère, avait déjà été identifié comme suppresseur de la dégénérescence musculaire lors du crible manuel des 800 premiers gènes du chromosome I, réalisé par Pierre-Emmanuel Imbert.

D'autres gènes liés à l'activité musculaire sont connus pour être des suppresseurs de la dégénérescence musculaire de *C. elegans*. Notamment, *egl-19*, qui code pour le principal canal calcium dépendant du voltage qui initie la contraction musculaire. Mariol et coll. ont montré qu'en son absence, la dégénérescence musculaire des vers *dys-1 ; hlh-1* était fortement diminuée (Mariol and Segalat, 2001). D'autre part, les mêmes auteurs viennent de montrer que l'inactivation de gènes impliqués dans la cascade du couplage de l'excitation à la contraction réduit fortement la dégénérescence musculaire des vers *dys-1 ; hlh-1* (article à paraître dans *Neuromuscular Disorders*). Ils ont inactivés, tour à tour, les gènes :

- *unc-13*, qui code pour une protéine nécessaire au relargage des neurotransmetteurs à la synapse neuromusculaire,
- *unc-29* et *unc-38*, qui codent pour des sous-unités α des récepteurs à l'acétylcholine,
- *unc-2*, qui code pour un canal calcium dépendant du voltage,
- *unc-68*, qui code pour un homologue des récepteurs ryanodine,
- *unc-22*, *unc89* et *unc96*, qui codent pour des protéines de structure du sarcomère,
- *lev-11* et *pat-10*, qui codent pour la tropomyosine et la troponine, deux protéines étroitement associées à l'actine musculaire.

La conclusion de cette étude est que la perturbation soit de la neurotransmission, soit du flux calcique, soit de la structure sarcomérique réduit la dégénérescence musculaire. Cela indique que les cellules musculaires se portent mieux lorsque le muscle se contracte moins (baisse de la neurotransmission), ou lorsque la structure sarcomérique est un peu relâchée. Ceci suggère que c'est la tension mécanique exercée sur le sarcomère qui, à la longue, engendre la dégénérescence musculaire en absence de *DYS-1*.

lev-10 et *jph-1* sont parfaitement assortis à cet éventail de gènes impliqués dans la contraction musculaire.

Des résultats provisoires montrent que l'inactivation d'*ikb-1*, l'homologue de Bcl-3, réduit la dégénérescence des vers *dys-1* ; *hlh-1*.

Bcl-3 est notamment capable d'activer NF- κ B, qui est impliqué dans la réponse immunitaire, mais aussi dans de nombreux autres processus biologiques dont l'atrophie musculaire induite par une sédentarisation prolongée (Hunter and Kandarian, 2004). Il semble que Bcl-3 et NF- κ B soient indispensables à l'atrophie musculaire. Bcl-3 et NF- κ B pourraient interagir dans le noyau pour induire la dégradation protéique *via* la voie du protéasome, qui est une cible connue de NF- κ B.

L'inactivation d'*ikb-1*, l'homologue de Bcl3, serait bénéfique à la dégénérescence en empêchant la dégradation protéique *via* l'activation de NF- κ B et de la voie du protéasome.

Conclusion

Les résultats qui sont commentés dans cette partie ont pour but de montrer que ce crible a permis de retrouver des mécanismes connus pour être impliqués dans la dégénérescence musculaire, notamment la transmission cholinergique, le couplage excitation-contraction.

Par ailleurs, la dégradation protéique pourrait être impliquée dans les mécanismes de dégénérescence des fibres musculaires. Il reste à savoir si l'inhibition de cette voie apporte un gain fonctionnel.

Nous espérons que l'étude des autres gènes issus de ce crible nous permettra de découvrir de nouvelles voies d'action impliquées dans la dégénérescence musculaire en absence de dystrophine.

APPORTS DU CRIBLE DE MOLÉCULES CHEZ *C. elegans*

Le crible de molécules réalisé chez *C. elegans* a révélé 26 molécules capables de freiner la dégénérescence musculaire. Les résultats de ce crible montrent clairement que nous avons sélectionné des molécules ayant un effet sur l'état du muscle :

- des relaxants musculaires (Orphenadrine, Cyclobenzaprine, Carisoprodol et Chlormezanone),
- des molécules agissant sur les canaux ioniques, ou les propriétés électriques des membranes (Nifédipine, Mexiletine),
- un anabolisant (Danazol).

Parmi les autres, les molécules agissant sur la voie sérotoninergique sont les plus nombreuses (8). On compte aussi des inhibiteurs d'anhydrase carbonique, des vasodilatateurs, des antibiotiques, *etc.* De façon intéressante, mais avec un effet plus faible, on retrouve la Prednisone, le seul traitement prescrit aux garçons atteints par la myopathie de Duchenne.

Un des objectifs de ce crible était de trouver des molécules actives sur la dégénérescence musculaire afin d'étudier leur mode d'action et d'ainsi identifier des mécanismes (peut-être nouveaux) impliqués dans la dégénérescence musculaire. Les mécanismes d'action putatifs des molécules agissant sur la voie sérotoninergique et des inhibiteurs d'anhydrase carbonique ont particulièrement retenu notre attention, et sont détaillées ci-après.

i) SLO-1, STN-1 et la sérotonine

La classe pharmaceutique prédominante est celle des molécules agissant sur la voie sérotoninergique : la sérotonine et les inhibiteurs de sa recapture, qui miment une augmentation de la sérotonine. La sérotonine est un neurotransmetteur impliqué dans beaucoup de comportements complexes chez les mammifères, tels que le sommeil, l'agressivité ou la perception de la douleur. Chez *C. elegans*, la sérotonine est impliquée dans des comportements quantifiables, tels que la ponte, les battements du pharynx qui permettent de pomper les bactéries ou la locomotion.

L'addition de sérotonine dans le milieu de culture freine la dégénérescence des doubles mutants *dys-1* ; *hlh-1*. A l'inverse, des mutants *tph-1*, chez qui il n'y a plus production de sérotonine, subissent une dégénérescence musculaire dans le contexte génétique *hlh-1*, comme les vers *dys-1* (Carre-Pierrat et al., 2006). La sérotonine semble donc avoir un effet protecteur sur le muscle, et son absence, un effet délétère. Chez *C. elegans*, la sérotonine est connue pour inhiber la libération d'acétylcholine par les neurones par son action sur la protéine G₀, codée par le gène *goa-1* (Nurrish et al., 1999). Cependant, son effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire est indépendant de cette voie puisque

des mutants *goa-1*, chez qui la libération d'acétylcholine est augmentée ne dégèrent pas dans un contexte *hlh-1*. C'est donc spécifiquement l'absence de la sérotonine qui provoque la dégénérescence musculaire chez les mutants *hlh-1*, et non l'augmentation de la libération d'acétylcholine. On peut en conclure que l'action de la sérotonine sur la dégénérescence musculaire ne se résume pas à une baisse de l'excitation.

Nous cherchons désormais à identifier la ou les voies de signalisation empruntées par la sérotonine pour avoir cet effet protecteur. Nous avons inactivé, un à un, tous les récepteurs sérotoninergiques connus chez les doubles mutants *dys-1 ; hlh-1* et nous avons observé le niveau de dégénérescence musculaire après traitement à la sérotonine. L'absence de SER-1, SER-7 ou MOD-1 n'engendre pas de diminution de l'effet de la sérotonine. Par contre, nous avons vu une faible diminution de l'effet bénéfique de la sérotonine sur la dégénérescence en absence du récepteur SER-4, un récepteur qui ressemble aux récepteurs à la sérotonine des mammifères de type 5-HT1. Il est donc possible que l'action de la sérotonine sur la dégénérescence de notre modèle *C. elegans* passe en partie par SER-4 (dont l'expression n'est pas décrite dans le muscle), mais surtout par un ou plusieurs récepteurs sérotoninergiques encore inconnu(s). Nous avons essayé de caractériser de nouveaux récepteurs sérotoninergiques parmi plusieurs récepteurs dont la séquence laisse supposer qu'ils sont spécifiques de la sérotonine. L'inactivation de SER-1, SER-7, K02F2.6, M03F4.3, F16D3.7, T02E9.3 et C24A8.1, un à un, n'a pas permis de mettre en évidence d'autres récepteurs impliqués dans la dégénérescence musculaire de notre modèle.

Chez les mammifères, les différents types de récepteurs à la sérotonine sont très bien caractérisés. Il en existe 7, un récepteur canal et 6 récepteurs à 7 domaines transmembranaires, couplés à des protéines G. Leurs modes d'action dans la cellule passent par de nombreuses voies, impliquant la régulation positive ou négative de différentes enzymes, telles que l'adénylate cyclase, les protéines kinases dépendantes du calcium ou de l'AMP cyclique, ou d'autres protéines, telles que la calmoduline ou certains canaux ioniques (pour revue, voir (Raymond et al., 2001)). Selon le type cellulaire et les récepteurs impliqués, la sérotonine peut avoir des effets antagonistes. Il est intéressant de noter que certains récepteurs à la sérotonine de type 1 sont connus pour stimuler des canaux potassiques dépendants du calcium et provoquer ainsi une hyperpolarisation lorsqu'ils sont transfectés dans des cellules C6 (Le Grand et al., 1998). Cette activation semble être dépendante de la voie des Inositol tri-Phosphate (IP3), indiquant une possible implication de la phospholipase C et peut-être de la protéine kinase C. De façon générale, les canaux potassiques de type BK sont connus pour être régulés par l'action de différentes protéines kinase sur leur longue queue intracellulaire (Schubert and Nelson, 2001). Plus particulièrement, les canaux BK des vaisseaux artériels

du poumon sont activés par l'activité de la PKC, de façon dépendante de la protéine kinase dépendante du GMP cyclique (Barman et al., 2004). Toutes ces informations nous poussent à imaginer que l'action bénéfique de la sérotonine sur la dégénérescence musculaire des doubles mutants *dys-1 ; hhh-1* pourrait être reliée à l'activation de l'activité des canaux potassiques dépendant du calcium, soit par l'intermédiaire des protéines kinases, soit par la calmoduline qui est connue pour agir sur les canaux Slo des mammifères (Schubert and Nelson, 2001), ou d'autres protéines encore.

D'autre part, il a récemment été montré que le récepteur 5-HT_{2C} interagit en double hybride avec le domaine PDZ de la protéine MUPP1 (Becamel et al., 2001). Cette protéine a été décrite comme une protéine permettant l'organisation des *tight junctions* dans les cellules épithéliales (Hamazaki et al., 2002). Ceci ouvre la possibilité que la signalisation sérotoninergique soit reliée aux syntrophines, qui contiennent un domaine PDZ. Comme pour beaucoup d'autres protéines, les syntrophines pourraient jouer un rôle d'organisateur des récepteurs sérotoninergiques à la membrane.

ii) SLO-1 et les inhibiteurs d'anhydrase carbonique

Deux inhibiteurs de l'anhydrase carbonique, la Méthazolamide et la Dichlorphénamide, permettent de réduire la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*. L'anhydrase carbonique est notamment responsable de la conversion du gaz carbonique en ions carbonates solubles dans l'eau. Ses inhibiteurs sont utilisés dans le traitement d'affections aussi diverses que le glaucome, l'épilepsie ou l'apnée du sommeil, et des maladies neuromusculaires comme la paralysie périodique ou l'ataxie, une maladie dégénérative touchant les nerfs (pour revue, voir (Pastorekova et al., 2004)). Il existe 6 gènes d'homologues putatifs d'anhydrase carbonique chez *C. elegans*, *cah-1* à *cah-6*. Ces gènes ont été peu caractérisés jusqu'à présent.

Tricarico et coll. ont montré récemment que certains inhibiteurs de l'anhydrase carbonique étaient capables d'induire l'ouverture des canaux potassiques de type BK dans les muscles de rats (Tricarico et al., 2006). La Dichlorphénamide est notamment capable de provoquer l'ouverture des canaux de type BK et d'ainsi contrebalancer la paralysie provoquée par l'injection d'insuline. On peut penser que, chez *C. elegans*, la Dichlorphénamide active l'ouverture de l'homologue des canaux de type BK, SLO-1, ce qui provoque la repolarisation de la membrane et la fin de l'excitation, réduisant ainsi la dégénérescence musculaire.

A l'inverse, la Méthazolamide n'est pas capable de provoquer l'ouverture des canaux de type BK chez le rat. Il est possible que le mode d'action de la Méthazolamide sur la dégénérescence musculaire de *C. elegans* soit différent de celui de la Dichlorphénamide,

ou bien que des différences évolutives font qu'elle est capable chez *C. elegans* d'induire l'ouverture de SLO-1, ce qu'elle ne peut pas faire chez le rat.

Des données non publiées de l'équipe de Bruno Allard ne montrent cependant aucune action des inhibiteurs d'anhydrase carbonique sur l'activité des canaux SLO-1 dans des préparations de cellules musculaires de *C. elegans* en patch.

Conclusion

La sérotonine et les inhibiteurs d'anhydrase carbonique ont un effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire de notre modèle *C. elegans*. Cet effet pourrait notamment être dû à l'activation du canal potassique SLO-1, soit directement par les inhibiteurs d'anhydrase carbonique, comme suggéré par les résultats de Tricarico et coll. (Tricarico et al., 2006), soit *via* la régulation de protéines kinases intracellulaires par la sérotonine.

D'après de récentes expériences, nous pensons que la protéine kinase PKC-2 pourrait intervenir dans l'action de la sérotonine chez *C. elegans*, puisque les mutants *pkc-2* sont hypersensibles à la sérotonine et que *pkc-2* est un suppresseur de la dégénérescence (données non publiées). Cette nouvelle piste est actuellement développée dans notre laboratoire. Ceci devrait nous permettre de dérouler le fil des cascades moléculaires un peu plus loin, et peut-être de clarifier les relations entre la sérotonine et SLO-1.

Une autre molécule issue du crible réalisé chez *C. elegans*, la Pentoxyfilline, est déjà à l'étude chez la souris *mdx*. Ainsi, tout récemment, Rolland et coll. ont formulé une hypothèse quant aux mécanismes de son effet bénéfique (article à paraître dans *Neurobiology of Disease*). Ce serait son activité d'inhibiteur de la phosphodiesterase qui, en augmentant le niveau intracellulaire d'AMP cyclique, protégerait les fibres musculaires de l'augmentation de calcium en inhibant l'activité des canaux calcium dépendant du stretch de la famille des *Transient Receptor Potential ion Channel* (TRPC). L'étude des mécanismes de ces molécules nous renseigne sur les mécanismes impliqués dans la dégénérescence musculaire.

LES MOLÉCULES EFFICACES CHEZ LA SOURIS *mdx5Cv*

Nous avons utilisé *C. elegans* comme organisme de crible primaire afin de sélectionner quelques molécules réduisant la dégénérescence musculaire (parmi plus de 700), pour ensuite les tester sur les souris *mdx5Cv*. L'objectif de ces tests est d'essayer de découvrir quelles sont les voies de signalisation impliquées dans la dégénérescence musculaire chez un modèle mammifère de la myopathie de Duchenne.

Nous avons d'abord testé la Prednisone, qui est un glucocorticoïde. La Prednisone, et ses dérivés, sont le seul traitement donné contre l'avancée de la myopathie de Duchenne.

Nos analyses histologiques montrent que la variance du diamètre des fibres musculaires des souris traitées à la Prednisone se rapproche de celle des souris sauvages. Cependant, la proportion de fibres musculaires à noyaux centraux reste inchangée par rapport aux souris *mdx5Cv* témoins. Ce test a été le premier que nous avons réalisé, nous n'avions pas encore mis en place le test d'endurance, ni l'évaluation de l'état du diaphragme.

Ces résultats suggèrent que les EDL des souris traitées à la Prednisone subissent le même nombre de cycle de dégénérescence-régénération que les souris témoins, puisque l'on observe un pourcentage comparable de fibres à noyaux centraux. Le fait que la variance du diamètre se rapproche significativement de celle des souris sauvages peut indiquer un rôle pour la Prednisone dans le contrôle des phénomènes de régénération. Le Déflazacort, un dérivé de la Prednisone, facilite la réparation musculaire en augmentant la différenciation myogénique et la fusion des myoblastes (Anderson et al., 2000). Nos résultats pourraient être le reflet de cette fonction.

La Prednisone et ses dérivés sont connus, et utilisés, pour leurs propriétés anti-inflammatoires (Gosselin and McCormick, 2004). *C. elegans* ne possède pas de système immunitaire. Il est probable que l'action de la Prednisone chez *C. elegans* passe par un autre mécanisme. L'examen des effets secondaires du traitement à la Prednisone sur le site <http://www.biam2.org/www/Isup.html>, montre qu'il peut induire une baisse du niveau de potassium dans le sang (hypokaliémie), comme la Dichlorphénamide, la Méthazolamide ou la Nifédipine. D'autre part, ce traitement peut induire une excitation psychomotrice, comme la Trimeprazine, l'Amitryptilline, l'Orphenadrine ou l'Eburnamonine. Enfin, dans certains cas rares, le traitement à la Prednisone peut induire une myopathie par atrophie musculaire. Le fait que la Prednisone présente des effets secondaires communs avec des molécules aussi diverses, et pourtant présentes dans cette liste de molécules réduisant la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*, nous laisse penser que la Prednisone agit par d'autres mécanismes en plus de son action anti-inflammatoire. L'étude des mécanismes des autres molécules pourra peut-être nous en

apprendre plus sur les mécanismes de la Prednisone sur la dégénérescence musculaire en absence de dystrophine.

Nous avons montré que l'activation de la voie sérotoninergique a un effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire des vers *dys-1 ; hhh-1* (Carre-Pierrat et al., 2006). Chez les mammifères, la sérotonine est peu biodisponible quand elle est donnée en tant que telle, et elle engendre de nombreux effets au niveau systémique. Pour les tests chez la souris *mdx*, nous avons choisi de tester les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, comme l'Imipramine, qui permettent d'augmenter le niveau de sérotonine endogène de façon spécifique aux synapses.

L'Imipramine a un effet bénéfique sur la dégénérescence des souris *mdx5Cv*. Le pourcentage de fibres à noyaux centraux, la variance du diamètre des fibres de l'EDL et le score du diaphragme sont améliorés chez les souris traitées à la dose 5X. Tous nos indicateurs montrent que cette molécule semble réduire la dégénérescence musculaire. La résistance de leurs pattes avant est elle aussi améliorée dans le test *in vivo*. Les tests réalisés dans le laboratoire de Corinne Huchet-Cadiou, montrent que cette molécule confère un gain fonctionnel dans les tests *in vivo* de résistance et de force, ainsi qu'une tension maximale des fibres isolées, plus proche de celle des souris sauvages.

Bien que l'Imipramine présente une action secondaire anticholinergique centrale, je ne pense pas que cela entre en jeu dans les phénomènes que nous observons, car nous n'avons pas vu de baisse du tonus, ni de l'activité des souris traitées à l'Imipramine. D'autre part, l'Imipramine, et la Sérotonine, ont été utilisées autrefois pour créer un modèle de la myopathie de Duchenne chez le rat (Mendell et al., 1976; Narukami et al., 1991). À haute dose, les deux molécules provoquent une dégénérescence musculaire semblable à celle provoquée par l'absence de la dystrophine. Une étude de Meltzer montre que l'utilisation d'antidépresseurs tricycliques, comme l'Imipramine, suivie de l'application de sérotonine est capable d'induire une dégénérescence musculaire qui n'est que partiellement abolie par la dénervation des muscles (Meltzer, 1976). Ceci suggère qu'une partie de l'effet de ce traitement se fait directement sur les muscles et pas seulement par la recapture de la sérotonine au niveau neuronal. Nous avons testé l'effet de l'imipramine à la dose 20X chez des souris sauvages. Les résultats préliminaires de ce traitement montrent que leurs muscles subissent de la dégénérescence musculaire. Ces résultats montrent que la voie sérotoninergique a un effet sur l'état musculaire. En pharmacologie, il est classique de trouver des molécules ayant des effets inverses à différentes concentrations. Nous nous sommes basés sur ces constatations pour retester l'imipramine sur les souris *mdx5Cv* à des doses moins élevées : 0,4X et 2X. Les tests sont en cours de réalisation.

CONCLUSION

La myopathie de Duchenne est une maladie très invalidante pour laquelle il n'existe pas de traitement curatif. Les travaux de recherche cherchent à clarifier les fonctions de la dystrophine (dont l'absence est responsable de la myopathie), comprendre la physiopathologie de cette maladie et trouver des traitements. Les traitements envisagés sont de deux types : thérapie génique et thérapie médicamenteuse. La thérapie génique est une voie prometteuse mais qui demande encore beaucoup d'études et de mise au point. Les thérapies médicamenteuses sont actuellement insuffisantes, seuls la Prednisone et ses dérivés sont prescrits pour ralentir la maladie.

L'approche de notre laboratoire est originale puisqu'elle utilise *Caenorhabditis elegans*, et la puissance de l'outil génétique, pour comprendre les fonctions de la dystrophine. Cette approche a notamment permis l'identification des gènes *slo-1* et *dyc-1* qui sont à la base de nouvelles hypothèses sur la physiopathologie, testées par notre laboratoire.

Par ailleurs, le crible de gènes suppresseurs qui se termine nous permettra d'identifier d'autres protéines participant activement au processus nécrotique des cellules musculaires en absence de dystrophine. Ces protéines constituent des points d'entrée potentiels pour des thérapies futures.

Nous avons aussi utilisé *C. elegans* comme premier crible pour identifier des molécules réduisant la dégénérescence musculaire. Nous avons trouvé plus de 20 molécules ayant un effet chez *C. elegans*. Pour quelques unes de ces molécules, nous avons montré qu'elles conservent leur effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire chez la souris *mdx*, notamment les molécules qui activent la voie sérotoninergique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(331 publications)

- Acsadi, G., Dickson, G., Love, D. R., Jani, A., Walsh, F. S., Gurusinghe, A., Wolff, J. A., and Davies, K. E. (1991): Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* **352**, 815-8.
- Ahn, A. H., Freener, C. A., Gussoni, E., Yoshida, M., Ozawa, E., and Kunkel, L. M. (1996): The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J Biol Chem* **271**, 2724-30.
- Anderson, J. E., McIntosh, L. M., and Poettcker, R. (1996a): Deflazacort but not prednisone improves both muscle repair and fiber growth in diaphragm and limb muscle in vivo in the mdx dystrophic mouse. *Muscle Nerve* **19**, 1576-85.
- Anderson, J. E., Weber, M., and Vargas, C. (2000): Deflazacort increases laminin expression and myogenic repair, and induces early persistent functional gain in mdx mouse muscular dystrophy. *Cell Transplant* **9**, 551-64.
- Anderson, J. T., Rogers, R. P., and Jarrett, H. W. (1996b): Ca²⁺-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem* **271**, 6605-10.
- Arakawa, M., Shiozuka, M., Nakayama, Y., Hara, T., Hamada, M., Kondo, S., Ikeda, D., Takahashi, Y., Sawa, R., Nonomura, Y., Sheykholeslami, K., Kondo, K., Kaga, K., Kitamura, T., Suzuki-Miyagoe, Y., Takeda, S., and Matsuda, R. (2003): Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice. *J Biochem (Tokyo)* **134**, 751-8.
- Araki, E., Nakamura, K., Nakao, K., Kameya, S., Kobayashi, O., Nonaka, I., Kobayashi, T., and Katsuki, M. (1997): Targeted disruption of exon 52 in the mouse dystrophin gene induced muscle degeneration similar to that observed in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* **238**, 492-7.
- Archer, J. D., Vargas, C. C., and Anderson, J. E. (2006): Persistent and improved functional gain in mdx dystrophic mice after treatment with L-arginine and deflazacort. *Faseb J* **20**, 738-40.
- Arikawa-Hirasawa, E., Le, A. H., Nishino, I., Nonaka, I., Ho, N. C., Francomano, C. A., Govindraj, P., Hassell, J. R., Devaney, J. M., Spranger, J., Stevenson, R. E., Iannaccone, S., Dalakas, M. C., and Yamada, Y. (2002): Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am J Hum Genet* **70**, 1368-75.
- Avner, P., and Heard, E. (2001): X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* **2**, 59-67.
- Bachrach, E., Li, S., Perez, A. L., Schienda, J., Liadaki, K., Volinski, J., Flint, A., Chamberlain, J., and Kunkel, L. M. (2004): Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3581-6.
- Bar, S., Barnea, E., Levy, Z., Neuman, S., Yaffe, D., and Nudel, U. (1990): A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J* **272**, 557-60.
- Barbujani, G., Russo, A., Danieli, G. A., Spiegler, A. W., Borkowska, J., and Petruszewicz, I. H. (1990): Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Hum Genet* **84**, 522-6.
- Barman, S. A., Zhu, S., and White, R. E. (2004): PKC activates BKCa channels in rat pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L1275-81.

- Barnea, E., Zuk, D., Simantov, R., Nudel, U., and Yaffe, D. (1990): Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron* **5**, 881-8.
- Barton-Davis, E. R., Cordier, L., Shoturma, D. I., Leland, S. E., and Sweeney, H. L. (1999): Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* **104**, 375-81.
- Bassett, D. I., and Currie, P. D. (2003): The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2**, R265-70.
- Batchelor, C. L., and Winder, S. J. (2006): Sparks, signals and shock absorbers: how dystrophin loss causes muscular dystrophy. *Trends Cell Biol* **16**, 198-205.
- Becamel, C., Figue, A., Poliak, S., Dumuis, A., Peles, E., Bockaert, J., Lubbert, H., and Ullmer, C. (2001): Interaction of serotonin 5-hydroxytryptamine type 2C receptors with PDZ10 of the multi-PDZ domain protein MUPP1. *J Biol Chem* **276**, 12974-82.
- Becker, P. E., and Kiener, F. (1955): [A new x-chromosomal muscular dystrophy.]. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr* **193**, 427-48.
- Benson, M. A., Newey, S. E., Martin-Rendon, E., Hawkes, R., and Blake, D. J. (2001): Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain. *J Biol Chem* **276**, 24232-41.
- Bertoni, C., and Rando, T. A. (2002): Dystrophin gene repair in mdx muscle precursor cells in vitro and in vivo mediated by RNA-DNA chimeric oligonucleotides. *Hum Gene Ther* **13**, 707-18.
- Bertorini, T. E., Bhattacharya, S. K., Palmieri, G. M., Chesney, C. M., Pifer, D., and Baker, B. (1982): Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* **32**, 1088-92.
- Bessou, C., Giugia, J. B., Franks, C. J., Holden-Dye, L., and Segalat, L. (1998): Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission. *Neurogenetics* **2**, 61-72.
- Beurg, M., Hafidi, A., Skinner, L. J., Ruel, J., Nouvian, R., Henaff, M., Puel, J. L., Aran, J. M., and Dulon, D. (2005): Ryanodine receptors and BK channels act as a presynaptic depressor of neurotransmission in cochlear inner hair cells. *Eur J Neurosci* **22**, 1109-19.
- Blake, D. J. (2002): Dystrobrevin dynamics in muscle-cell signalling: a possible target for therapeutic intervention in Duchenne muscular dystrophy? *Neuromuscul Disord* **12 Suppl 1**, S110-7.
- Blake, D. J., Hawkes, R., Benson, M. A., and Beesley, P. W. (1999): Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J Cell Biol* **147**, 645-58.
- Blake, D. J., Nawrotzki, R., Loh, N. Y., Gorecki, D. C., and Davies, K. E. (1998): beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 241-6.
- Blake, D. J., Tinsley, J. M., Davies, K. E., Knight, A. E., Winder, S. J., and Kendrick-Jones, J. (1995): Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci* **20**, 133-5.
- Bogdanovich, S., Krag, T. O., Barton, E. R., Morris, L. D., Whittemore, L. A., Ahima, R. S., and Khurana, T. S. (2002): Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* **420**, 418-21.

- Bonnemann, C. G., Modi, R., Noguchi, S., Mizuno, Y., Yoshida, M., Gussoni, E., McNally, E. M., Duggan, D. J., Angelini, C., and Hoffman, E. P. (1995): Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet* **11**, 266-73.
- Bonuccelli, G., Sotgia, F., Schubert, W., Park, D. S., Frank, P. G., Woodman, S. E., Insabato, L., Cammer, M., Minetti, C., and Lisanti, M. P. (2003): Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins. *Am J Pathol* **163**, 1663-75.
- Bork, P., and Sudol, M. (1994): The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci* **19**, 531-3.
- Boyce, F. M., Beggs, A. H., Feener, C., and Kunkel, L. M. (1991): Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1276-80.
- Boyd, Y., Buckle, V., Holt, S., Munro, E., Hunter, D., and Craig, I. (1986): Muscular dystrophy in girls with X;autosome translocations. *J Med Genet* **23**, 484-90.
- Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., McGee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M. F., Froehner, S. C., and Brecht, D. S. (1996): Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* **84**, 757-67.
- Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K., and Brecht, D. S. (1995): Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **82**, 743-52.
- Brenner, S. (1974): The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Briguet, A., Courdier-Fruh, I., Foster, M., Meier, T., and Magyar, J. P. (2004): Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. *Neuromuscul Disord* **14**, 675-82.
- Buckle, V. J., Guenet, J. L., Simon-Chazottes, D., Love, D. R., and Davies, K. E. (1990): Localisation of a dystrophin-related autosomal gene to 6q24 in man, and to mouse chromosome 10 in the region of the dystrophia muscularis (dy) locus. *Hum Genet* **85**, 324-6.
- Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A., and Moore, K. J. (1984): X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1189-92.
- Bushby, K. M. (1999): The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet* **8**, 1875-82.
- Byers, T. J., Lidov, H. G., and Kunkel, L. M. (1993): An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet* **4**, 77-81.
- Calderone, V. (2002): Large-conductance, Ca^{2+} -activated K^{+} channels: function, pharmacology and drugs. *Curr Med Chem* **9**, 1385-95.
- Campbell, C., and Jacob, P. (2003): Deflazacort for the treatment of Duchenne Dystrophy: a systematic review. *BMC Neurol* **3**, 7.
- Campbell, K. P., and Kahl, S. D. (1989): Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* **338**, 259-62.
- Carnwath, J. W., and Shotton, D. M. (1987): Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci* **80**, 39-54.
- Carpenter, J. L., Hoffman, E. P., Romanul, F. C., Kunkel, L. M., Rosales, R. K., Ma, N. S., Dasbach, J. J., Rae, J. F., Moore, F. M., McAfee, M. B., and et al. (1989): Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am J Pathol* **135**, 909-19.

- Carre-Pierrat, M., Mariol, M. C., Chambonnier, L., Laugraud, A., Heskia, F., Giacomotto, J., and Segalat, L. (2006): Blocking of Striated Muscle Degeneration by Serotonin in *C. elegans*. *J Muscle Res Cell Motil* **27**, 253-8.
- Cartaud, A., Coutant, S., Petrucci, T. C., and Cartaud, J. (1998): Evidence for in situ and in vitro association between beta-dystroglycan and the subsynaptic 43K rapsyn protein. Consequence for acetylcholine receptor clustering at the synapse. *J Biol Chem* **273**, 11321-6.
- Catterall, W. A. (1991): Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels. *Cell* **64**, 871-4.
- Chamberlain, J. S. (2002): Gene therapy of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **11**, 2355-62.
- Chambers, S. P., Dodd, A., Overall, R., Sirey, T., Lam, L. T., Morris, G. E., and Love, D. R. (2001): Dystrophin in adult zebrafish muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 478-83.
- Chapman, V. M., Miller, D. R., Armstrong, D., and Caskey, C. T. (1989): Recovery of induced mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1292-6.
- Chardin, P., Cussac, D., Maignan, S., and Ducruix, A. (1995): The Grb2 adaptor. *FEBS Lett* **369**, 47-51.
- Charge, S. B., and Rudnicki, M. A. (2004): Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* **84**, 209-38.
- Chaubourt, E., Voisin, V., Fossier, P., Baux, G., Israel, M., and De La Porte, S. (2002): Muscular nitric oxide synthase (muNOS) and utrophin. *J Physiol Paris* **96**, 43-52.
- Chen, L., Krause, M., Sepanski, M., and Fire, A. (1994): The *Caenorhabditis elegans* MYOD homologue HLH-1 is essential for proper muscle function and complete morphogenesis. *Development* **120**, 1631-41.
- Clerk, A., Morris, G. E., Dubowitz, V., Davies, K. E., and Sewry, C. A. (1993): Dystrophin-related protein, utrophin, in normal and dystrophic human fetal skeletal muscle. *Histochem J* **25**, 554-61.
- Coffey, A. J., Roberts, R. G., Green, E. D., Cole, C. G., Butler, R., Anand, R., Giannelli, F., and Bentley, D. R. (1992): Construction of a 2.6-Mb contig in yeast artificial chromosomes spanning the human dystrophin gene using an STS-based approach. *Genomics* **12**, 474-84.
- Connors, N. C., Adams, M. E., Froehner, S. C., and Kofuji, P. (2004): The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J Biol Chem* **279**, 28387-92.
- Consortium, T. C. e. S. (1998): Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-8.
- Coulton, G. R., Morgan, J. E., Partridge, T. A., and Sloper, J. C. (1988): The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol* **14**, 53-70.
- Cox, G. A., Phelps, S. F., Chapman, V. M., and Chamberlain, J. S. (1993): New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin. *Nat Genet* **4**, 87-93.
- Cox, G. A., Sunada, Y., Campbell, K. P., and Chamberlain, J. S. (1994): Dp71 can restore the dystrophin-associated glycoprotein complex in muscle but fails to prevent dystrophy. *Nat Genet* **8**, 333-9.
- Cozier, G. E., Carlton, J., Bouyoucef, D., and Cullen, P. J. (2004): Membrane targeting by pleckstrin homology domains. *Curr Top Microbiol Immunol* **282**, 49-88.

- Crosbie, R. H., Heighway, J., Venzke, D. P., Lee, J. C., and Campbell, K. P. (1997): Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* **272**, 31221-4.
- Crosbie, R. H., Lebakken, C. S., Holt, K. H., Venzke, D. P., Straub, V., Lee, J. C., Grady, R. M., Chamberlain, J. S., Sanes, J. R., and Campbell, K. P. (1999): Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *J Cell Biol* **145**, 153-65.
- D'Souza, V. N., Nguyen, T. M., Morris, G. E., Karges, W., Pillers, D. A., and Ray, P. N. (1995): A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum Mol Genet* **4**, 837-42.
- Danko, I., Chapman, V., and Wolff, J. A. (1992): The frequency of revertants in mdx mouse genetic models for Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* **32**, 128-31.
- Davies, A. G., Pierce-Shimomura, J. T., Kim, H., VanHoven, M. K., Thiele, T. R., Bonci, A., Bargmann, C. I., and McIntire, S. L. (2003): A central role of the BK potassium channel in behavioral responses to ethanol in *C. elegans*. *Cell* **115**, 655-66.
- De Luca, A., Pierno, S., Liantonio, A., Cetrone, M., Camerino, C., Fraysse, B., Mirabella, M., Servidei, S., Ruegg, U. T., and Conte Camerino, D. (2003): Enhanced dystrophic progression in mdx mice by exercise and beneficial effects of taurine and insulin-like growth factor-1. *J Pharmacol Exp Ther* **304**, 453-63.
- De Recondo, J., and De Recondo, A.-M. (2001a): Dysfonctionnements du complexe dystrophine-protéines associées, pp. 69-88. In J. De Recondo, and A.-M. De Recondo (Eds): *Pathologie du muscle strié*, Flammarion, Paris.
- De Recondo, J., and De Recondo, A.-M. (2001b): Le muscle normal, pp. 1-24. In J. De Recondo, and A.-M. De Recondo (Eds): *Pathologie du muscle strié*, Flammarion, Paris.
- Deconinck, A. E., Rafael, J. A., Skinner, J. A., Brown, S. C., Potter, A. C., Metzinger, L., Watt, D. J., Dickson, J. G., Tinsley, J. M., and Davies, K. E. (1997a): Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **90**, 717-27.
- Deconinck, N., Tinsley, J., De Backer, F., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Davies, K., and Gillis, J. M. (1997b): Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice. *Nat Med* **3**, 1216-21.
- DelloRusso, C., Scott, J. M., Hartigan-O'Connor, D., Salvatori, G., Barjot, C., Robinson, A. S., Crawford, R. W., Brooks, S. V., and Chamberlain, J. S. (2002): Functional correction of adult mdx mouse muscle using gutted adenoviral vectors expressing full-length dystrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12979-84.
- Disatnik, M. H., Dhawan, J., Yu, Y., Beal, M. F., Whirl, M. M., Franco, A. A., and Rando, T. A. (1998): Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. *J Neurol Sci* **161**, 77-84.
- Dixon, A. K., Tait, T. M., Campbell, E. A., Bobrow, M., Roberts, R. G., and Freeman, T. C. (1997): Expression of the dystrophin-related protein 2 (Drp2) transcript in the mouse. *J Mol Biol* **270**, 551-8.
- Dorchies, O. M., Wagner, S., Vuadens, O., Waldhauser, K., Buetler, T. M., Kucera, P., and Ruegg, U. T. (2006): Green tea extract and its major polyphenol (-)-epigallocatechin gallate improve muscle function in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C616-25.

- Dunant, P., Walter, M. C., Karpati, G., and Lochmuller, H. (2003): Gentamicin fails to increase dystrophin expression in dystrophin-deficient muscle. *Muscle Nerve* **27**, 624-7.
- Duncan, C. J. (1978): Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: a strategy for controlling the dystrophic condition. *Experientia* **34**, 1531-5.
- Dunckley, M. G., Wells, D. J., Walsh, F. S., and Dickson, G. (1993): Direct retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse muscle in vivo. *Hum Mol Genet* **2**, 717-23.
- Durbeej, M., Jung, D., Hjalt, T., Campbell, K. P., and Ekblom, P. (1997): Transient expression of Dp140, a product of the Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis. *Dev Biol* **181**, 156-67.
- Earnest, J. P., Santos, G. F., Zuerbig, S., and Fox, J. E. (1995): Dystrophin-related protein in the platelet membrane skeleton. Integrin-induced change in detergent-insolubility and cleavage by calpain in aggregating platelets. *J Biol Chem* **270**, 27259-65.
- Ehmsen, J., Poon, E., and Davies, K. (2002): The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci* **115**, 2801-3.
- Emery, A. E. (1991): Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord* **1**, 19-29.
- Emery, A. E. (1993): Duchenne muscular dystrophy--Meryon's disease. *Neuromuscul Disord* **3**, 263-6.
- Endo, T. (2005): Aberrant glycosylation of alpha-dystroglycan and congenital muscular dystrophies. *Acta Myol* **24**, 64-9.
- England, S. B., Nicholson, L. V., Johnson, M. A., Forrest, S. M., Love, D. R., Zubrzycka-Gaarn, E. E., Bulman, D. E., Harris, J. B., and Davies, K. E. (1990): Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* **343**, 180-2.
- Ettinger, A. J., Feng, G., and Sanes, J. R. (1997): epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem* **272**, 32534-8.
- Feener, C. A., Koenig, M., and Kunkel, L. M. (1989): Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* **338**, 509-11.
- Fire, A. (1986): Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* **5**, 2673-2680.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Fisher, K. J., and Wilson, J. M. (1997): The transmembrane domain of diphtheria toxin improves molecular conjugate gene transfer. *Biochem J* **321 (Pt 1)**, 49-58.
- Fowler, E. G., Graves, M. C., Wetzel, G. T., and Spencer, M. J. (2004): Pilot trial of albuterol in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurology* **62**, 1006-8.
- Francis, G. R., and 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**, 1532-49.
- Froehner, S. C., Murnane, A. A., Tobler, M., Peng, H. B., and Sealock, R. (1987): A postsynaptic Mr 58,000 (58K) protein concentrated at acetylcholine receptor-rich sites in *Torpedo* electroplaques and skeletal muscle. *J Cell Biol* **104**, 1633-46.

- Gally, C., Eimer, S., Richmond, J. E., and Bessereau, J. L. (2004): A transmembrane protein required for acetylcholine receptor clustering in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **431**, 578-82.
- Gaschen, L., Lang, J., Lin, S., Ade-Damilano, M., Busato, A., Lombard, C. W., and Gaschen, F. P. (1999): Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hypertrophic feline muscular dystrophy. *J Vet Intern Med* **13**, 346-56.
- Gee, S. H., Madhavan, R., Levinson, S. R., Caldwell, J. H., Sealock, R., and Froehner, S. C. (1998): Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci* **18**, 128-37.
- Gee, S. H., Montanaro, F., Lindenbaum, M. H., and Carbonetto, S. (1994): Dystroglycan-alpha, a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. *Cell* **77**, 675-86.
- Gieseler, K., Abdel-Dayem, M., and Segalat, L. (1999a): In vitro interactions of *Caenorhabditis elegans* dystrophin with dystrobrevin and syntrophin. *FEBS Lett* **461**, 59-62.
- Gieseler, K., Bessou, C., and Segalat, L. (1999b): Dystrobrevin- and dystrophin-like mutants display similar phenotypes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurogenetics* **2**, 87-90.
- Gieseler, K., Grisoni, K., Mariol, M. C., and Segalat, L. (2002): Overexpression of dystrobrevin delays locomotion defects and muscle degeneration in a dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul Disord* **12**, 371-7.
- Gieseler, K., Grisoni, K., and Segalat, L. (2000): Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **10**, 1092-7.
- Gieseler, K., Mariol, M. C., Bessou, C., Migaud, M., Franks, C. J., Holden-Dye, L., and Segalat, L. (2001): Molecular, genetic and physiological characterisation of dystrobrevin-like (*dyb-1*) mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* **307**, 107-17.
- Gorecki, D. C., Monaco, A. P., Derry, J. M., Walker, A. P., Barnard, E. A., and Barnard, P. J. (1992): Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet* **1**, 505-10.
- Gosselin, L. E., and McCormick, K. M. (2004): Targeting the immune system to improve ventilatory function in muscular dystrophy. *Med Sci Sports Exerc* **36**, 44-51.
- Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J. C., Garcia, L., and Danos, O. (2004): Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* **306**, 1796-9.
- Grady, R. M., Grange, R. W., Lau, K. S., Maimone, M. M., Nichol, M. C., Stull, J. T., and Sanes, J. R. (1999): Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nat Cell Biol* **1**, 215-20.
- Grady, R. M., Zhou, H., Cunningham, J. M., Henry, M. D., Campbell, K. P., and Sanes, J. R. (2000): Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin--glycoprotein complex. *Neuron* **25**, 279-93.
- Graham, E., and Prevec, L. (1991): Manipulation of Adenovirus Vectors., pp. 109-128. In M. EJ (Ed.): *Methods in Molecular Biology*, Humana Press.
- Greener, M. J., and Roberts, R. G. (2000): Conservation of components of the dystrophin complex in *Drosophila*. *FEBS Lett* **482**, 13-8.
- Gregorevic, P., Plant, D. R., Leeding, K. S., Bach, L. A., and Lynch, G. S. (2002): Improved contractile function of the mdx dystrophic mouse diaphragm muscle after insulin-like growth factor-I administration. *Am J Pathol* **161**, 2263-72.

- Grishok, A. (2005): RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett* **579**, 5932-9.
- Grisoni, K., Gieseler, K., and Segalat, L. (2002a): Dystrobrevin requires a dystrophin-binding domain to function in *Caenorhabditis elegans*. *Eur J Biochem* **269**, 1607-12.
- Grisoni, K., Martin, E., Gieseler, K., Mariol, M. C., and Segalat, L. (2002b): Genetic evidence for a dystrophin-glycoprotein complex (DGC) in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **294**, 77-86.
- Grounds, M. D., and Torrisi, J. (2004): Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *Faseb J* **18**, 676-82.
- Gullberg, D. (2003): Cell biology: the molecules that make muscle. *Nature* **424**, 138-40.
- Guo, S., and Kemphues, K. J. (1995): par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**, 611-20.
- Gussoni, E., Bennett, R. R., Muskiewicz, K. R., Meyerrose, T., Nolte, J. A., Gilgoff, I., Stein, J., Chan, Y. M., Lidov, H. G., Bonnemant, C. G., Von Moers, A., Morris, G. E., Den Dunnen, J. T., Chamberlain, J. S., Kunkel, L. M., and Weinberg, K. (2002): Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J Clin Invest* **110**, 807-14.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M., and Mulligan, R. C. (1999): Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**, 390-4.
- Guttridge, D. C. (2004): Signaling pathways weigh in on decisions to make or break skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **7**, 443-50.
- Guyon, J. R., Mosley, A. N., Zhou, Y., O'Brien, K. F., Sheng, X., Chiang, K., Davidson, A. J., Volinski, J. M., Zon, L. I., and Kunkel, L. M. (2003): The dystrophin associated protein complex in zebrafish. *Hum Mol Genet* **12**, 601-15.
- Gyrd-Hansen, M., Krag, T. O., Rosmarin, A. G., and Khurana, T. S. (2002): Sp1 and the ets-related transcription factor complex GABP alpha/beta functionally cooperate to activate the utrophin promoter. *J Neurol Sci* **197**, 27-35.
- Hamamichi, Y., Ichida, F., Hashimoto, I., Uese, K. H., Miyawaki, T., Tsukano, S., Ono, Y., Echigo, S., and Kamiya, T. (2001): Isolated noncompaction of the ventricular myocardium: ultrafast computed tomography and magnetic resonance imaging. *Int J Cardiovasc Imaging* **17**, 305-14.
- Hamazaki, Y., Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., and Tsukita, S. (2002): Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* **277**, 455-61.
- Hamdan, F. F., Ungrin, M. D., Abramovitz, M., and Ribeiro, P. (1999): Characterization of a novel serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*: cloning and expression of two splice variants. *J Neurochem* **72**, 1372-83.
- Harper, P. S. (1986): Isolating the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Br Med J (Clin Res Ed)* **293**, 773-4.
- Harper, S. Q., Hauser, M. A., DelloRusso, C., Duan, D., Crawford, R. W., Phelps, S. F., Harper, H. A., Robinson, A. S., Engelhardt, J. F., Brooks, S. V., and Chamberlain, J. S. (2002): Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* **8**, 253-61.
- Hasegawa, M., Cuenda, A., Spillantini, M. G., Thomas, G. M., Buee-Scherrer, V., Cohen, P., and Goedert, M. (1999): Stress-activated protein kinase-3 interacts with the

- PDZ domain of alpha1-syntrophin. A mechanism for specific substrate recognition. *J Biol Chem* **274**, 12626-31.
- Helliwell, T. R., Jackson, M. J., Phoenix, J., MacLennan, P., West-Jordan, J., and Edwards, R. H. (1994): Immunohistochemical and biochemical indicators of muscle damage in vitro: the stability of control muscle and the effects of dinitrophenol and calcium ionophore. *Int J Exp Pathol* **75**, 329-43.
- Herrera, G. M., and Nelson, M. T. (2002): Differential regulation of SK and BK channels by Ca(2+) signals from Ca(2+) channels and ryanodine receptors in guinea-pig urinary bladder myocytes. *J Physiol* **541**, 483-92.
- Hobson, R. J., Geng, J., Gray, A. D., and Komuniecki, R. W. (2003): SER-7b, a constitutively active Galphas coupled 5-HT7-like receptor expressed in the *Caenorhabditis elegans* M4 pharyngeal motoneuron. *J Neurochem* **87**, 22-9.
- Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr., and Kunkel, L. M. (1987): Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**, 919-28.
- Hohenester, E., Tisi, D., Talts, J. F., and Timpl, R. (1999): The crystal structure of a laminin G-like module reveals the molecular basis of alpha-dystroglycan binding to laminins, perlecan, and agrin. *Mol Cell* **4**, 783-92.
- Holder, E., Maeda, M., and Bies, R. D. (1996): Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain. *Hum Genet* **97**, 232-9.
- Howell, J. M., Fletcher, S., Kakulas, B. A., O'Hara, M., Lochmuller, H., and Karpati, G. (1997): Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. *Neuromuscul Disord* **7**, 325-8.
- Hunter, R. B., and Kandarian, S. C. (2004): Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. *J Clin Invest* **114**, 1504-11.
- Ibraghimov-Beskrovnyaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W., and Campbell, K. P. (1992): Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* **355**, 696-702.
- Ibraghimov-Beskrovnyaya, O., Milatovich, A., Ozcelik, T., Yang, B., Koepnick, K., Francke, U., and Campbell, K. P. (1993): Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum Mol Genet* **2**, 1651-7.
- Ichida, F., Tsubata, S., Bowles, K. R., Haneda, N., Uese, K., Miyawaki, T., Dreyer, W. J., Messina, J., Li, H., Bowles, N. E., and Towbin, J. A. (2001): Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome. *Circulation* **103**, 1256-63.
- Im, W. B., Phelps, S. F., Copen, E. H., Adams, E. G., Slightom, J. L., and Chamberlain, J. S. (1996): Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Hum Mol Genet* **5**, 1149-53.
- Ito, K., Komazaki, S., Sasamoto, K., Yoshida, M., Nishi, M., Kitamura, K., and Takeshima, H. (2001): Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J Cell Biol* **154**, 1059-67.
- Jacquemond, V., and Allard, B. (1998): Activation of Ca2+-activated K+ channels by an increase in intracellular Ca2+ induced by depolarization of mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* **509 (Pt 1)**, 93-102.
- James, M., Simmons, C., Wise, C. J., Jones, G. E., and Morris, G. E. (1995): Evidence for a utrophin-glycoprotein complex in cultured cell lines and a possible role in cell adhesion. *Biochem Soc Trans* **23**, 398S.

- Jospin, M., Jacquemond, V., Mariol, M. C., Segalat, L., and Allard, B. (2002): The L-type voltage-dependent Ca²⁺ channel EGL-19 controls body wall muscle function in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **159**, 337-48.
- Judge, L. M., Haraguchiln, M., and Chamberlain, J. S. (2006): Dissecting the signaling and mechanical functions of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci* **119**, 1537-46.
- Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J. S., and Campbell, K. P. (1995): Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem* **270**, 27305-10.
- Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G., and Ahringer, J. (2001): Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* **2**, RESEARCH0002.
- Kapsa, R., Quigley, A., Lynch, G. S., Steeper, K., Kornberg, A. J., Gregorevic, P., Austin, L., and Byrne, E. (2001): In vivo and in vitro correction of the mdx dystrophin gene nonsense mutation by short-fragment homologous replacement. *Hum Gene Ther* **12**, 629-42.
- Karpati, G. (2002): Dystrophinopathies, pp. 6-23. In G. Karpati (Ed.): *Structural and molecular basis of skeletal muscle diseases*, ISN Neuropath Press.
- Khurana, T. S., Watkins, S. C., Chafey, P., Chelly, J., Tome, F. M., Fardeau, M., Kaplan, J. C., and Kunkel, L. M. (1991): Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* **1**, 185-94.
- Khurana, T. S., Watkins, S. C., and Kunkel, L. M. (1992): The subcellular distribution of chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in the brain. *J Cell Biol* **119**, 357-66.
- Kim, H., Rogers, M. J., Richmond, J. E., and McIntire, S. L. (2004): SNF-6 is an acetylcholine transporter interacting with the dystrophin complex in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **430**, 891-6.
- Koenig, M., Beggs, A. H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Muller, C. R., Lindlof, M., Kaariainen, H., and et al. (1989): The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* **45**, 498-506.
- Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., and Kunkel, L. M. (1987): Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* **50**, 509-17.
- Koenig, M., and Kunkel, L. M. (1990): Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem* **265**, 4560-6.
- Koenig, M., Monaco, A. P., and Kunkel, L. M. (1988): The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* **53**, 219-26.
- Korovkina, V. P., and England, S. K. (2002): Detection and implications of potassium channel alterations. *Vascul Pharmacol* **38**, 3-12.
- Krause, M., Fire, A., Harrison, S. W., Priess, J., and Weintraub, H. (1990): CeMyoD accumulation defines the body wall muscle cell fate during *C. elegans* embryogenesis. *Cell* **63**, 907-19.
- Kunkel, L. M., Hejtmancik, J. F., Caskey, C. T., Speer, A., Monaco, A. P., Middlesworth, W., Colletti, C. A., Bertelson, C., Muller, U., Bresnan, M., Shapiro, F., Tantravahi, U., Speer, J., Latt, S. A., Bartlett, R., Pericak-Vance, M. A., Roses,

- A. D., Thompson, M. W., Ray, P. N., Worton, R. G., Fischbeck, K. H., Gallano, P., Coulon, M., Duros, C., Boue, J., Junien, C., Chelly, J., Hamard, G., Jeanpierre, M., Lambert, M., Kaplan, J. C., Emery, A., Dorkins, H., McGlade, S., Davies, K. E., Boehm, C., Arveiler, B., Lemaire, C., Morgan, G. J., Denton, M. J., Amos, J., Bobrow, M., Benham, F., Boswinkel, E., Cole, C., Dubowitz, V., Hart, K., Hodgson, S., Johnson, L., Walker, A., Roncuzzi, L., Ferlini, A., Nobile, C., Romeo, G., Wilcox, D. E., Affara, N. A., Ferguson-Smith, M. A., Lindolf, M., Kaariainen, H., de la Chapelle, A., Ionasescu, V., Searby, C., Ionasescu, R., Bakker, E., van Ommen, G. J., Pearson, P. L., Greenberg, C. R., Hamerton, J. L., Wrogemann, K., Doherty, R. A., Polakowska, R., Hyser, C., Quirk, S., Thomas, N., Harper, J. F., Darras, B. T., and Francke, U. (1986): Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **322**, 73-7.
- Le Grand, B., Panissie, A., Pauwels, P. J., and John, G. W. (1998): Activation of recombinant h 5-HT1B and h 5-HT1D receptors stably expressed in C6 glioma cells produces increases in Ca²⁺-dependent K⁺ current. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **358**, 608-15.
- Liang, K. W., Nishikawa, M., Liu, F., Sun, B., Ye, Q., and Huang, L. (2004): Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA. *Gene Ther* **11**, 901-8.
- Lidov, H. G., Selig, S., and Kunkel, L. M. (1995): Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet* **4**, 329-35.
- Lim, H. H., Park, B. J., Choi, H. S., Park, C. S., Eom, S. H., and Ahnn, J. (1999): Identification and characterization of a putative *C. elegans* potassium channel gene (*Ce-slo-2*) distantly related to Ca(2+)-activated K(+) channels. *Gene* **240**, 35-43.
- Lim, L. E., Duclos, F., Broux, O., Bourg, N., Sunada, Y., Allamand, V., Meyer, J., Richard, I., Moomaw, C., Slaughter, C., and et al. (1995): Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet* **11**, 257-65.
- Liu, F., Nishikawa, M., Clemens, P. R., and Huang, L. (2001): Transfer of full-length Dmd to the diaphragm muscle of Dmd(mdx/mdx) mice through systemic administration of plasmid DNA. *Mol Ther* **4**, 45-51.
- Loh, N. Y., Newey, S. E., Davies, K. E., and Blake, D. J. (2000): Assembly of multiple dystrobrevin-containing complexes in the kidney. *J Cell Sci* **113 (Pt 15)**, 2715-24.
- Louboutin, J. P., Fichter-Gagnepain, V., Thaon, E., and Fardeau, M. (1993): Morphometric analysis of mdx diaphragm muscle fibres. Comparison with hindlimb muscles. *Neuromuscul Disord* **3**, 463-9.
- Love, D. R., Byth, B. C., Tinsley, J. M., Blake, D. J., and Davies, K. E. (1993): Dystrophin and dystrophin-related proteins: a review of protein and RNA studies. *Neuromuscul Disord* **3**, 5-21.
- Love, D. R., Hill, D. F., Dickson, G., Spurr, N. K., Byth, B. C., Marsden, R. F., Walsh, F. S., Edwards, Y. H., and Davies, K. E. (1989): An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* **339**, 55-8.
- Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. (1992): The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**, 431-42.

- Mallouk, N., Jacquemond, V., and Allard, B. (2000): Elevated subsarcolemmal Ca²⁺ in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4950-5.
- Mariol, M. C., and Segalat, L. (2001): Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. *Curr Biol* **11**, 1691-4.
- Maryon, E. B., Saari, B., and Anderson, P. (1998): Muscle-specific functions of ryanodine receptor channels in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* **111** (Pt 19), 2885-95.
- Matsumura, K., Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., and Campbell, K. P. (1992): Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature* **360**, 588-91.
- Matzke, M. A., and Birchler, J. A. (2005): RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet* **6**, 24-35.
- McClorey, G., Moulton, H. M., Iversen, P. L., Fletcher, S., and Wilton, S. D. (2006): Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. *Gene Ther.*
- McPherron, A. C., Lawler, A. M., and Lee, S. J. (1997): Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**, 83-90.
- Megeney, L. A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J. E., and Rudnicki, M. A. (1996): MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev* **10**, 1173-83.
- Megeney, L. A., Kablar, B., Perry, R. L., Ying, C., May, L., and Rudnicki, M. A. (1999): Severe cardiomyopathy in mice lacking dystrophin and MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 220-5.
- Meltzer, H. Y. (1976): Skeletal muscle necrosis following membrane-active drugs plus serotonin. *J Neurol Sci* **28**, 41-56.
- Mendell, J. R., Silverman, L. M., Verrill, H. L., Parker, J. M., and Olson, W. H. (1976): Imipramine-serotonin induced myopathy. *Neurology* **26**, 968-74.
- Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, M. A., Volonte, D., Galbiati, F., Cordone, G., Bricarelli, F. D., Lisanti, M. P., and Zara, F. (1998): Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* **18**, 365-8.
- Miyagoe-Suzuki, Y., Nakagawa, M., and Takeda, S. (2000): Merosin and congenital muscular dystrophy. *Microsc Res Tech* **48**, 181-91.
- Mizuno, Y., Thompson, T. G., Guyon, J. R., Lidov, H. G., Brosius, M., Imamura, M., Ozawa, E., Watkins, S. C., and Kunkel, L. M. (2001): Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha -dystrobrevin and desmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6156-61.
- Monaco, A. P., Walker, A. P., Millwood, I., Larin, Z., and Lehrach, H. (1992): A yeast artificial chromosome contig containing the complete Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics* **12**, 465-73.
- Mouly, V., Aamiri, A., Perie, S., Mamchaoui, K., Barani, A., Bigot, A., Bouazza, B., Francois, V., Furling, D., Jacquemin, V., Negroni, E., Riederer, I., Vignaud, A., St Guily, J. L., and Butler-Browne, G. S. (2005): Myoblast transfer therapy: is there any light at the end of the tunnel? *Acta Myol* **24**, 128-33.
- Muntoni, F., Mateddu, A., Marchei, F., Clerk, A., and Serra, G. (1993): Muscular weakness in the mdx mouse. *J Neurol Sci* **120**, 71-7.

- Murray, J. M., Davies, K. E., Harper, P. S., Meredith, L., Mueller, C. R., and Williamson, R. (1982): Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **300**, 69-71.
- Narukami, H., Yoshioka, K., Zhao, J., and Miike, T. (1991): Experimental serotonin myopathy as an animal model of muscle degeneration and regeneration in muscular dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* **81**, 510-6.
- Newey, S. E., Benson, M. A., Ponting, C. P., Davies, K. E., and Blake, D. J. (2000): Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr Biol* **10**, 1295-8.
- Newey, S. E., Howman, E. V., Ponting, C. P., Benson, M. A., Nawrotzki, R., Loh, N. Y., Davies, K. E., and Blake, D. J. (2001): Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle. *J Biol Chem* **276**, 6645-55.
- Nguyen, T. M., Ellis, J. M., Love, D. R., Davies, K. E., Gatter, K. C., Dickson, G., and Morris, G. E. (1991): Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines. *J Cell Biol* **115**, 1695-700.
- Nguyen, T. M., Le, T. T., Blake, D. J., Davies, K. E., and Morris, G. E. (1992): Utrophin, the autosomal homologue of dystrophin, is widely-expressed and membrane-associated in cultured cell lines. *FEBS Lett* **313**, 19-22.
- Nicole, S., Davoine, C. S., Topaloglu, H., Cattolico, L., Barral, D., Beighton, P., Hamida, C. B., Hammouda, H., Cruaud, C., White, P. S., Samson, D., Urtizberea, J. A., Lehmann-Horn, F., Weissenbach, J., Hentati, F., and Fontaine, B. (2000): Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). *Nat Genet* **26**, 480-3.
- Nigro, V., de Sa Moreira, E., Piluso, G., Vainzof, M., Belsito, A., Politano, L., Puca, A. A., Passos-Bueno, M. R., and Zatz, M. (1996a): Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet* **14**, 195-8.
- Nigro, V., Piluso, G., Belsito, A., Politano, L., Puca, A. A., Papparella, S., Rossi, E., Viglietto, G., Esposito, M. G., Abbondanza, C., Medici, N., Molinari, A. M., Nigro, G., and Puca, G. A. (1996b): Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum Mol Genet* **5**, 1179-86.
- Nishio, H., Takeshima, Y., Narita, N., Yanagawa, H., Suzuki, Y., Ishikawa, Y., Ishikawa, Y., Minami, R., Nakamura, H., and Matsuo, M. (1994): Identification of a novel first exon in the human dystrophin gene and of a new promoter located more than 500 kb upstream of the nearest known promoter. *J Clin Invest* **94**, 1037-42.
- Nobile, C., Marchi, J., Nigro, V., Roberts, R. G., and Danieli, G. A. (1997): Exon-intron organization of the human dystrophin gene. *Genomics* **45**, 421-4.
- Noguchi, S., McNally, E. M., Ben Othmane, K., Hagiwara, Y., Mizuno, Y., Yoshida, M., Yamamoto, H., Bonnemann, C. G., Gussoni, E., Denton, P. H., Kyriakides, T., Middleton, L., Hentati, F., Ben Hamida, M., Nonaka, I., Vance, J. M., Kunkel, L. M., and Ozawa, E. (1995): Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* **270**, 819-22.
- Nowak, K. J., and Davies, K. E. (2004): Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep* **5**, 872-6.

- Nudel, U., Zuk, D., Einat, P., Zeelon, E., Levy, Z., Neuman, S., and Yaffe, D. (1989): Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature* **337**, 76-8.
- Nurrish, S., Segalat, L., and Kaplan, J. M. (1999): Serotonin inhibition of synaptic transmission: Galpha(0) decreases the abundance of UNC-13 at release sites. *Neuron* **24**, 231-42.
- Ohi, Y., Yamamura, H., Nagano, N., Ohya, S., Muraki, K., Watanabe, M., and Imaizumi, Y. (2001): Local Ca(2+) transients and distribution of BK channels and ryanodine receptors in smooth muscle cells of guinea-pig vas deferens and urinary bladder. *J Physiol* **534**, 313-26.
- Ohlendieck, K., and Campbell, K. P. (1991): Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. *J Cell Biol* **115**, 1685-94.
- Ohlendieck, K., Ervasti, J. M., Matsumura, K., Kahl, S. D., Leveille, C. J., and Campbell, K. P. (1991): Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron* **7**, 499-508.
- Olde, B., and McCombie, W. R. (1997): Molecular cloning and functional expression of a serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Neurosci* **8**, 53-62.
- Ozawa, E., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., Sasaoka, T., and Yoshida, M. (2005): Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve* **32**, 563-76.
- Partridge, T. A., Morgan, J. E., Coulton, G. R., Hoffman, E. P., and Kunkel, L. M. (1989): Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* **337**, 176-9.
- Pastorekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., and Supuran, C. T. (2004): Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J Enzyme Inhib Med Chem* **19**, 199-229.
- Peng, H., and Huard, J. (2004): Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl Immunol* **12**, 311-9.
- Peng, H. B., Ali, A. A., Daggett, D. F., Rauvala, H., Hassell, J. R., and Smalheiser, N. R. (1998): The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction. *Cell Adhes Commun* **5**, 475-89.
- Peters, M. F., Kramarcy, N. R., Sealock, R., and Froehner, S. C. (1994): beta 2-Syntrophin: localization at the neuromuscular junction in skeletal muscle. *Neuroreport* **5**, 1577-80.
- Peters, M. F., Sadoulet-Puccio, H. M., Grady, M. R., Kramarcy, N. R., Kunkel, L. M., Sanes, J. R., Sealock, R., and Froehner, S. C. (1998): Differential membrane localization and intermolecular associations of alpha-dystrobrevin isoforms in skeletal muscle. *J Cell Biol* **142**, 1269-78.
- Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M., and Sweeney, H. L. (1993): Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3710-4.
- Pillers, D. A., Bulman, D. E., Weleber, R. G., Sigesmund, D. A., Musarella, M. A., Powell, B. R., Murphey, W. H., Westall, C., Panton, C., Becker, L. E., and et al. (1993): Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat Genet* **4**, 82-6.
- Piluso, G., Mirabella, M., Ricci, E., Belsito, A., Abbondanza, C., Servidei, S., Puca, A. A., Tonali, P., Puca, G. A., and Nigro, V. (2000): Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells. *J Biol Chem* **275**, 15851-60.

- Polakoff, R. J., Morton, A. A., Koch, K. D., and Rios, C. M. (1998): The psychosocial and cognitive impact of Duchenne's muscular dystrophy. *Semin Pediatr Neurol* **5**, 116-23.
- Pons, F., Robert, A., Fabrizio, E., Hugon, G., Califano, J. C., Fehrentz, J. A., Martinez, J., and Mornet, D. (1994): Utrophin localization in normal and dystrophin-deficient heart. *Circulation* **90**, 369-74.
- Ponting, C. P., Blake, D. J., Davies, K. E., Kendrick-Jones, J., and Winder, S. J. (1996): ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem Sci* **21**, 11-13.
- Ponting, C. P., and Phillips, C. (1995): DHR domains in syntrophins, neuronal NO synthases and other intracellular proteins. *Trends Biochem Sci* **20**, 102-3.
- Rando, T. A. (2001): The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* **24**, 1575-94.
- Ranganathan, R., Cannon, S. C., and Horvitz, H. R. (2000): MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature* **408**, 470-5.
- Rapaport, D., Lederfein, D., den Dunnen, J. T., Grootsholten, P. M., Van Ommen, G. J., Fuchs, O., Nudel, U., and Yaffe, D. (1992): Characterization and cell type distribution of a novel, major transcript of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Differentiation* **49**, 187-93.
- Raymackers, J. M., Debaix, H., Colson-Van Schoor, M., De Backer, F., Tajeddine, N., Schwaller, B., Gailly, P., and Gillis, J. M. (2003): Consequence of parvalbumin deficiency in the mdx mouse: histological, biochemical and mechanical phenotype of a new double mutant. *Neuromuscul Disord* **13**, 376-87.
- Raymond, J. R., Mukhin, Y. V., Gelasco, A., Turner, J., Collinsworth, G., Gettys, T. W., Grewal, J. S., and Garnovskaya, M. N. (2001): Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* **92**, 179-212.
- Reboul, J., Vaglio, P., Tzellas, N., Thierry-Mieg, N., Moore, T., Jackson, C., Shin-i, T., Kohara, Y., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Lee, H., Hitti, J., Doucette-Stamm, L., Hartley, J. L., Temple, G. F., Brasch, M. A., Vandenhoute, J., Lamesch, P. E., Hill, D. E., and Vidal, M. (2001): Open-reading-frame sequence tags (OSTs) support the existence of at least 17,300 genes in *C. elegans*. *Nat Genet* **27**, 332-6.
- Riddle, D., Blumenthal, T., Meyer, B., and Priess, J. (1997): Introduction to *C. elegans*, pp. 1-22. In D. Riddle, T. Blumenthal, B. Meyer, and J. Priess (Eds): *C. elegans II*, Cold Spring Harbor laboratory press.
- Rivier, F., Robert, A., Hugon, G., and Mornet, D. (1997): Different utrophin and dystrophin properties related to their vascular smooth muscle distributions. *FEBS Lett* **408**, 94-8.
- Roberds, S. L., Anderson, R. D., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., and Campbell, K. P. (1993): Primary structure and muscle-specific expression of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhelin). *J Biol Chem* **268**, 23739-42.
- Roberts, R. G. (2001): Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3006.
- Roberts, R. G., and Bobrow, M. (1998): Dystrophins in vertebrates and invertebrates. *Hum Mol Genet* **7**, 589-95.
- Roberts, R. G., Coffey, A. J., Bobrow, M., and Bentley, D. R. (1993): Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* **16**, 536-8.

- Roberts, R. G., Freeman, T. C., Kendall, E., Vetrie, D. L., Dixon, A. K., Shaw-Smith, C., Bone, Q., and Bobrow, M. (1996): Characterization of DRP2, a novel human dystrophin homologue. *Nat Genet* **13**, 223-6.
- Romero, N. B., Benveniste, O., Payan, C., Braun, S., Squiban, P., Herson, S., and Fardeau, M. (2002): Current protocol of a research phase I clinical trial of full-length dystrophin plasmid DNA in Duchenne/Becker muscular dystrophies. Part II: clinical protocol. *Neuromuscul Disord* **12 Suppl 1**, S45-8.
- Romero, N. B., Braun, S., Benveniste, O., Leturcq, F., Hogrel, J. Y., Morris, G. E., Barois, A., Eymard, B., Payan, C., Ortega, V., Boch, A. L., Lejean, L., Thiouellet, C., Mourot, B., Escot, C., Choquel, A., Recan, D., Kaplan, J. C., Dickson, G., Klatzmann, D., Molinier-Frenckel, V., Guillet, J. G., Squiban, P., Herson, S., and Fardeau, M. (2004): Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* **15**, 1065-76.
- Sadoulet-Puccio, H. M., Khurana, T. S., Cohen, J. B., and Kunkel, L. M. (1996): Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane. *Hum Mol Genet* **5**, 489-96.
- Sadoulet-Puccio, H. M., and Kunkel, L. M. (1996): Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol* **6**, 25-35.
- Sakamoto, A., Ono, K., Abe, M., Jasmin, G., Eki, T., Murakami, Y., Masaki, T., Toyooka, T., and Hanaoka, F. (1997): Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13873-8.
- Santi, C. M., Yuan, A., Fawcett, G., Wang, Z. W., Butler, A., Nonet, M. L., Wei, A., Rojas, P., and Salkoff, L. (2003): Dissection of K⁺ currents in *Caenorhabditis elegans* muscle cells by genetics and RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14391-6.
- Schatzberg, S. J., Anderson, L. V., Wilton, S. D., Kornegay, J. N., Mann, C. J., Solomon, G. G., and Sharp, N. J. (1998): Alternative dystrophin gene transcripts in golden retriever muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **21**, 991-8.
- Schubert, R., and Nelson, M. T. (2001): Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 505-12.
- Schultz, J., Hoffmuller, U., Krause, G., Ashurst, J., Macias, M. J., Schmieder, P., Schneider-Mergener, J., and Oschkinat, H. (1998): Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nat Struct Biol* **5**, 19-24.
- Segalat, L. (2002): Dystrophin and functionally related proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul Disord* **12 Suppl 1**, S105-9.
- Shavlakadze, T., White, J., Hoh, J. F., Rosenthal, N., and Grounds, M. D. (2004): Targeted expression of insulin-like growth factor-I reduces early myofiber necrosis in dystrophic mdx mice. *Mol Ther* **10**, 829-43.
- Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A. S., Barnard, E. A., Darlison, M. G., and Barnard, P. J. (1989): The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* **244**, 1578-80.
- Skuk, D., and Tremblay, J. P. (2000): Progress in myoblast transplantation: a potential treatment of dystrophies. *Microsc Res Tech* **48**, 213-22.
- Smythe, G. M., Eby, J. C., Disatnik, M. H., and Rando, T. A. (2003): A caveolin-3 mutant that causes limb girdle muscular dystrophy type 1C disrupts Src

- localization and activity and induces apoptosis in skeletal myotubes. *J Cell Sci* **116**, 4739-49.
- Smythe, G. M., Hodgetts, S. I., and Grounds, M. D. (2001): Problems and solutions in myoblast transfer therapy. *J Cell Mol Med* **5**, 33-47.
- Sotgia, F., Lee, J. K., Das, K., Bedford, M., Petrucci, T. C., Macioce, P., Sargiacomo, M., Bricarelli, F. D., Minetti, C., Sudol, M., and Lisanti, M. P. (2000): Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem* **275**, 38048-58.
- Stedman, H. H., Sweeney, H. L., Shrager, J. B., Maguire, H. C., Panettieri, R. A., Petrof, B., Narusawa, M., Leferovich, J. M., Sladky, J. T., and Kelly, A. M. (1991): The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **352**, 536-9.
- Sugimoto, A. (2004): High-throughput RNAi in *Caenorhabditis elegans*: genome-wide screens and functional genomics. *Differentiation* **72**, 81-91.
- Sulston, J., and Hodgkin, J. (1988): Methods, pp. 587-606. In W. B. Wood (Ed.): *The nematode Caenorhabditis elegans*, Cold Spring Harbor laboratory press.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., and Thomson, J. N. (1983): The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**, 64-119.
- Suzuki, A., Yoshida, M., Hayashi, K., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., and Ozawa, E. (1994): Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. Three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin. *Eur J Biochem* **220**, 283-92.
- Suzuki, A., Yoshida, M., Yamamoto, H., and Ozawa, E. (1992): Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain. *FEBS Lett* **308**, 154-60.
- Tabara, H., Grishok, A., and Mello, C. C. (1998): RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* **282**, 430-1.
- Takehima, Y., Yagi, M., Wada, H., Ishibashi, K., Nishiyama, A., Kakumoto, M., Sakaeda, T., Saura, R., Okumura, K., and Matsuo, M. (2006): Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* **59**, 690-4.
- Tanabe, Y., Esaki, K., and Nomura, T. (1986): Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol (Berl)* **69**, 91-5.
- Tavernarakis, N., Wang, S. L., Dorovkov, M., Ryazanov, A., and Driscoll, M. (2000): Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet* **24**, 180-3.
- Thompson, T. G., Chan, Y. M., Hack, A. A., Brosius, M., Rajala, M., Lidov, H. G., McNally, E. M., Watkins, S., and Kunkel, L. M. (2000): Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J Cell Biol* **148**, 115-26.
- Tidball, J. G., and Wehling-Henricks, M. (2004): Evolving therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: targeting downstream events. *Pediatr Res* **56**, 831-41.
- Timmons, L., and Fire, A. (1998): Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854.
- Tinsley, J. M., Blake, D. J., Roche, A., Fairbrother, U., Riss, J., Byth, B. C., Knight, A. E., Kendrick-Jones, J., Suthers, G. K., Love, D. R., and et al. (1992): Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* **360**, 591-3.

- Tinsley, J. M., Potter, A. C., Phelps, S. R., Fisher, R., Trickett, J. I., and Davies, K. E. (1996): Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* **384**, 349-53.
- Towers, P. R., Lescure, P., Baban, D., Malek, J. A., Duarte, J., Jones, E., Davies, K. E., Segalat, L., and Sattelle, D. B. (2006): Gene expression profiling studies on *Caenorhabditis elegans* dystrophin mutants dys-1(cx-35) and dys-1(cx18). *Genomics*.
- Tremblay, J. P., and Vilquin, J. T. (2001): [Transplantation of normal or genetically modified myoblasts for the treatment of hereditary or acquired diseases]. *J Soc Biol* **195**, 29-37.
- Tricarico, D., Mele, A., and Conte Camerino, D. (2006): Carbonic anhydrase inhibitors ameliorate the symptoms of hypokalaemic periodic paralysis in rats by opening the muscular Ca²⁺-activated-K⁺ channels. *Neuromuscul Disord* **16**, 39-45.
- Vainzof, M., Passos-Bueno, M. R., Pavanello, R. C., Schreiber, R., and Zatz, M. (1992): A model to estimate the expression of the dystrophin gene in muscle from female Becker muscular dystrophy carriers. *J Med Genet* **29**, 476-9.
- Valentine, B. A., Cooper, B. J., Cummings, J. F., and deLahunta, A. (1986): Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol (Berl)* **71**, 301-10.
- Valentine, B. A., Cooper, B. J., de Lahunta, A., O'Quinn, R., and Blue, J. T. (1988): Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. *J Neurol Sci* **88**, 69-81.
- Valentine, B. A., Winand, N. J., Pradhan, D., Moise, N. S., de Lahunta, A., Kornegay, J. N., and Cooper, B. J. (1992): Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: a review. *Am J Med Genet* **42**, 352-6.
- van der Plas, M. C., Pilgram, G. S., Plomp, J. J., de Jong, A., Fradkin, L. G., and Noordermeer, J. N. (2006): Dystrophin is required for appropriate retrograde control of neurotransmitter release at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurosci* **26**, 333-44.
- Vastenhouw, N. L., and Plasterk, R. H. (2004): RNAi protects the *Caenorhabditis elegans* germline against transposition. *Trends Genet* **20**, 314-9.
- Venema, V. J., Ju, H., Zou, R., and Venema, R. C. (1997): Interaction of neuronal nitric oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J Biol Chem* **272**, 28187-90.
- Vincent-Lacaze, N., Snyder, R. O., Gluzman, R., Bohl, D., Lagarde, C., and Danos, O. (1999): Structure of adeno-associated virus vector DNA following transduction of the skeletal muscle. *J Virol* **73**, 1949-55.
- Wang, Z. W., Saifee, O., Nonet, M. L., and Salkoff, L. (2001): SLO-1 potassium channels control quantal content of neurotransmitter release at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Neuron* **32**, 867-81.
- Waterstone, R. (1988): Muscle, pp. 281-335. In W. Wood (Ed.): *The nematode Caenorhabditis elegans*, Corls Spring Harbor laboratory press.
- Webster, C., Silberstein, L., Hays, A. P., and Blau, H. M. (1988): Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **52**, 503-13.
- Wells, K. E., Fletcher, S., Mann, C. J., Wilton, S. D., and Wells, D. J. (2003): Enhanced in vivo delivery of antisense oligonucleotides to restore dystrophin expression in adult mdx mouse muscle. *FEBS Lett* **552**, 145-9.
- Wheeler, M. T., Zarnegar, S., and McNally, E. M. (2002): Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **11**, 2147-54.

- Whewey, J. M., and Roberts, R. G. (2003): The dystrophin lymphocyte promoter revisited: 4.5-megabase intron, or artifact? *Neuromuscul Disord* **13**, 17-20.
- Williams, J. C., Armesilla, A. L., Mohamed, T. M., Hagarty, C. L., McIntyre, F. H., Schomburg, S., Zaki, A. O., Oceandy, D., Cartwright, E. J., Buch, M. H., Emerson, M., and Neyses, L. (2006): The sarcolemmal calcium pump, alpha-1 syntrophin and neuronal nitric oxide synthase are part of a macromolecular protein complex. *J Biol Chem*.
- Winand, N. J., Edwards, M., Pradhan, D., Berian, C. A., and Cooper, B. J. (1994): Deletion of the dystrophin muscle promoter in feline muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* **4**, 433-45.
- Wood, W. (1988): Introduction to *C. elegans* biology, pp. 1-16. In W. B. Wood (Ed.): *The nematode Caenorhabditis elegans*, Cold spring harbor laboratory press.
- Xiao, W., and Brandsma, J. L. (1996): High efficiency, long-term clinical expression of cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) DNA in rabbit skin following particle-mediated DNA transfer. *Nucleic Acids Res* **24**, 2620-2.
- Yang, B., Jung, D., Rafael, J. A., Chamberlain, J. S., and Campbell, K. P. (1995): Identification of alpha-syntrophin binding to syntrophin triplet, dystrophin, and utrophin. *J Biol Chem* **270**, 4975-8.
- Yoshida, M., Hama, H., Ishikawa-Sakurai, M., Imamura, M., Mizuno, Y., Araishi, K., Wakabayashi-Takai, E., Noguchi, S., Sasaoka, T., and Ozawa, E. (2000): Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum Mol Genet* **9**, 1033-40.
- Yoshida, M., and Ozawa, E. (1990): Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem (Tokyo)* **108**, 748-52.
- Yoshida, M., Sugimoto, A., Ohshima, Y., and Takeshima, H. (2001): Important role of junctophilin in nematode motor function. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 234-9.
- Yoshida, M., Suzuki, A., Yamamoto, H., Noguchi, S., Mizuno, Y., and Ozawa, E. (1994): Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta-D-glucoside. *Eur J Biochem* **222**, 1055-61.
- Yuan, A., Dourado, M., Butler, A., Walton, N., Wei, A., and Salkoff, L. (2000): SLO-2, a K⁺ channel with an unusual Cl⁻ dependence. *Nat Neurosci* **3**, 771-9.
- Zhang, G., Ludtke, J. J., Thioudellet, C., Kleinpeter, P., Antoniou, M., Herweijer, H., Braun, S., and Wolff, J. A. (2004): Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* **15**, 770-82.

Recherche de gènes et de molécules freinant la dégénérescence musculaire chez deux modèles animaux de la myopathie de Duchenne, *Caenorhabditis elegans* et la souris *mdx*.

La myopathie de Duchenne se caractérise principalement par une forte dégénérescence musculaire, due à l'absence de la dystrophine. La fonction de la dystrophine et les causes de la dégénérescence musculaire qui survient en son absence ne sont pas connues.

J'ai combiné des études chez les modèles animaux *Caenorhabditis elegans* et souris de cette maladie, afin d'essayer d'élucider les mécanismes de la dégénérescence musculaire.

Nous avons montré que le canal potassium SLO-1 et l'homologue de la syntrophine, STN-1, sont fonctionnellement reliés à l'homologue de la dystrophine de *C. elegans*, DYS-1. Nous avons entrepris le crible du génome entier de *C. elegans* à la recherche de gènes supprimant la dégénérescence musculaire. Au cours de ce crible, nous avons montré que la voie de la dégradation protéique ainsi que plusieurs protéines kinases sont impliqués dans la dégénérescence musculaire. En parallèle, j'ai participé à la recherche de molécules actives sur la dégénérescence musculaire de *C. elegans*, puis chez la souris *mdx*. Nous avons notamment confirmé chez la souris *mdx* l'effet bénéfique de l'activation de la voie sérotoninergique.

Termes clés : dystrophine, myopathie de Duchenne, *Caenorhabditis elegans*, souris *mdx*



Search for genes and molecules able to reduce muscular degeneration in two animal models of Duchenne muscular dystrophy, *Caenorhabditis elegans* and *mdx* mice.

Duchenne muscular dystrophy is a muscular degenerative disease caused by the absence of dystrophin. Dystrophin function and the causes of muscle degeneration in its absence are still not known.

I combined studies in the *Caenorhabditis elegans* and murine animal models of this disease to elucidate the mechanisms of muscle degeneration.

We demonstrated that the calcium-dependant potassium channel, SLO-1, and the syntrophin homologue, STN-1, are functionally linked to the *C. elegans* homologue of dystrophin, DYS-1. We ran a genome-wide screen in search of suppressor genes of muscular degeneration. We showed that the protein degradation pathways and several kinases are involved in muscular degeneration in *C. elegans*. In parallel, I participated to the search of molecules reducing muscle degeneration in *C. elegans*, and then in *mdx* mice. We confirmed the beneficial effect of the activation of the serotonergic pathway on the muscular degeneration of *mdx* mice.

Key terms : dystrophin, Duchenne muscular dystrophy, *Caenorhabditis elegans*, *mdx* mice