



**HAL**  
open science

## C. elegans, un outil de criblage pour la recherche de traitements contre les maladies rares

Jean Giacomotto

► **To cite this version:**

Jean Giacomotto. C. elegans, un outil de criblage pour la recherche de traitements contre les maladies rares. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10030 . tel-00707724

**HAL Id: tel-00707724**

**<https://theses.hal.science/tel-00707724>**

Submitted on 13 Jun 2012

**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**  
**Ecole doctorale: Biologie Moléculaire Intégrée Cognitive**

**THESE**

**présentée**

**à l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1**  
**pour l'obtention du DIPLOME DE DOCTORAT**

(arrêté du 25 avril 2002)

**soutenue publiquement le 8 mars 2010**

**par**

**Jean GIACOMOTTO**

***C. ELEGANS*, UN OUTIL DE CRIBLAGE POUR LA RECHERCHE DE  
TRAITEMENTS CONTRE LES MALADIES RARES.**

**Directeur :**

**Mr Laurent SEGALAT, CNRS, Université Lyon 1.**

**JURY :**

**Mr Bruno DUMAS, SANOFI-AVENTIS, Vitry-sur-Seine,**

**Mr Pierre COLAS, INSERM, Roscoff,**

**Mme Laurence LAFANECHERE, CEA, Grenoble,**

**Mr François MORLE, INSERM, Université Lyon 1,**

**Mr Gilles COMTE, CNRS, Université Lyon 1,**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Examineur**

**Examineur**

**Examineur**

# REMERCIEMENTS

*Je remercie l'association Française contre les myopathies (AFM) qui a financé ces travaux. Je remercie également Monsieur Laurent Ségalat, mon directeur de thèse, non seulement pour m'avoir permis de réaliser ces recherches, mais aussi pour la maturité qu'il m'a permis d'acquérir et la liberté d'action qu'il m'a offert.*

*J'adresse aussi tous mes remerciements à Madame Laurence Lafanechère, pour m'avoir donné du temps et des idées lors de mon comité de thèse, pour sa convivialité et sa disponibilité. Monsieur Bruno Dumas pour n'avoir jamais refusé de m'aider et pour tout le soutien qu'il m'a offert lors de mon expérience chez SANOFI-AVENTIS -j'en profite également pour remercier Marie-Françoise Paul, ma directrice au sein de cette entreprise, qui a fait grandir mon goût pour la science et m'a donné l'envie de persévérer dans mon cursus -. Monsieur Pierre Colas, pour avoir accepté de juger mon travail et pour avoir pris du temps pour venir en débattre avec moi. Monsieur François Morlé, pour sa présence lors de mon comité et lors de ma soutenance, mais aussi pour sa convivialité au quotidien. Monsieur Gilles Comte, pour sa présence lors de ma soutenance mais aussi et surtout pour l'homme qu'il est, un homme que j'apprécie tout particulièrement.*

*Je tiens aussi à remercier toute mon équipe, Kathrin Gieseler, Marie Christine Mariol, Caroline Borrel, Jessica Cisek, Angela Rea, April Reedy, Nicolas Brouilly, Edwige Martin, Mohamed Triba, Claire Lecroisey et Maité Carre-Pierrat. Toutes ces personnes ont fait que cette expérience a été vraiment agréable, conviviale et enrichissante sur tous les points.*

*Mes remerciements vont aussi vers Lucie Chambonnier et Laure Granger, qui m'ont apporté une joie de vivre au quotidien. Lucie pour son amitié et son attention qui m'ont tant aidé. Laure pour avoir été ma confidente - et cela quelques soient mes humeurs-, mais aussi pour tous les bons plats qu'elle m'a préparé, les moments de sports partagés et les apéros qui ont rendu si douloureux certains lendemains. Je remercie également Stefan Junneman, mon ancien collègue de paillasse, pour m'avoir laissé gagner quelques-unes de nos parties d'échecs, mais aussi pour m'avoir donné goût à la bière et m'avoir appris à ne pas m'énerver quand je trouvais le labo transformé en champs de bataille. Je remercie aussi la patience des différents stagiaires que j'ai eu l'honneur d'encadrer, notamment Francis et Claire.*

*Enfin, je tiens à remercier tous les gens que j'ai rencontrés au cours de ces années. Je pense à mes collègues du 5°, Arnaud, Caroline, Denis, Michael; mais aussi tous les autres, Dad,*

*Eléonore, Guillaume, David, Edwige, Olivier, Fred, Stéphanie, Mathieu, Osman, Samer... Avec des remerciements tout particuliers à Arnaud et Guillaume, avec qui j'ai partagé les meilleurs moments comme les pires ! Un merci supplémentaire à Caro, ma collègue de bureau, qui a bien voulu corriger mon orthographe "bien personnelle"...*

*Pour terminer j'aimerais remercier mes proches qui ont accepté de supporter le thésard que j'ai été avec tous les désagréments que cela comporte... Merci à eux... Merci à ma femme, Julia, pour m'avoir donné la force d'aller de l'avant, même quand j'étais au plus bas. Merci aux "supporters de Saint Etienne", hum... pardon, de l'Olympique Lyonnais, à savoir Philippe, Thomas, Erwan, pour tous ces moments "non-footballistiques" partagés, ces éclats de rires et notre vie communautaire. Merci à Julien, pour le pote qu'il est et pour tous les bons plans ski auxquels j'ai pu participé, même quand cela se finissait avec des os en vrac. Merci à Laure, Pauline, Laetitia pour supporter notre humour bien particulier. Merci à Anne et Stef pour les moments de détente qu'ils nous ont offert et leurs cochons "annuels" tant appréciés par nos chers Lyonnais. Merci à Aurélien, Thierry et tous les "Tripodien" de Bordeaux -les amis d'une vie-. Merci à René pour tous ces moments partagés, pour l'homme, le "père" qu'il est ; un homme simple, intéressant et passionné. Merci aussi pour tous ces repas partagés avec lui, où discuter science se faisait sans contrainte et avec un réel engouement. Merci à Babeth pour avoir toujours été à l'écoute de nos envies et nos besoins durant ces années. Merci à Myriam, ma mère, qui a toujours été là pour me soutenir et m'écouter, pour tous les gestes qu'elle a pu faire pour ma petite famille ces dernières années malgré notre éloignement géographique. Merci également de m'avoir bichonné et nourri pendant ces quelques semaines d'été, la "gestation" de ce manuscrit en a été bien plus facile et agréable. Enfin, merci à mon père, Hervé, qui me manque terriblement et qui serait, j'en suis sûr, fier de ce que je suis devenu.*

# ABBREVIATIONS

a.a.	acides aminés
Ach	acétylcholine
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNdb	ARN double brin
CA	Carbonic Anhydrase
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CGC	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Center
DGC	Dystrophin Glycoprotein Complex (complexe de la dystrophine)
DHPR	Dihydropyridine Receptor
DMD	Duchenne Muscular Dystrophy (dystrophie musculaire de Duchenne)
DYS	Dystrophine
EMS	Ethyl Méthanesulfonate
GFP	Green Fluorescent Protein
GRMD	golden retriever muscular dystrophy
HRMAS-NMR	High Resolution Magic-Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
HSPG-2	Heparan Sulfate Proteoglycan 2 (Perlecan)
IP3	Inositol Trisphosphate
IP3R	Inositol Trisphosphate Receptor
kb	kilobases
KO	knock out
mdx	X chromosome- linked muscular dystrophy
N2	souche sauvage de référence de <i>C. elegans</i>
ORF	open reading frame (cadre ouvert de lecture)
pb	paire de base
PCR	polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNAi	RNA interférence
RT- PCR	rétrotranscription suivie d'une PCR
RYR	Ryanodine Receptor
SMA	Spinal Muscular Atrophy (Amyotrophie Spinale)
SMN	Survival of Motor Neuron

# SOMMAIRE

<b><i>CONTEXTE ET OBJECTIFS</i></b>	<b>8</b>
-------------------------------------	----------

---

<b><i>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</i></b>	<b>10</b>
--	-----------

---

<b><i>I. Caenorhabditis elegans comme modèle d'étude</i></b>	<b>11</b>
--	-----------

<b>1. Généralités et physiologie <i>C. elegans</i></b>	<b>11</b>
1.1. Un animal de petite taille et facile à élever en grand nombre	11
1.2. Cycle de reproduction et étapes du développement	12
1.3. Généralités anatomiques	13
1.4. Voies d'entrées des molécules présentes dans son environnement	14
<b>2. Génome et outils moléculaires</b>	<b>16</b>
2.1. Génome et ressources génomiques	16
2.2. Outils moléculaires	16
2.2.1. Création de mutants	17
2.2.2. ARN interférence	17
2.2.3. Transgénèse	18

<b><i>II. L'unité motrice chez les mammifères</i></b>	<b>20</b>
---	-----------

<b>1. Vue schématique de l'unité motrice des mammifères</b>	<b>20</b>
<b>2. Les motoneurones</b>	<b>23</b>
<b>3. La jonction neuromusculaire, l'acétylcholine et la libération de calcium</b>	<b>24</b>
3.1. La jonction neuromusculaire et la libération de l'acétylcholine	24
3.2. La libération du calcium	25
<b>4. Le sarcomère et la contraction</b>	<b>28</b>
<b>5. Organisation des muscles striés squelettiques chez les mammifères</b>	<b>30</b>
<b>6. Sarcolemme et DGC (Dystrophin Glycoprotein Complex)</b>	<b>31</b>
6.1. Le complexe des dystroglycanes	34
6.2. Les sarcoglycanes	35
6.3. Le sarcospane	35
6.4. Les syntrophines	35
6.5. L' $\alpha$ -dystrobrevine	36

<b><i>III. L'unité motrice chez <i>C. elegans</i></i></b>	<b>37</b>
---	-----------

<b>1. Les motoneurones</b>	<b>37</b>
<b>2. La jonction neuromusculaire</b>	<b>39</b>
<b>3. Les muscles de <i>C. elegans</i></b>	<b>41</b>
<b>4. Couplage excitation / contraction chez <i>C. elegans</i></b>	<b>43</b>
<b>5. Le DGC</b>	<b>44</b>

<b>IV. La myopathie de Duchenne et la Dystrophine</b>	<b>46</b>
1. La myopathie de Duchenne	46
2. La Dystrophine chez les mammifères	47
3. Le rôle de la Dystrophine et de son complexe dans la myopathie de Duchenne	49
3.1. Rôle structural	49
3.2. Rôle métabolique	50
3.3. Rôle signalétique	50
4. Les différents modèles animaux et les souris <i>mdx</i> (muscular dystrophy X-linked)	51
5. Les traitements / La recherche	52
6. La dystrophine chez <i>C. elegans</i>	58
7. Mutations du gène <i>dys-1</i> et conséquences chez <i>C. elegans</i>	59
<b>V. Amyotrophie spinale / SMN (Survival Motor Neuron)</b>	<b>62</b>
1. L'amyotrophie spinale	62
2. SMN	64
2.1. Le gène <i>SMN</i>	64
2.2. La protéine SMN	66
3. Les modèles	68
4. Les traitements / La recherche	69
5. SMN chez <i>C. elegans</i>	70
6. Mutations du gène <i>smn-1</i> et conséquences chez <i>C. elegans</i>	70
<b>VI. Syndrome de Schwartz-Jampel / Perlecan</b>	<b>73</b>
1. Le syndrome de Schwartz-Jampel	73
2. Le Perlecan	74
2.1. Structure	74
2.2. Expression	75
2.3. Fonctions	76
3. Les traitements	78
4. Les modèles	78
5. Le Perlecan chez <i>C. elegans</i>	79
6. Mutations du gène <i>unc-52</i> et conséquences chez <i>C. elegans</i>	80
<b><u>MATERIELS ET METHODES DE CRIBLAGE</u></b>	<b>82</b>
<b>I. Les molécules testées</b>	<b>83</b>
<b>II. Le trieur / analyseur de nématodes ou COPAS Biosort</b>	<b>84</b>
<b>III. Développement des cribles</b>	<b>86</b>
1. Le crible DMD	87
2. Le crible SMA	94
3. Le crible Schwartz-Jampel	99

## **RESULTATS** **107**

### ***I. Résultats des cribles*** **108**

<b>1. Le crible DMD</b>	<b>108</b>
1.1. Chimiothèque Prestwick	108
1.2. Chimiothèque Patrimoine et ICBMS	111
1.3. Analyse des résultats et discussion	115
<b>2. Le crible SMA</b>	<b>118</b>
2.1. Chimiothèque Patrimoine & ICBMS	118
2.2. Chimiothèque Prestwick	123
2.3. Analyse des résultats et discussion	125
<b>3. Le crible Schwartz-Jampel</b>	<b>127</b>
3.1. Chimiothèque Prestwick	127
3.2. Chimiothèque Patrimoine et ICBMS	128
3.3. Analyse des résultats et discussion	128

### ***II. Identification des voies d'action*** **129**

<b>1. Les sulfonamides</b>	<b>131</b>
<b>2. Les tricycliques et les molécules reliées à la sérotonine</b>	<b>146</b>
2.1. Etudes préliminaires	146
2.2. Recherche du mode d'action des composés reliés à la sérotonine	153
<b>3. Approche métabolomique</b>	<b>159</b>
3.1. Preuve de concept de la métabolomique sur animal entier :	160
3.2. Résultats préliminaires DMD	187

## **DISCUSSION / CONCLUSION GENERALE** **191**

### ***I. Du nouveau pour la myopathie de Duchenne ?*** **194**

<b>1. Récapitulatif des résultats du crible DMD</b>	<b>194</b>
<b>2. Des molécules, des mécanismes et des pistes thérapeutiques ?</b>	<b>195</b>

### ***II. Le criblage sur animal entier*** **209**

## **REFERENCES** **229**

## **ANNEXES** **249**

<i>Annexe 1 : Crible DMD en plaques 24 puits (milieu solide)</i>	250
<i>Annexe 2 : CRIBLE SMA</i>	253
<i>Annexe 3 : Programme informatique pour le traitement des données du crible SMA.</i>	255
<i>Annexe 4 : Crible Schwartz-Jampel</i>	260
<i>Annexe 5 : Programme informatique pour le traitement des données du crible Schwartz-Jampel.</i>	263



# PUBLICATIONS

## **Article 1 :**

Pages 133 à 145

**Evaluation of the therapeutic potential of carbonic anhydrase inhibitors in two animal models of dystrophin deficient muscular dystrophy.**

Giacomotto, J.\* , Pertl, C.\* , Borrel, C., Walter, M.C. , Bulst, S. , Johnsen, B. , Baillie, D.L. , Lochmüller, H. , Thirion, C. , Ségalat L.

**Human Molecular Genetics**, 2009, 18(21), 4089-101.

*\* Author contributed equally to this work.*

## **Article 2 :**

Pages 147 à 152

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

Carre-Pierrat, M., Mariol, M.C., Chambonnier, L., Laugraud, A., Heskia, F., Giacomotto, J. and Segalat, L.

**Journal of Muscle Research and Cell Motility**, 2006, 27, 253-8.

## **Article 3 :**

Pages 162 à 174

**Metabotyping of *Caenorhabditis elegans* reveals latent phenotypes.**

Blaise, B.J., Giacomotto, J., Elena, B., Dumas, M.E., Toulhoat, P., Segalat, L. and Emsley, L.

**Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 2007, 104, 19808-12.

*Paper selected as "Exceptionnal" by the Faculty of 1000,  
([www.f1000biology.com/article/doi/1098270/evaluation](http://www.f1000biology.com/article/doi/1098270/evaluation)).*

## **Article 4 :**

Pages 175 à 186

**Metabolic Profiling Strategy of *Caenorhabditis elegans* by Whole-Organism Nuclear Magnetic Resonance.**

Blaise, B.J.\* , Giacomotto, J.\* , Triba, M.N.\* , Toulhoat, P., Piotto, M., Emsley, L., Segalat, L., Dumas, M.E. and Elena, B.

**Journal of Proteome Research**, 2009, 8, 2542-2550.

*\* Author contributed equally to this work.*

## **Article 5 :**

Pages 211 à 228

**High-throughput screening and small animals models, where are we ?**

Giacomotto, J., Ségalat L.,

**British Journal of Pharmacology** (Accepted).

# Figures et Tableaux

- Figure 1 (page 12)** : Le nématode *Caenorhabditis elegans*.
- Figure 2 (page 13)** : Cycle du développement du nématode *C. elegans*.
- Figure 3 (page 15)** : Voies d'entrée des molécules présentes dans l'environnement de *C. elegans*.
- Figure 4 (page 18)** : Introduction d'ADN exogène (Transgénèse) par microinjection.
- Figure 5 (page 21)** : Représentation schématique de l'unité motrice des mammifères.
- Figure 6 (page 22)** : Succession d'évènements conduisant à la contraction musculaire suite à une libération d'acétylcholine au niveau des jonctions neuromusculaire.
- Figure 7 (page 23)** : Représentation schématique d'un motoneurone.
- Figure 8 (page 25)** : La jonction neuromusculaire et la libération d'acétylcholine.
- Figure 9 (page 28)** : Représentation schématique de la libération de calcium suite à la propagation d'un potentiel membranaire au niveau des muscles striés.
- Figure 10 (page 29)** : Le sarcomère.
- Figure 11 (page 30)** : Organisation du muscle squelettique chez l'homme.
- Figure 12 (page 32)** : Le DGC (Dystrophin Glycoprotein Complex) et son organisation dans la fibre musculaire squelettique.
- Figure 13 (page 33)** : Représentation schématique des interactions protéiques du DGC (Dystrophin Glycoprotein Complex).
- Figure 14 (page 37)** : Représentation schématique du système nerveux de *C. elegans*.
- Figure 15 (page 39)** : Les motoneurones de *C. elegans* et leur fonctionnement.
- Figure 16 (page 40)** : Représentation schématique de l'organisation des cellules musculaires, des cordes nerveuses et des jonctions neuromusculaires de *C. elegans*.
- Figure 17 (page 41)** : *C. elegans* adulte, coloré à la phalloïdine-rhodamine.
- Figure 18 (page 42)** : Représentation schématique de l'organisation des cellules musculaires striées de *C. elegans*.
- Figure 19 (page 43)** : Structures impliquées dans le couplage excitation/contraction des cellules musculaires striées *C. elegans* comparativement aux mammifères.
- Figure 20 (page 45)** : Représentation schématique du complexe DGC chez *C. elegans*.
- Figure 21 (page 47)** : Représentation schématique de la structure de la protéine Dystrophine.
- Figure 22 (page 48)** : Les promoteurs alternatifs du gène de la dystrophine.
- Figure 23 (page 54)** : La thérapie génique ou comment remplacer un gène muté.
- Figure 24 (page 55)** : La thérapie cellulaire.
- Figure 25 (page 56)** : Le saut d'exon ou comment réparer le gène endogène.
- Figure 26 (page 56)** : La translecture de codon stop.
- Figure 27 (page 57)** : Les traitements chimiques actuels et/ou en essais.
- Figure 28 (page 59)** : Gène codant la dystrophine chez *C. elegans* et mutations générés au laboratoire.
- Figure 29 (page 60)** : Dégénérescence des cellules musculaires striées des vers *dys-1(cx18)* ; *hll-1(cc561)*.
- Figure 30 (page 65)** : Structure du locus q11.2-13.3 du bras long du chromosome 5 et du gène *SMN*.
- Figure 31 (page 66)** : Bases génétiques des amyotrophies spinales.
- Figure 32 (page 71)** : Représentation schématique de l'allèle *ok355* du gène *smn-1*.
- Figure 33 (page 73)** : Représentation schématique du perlecan (HSPG2) et des mutations retrouvées à ce jour chez les patients atteints du syndrome de Schwartz-Jampel.
- Figure 34 (page 77)** : Rôle du perlecan.
- Figure 35 (page 80)** : Schéma représentatif des différentes isoformes de UNC-52.
- Figure 36 (page 81)** : Représentation schématique de la protéine HSPG2 et de son homologue *C. elegans* UNC-52.
- Figure 37 (page 85)** : Le COPAS Biosort.
- Figure 38 (page 90)** : Préparation d'un grand nombre d'oeufs stadés (15°C).
- Figure 39 (page 91)** : Expression de la protéine GFP dans les noyaux des cellules musculaires de *C. elegans*.
- Figure 40 (page 93)** : Protocole permettant d'évaluer la dégénérescence musculaire des animaux *dys-1(cx18)* ; *hll-1(cc561)* avec un débit >1500 composés par mois.
- Figure 41 (page 98)** : Représentation schématique du crible SMA.
- Figure 42 (page 100)** : Image représentative des muscles d'un animal adulte sauvage et d'un mutant CB444.

**Figure 43 (page 101) :** Animaux CB444 adultes au 4<sup>e</sup> jour de culture liquide à 23°C.

**Figure 44 (page 102) :** Comparaison d'animaux adultes PD4251 et LS1095 (*unc-52(e444)*).

**Figure 45 (page 104) :** Comparaison de la moyenne d'intensité de fluorescence des animaux adultes présents dans les puits d'une plaque de culture défini dans l'annexe 4.

**Figure 46 (page 104) :** Image représentative du profil fluorescent d'animaux sauvages et LS1095 observés au 6<sup>e</sup> jour de culture à 23°C.

**Figure 47 (page 106) :** Représentation schématique du crible Schwartz-Jampel.

**Figure 48 (page 109) :** Résumé des composés issus de la chimiothèque Prestwick ayant un effet bénéfique sur le modèle DMD.

**Figure 49 (page 111) :** Squelette chimique retrouvé dans les sulfonamides, les benzodiazépines et les tricycliques.

**Figure 50 (page 117) :** Répartition de l'effet des hits Prestwick en fonction de leur concentration dans les conditions définies en annexe 1.

**Figure 51 (page 121) :** Représentation schématique du modèle utilisé pour évaluer le potentiel anti-RNAi des composés identifiés dans le crible SMA.

**Figure 52 (page 121) :** Evaluation de l'impact sur les processus RNAi des composés identifiés dans le crible SMA.

**Figure 53 (page 155) :** Evaluation quantitative de la dégénérescence musculaire des mutants *dys-1(cx18)*, *hlh-1(cc561)* en présence ou en absence de sérotonine et/ou d'ARNdb *itr-1*.

**Figure 54 (page 157) :** Dégénérescence musculaire observée chez le mutant *dys-1(cx18)*, *hlh-1(cc561)* en fonction de la concentration en sérotonine, et en présence ou en absence de RNAi *itr-1*.

**Figure 55 (page 188) :** Comparaison entre des animaux sauvages et mutants *dys-1(cx18)*.

**Figure 56 (page 190) :** Modèle de prédiction DMD et effet des traitements sur le profil métabolique des mutants *dys-1(cx18)*.

**Figure 57 (page 196) :** Perturbations supposées au niveau des muscles des animaux *dys-1(cx18)*.

**Figure 58 (page 200) :** Rôle putatif des benzodiazépines dans les mécanismes de dégénérescence musculaire.

**Figure 59 (page 203) :** Mode d'action putatif des composés liés au métabolisme de la sérotonine.

**Figure 60 (page 204) :** Rôle putatif des inhibiteurs d'anhydrases carboniques (sulfonamides) dans les mécanismes de dégénérescence musculaire.

**Figure 61 (page 205) :** Observation d'animaux PD4251 et LS761 non traités sous une loupe à fluorescence (Animaux cultivés 7 jours à 15°C).

**Figure 62 (page 206) :** Clichés de cellules musculaires de *C.elegans* obtenus en microscopie électronique.

**Tableau 1 (page 38) :** Les différents types de motoneurones chez *C. elegans*.

**Tableau 2 (page 68) :** Phénotypes et taux d'expression de la protéine SMN extraite de lignées lymphoblastoïde.

**Tableau 3 (page 110) :** Listes des molécules réduisant la dégénérescence du modèle nématode DMD.

**Tableau 4 (page 112) :** Synthèse des résultats obtenus avec la chimiothèque Patrimoine (DMD).

**Tableau 5 (page 113) :** Synthèse des résultats obtenus avec la chimiothèque ICBMS (DMD).

**Tableau 6 (page 114) :** Synthèse des résultats obtenus avec les analogues des composés identifiés dans la Chimiothèque Patrimoine (DMD).

**Tableau 7 (page 119) :** Présentation et validation des hits obtenus avec les composés de la chimiothèque Nationale (DMD).

**Tableau 8 (page 124) :** Synthèse des hits SMA confirmés lors du criblage secondaire.

**Tableau 9 (page 125) :** Toxicité des molécules criblées à 10<sup>-4</sup> M appartenant à la chimiothèque ICBMS en fonction du modèle utilisé (DMD / SMA).

**Tableau 10 (page 126) :** Toxicité des molécules criblées à 10<sup>-4</sup> M appartenant à la chimiothèque Patrimoine en fonction du modèle utilisé (DMD / SMA).

**Tableau 11 (page 128) :** Synthèse des hits Schwartz-Jampel (criblage primaire Prestwick, 800/1120).

**Tableau 12 (page 154) :** Evaluation qualitative de la motricité des animaux *dys-1(cx18)*, *hlh-1(cc561)* traités ou non traités et/ou en présence ou en absence d'ARNdb *itr-1* (RNAi).

**Tableau 13 (page 156) :** Evaluation de l'activité motrice des animaux en présence ou en absence de sérotonine (4 mg/ml) et d'ARNdb *itr-1*.

# **CONTEXTE ET OBJECTIFS**

# CONTEXTE ET OBJECTIFS

Ce projet de thèse trouve sa source dans les travaux menés de longue date par l'équipe du docteur Laurent Ségalat, travaux visant à utiliser le modèle animal *C. elegans* pour comprendre les mécanismes de dégénérescence survenant chez les patients atteints de la myopathie de Duchenne, mais aussi à l'utiliser comme outil de criblage de médicaments. En effet, bien qu'il existe probablement, dans les molécules disponibles à ce jour, des composés qui pourraient être bénéfiques aux patients souffrants de maladies rares, neuromusculaires et non neuromusculaires, ceux-ci sont difficiles à identifier, faute d'outil de criblage approprié. Les myopathies dégénératives sont une parfaite illustration de cette situation : les modèles cellulaires existant ne sont pas assez pertinents au regard de la maladie pour être utilisés comme outil de criblage médicamenteux avec un degré de confiance acceptable. Pour compenser l'absence de modèle cellulaire exploitable dans une optique de criblage, l'équipe de Laurent Ségalat a proposé dès 2001 le recours à des modèles animaux simples et peu coûteux, tel que le nématode *C. elegans* qui possède des muscles présentant de nombreuses similarités avec ceux des vertébrés, en dépit de leur éloignement dans la phylogénie (1, 2). Dès 2003, l'équipe de Laurent Ségalat a validé ce concept avec la myopathie de Duchenne en montrant que le traitement de référence délivré aux patients, la Prednisone, est actif sur des nématodes dépourvus de dystrophine (3). L'utilisation de cette approche pour identifier de nouvelles pistes thérapeutiques a alors éveillé l'intérêt de l'AFM (Association Française contre les Myopathies). De plus, la simplicité du nématode devrait nous permettre d'apporter rapidement, et à moindre coût, des éléments de réponse quant au(x) mécanisme(s) d'action de ces composés, et par là même mieux comprendre les mécanismes dégénératifs observés dans ces maladies rares.

Une réflexion a alors été menée entre Laurent Ségalat et la direction de l'AFM à partir du congrès AFM 2005 à Nantes, pour étudier comment pouvait être implémentée une telle stratégie à une échelle qui dépasse les cadences artisanales initiales, et qui puisse avoir un impact réel sur la découverte médicamenteuse pour les maladies rares. Ce projet a finalement débuté officiellement au 1<sup>er</sup> Décembre 2006.

Le but initial de ce projet est donc d'utiliser le modèle nématode *C. elegans* afin de rechercher, dans la pharmacopée existante et dans des chimiothèques appropriées, des médicaments actifs contre plusieurs maladies génétiques neuromusculaires, et de caractériser leur mode d'action. Le choix des maladies à traiter a été guidé par plusieurs critères,

- i) physiopathologie complexe et/ou mal comprise excluant le développement à court terme de médicaments sur une base rationnelle,
- ii) peu d'espoir de thérapie génique/cellulaire à court terme,
- iii) conservation chez *C. elegans* du gène relié à la maladie,
- iv) phénotype exploitable chez *C. elegans*.

Mon travail a donc consisté à **1)** développer et optimiser des modèles nématodes reproduisant certains mécanismes retrouvés dans 3 maladies neuromusculaires, la myopathie de Duchenne (DMD) (modèle déjà validé au laboratoire), la maladie de Schwartz-Jampel de type I et l'amyotrophie spinale (SMA), **2)** mettre en place des méthodes de criblage robustes, reproductibles, et transversales à d'autres maladies, permettant de tester un grand nombre de molécules chimiques ; avec le but ultime d'identifier des composés actifs susceptibles de ralentir l'apparition de ces maladies chez l'homme, **3)** apporter des éléments de réponse quant aux mécanismes d'actions des composés les plus prometteurs.

**INTRODUCTION**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

## I. *Caenorhabditis elegans* comme modèle d'étude

*Caenorhabditis elegans* est un ver bactériophage, qui vit dans le sol à l'état sauvage. Il a été introduit dans les laboratoires de génétique dans les années 1960 par Sydney Brenner comme modèle d'étude de la biologie du développement et du fonctionnement du système nerveux. Ce choix fut motivé par la simplicité générale de cet organisme, sa facilité d'élevage, et sa transparence. Cette dernière caractéristique était particulièrement attractive à l'époque, car un simple microscope suffisait à observer *in vivo* les différents évènements survenant lors du développement. Quarante ans après son introduction dans les laboratoires, *C. elegans* fait partie des organismes les plus complètement décrits. Il a été notamment le premier animal dont le génome a été entièrement séquencé (The *C. elegans* sequencing consortium, 1998). De plus, les différentes recherches de Sydney Brenner, John Sulston et Bob Horvitz menées sur cet organisme leur ont valu le prix Nobel en 2002.

### 1. Généralités et physiologie *C. elegans*

#### 1.1. Un animal de petite taille et facile à élever en grand nombre

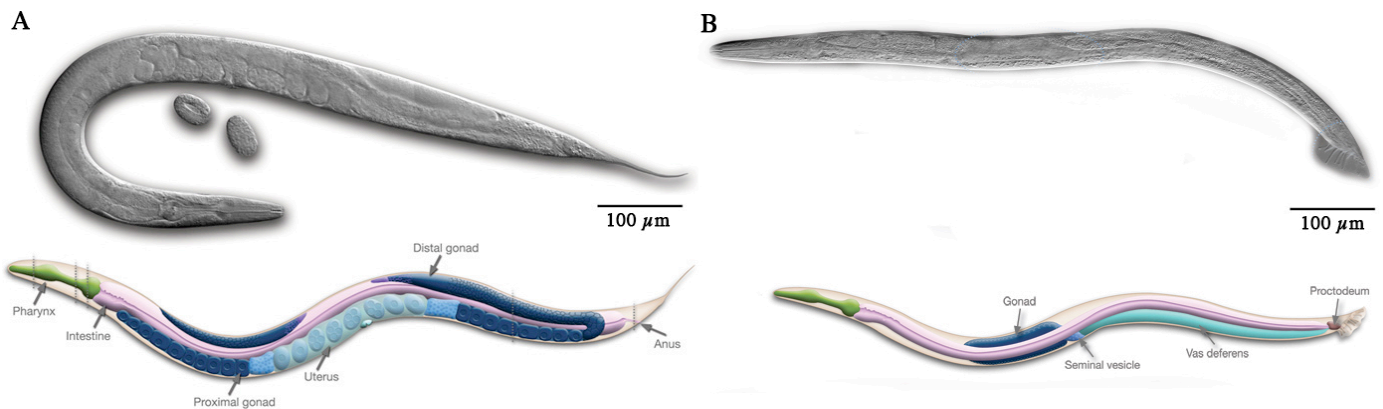
*C. elegans* est un nématode d'environ 1 mm de long pour 80  $\mu\text{m}$  de diamètre à l'état adulte. Il existe deux formes sexuées : les hermaphrodites et les mâles (**fig. 1**). Dans des conditions favorables, les mâles apparaissent dans la population avec une fréquence très faible (0,05%) (**4**). Cette fréquence peut être augmentée par des stress environnementaux, tel un choc thermique (**5**). Ces mâles sont généralement utilisés pour croiser des souches entre elles et ainsi introduire de nouveaux allèles. Les différentes populations de *C. elegans* sont donc essentiellement constituées d'animaux hermaphrodites, se reproduisant par autofécondation avec une descendance d'environ 250 individus ; cette caractéristique facilite l'entretien des souches (**4, 6**).

La culture de *C. elegans* au sein des laboratoires est très facile. Elle se réalise en routine sur des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé, recouvert par un fin tapis bactérien (*Escherichia coli*) servant de nourriture (**5, 7**).

Un énorme avantage de cet animal pour la communauté scientifique, est sa capacité à résister à la congélation. Les animaux sont alors placés dans un milieu cryoprotecteur (glycérol) et congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  ou dans l'azote liquide (**8**). Toutes nouvelles souches obtenues



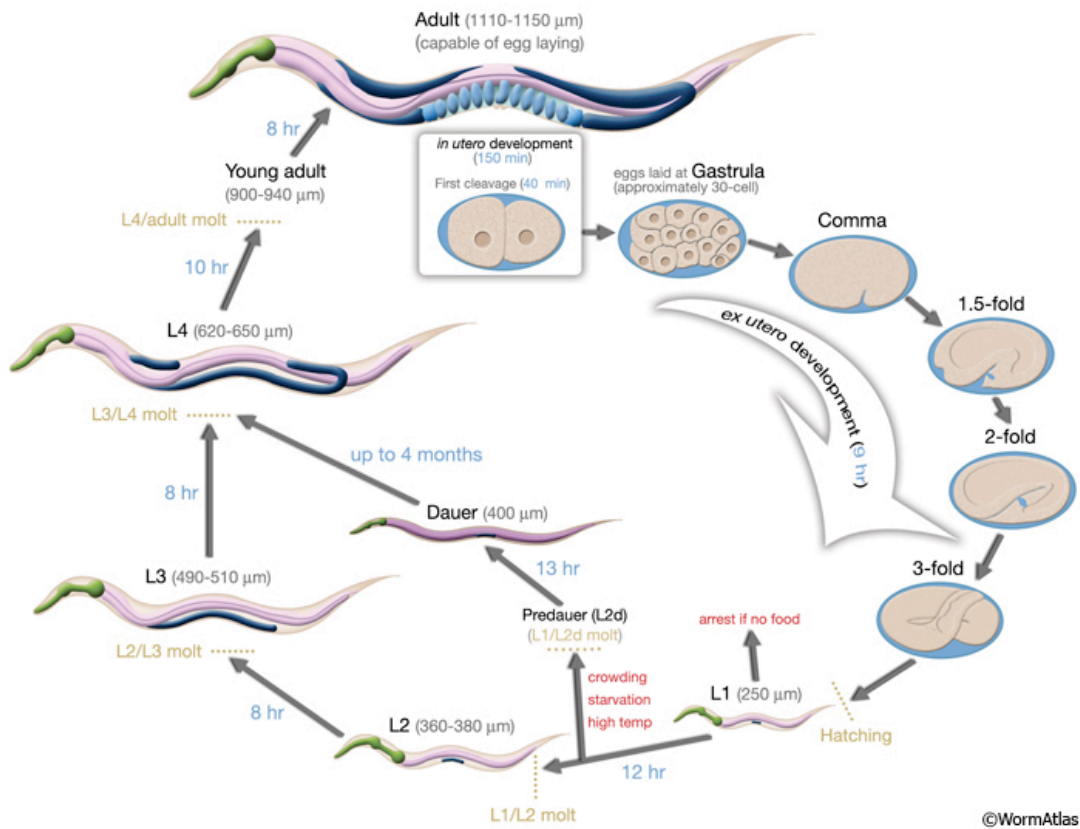
dans les différents laboratoires peuvent alors être stockées et mises à la disposition de la communauté en fonction des besoins. Le *Caenorhabditis* Genetics Center (<http://www.cbs.umn.edu/CGC>), par exemple, centralise les différentes souches connues et les met à disposition des chercheurs.



**Figure 1 :** Le nématode *Caenorhabditis elegans*. Animal adulte hermaphrodite (A) et mâle (B). Images adaptées d'illustrations obtenues sur le site <http://www.wormatlas.org>.

## 1.2. Cycle de reproduction et étapes du développement

Cet animal présente un cycle de vie très court et dépendant de la température, ainsi son temps de génération est de seulement 3 jours à 23°C et de 5 jours à 15°C. Avant d'atteindre le stade adulte, son développement passe par un stade embryonnaire et quatre stades larvaires (L1 à L4) séparés par des mues (**fig. 2**) (**4, 6**). A la fin du stade larvaire L2, les larves peuvent, soit s'engager dans un développement normal en conditions favorables soit, soumises à un stress environnemental (absence de nourriture par exemple) entrer dans un stade dit de *dauer* (L2d) pour survivre. *C. elegans* peut ainsi bloquer son développement pendant une durée allant jusqu'à 4 mois afin d'attendre des conditions plus favorables à sa propagation. Ces larves L2d muent alors en larves L4 pour reprendre un cycle normal.



**Figure 2 :** Cycle du développement du nématode *C. elegans*. Illustration tirée du site <http://www.wormatlas.org>.

### 1.3. Généralités anatomiques

*C. elegans* est un ver cylindrique non segmenté entouré d'une cuticule très résistante et relativement imperméable, constituée en grande partie de collagène. Sous cette protection vis à vis de l'environnement se trouve l'hypoderme, les muscles et les organes internes (4). Les organes internes sont sommaires et se composent d'un tube digestif précédé du pharynx et de l'appareil reproducteur. Le système nerveux de cet animal est aussi rudimentaire. La plupart des neurones sont regroupés au niveau du pharynx, se projetant en 2 grandes cordes, nommées Ventral et Dorsal Nerve Cord (VNC et DNC). Le système musculaire est constitué de muscles striés et de muscles lisses. Les muscles et le système nerveux de *C. elegans* sont décrits plus amplement dans la suite de ce manuscrit. Chez les hermaphrodites, l'appareil

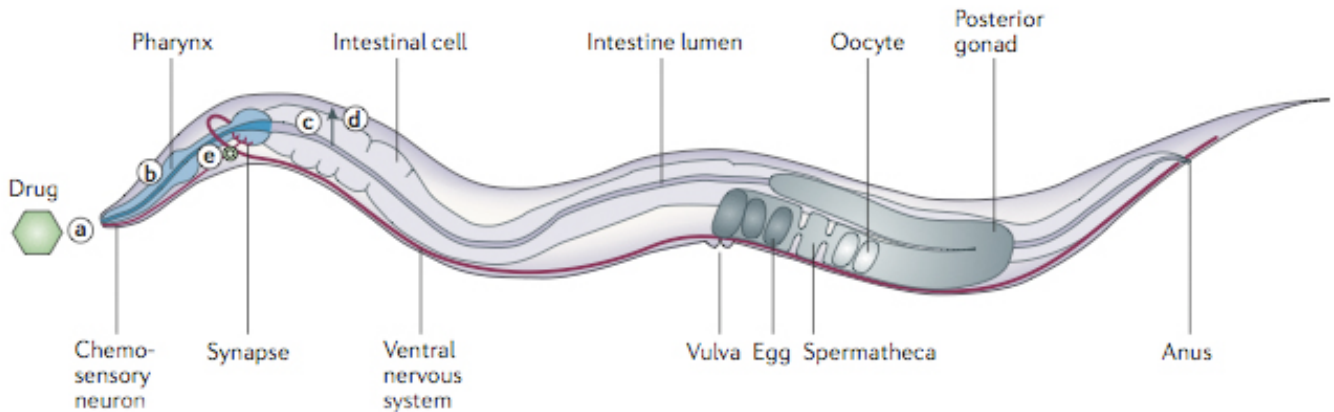
reproducteur est constitué de deux gonades symétriques. Les ovocytes sont produits dans les ovaires (gonade distale), passent à travers les spermathèques (gonades proximales) où ils sont fécondés par les spermatozoïdes (**fig. 1**). Les oeufs aboutissent alors dans l'utérus situé au centre de l'animal, et sont ensuite expulsés par les muscles de la vulve. Chez les mâles, une seule gonade est présente, se prolongeant par le *vas deferens* et le *protodeum* au niveau de la queue de l'individu mâle, constituant l'appareil copulatoire (**fig. 1**).

Une particularité et un grand avantage de cet animal réside dans son développement invariant. Dès la première division, les cellules filles adoptent une destinée cellulaire précise, qui reste la même d'un individu à l'autre. Son plan de développement a été entièrement décrit (**5**). De plus, *C. elegans* possède un nombre invariant de cellules somatiques. En effet, l'hermaphrodite adulte est constitué de 959 cellules somatiques et de 1031 pour le mâle (**4, 9**). Chez l'hermaphrodite, ces cellules sont constituées, entre autres, de 111 cellules musculaires, 302 neurones, 34 cellules intestinales et 213 cellules épidermiques. Il est à noter que, en plus de leur nombre invariant, ces cellules ne sont pas capables de se régénérer ; l'ablation d'un neurone ou tout autre cellule permet d'en étudier son rôle dans l'organisme (**10**). Néanmoins, cet avantage est aussi un défaut car des études sur la régénération des tissus ne peuvent pas être entreprises avec cet animal.

Les détails anatomiques et moléculaires de l'appareil neuromusculaire de ce nématode feront l'objet d'une description plus approfondie dans le chapitre II.

#### **1.4. Voies d'entrées des molécules présentes dans son environnement**

Dans la recherche de composés bioactifs, la méthode d'administration des composés est un élément important. Généralement, avec cet animal les éléments à tester sont mélangés au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide. En fonction de leurs propriétés physico-chimiques, ces composés peuvent alors pénétrer dans l'animal par 3 voies distinctes : par ingestion, par diffusion au travers de la cuticule, qui est peu perméable, et par capture via le prolongement de certains neurones sensoriels (**11-13**).



**Figure 3 : Voies d'entrée des molécules présentes dans l'environnement de *C. elegans*.**

Les molécules présentes dans l'environnement peuvent entrer dans l'animal par 3 routes distinctes (Ingestion, diffusion au travers de la cuticule et/ou par capture via certains neurones sensoriels). L'administration par ingestion est un processus lent (de l'ordre de la minute) qui peut se décomposer en plusieurs étapes. **a.** Les neurones chémo-sensitifs renseignent l'animal sur les composés appropriés à ingérer. Par exemple les composés présentant une odeur ou un goût perçu par l'animal comme déplaisant ne seront pas ingérés efficacement, ils peuvent néanmoins diffuser au travers de la cuticule si leurs propriétés le permettent. **b.** Le composé est aspiré par le pharynx. L'activité du pharynx est contrôlée par le système nerveux et peut varier en fonction de l'état de satiété de l'animal et de la disponibilité de nourriture dans son environnement proche. **c.** Une fois un composé ingéré, il pénètre dans la cavité de l'intestin où il est absorbé par les cellules intestinales de façon passive et/ou active via certains transporteurs. **d.** Le composé une fois absorbé, diffuse dans le corps de l'animal. **e.** La drogue atteint finalement sa cible. Dans l'exemple de la figure 3, la drogue se fixe sur les récepteurs synaptiques du système nerveux central, entraînant une réponse comportementale telle que la réduction de l'activité de son pharynx. *Image adaptée de Kaletta et Hengartner, 2006.*

## 2. Génome et outils moléculaires

### 2.1. Génome et ressources génomiques

Le génome de *C. elegans* est diploïde et constitué de 5 autosomes (I, II, III, IV, V) et d'un chromosome sexuel X (les hermaphrodites sont XX et les mâles XO). Il comprend 97 mégabases dont la totalité a été clonée dans des cosmides (environ 40 kb) et des YACs (100 à 600 kb). Ces vecteurs ont été ordonnés les uns par rapports aux autres afin d'établir une carte physique complète (14). L'analyse des ORFs (Open Reading Frame) a permis d'estimer le nombre de gènes à environ 17300 (15).

Les différentes ORFs de *C. elegans* ainsi que leurs annotations sont accessibles sur le site <http://wormbase.org>. Wormbase centralise aussi un grand nombre d'informations relatives à la génétique de cet animal avec le but ultime de caractériser chacun des gènes identifiés de son génome.

### 2.2. Outils moléculaires

La simplicité et la rapidité de culture de ce nématode couplé à la puissance de ses outils moléculaires ont conduit à d'importantes découvertes durant ces 30 dernières années, dont la découverte des processus d'ARN interférence (RNAi) récompensée par un prix Nobel. Les approches génétiques conduites avec cet organisme peuvent se concevoir dans deux directions :

- La génétique inverse qui va du gène au phénotype. Un gène déterminé est inactivé de façon transitoire ou permanente afin de déterminer le rôle de ce gène dans l'organisme.

- La génétique classique qui se base sur l'observation d'un phénotype pour remonter jusqu'au gène impliqué. La plupart des études menées avec cette approche se basent sur des mutagenèses aléatoires entraînées par l'exposition des individus à l'EMS (éthylméthanesulfonate). Ce produit chimique entraîne des mutations ponctuelles et des délétions dans le génome (16). Les animaux présentant un phénotype recherché, ou non, sont alors isolés pour permettre l'identification du gène impliqué dans l'apparition de ce phénotype. La mutation est alors généralement localisée par mapping et le gène touché identifié (17).

### 2.2.1. Création de mutants

Chez *C. elegans*, il n'est pas possible, à ce jour, de créer des mutations dirigées (cibler un gène), néanmoins de nombreux mutants ont été générés et identifiés via leur phénotype lors de cribles basés sur la mutagenèse aléatoire (16). La plupart de ces mutants sont disponibles au CGC. En parallèle, la communauté scientifique déploie de nombreux efforts afin de muter chacun des gènes identifiés du génome de *C. elegans*. Par exemple, le projet NemaGENETAG utilise la technologie des transposons pour tenter de générer des mutations dans chacun de ses gènes (18).

### 2.2.2. ARN interférence (RNAi)

A la différence du caractère permanent des mutations engendrées par des agents mutagènes, le RNAi est une méthode transitoire d'inactivation de l'expression des gènes. Cette technologie a été découverte chez *C. elegans* en 1998 (19). Elle est depuis utilisée avec de nombreux organismes.

Cette technologie consiste chez *C. elegans* en l'introduction artificielle d'ARN double brin, déclenchant un mécanisme catalytique qui dégrade sélectivement les ARNs correspondants à la séquence introduite (20).

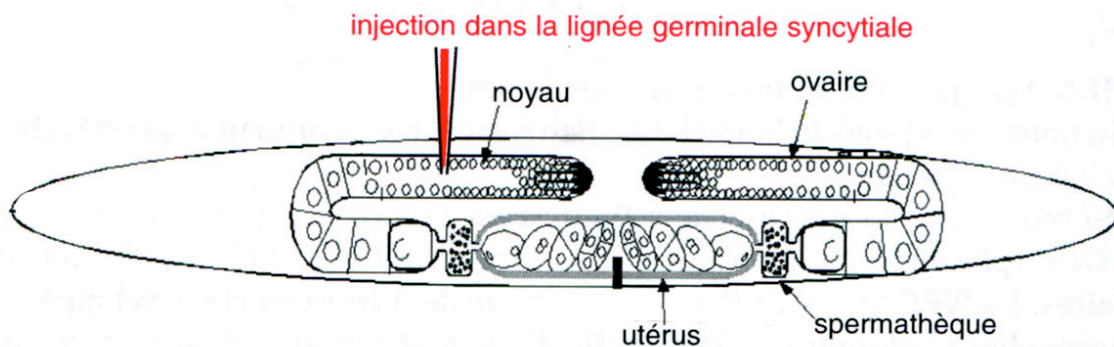
Les ARN double brin peuvent être introduits de 3 façons distinctes chez *C. elegans*. i) Par injection d'un plasmide capable de produire un double brin d'ARN spécifique du transcrite à dégrader, le plasmide se transmet alors via les cellules germinales (19). Il faut noter que cette technique ne permet pas de toucher toutes les cellules car le plasmide se transmet de façon hétérogène et aléatoire, ii) par immersion dans une solution chargée en ARNdb (21). iii) ou par ingestion de bactéries préalablement modifiées pour exprimer l'ARNdb désiré (22). Cette dernière technique est particulièrement pratique car il suffit de remplacer la souche d'*Escherichia coli* couramment utilisée comme source de nourriture par ces souches préalablement transformées, tous les animaux sont alors touchés par le processus d'interférence.

L'utilisation de cette technique est rendue encore plus aisée depuis que le laboratoire de Julie Ahringer a inséré la séquence de la plupart des gènes prédits de *C. elegans* (87%, 16,757 souches bactériennes) 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 polymérase T7, qui prend en charge la transcription des ARNdb. On peut acquérir cette banque de clones bactériens auprès de la société Geneservice (<http://www.geneservice.co.uk>). Elle se présente sous la forme de 50 plaques de 384 puits, où chaque puits contient un clone bactérien spécifique d'un gène. Cette banque est d'ailleurs couramment utilisée pour mener des cribles recouvrant la globalité du génome (23, 24).

### 2.2.3. Transgénèse

La transgénèse correspond à l'introduction de matériel génétique étranger au génome de l'animal. Elle se réalise généralement par microinjection de l'ADN exogène dans la partie syncytiale de la gonade de l'hermaphrodite adulte (**Figure 4**) (25). L'ADN injecté entre ainsi dans les ovocytes, mais ne s'intègre généralement pas dans les chromosomes. Le matériel injecté peut par contre être coupé et ligué, ce qui aboutit à la formation de "minichromosome" contenant de multiples copies de l'ADN injecté. Ce dernier est alors reconnu par les machineries de réplication et de disjonction des chromosomes à la mitose (25).



**Figure 4 : Introduction d'ADN exogène (Transgénèse) par microinjection.** Le matériel génétique est injecté dans la partie syncytiale de la gonade d'un jeune adulte hermaphrodite. Dans 0,1 % des cas, l'ADN s'intègre au hasard dans le génome des embryons. Dans 1 à 10 % des cas, les molécules d'ADN injectées se concatémérisent et forment un minichromosome

capable d'être pris en charge par la machinerie de réplication (D'après Mello et al., 1991 et 1995).

Afin d'identifier les animaux présentant une expression stable et transmise aux descendants, le matériel génétique à injecter est couplé à un marqueur de transformation, un gène codant pour une protéine fluorescente sous contrôle d'un promoteur tissu spécifique, par exemple. Les animaux fluorescents sont alors sélectionnés et les individus présentant une transmission stable sont amplifiés et conservés.

Cette technique est utilisée entre autres pour :

- Réaliser des études d'homologie entre espèces : Par exemple, une souche mutée pour un gène donné peut être transformée avec l'ADN correspondant au gène homologue humain pour voir si leurs fonctions sont identiques. Le groupe de Laurent Ségalat a ainsi montré que le gène codant la dystrophine humaine permettait aux mutants dystrophine (*dys-1*) de retrouver un phénotype sauvage (26).
- Etudier la structure/fonction des gènes : Un gène présentant des mutations dans des points clés de sa séquence est injecté dans une souche mutée pour ce même gène. Les régions importantes pour le gène, tel que les sites actifs, peuvent alors être identifiées ou confirmées.
- Mettre en évidence un tissu *in vivo* et étudier l'expression des gènes : On peut, par exemple, cloner la région promotrice d'un gène donné (environ 3 kb incluant le codon start et le début de la séquence) et la fusionner avec une protéine fluorescente comme la GFP (Green Fluorescent Protein) (27). La localisation de la GFP permet alors de déterminer dans quel tissu et à quel moment du développement ce promoteur est actif. Cette technique peut aussi être utilisée pour mettre en évidence un tissu ou une protéine, les analyses peuvent alors s'effectuer *in vivo*. Cette dernière technologie est particulièrement intéressante car les techniques d'immunocytochimie sont souvent longues et difficiles à mener chez *C. elegans*.



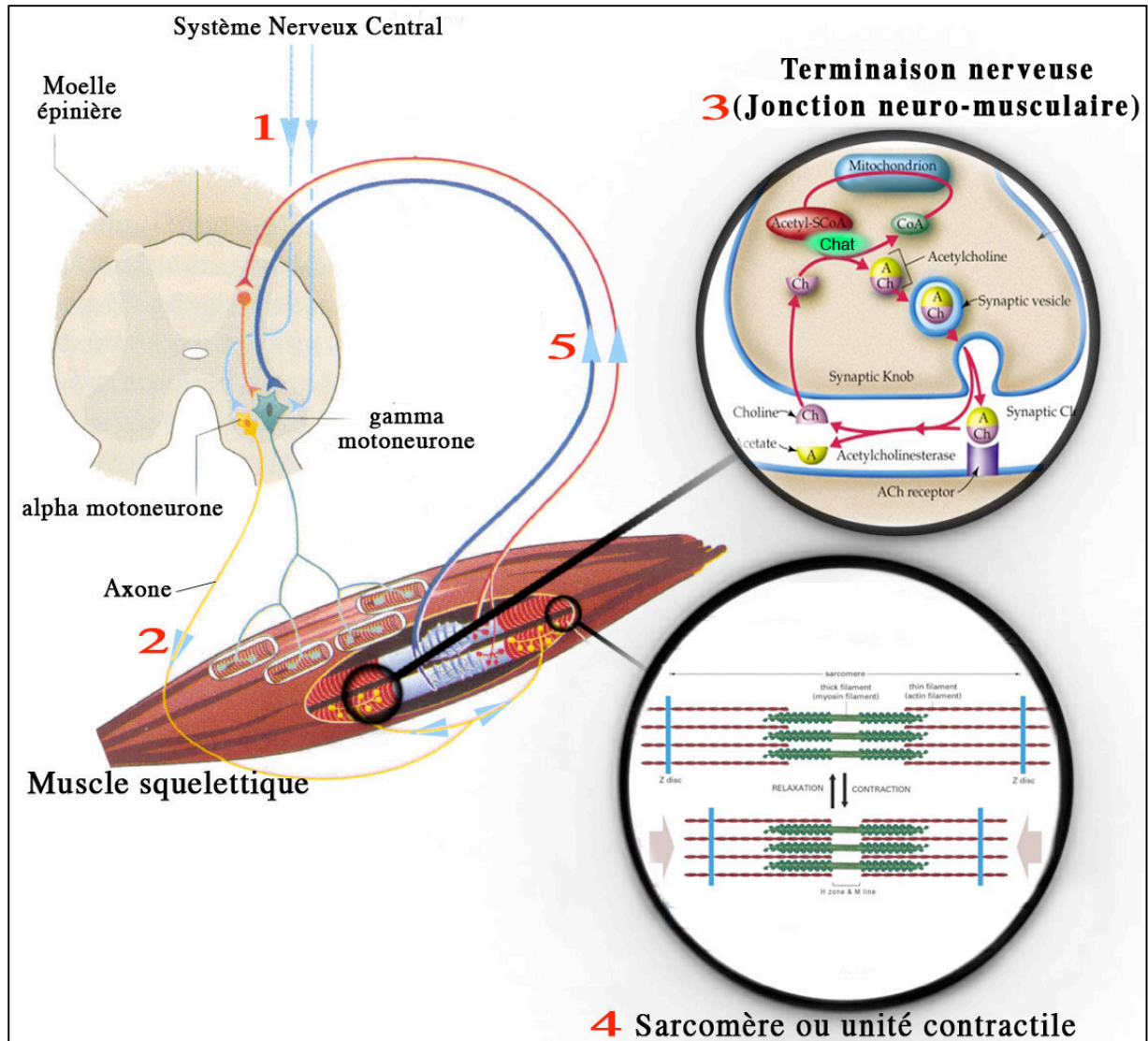
## **II. L'unité motrice chez les mammifères**

Ce chapitre présente les différentes structures anatomiques et moléculaires de l'appareil neuromusculaire, ou unité motrice. Cette présentation ne prétend pas être exhaustive, elle sert de base pour mettre en évidence les éléments importants nécessaires à la compréhension de ce manuscrit. Elle permet aussi de comprendre les similarités et les différences de cette partie anatomique entre les mammifères et le nématode *C. elegans*.

### **1. Vue schématique de l'unité motrice des mammifères**

Une unité motrice est constituée d'un motoneurone se prolongeant par un axone permettant de véhiculer l'influx nerveux (le potentiel d'action). Cet axone se projette en terminaisons nerveuses permettant de transmettre l'ordre de mouvement aux fibres musculaires via la libération de neurotransmetteurs, dont d'acétylcholine (**fig. 5 et fig. 6**).

Lors d'un mouvement volontaire, un influx nerveux, provenant du système nerveux central (SNC), vient stimuler le motoneurone (**fig. 5.1**). Plusieurs types de récepteurs existent à la surface de ces motoneurones mais ne seront pas décrits dans ce manuscrit. Le signal est alors traité, et dans le cas d'une stimulation, un potentiel d'action (dépolérisation membranaire) est généré et se propage le long de l'axone (**fig. 5.2**). Ce potentiel d'action finit par atteindre les terminaisons nerveuses et entraîne la libération de vésicules renfermant le neurotransmetteur, l'acétylcholine par exemple, le signal électrique se transforme alors en signal chimique (**fig. 5.3**). L'acétylcholine, une fois dans la fente synaptique, se fixe sur les récepteurs situés sur la membrane des cellules musculaires (le sarcolemme), transmettant l'ordre de mouvement aux unités contractiles (les sarcomères) par l'intermédiaire d'une cascade signalétique impliquant une libération massive de calcium (**fig. 5.4 et fig. 6**). Une fois le mouvement exécuté, des nerfs sensitifs renseignent les motoneurones sur l'état de contraction du muscle (**fig. 5.5**). Les motoneurones peuvent ainsi renvoyer des influx nerveux aux muscles sans intervention du SNC. Cette caractéristique permet d'adapter la contraction musculaire au mouvement désiré mais aussi d'effectuer des mouvements réflexes, en réponse à un étirement par exemple. Les détails des étapes clés et des structures impliquées seront présentées dans les paragraphes suivants.



**Figure 5 : Représentation schématique de l'unité motrice des mammifères.** Une unité motrice est constituée d'un motoneurone se prolongeant par un axone permettant de véhiculer l'influx nerveux (le potentiel d'action). Cet axone se projette en terminaisons nerveuses capables de libérer un neurotransmetteur, tel que l'acétylcholine, au niveau des fibres musculaires ; ce signal entraînera alors une libération massive de calcium dans le cytoplasme des cellules musculaires (sarcoplasme). Cette augmentation de calcium sarcoplasmique se traduira par un rétrécissement des unités contractiles (Les sarcomères). *Images adaptées de <http://www.frca.co.uk> et <http://www.uni-saarland.de/>.*

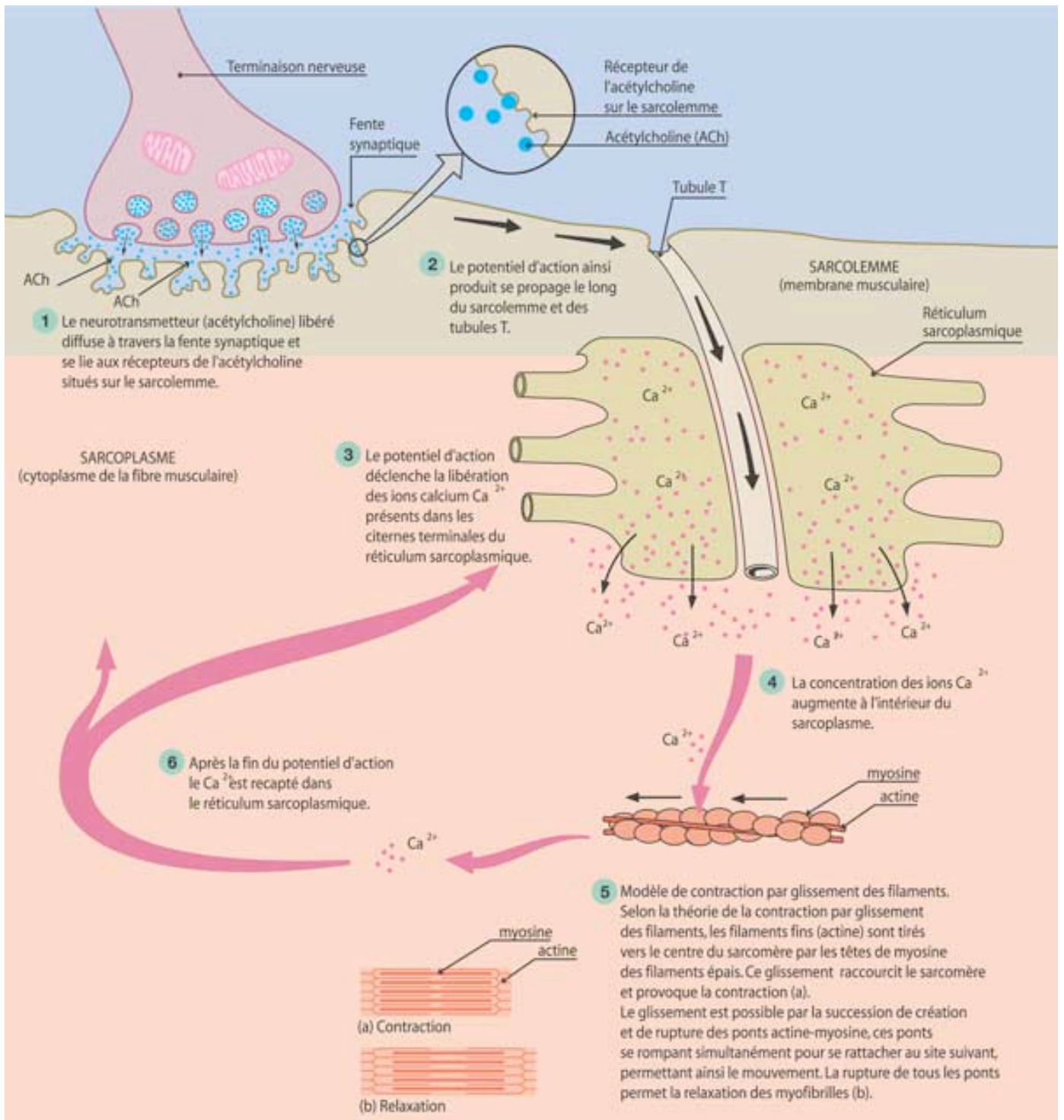
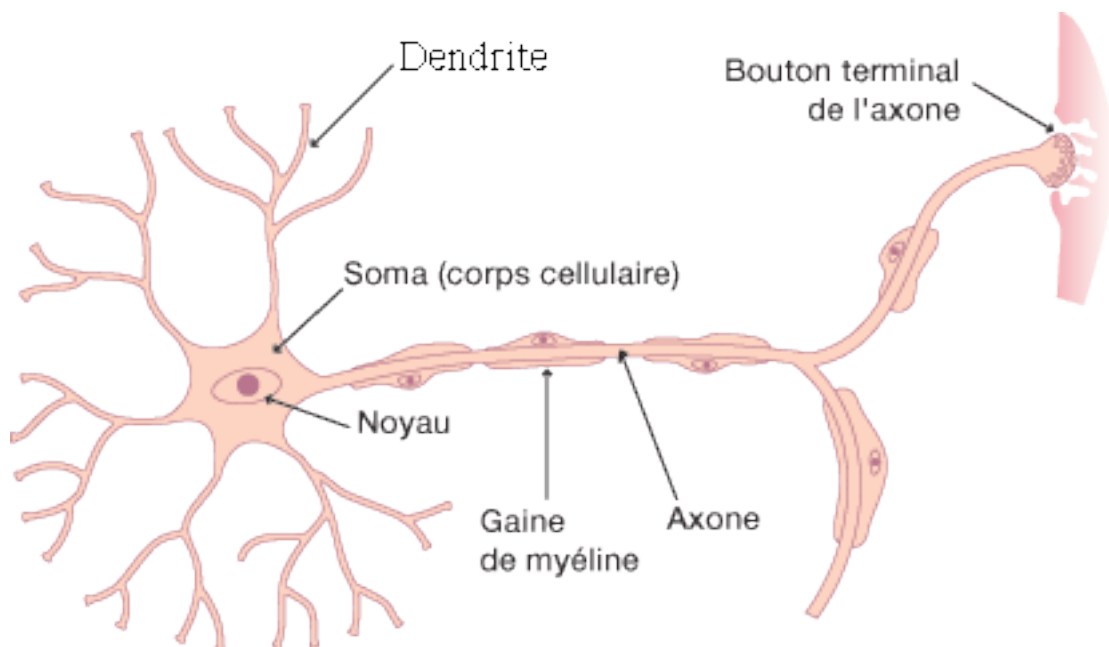


Figure 6 : Succession d'évènements conduisant à la contraction musculaire suite à une libération d'acétylcholine au niveau des jonctions neuromusculaire. Image adaptée de la bibliothèque de l'AFM .

## 2. Les motoneurones

Les motoneurones constituent la voie de sortie du système nerveux central de tout acte moteur. Les corps cellulaires des motoneurones sont localisés dans le tronc cérébral et dans la corne ventrale de la substance grise de la moelle épinière (28). Chaque motoneurone se prolonge par un axone pour aller innervé les fibres musculaires d'un muscle (fig. 5, 6 et 7). Arrivés aux muscles, les axones se divisent en fibres terminales (20 à 100) et chacune d'elle innervera une seule fibre musculaire (29). On distingue trois types de motoneurones: les motoneurones alpha, qui innervent les fibres musculaires responsables de la contraction, les motoneurones gamma, qui innervent les fuseaux neuromusculaires et qui sont sensibles à l'étirement, enfin les motoneurones bêta, qui innervent les deux types de fibres (28). Chez les patients atteints d'amyotrophie spinale, on observe une dégénérescence de ces motoneurones (30). L'ordre de mouvement ne peut plus atteindre le muscle qui devient inactif. Les muscles innervés par ces motoneurones finissent par s'affaiblir, puis s'atrophient et se rétractent, conduisant à une atrophie sévère (30). Il faut noter que l'apparition de l'atrophie musculaire n'est pas aussi simple, et sera plus longuement débattue dans le chapitre dédié à l'amyotrophie spinale. Le gène impliqué dans cette pathologie est appelé *survival motor neuron* (SMN).



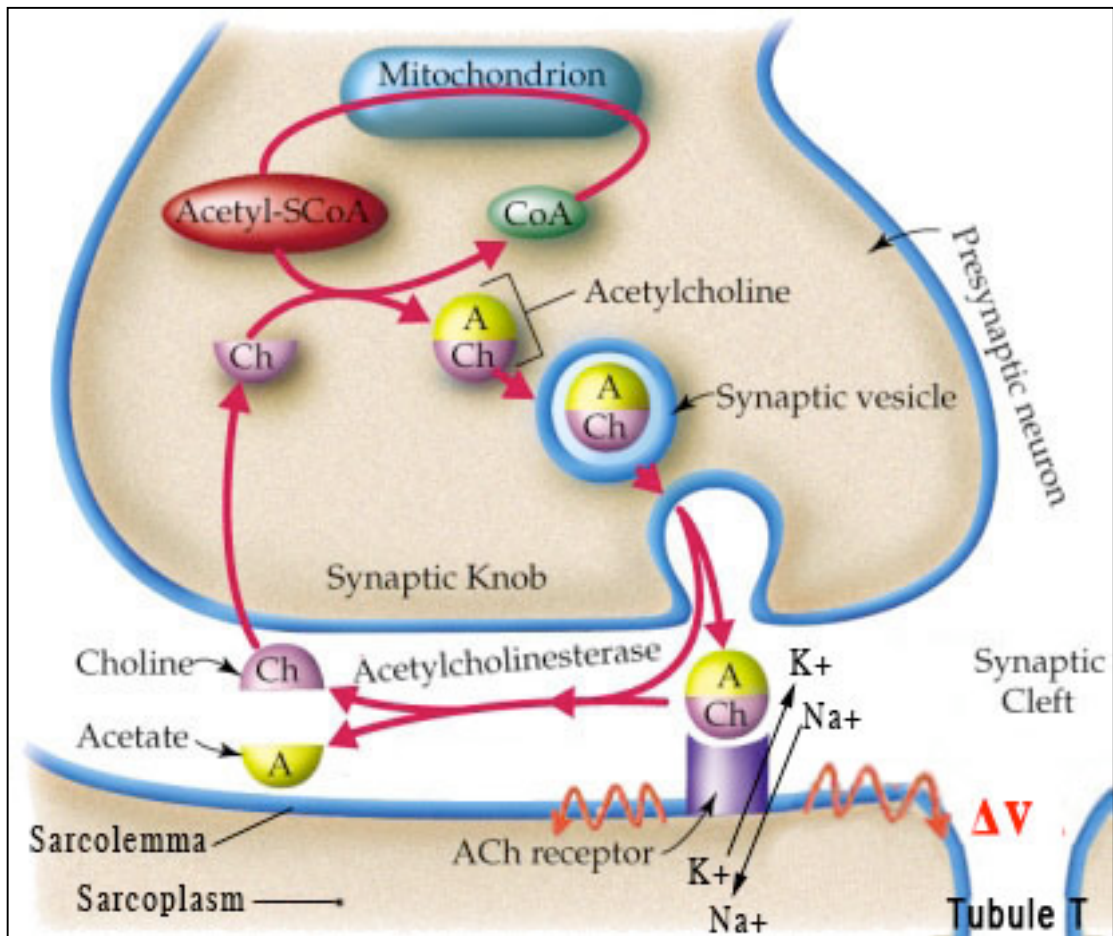
**Figure 7 : Représentation schématique d'un motoneurone.** Image tirée de la bibliothèque de l'AFM.

### **3. La jonction neuromusculaire, l'acétylcholine et la libération de calcium**

#### **3.1. La jonction neuromusculaire et la libération de l'acétylcholine**

La jonction neuromusculaire est composée de la terminaison nerveuse d'un motoneurone (compartiment présynaptique), de la fente synaptique et de la membrane plasmique de la cellule musculaire innervée (le sarcolemme) (29). On retrouve dans le compartiment présynaptique des vésicules renfermant le neurotransmetteur acétylcholine. Ce neurotransmetteur est produit par les motoneurones grâce à l'enzyme choline acetyltransférase (fig. 8) (31). Lorsqu'un potentiel d'action parvient dans ces terminaisons nerveuses, il entraîne l'ouverture de canaux calciques voltage dépendants (32, 33). Suite à ce signal, par un phénomène d'exocytose, les vésicules fusionnent alors avec la membrane présynaptique pour libérer l'acétylcholine dans la fente synaptique (fig. 8) (28).

L'acétylcholine libérée dans la fente synaptique sera, soit hydrolysée par l'enzyme acétylcholinestérase, soit capable de se fixer sur des récepteurs cholinergiques (nicotiques) situés sur la membrane de la cellule musculaire (le sarcolemme) (28, 29). La distribution, la structure et l'intégrité de ces récepteurs sont dépendantes de plusieurs complexes protéiques (Pour revue voir (34)). La fixation de l'acétylcholine entraîne un changement de conformation de ces récepteurs qui deviennent perméables aux ions sodium et potassium. Il s'ensuit une entrée de sodium et une sortie de potassium générant un potentiel membranaire (fig. 8) (28). Ce potentiel parcourt alors le sarcolemme jusqu'aux tubules T (fig. 6). Ces tubules sont des invaginations du sarcolemme dans le cytoplasme (sarcoplasme) de la cellule musculaire. Ces tubules regroupent un grand nombre de canaux calciques voltage dépendants et permettent d'optimiser la réponse à la libération d'acétylcholine (35). Ces canaux sont essentiellement représentés par les DHPR (Dihydropyridine receptor) qui sont des canaux calciques voltage dépendants de type L (36). Leur ouverture entraînera une entrée massive de calcium dans le sarcoplasme via plusieurs processus décrits dans le paragraphe suivant.



**Figure 8 : La jonction neuromusculaire et la libération d'acétylcholine.** La fixation d'acétylcholine sur les récepteurs cholinergiques (nicotinique) se traduira par la génération d'un potentiel de membrane se propageant le long du sarcolemme jusqu'aux tubules T. *Image adaptée de <http://lecerveau.mcgill.com>.*

### 3.2. La libération du calcium

Dans les muscles striés le couplage excitation-contraction est dépendant des mécanismes de libération et de recapture du calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique (37). Ce réticulum est retrouvé dans le sarcoplasme agencé autour des tubules T (fig. 6 et 9). Suite à la dépolarisation des tubules T, la libération du calcium contenu dans ces citernes est due à deux mécanismes (fig. 9). Le premier mécanisme, majoritaire et entraînant une sortie rapide et massive de calcium, implique le couplage entre les canaux calciques de type L voltage dépendant (Dihydropyridine receptor, DHPR), localisés sur le sarcolemme des tubules T, et les canaux de relargage du calcium (Ryanodine receptor, RYR),

situés sur la membrane du réticulum sarcoplasmique (38-41). Le deuxième mécanisme, entraînant une sortie plus lente de calcium, implique les récepteurs IP3R (Inositol 1,4,5-triphosphate receptor) situés sur les membranes du réticulum sarcoplasmique (42).

Le mécanisme de libération du calcium impliquant les RYR est décrit comme étant le principal, voire le seul acteur du phénomène de contraction des fibres musculaires (41, 43). Lorsque les canaux DHPR sont parcourus par une dépolarisation membranaire, ils changent de conformation, laissant passer un flux entrant de calcium dans la cellule (40). Ce changement de conformation et cette entrée de calcium entraîneront l'ouverture des canaux calciques RYR. Les canaux calciques RYR tirent leur nom de la ryanodine, un alcaloïde extrait des plantes *Ryana speciosa*. La ryanodine est couramment utilisée pour réaliser des études fonctionnelles de ces canaux (44). Le récepteur de la ryanodine (RYR) est un tétramère formé de quatre sous unités identiques de 560 kDa environ. Les trois isoformes connues de RYR sont codées par trois gènes provenant d'un gène ancestral commun. Ils présentent une homologie importante (environ 70 % d'identité) et une hypervariabilité de leur domaine C-terminal. RYR1 est l'isoforme du muscle squelettique. RYR2 est l'isoforme du muscle cardiaque et du cerveau, et RYR3 est exprimée de façon ubiquitaire à un faible niveau (38). Ce canal a été identifié par microscopie électronique dans le muscle squelettique ; il se présente comme une structure de trèfle à quatre feuilles, dont les feuilles forment une structure représentant 80% de la protéine qui s'étend du réticulum sarcoplasmique au sarcolemme (Tubules T), alors que la partie canal est transmembranaire (45).

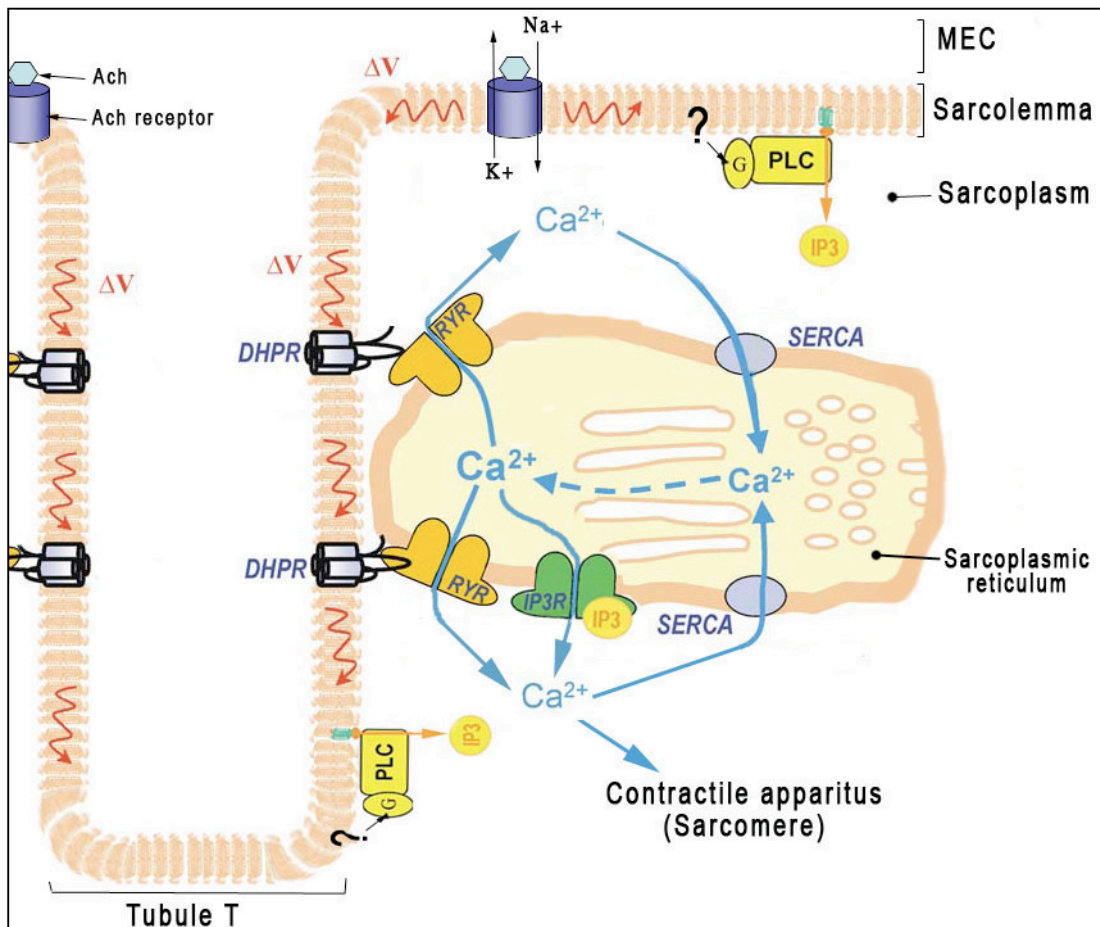
Dans les muscles cardiaques, l'entrée de calcium au travers des DHPR entraîne l'ouverture des canaux RYR2 (l'isoforme cardiaque des RYR) qui sont responsables de la sortie massive de calcium du réticulum sarcoplasmique (46). Contrairement aux muscles cardiaques, cette entrée de calcium via les DHPR dans le muscle squelettique n'est pas indispensable à l'ouverture des canaux RYR1, l'isoforme squelettique des RYR (47). En effet, il a été montré que les DHPR et les RYR du muscle squelettique sont physiquement liés et que le changement conformationnel des DHPR suffit à entraîner l'ouverture des RYR1 par un phénomène "mécanique" (fig. 9) (38, 39). L'entrée de calcium viendrait s'ajouter à ce signal (48). Une fois le canal calcique RYR1 ouvert, le calcium séquestré dans le réticulum sarcoplasmique passe dans le sarcoplasme de la cellule musculaire et va entraîner une contraction des sarcomères, le muscle se raccourcira et entraînera le mouvement (voir plus bas). Enfin, il faut noter que l'activité des canaux (RYR) peut aussi être modulée par d'autres éléments, comme la calmoduline et la calsequestrine, par exemple, mais aussi par la concentration en calcium et par phosphorylation (pour revue (41, 49)).

Le deuxième mécanisme conduisant à une libération de calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique implique les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3R). IP3R est retrouvé dans tous les types cellulaires. Ces canaux calciques IP3R tirent leur nom de leur ligand, l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). Ils sont retrouvés agencés sur la membrane du réticulum mais ils ont également été observés associés à la membrane nucléaire (**50, 51**). Il existe trois isotypes de IP3R (I, II et III) ; leurs séquences en acides aminés présentent une forte homologie (60 à 80 %) (**52**). Chacun des trois isotypes peut varier par des phénomènes d'épissage alternatif. IP3R-I est prédominant dans le cerveau, IP3R-II dans le foie et les cellules musculaires cardiaques et squelettiques, enfin IP3R-III prédomine dans les cellules présentant un haut potentiel mitotique (**53**). Leur rôle dans le relargage du calcium a été décrit comme bien plus important dans les muscles lisses que dans les muscles striés (**54**). Leur structure ressemble beaucoup à celle des canaux RYR mais présente des caractéristiques biophysiques distinctes (**55**). En effet, leur ouverture entraîne une sortie de calcium plus lente et moins importante que le mécanisme impliquant les RYR. Leur rôle dans les cellules squelettiques n'est pas clair, ils sont décrits comme n'ayant pas d'impact réel sur le phénomène de contraction, ils seraient par contre impliqués dans une transduction de signal pouvant réprimer ou activer certains gènes, mais cela reste matière à débat (**41-43, 51**).

Leur activation dépend de la formation d'IP3 par hydrolyse des phospholipides PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) présents sur les membranes plasmiques, et notamment au niveau des tubules T dans les muscles squelettiques (**fig. 9**). En fonction du type cellulaire, divers récepteurs, tel que les récepteurs sérotoninergiques, pourraient activer les phospholipase C (PLC) via les protéines G ou les tyrosines kinases (**56-58**). Les PLC hydrolyseront alors PIP2 en IP3 et en diglycéride. Les molécules d'IP3 relâchées dans le cytoplasme se fixeront alors sur les récepteurs IP3R localisés sur le réticulum, entraînant leur ouverture et une sortie de calcium. Plusieurs études ont montré que la dépolarisation des tubules T entraînait la formation de IP3 et ont noté un relargage de calcium indépendant des RYR ; mais encore une fois la relation entre la dépolarisation des tubules T et la formation d'IP3 n'est pas claire ; plusieurs hypothèses relient l'activation des DHPR à une activation des protéines G (**42, 43, 59**).

Dans les deux processus décrits ci-dessus, le calcium libéré dans le cytoplasme de la cellule musculaire sera alors recapté dans le réticulum sarcoplasmique par les pompes SERCA (Sarcoplasmique réticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase), qui comme leur nom l'indique sont ATP-dépendantes (**fig. 9**) (**37, 41**). L'activité de ces pompes peut être modulée par de multiples éléments, telles que des protéines dépendantes de la concentration en calcium, certaines protéines kinases et même le potentiel redox de la cellule musculaire (pour revue voir (**37**)).

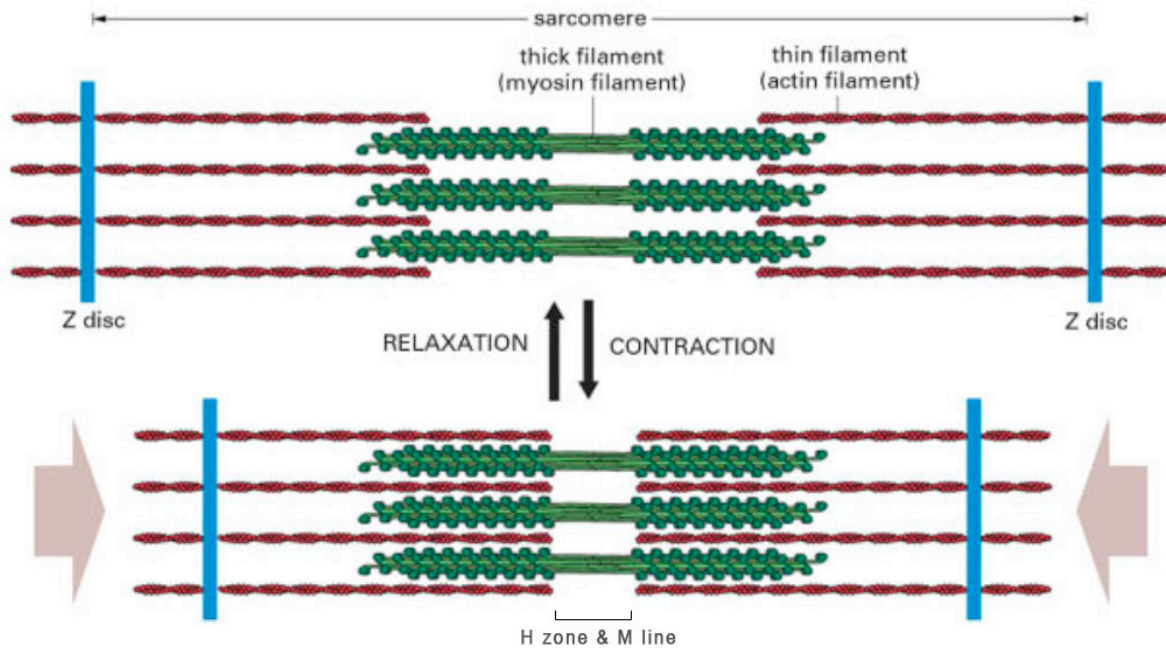




**Figure 9 : Représentation schématique de la libération de calcium suite à la propagation d'un potentiel membranaire dans les tubules T.** Ach : Acétylcholine,  $\Delta V$  : Dépolarisation membranaire, DHPR : Dihydropyridine receptor (Voltages dépendants), G : Protein G, PLC : Phospholipase C, IP3 : Inositol triphosphate, IP3R : Inositol triphosphate receptor. *Image adaptée de la bibliothèque de l'AFM.*

#### 4. Le sarcomère et la contraction

Les sarcomères sont les éléments responsables de l'apparence striée des muscles squelettiques et cardiaques. Les sarcomères sont constitués essentiellement d'actine et de myosine. Chaque sarcomère est délimité de chaque côté par une strie Z, ou Z disc (de l'allemand zwischen, signifiant "entre") (**fig. 10**). On retrouve les filaments fins d'actine ancrés sur ces stries Z. Intercalés entre les filaments d'actine, on retrouve des filaments épais de myosine qui sont organisés de chaque côté de la ligne M, ou M line (de l'allemand mittel, center). La contraction se traduira par un coulisement actif des filaments fins d'actine sur les filaments épais de myosine, les stries Z se rapprochent alors les unes des autres.



**Figure 10 : Le sarcomère** (Image adaptée de la bibliothèque de l'AFM). Le mécanisme de déplacement de la myosine sur l'actine se fait grâce à l'énergie fournie par l'ATP. Ce mécanisme peut se décomposer en plusieurs étapes :

1. La myosine est liée à l'ADP et son domaine d'interaction avec l'actine est recouvert par la troponine, les têtes de myosine ont une position repliée.
  2. Le calcium libéré par le réticulum sarcoplasmique vient se fixer sur la troponine ce qui provoque la libération du domaine d'interaction de la myosine avec l'actine. La myosine se fixe alors à l'actine.
  3. Lors de l'interaction myosine-actine, la molécule d'ADP fixée sur les têtes de myosine est libérée, ce qui provoque un changement de conformation et bascule la tête de myosine. Ce basculement tracte l'actine vers la ligne M, provoquant un raccourcissement du sarcomère.
  4. Au terme de ce mouvement, une molécule d'ATP vient se fixer sur la myosine. La tête de myosine se détache alors de l'actine et retourne à une position repliée.
  5. L'ATP est hydrolysé en ADP permettant une nouvelle interaction avec l'actine. A ce stade, la troponine peut empêcher cette interaction si elle n'est plus fixée au calcium.
- Dans tous les cas, le cycle est terminé et peut, soit recommencer pour entraîner une contraction (raccourcissement) plus importante, soit se stopper.

## 5. Organisation des muscles striés squelettiques chez les mammifères

Seuls les muscles striés squelettiques seront abordés dans ce manuscrit. Un muscle squelettique est constitué d'un regroupement de faisceaux musculaires (**fig. 11**). Ces faisceaux sont composés de plusieurs fibres musculaires qui correspondent à des cellules musculaires qui ont fusionné à l'état de myoblastes (les précurseurs des cellules musculaires). Ces cellules, ou fibres musculaires, sont donc plurinucléées et sont constituées d'une répétition de sarcomères. Elles présentent un aspect strié en raison de cette répétition de sarcomères.

Lorsque le muscle subit un dommage, 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 (**fig. 11**). Elles se trouvent en périphérie des fibres musculaires. Le processus régénératif commence par la prolifération des cellules satellites, puis elles fusionnent avec les fibres existantes. Les noyaux nouvellement ajoutés à la fibre migrent par la suite en périphérie (pour revue (60)).

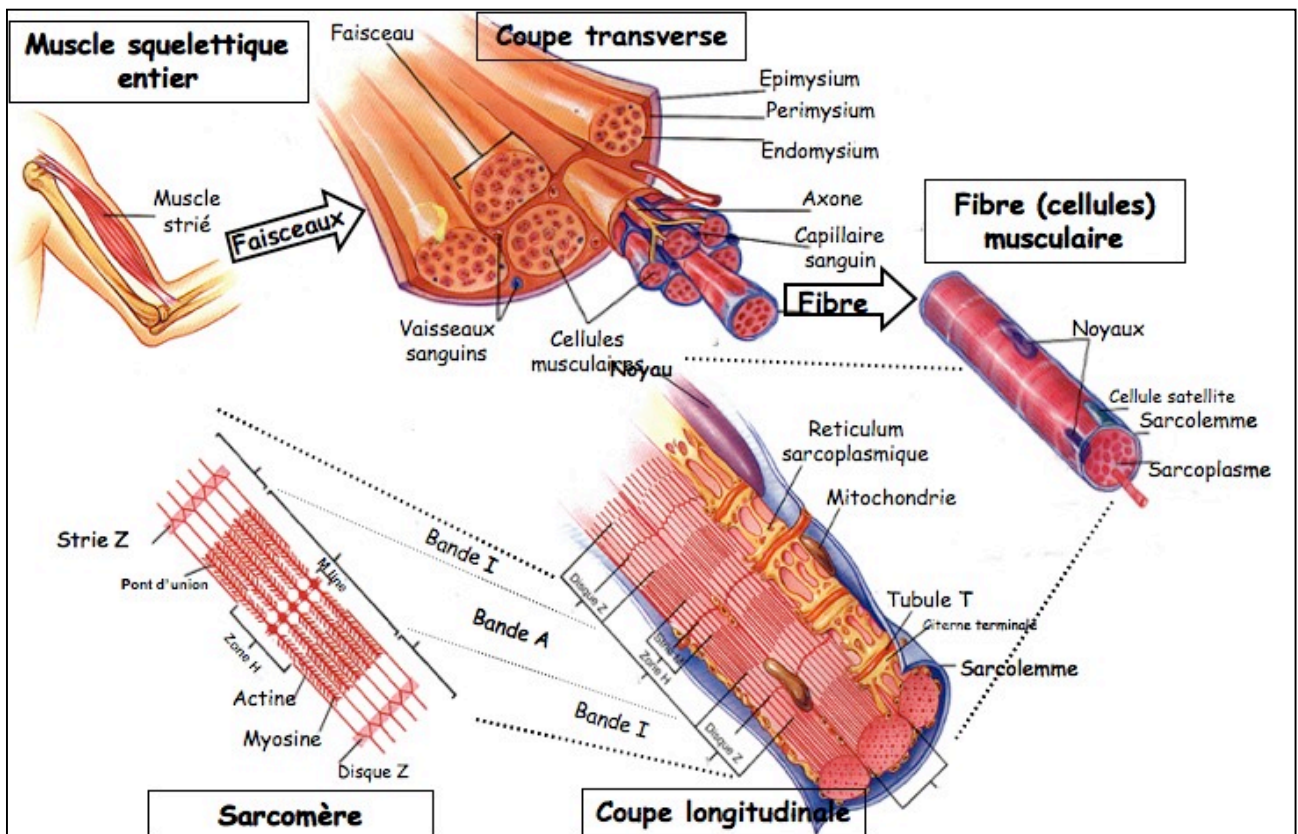


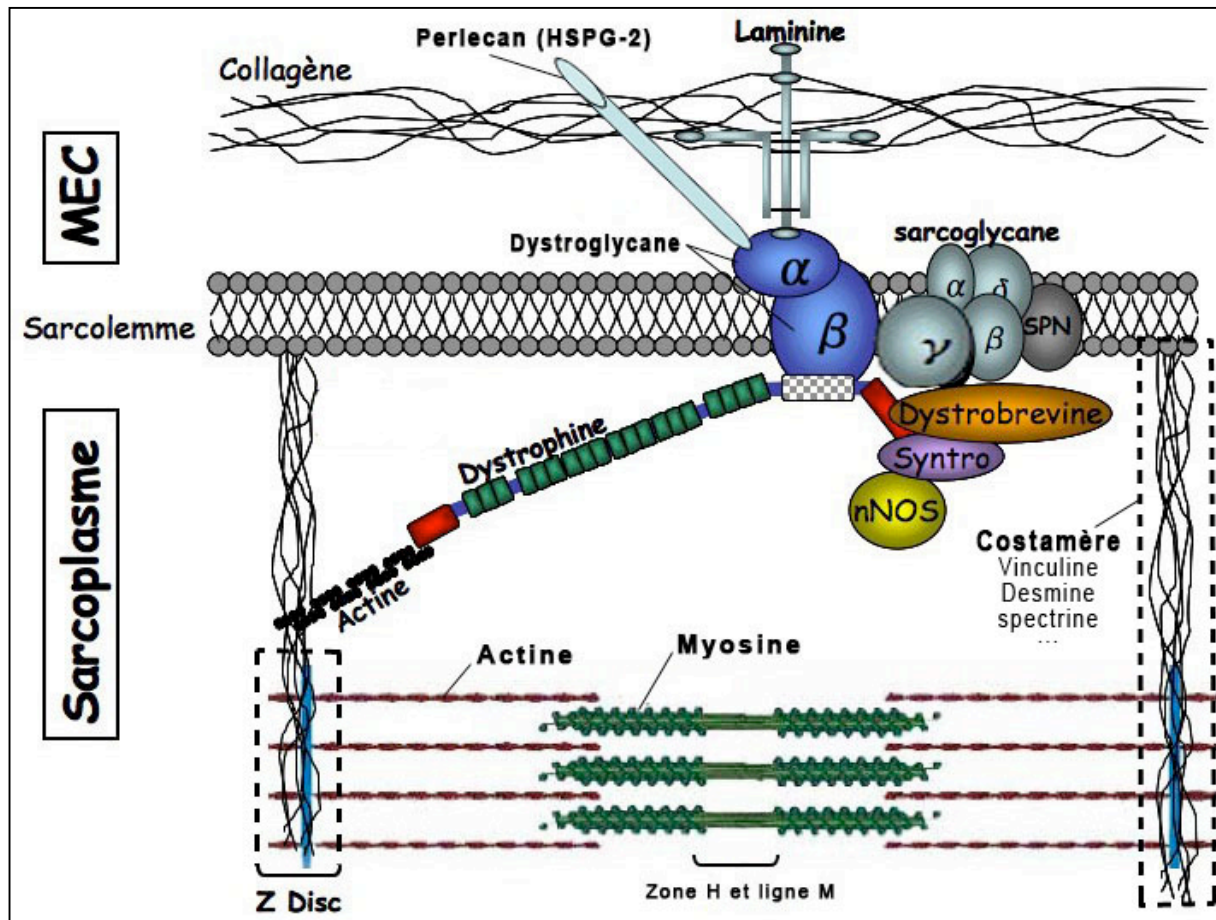
Figure 11 : Organisation du muscle squelettique chez l'homme. Image adaptée de [www.theses.ulaval.ca/2004/21784/ch02.html](http://www.theses.ulaval.ca/2004/21784/ch02.html).

## **6. Sarcolemme et DGC (Dystrophin Glycoprotein Complex)**

Pour permettre de répercuter le phénomène contractile des sarcomères à l'ensemble de la cellule, les sarcomères sont reliés à la membrane plasmique, le sarcolemme, par l'intermédiaire de filaments intermédiaires, ce réseau de filaments forment ce que l'on appelle les costamères (**fig. 12**). En plus de ces filaments, le DGC pour Dystrophin Glycoprotein Complex, ou DAPC pour Dystrophin Associated Protein Complex, joue un rôle important dans l'organisation des différents éléments de la cellule musculaire (**fig. 12**).

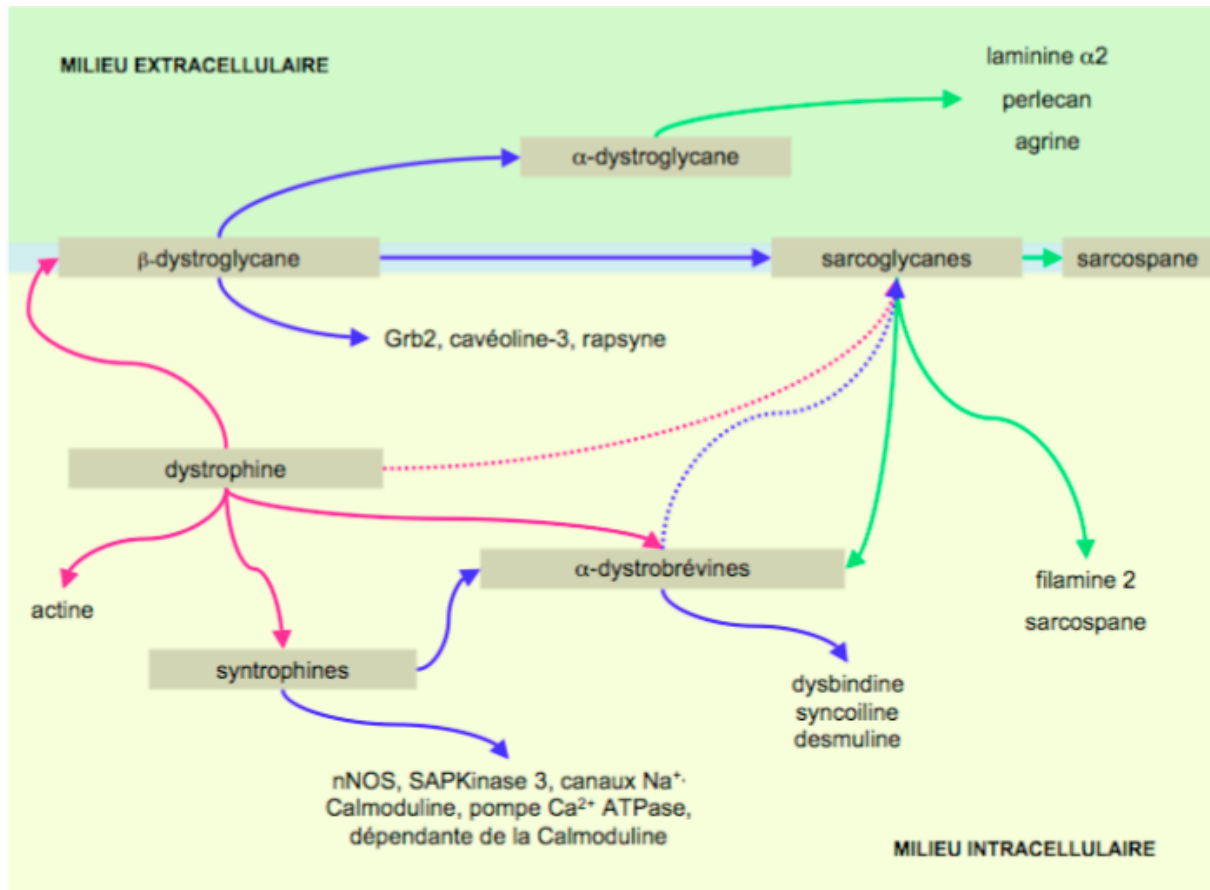
Ce complexe protéique est impliqué dans de nombreuses myopathies, notamment dans la myopathie de Duchenne et le syndrome de Schwartz-Jampel. Ce complexe peut être subdivisé en trois sous-groupes : 1) la dystrophine (impliquée dans la Myopathie de Duchenne, voir le chapitre dédié) et le complexe des dystroglycanes, qui constituent le cœur du DGC, 2) les sarcoglycanes et le sarcospane, composants transmembranaires, 3) la dystrobrevine et les syntrophines composants intracellulaires du complexe. Il faut noter que ce complexe est lié à la matrice extracellulaire par des interactions entre l' $\alpha$ -dystroglycane et le perlecan (impliquée dans le syndrome de Schwartz-Jampel, voir le chapitre dédié), l'agrine et la laminine, composants de la matrice extracellulaire (**fig. 12 et 13**). Il est aussi lié aux unités contractiles de la cellule musculaire par l'intermédiaire de l'actine cytosquelettique et des filaments intermédiaires (**fig. 12 et 13**).

Le DGC est retrouvé dans plusieurs types cellulaires et présente une composition variable en fonction du tissu dans lequel il est exprimé (muscles striés ou lisses, tissu nerveux, etc) et de sa localisation cellulaire ; par exemple, dans le muscle strié squelettique, les complexes DGC agencés au niveau du sarcolemme extrajonctionnel sont légèrement différents des complexes retrouvés au niveau des jonctions neuromusculaires (pour revue, voir (**61**)).



**Figure 12 : Le DGC (Dystrophin Glycoprotein Complex) et son organisation dans la fibre musculaire squelettique.** Dans le muscle strié squelettique, le DGC est généralement constitué par la dystrophine, les dystroglycane, les sarcoglycane (alpha, bêta, delta et gamma), le sarcospane, les syntrophines alpha1, bêta 1 et bêta2, la dystrobrevine alpha. S'ajoutent à ces protéines, le perlecan, l'agrine et la laminine au niveau de la matrice extracellulaire. MEC : Matrice Extra Cellulaire, SPN : sarcospane, Syntro : Syntrophine

Les interactions protéiques du DGC sont nombreuses et complexes. La **figure 13**, ci-contre, a pour but de résumer les interactions des différentes protéines du DGC entre elles, et avec les protéines adjacentes.



**Figure 13 : Représentation schématique des interactions protéiques du DGC (Dystrophin Glycoprotein Complex).** L'extérieur de la fibre musculaire est représenté 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 les protéines associées de façon indirecte à la dystrophine et d'autres protéines, sont représentées en vert. Les flèches en pointillées représentent des interactions controversées. *Image tirée du manuscrit thèse de Maité Carre-Pierrat.*

Les différentes fonctions du DGC ne sont pas clairement définies, néanmoins les différentes protéines appartenant à ce complexe nous renseignent sur les différents rôles qu'il accomplit. Il pourrait être impliqué dans des phénomènes mécaniques, métaboliques, développementaux et signalétiques. Certains de ses composants jouent un rôle dans le recrutement des éléments nécessaires au fonctionnement de la jonction neuromusculaire par exemple, d'autres participent au maintien et à l'organisation de la cellule avec le milieu qui l'entoure. Ces hypothèses et la présentation de la dystrophine sont plus amplement présentées dans la section consacrée à la myopathie de Duchenne. Les autres protéines de ce complexe et leurs différents rôles sont par contre décrits en détails dans les paragraphes suivants.

## **6.1. Le complexe des dystroglycanes**

Le complexe des dystroglycanes est constitué de l' $\alpha$  et la  $\beta$  dystroglycane (**62, 63**). Chacune d'elles peuvent varier en fonction de son degré de glycosylation, et peuvent conduire à des maladies musculaires en cas d'anomalies d'expression ou de glycosylation (**64, 65**).

L' $\alpha$ -dystroglycane est une protéine extracellulaire qui interagit avec plusieurs protéines de la matrice extracellulaire, dont :

- Le perlecan, ou HSPG2 (Heparan Sulfate Proteoglycane 2, qui est impliqué dans un grand nombre d'interactions et de fonctions cellulaires. Des mutations de ce gène peuvent conduire à une maladie connue sous le nom de syndrome myotonique de Schwartz-Jampel (**66, 67**). Ce gène et ses différents rôles connus et supposés sont plus amplement décrits dans un chapitre dédié au syndrome de Schwartz-Jampel.
- la laminine- $\alpha$ 2, élément de la matrice extracellulaire, qui est liée aux intégrines. Son absence provoque une myopathie musculaire congénitale nommée CMD (merosin-deficient Congenital Muscular Dystrophy) (**68**).
- L'agrine, une protéine sécrétée impliquée dans l'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine aux jonctions neuromusculaires (**69, 70**).

La  $\beta$ -dystroglycane présente une localisation transmembranaire. Elle interagit avec l' $\alpha$ -dystroglycane du côté de la matrice extracellulaire et avec la dystrophine du côté cytoplasmique (**71-73**). La  $\beta$ -dystroglycane interagit aussi avec plusieurs protéines intracellulaires, dont :

- Grb2 (Growth factor Receptor Bound protein 2), une protéine impliquée dans la transduction du signal et dans l'organisation du cytosquelette (**74-76**).
- La rapsyne, une protéine impliquée dans la formation des jonctions neuromusculaires (**77**).
- La cavéoline-3, une protéine transmembranaire impliquée dans plusieurs phénomènes, dont l'internalisation des récepteurs, l'endocytose de petites molécules et les processus apoptotiques (**78, 79**). Au niveau du muscle squelettique, elle pourrait aussi être impliquée dans la régulation de certains éléments du DGC, dont l'enzyme nNOS (neuronal Nitric Oxyde Synthase) (**80**). Son absence provoque la myopathie des ceintures de type LGMD 1C (Limb Girdle Muscular Dystrophy) (**65**).

Les nombreuses interactions présentées ci-dessus et les maladies liées à ce complexe suggèrent qu'il joue un rôle clé dans l'organisation et l'intégrité de la membrane plasmique et de la jonction neuromusculaire, mais aussi dans la transduction du signal.

## **6.2. Les sarcoglycanes**

Quatre isoformes de sarcoglycanes ont été identifiées dans les muscles striés, l' $\alpha$ -sarcoglycane (**81**), la  $\beta$ -sarcoglycane (**82, 83**), la  $\gamma$ -sarcoglycane (**84**) et la  $\delta$ -sarcoglycane (**85, 86**). Elles sont toutes transmembranaires et s'associent en complexe (**87**).

Le complexe des sarcoglycanes est directement lié au complexe des dystroglycanes, par contre son interaction avec la dystrophine est probablement indirecte (**87**). Ce complexe est aussi lié à plusieurs protéines intracellulaires, dont la dystrobrevine (voir plus bas), et la  $\gamma$ -filamine, une protéine participant à l'organisation de l'actine cytosquelettique (**88**).

La perte des sarcoglycanes  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\delta$  cause respectivement les myopathies musculaires des ceintures LGMD (Limb Girdle Muscular Dystrophy) 2C, 2D, 2E, et 2F (**89**).

## **6.3. Le sarcospane**

Le sarcospane est une protéine transmembranaire non-glycosylée (**90**). Yoshida *et al.* ont montré qu'elle interagissait avec le complexe des sarcoglycanes (**91**). Son absence n'entraîne pas de maladie musculaire connue.

## **6.4. Les syntrophines**

Les syntrophines sont des protéines cytoplasmiques. Trois isoformes ont été identifiées dans les muscles striés ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 2$ ) et deux dans les neurones ( $\gamma 1$  et  $\gamma 2$ ) (**92, 93**). Elles joueraient un rôle dans la signalisation intracellulaire et dans l'adressage à la membrane de certaines protéines (**94, 95**).

L' $\alpha$ -syntrophine est la forme prédominante dans les fibres musculaires. Elle est présente sous la membrane plasmique de toutes les fibres musculaires alors que la  $\beta 1$ -syntrophine est préférentiellement exprimée dans les fibres rapides et la  $\beta 2$ -syntrophine exprimée au niveau des jonctions neuromusculaires (**96, 97**). Les syntrophines interagissent avec la dystrophine et la dystrobrevine via leur extrémité C-terminale (**98**).

Les syntrophines interagissent aussi avec plusieurs protéines impliquées dans les phénomènes de transduction du signal, dont :



- nNOS (neuronal Nitric Oxide Synthase), une enzyme responsable de la synthèse du monoxyde d'azote (NO), et qui est impliqué dans la signalisation intercellulaire de proximité (**99, 100**).
- SAPK3, une MAP kinase sensible au stress (**101**).
- Des canaux sodiques voltage dépendant adressés au niveau des jonctions neuromusculaires via cette interaction (**102**).
- La calmoduline (**103**), 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 calcium ATPase calmoduline dépendante, qui est impliquée dans la sortie active des ions  $Ca^{2+}$  présents dans les fibres musculaires (**104**).

Malgré un rôle apparemment important, aucune maladie musculaire n'a été identifiée en absence de syntrophine.

### **6.5. L' $\alpha$ -dystrobrevine**

Les dystrobrevines sont des protéines cytoplasmiques présentant une structure proche de la partie C-terminale dystrophine (**105**). Il existe deux formes de dystrobrevines, l' $\alpha$ -dystrobrevine et la  $\beta$ -dystrobrevine. Dans les muscles striés, les dystrobrevines s'associent directement à la dystrophine dans sa partie C-terminale, elle s'associe aussi aux syntrophines (**106**). Une relation directe avec le complexe des sarcoglycanes est aussi évoquée (**91**). Les  $\beta$ -dystrobrevines sont également exprimées dans de nombreux tissus non-musculaires en association avec la dystrophine (**107, 108**). Les  $\alpha$ -dystrobrevines présentent plusieurs isoformes musculaires, dont des formes prédominantes :  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  (**109**). L' $\alpha 1$ -dystrobrevine est principalement localisée au niveau des jonctions neuromusculaires alors que l' $\alpha 2$ -dystrobrevine est préférentiellement adressée sous la membrane plasmique (**110**).

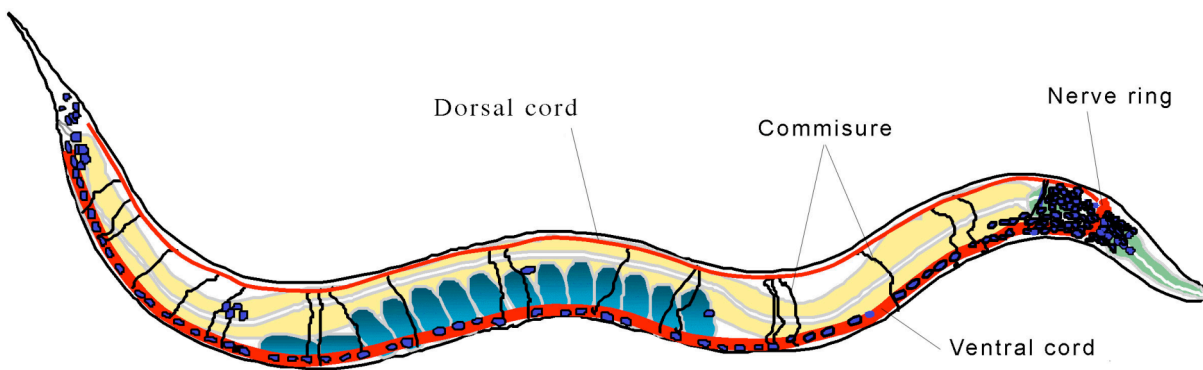
Les  $\alpha$ -dystrobrevines interagissent aussi avec plusieurs protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette (**111-113**). Ainsi, au sein du DGC, les  $\alpha$ -dystrobrevines constituent avec la dystrophine, présentée plus loin, un lien mécanique avec le cytosquelette. De plus, elles auraient un rôle dans l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine à la jonction neuromusculaire (**114, 115**).

Des anomalies des  $\alpha$ -dystrobrevines peuvent entraîner une cardiomyopathie connue sous le nom de syndrome de Barth (**116**).

### III. L'unité motrice chez *C. elegans*

#### 1. Les motoneurones

Le système nerveux de *C. elegans* est constitué de 302 neurones qui forment plus de 6000 synapses (117). Ces neurones s'organisent en trois structures : i) l'anneau nerveux (Nerve Ring) qui se situe autour du pharynx de l'animal, ii) la corde ventrale (Ventral Cord, VC) iii) la corde dorsale (Dorsal Cord, DC) (figure 14). Quelques neurones se regroupent aussi au niveau de la queue de l'animal.



**Figure 14. Représentation schématique du système nerveux de *C. elegans*.** Image d'un adulte mettant en évidence le pharynx (vert), l'intestin (jaune), les oeufs (grande sphères bleues), les neurones (petites sphères bleues), les trajets nerveux (rouge), les commissures (noir). Image adaptée de <http://thalamus.wustl.edu/nonetlab/ResearchF/elegans.html>.

Le système nerveux de *C. elegans* est composé de neurones sensoriels, d'inter-neurones et de motoneurones. Les corps cellulaires (petites sphères bleues) de la plupart des neurones sensoriels et des inter-neurones sont situés au niveau de l'anneau nerveux (Nerve ring), certains sont aussi retrouvés au niveau de l'appareil excréteur. Les corps cellulaires des motoneurones résident dans la corde ventrale. Certains de ces motoneurones projettent des commissures (trajets noirs) vers la corde dorsale pour aller innover les muscles dorsaux.

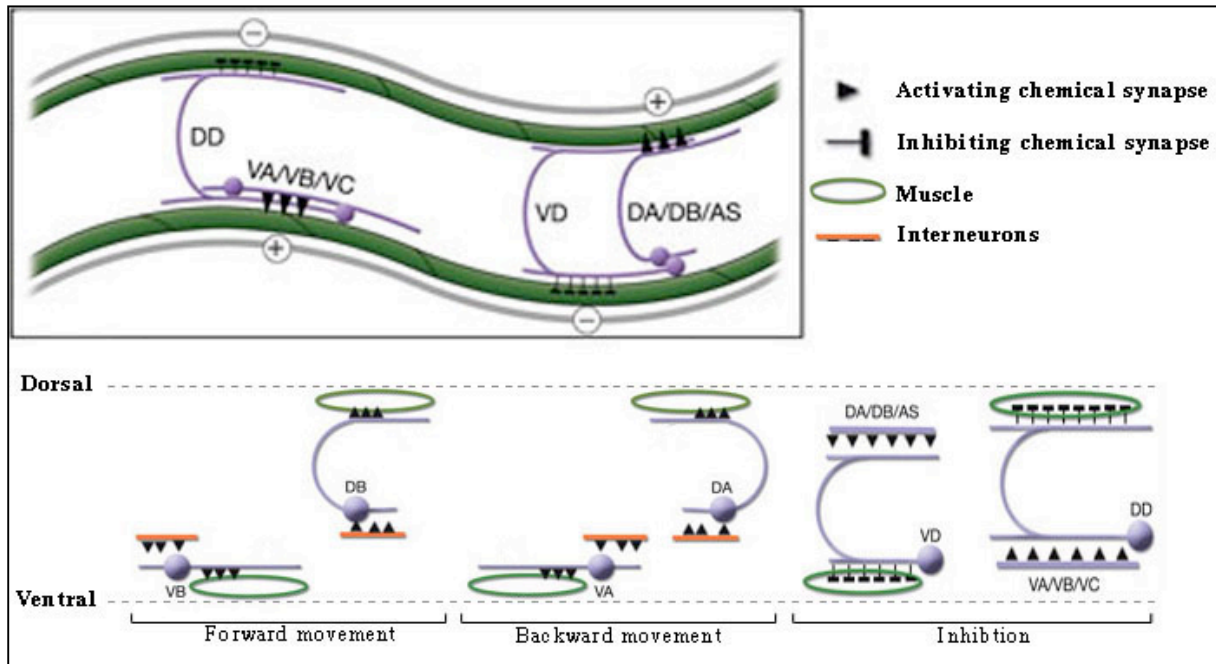
Le comportement locomoteur de *C. elegans* se décompose en mouvements sinusoïdaux, il peut ramper sur des surfaces solides ou nager dans un milieu liquide. Sur ses 302 neurones, 113 appartiennent à la catégorie des motoneurones. Ils contrôlent la mobilité, mais aussi le système alimentaire (notamment le pharynx) et reproductif (les muscles de la vulve). Sur les 113 motoneurones, 75 contrôlent les muscles locomoteurs du tronc (body wall muscles) et peuvent être divisées en 8 groupes différents (VA, VB, DA, DB, VD, DD, AS et VC) (**tableau 1**). Les motoneurones de type A et B (VA, VB, DA, DB, AS) sont cholinergiques (acétylcholine) et ont un rôle stimulateur (**tableau 1**). Les motoneurones de type D (DD et VD) sécrètent de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABAergique) et exercent une fonction inhibitrice sur les muscles (**tableau 1**), ils sont strictement post-synaptiques aux autres motoneurones. Lorsqu'un muscle ventral est stimulé, il permet d'inhiber la contraction du muscle dorsal opposé, et inversement (**Figure 15**). Les motoneurones de type VC sécrètent plusieurs neurotransmetteurs et leurs principales cibles sont les muscles de la vulve. Les motoneurones de type VA, VB, VC et VD innervent les muscles de la partie ventrale de l'animal alors que DA, DB, DD et AS innervent les muscles de la partie dorsale en envoyant des "commissures" vers la corde dorsale (**Figure 15**) (**118-120**).

Motoneurone	Muscles innervés (localisation)	Type	Action
VA	Ventrale	Cholinergique	+
VB	Ventrale	Cholinergique	+
DA	Dorsale	Cholinergique	+
DB	Dorsale	Cholinergique	+
VD	Ventrale	GABAergique	-
DD	Dorsale	GABAergique	-
AS	Dorsale	Cholinergique	+
VC	Vulve	Multiple	+/-

**Tableau 1 : Les différents types de motoneurones chez *C. elegans*.**

Les motoneurones de type cholinergique sécrètent de l'acétylcholine, ceux de type GABAergique sécrètent de l'acide  $\gamma$ -amino butyrique.

+ : stimulation, - : inhibition.

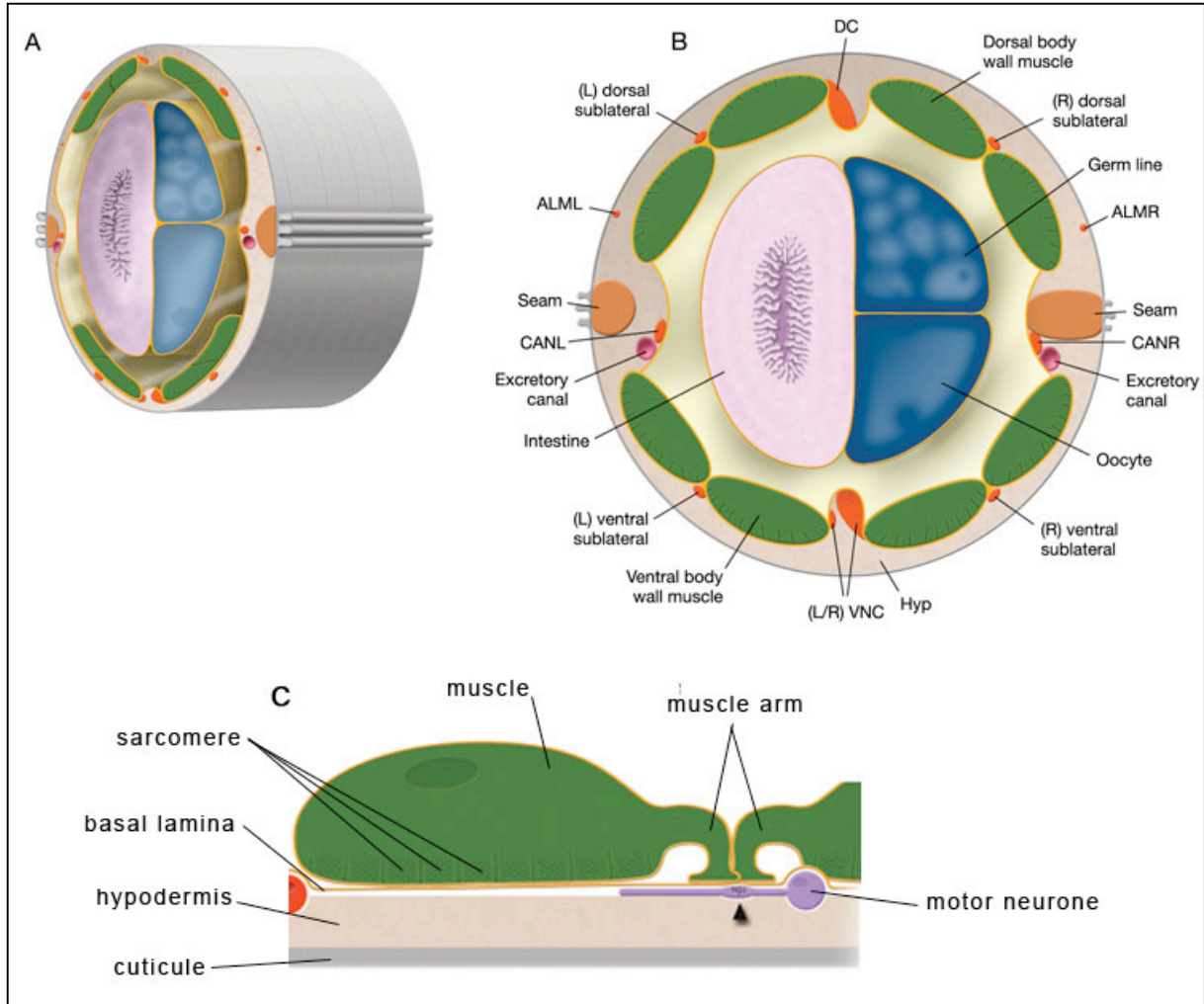


**Figure 15 : Les motoneurones de *C. elegans* et leur fonctionnement.** Les motoneurones de type A permettent les mouvements vers l'avant, ceux de type B permettent à l'animal de reculer. Les motoneurones de type D, post-synaptiques aux types A et B, permettent de relâcher le muscle opposé au muscle stimulé par les motoneurones de type A ou B. Images adaptées de <http://thalamus.wustl.edu/nonetlab/ResearchF/elegans.html>.

## 2. La jonction neuromusculaire

Contrairement à la plupart des organismes, chez *C. elegans*, ce ne sont pas les motoneurones qui vont atteindre les muscles pour former les jonctions neuromusculaires, mais les muscles qui projettent des prolongements (muscle arms) jusqu'aux axones des motoneurones (**figure 16**) (118-120). Dans beaucoup de cas, les bras musculaires de plusieurs muscles adjacents se regroupent pour former des plaques motrices (muscle plates) au niveau d'un même axone, ces plaques forment alors des synapses avec l'axone (**figure 16**) (118-121). Par conséquent, les vésicules libérées par un même axone sont capables de stimuler simultanément plusieurs cellules musculaires (118, 121). Il existe en plus des jonctions de type GAP entre les bras musculaires. Les muscles ventraux projettent des bras vers la corde ventrale et les muscles dorsaux projettent leurs bras vers la corde dorsale.

Contrairement aux muscles du tronc, les muscles du pharynx ne forment pas de bras, la partie présynaptique de la jonction neuromusculaire se situe directement sur le corps du muscle.

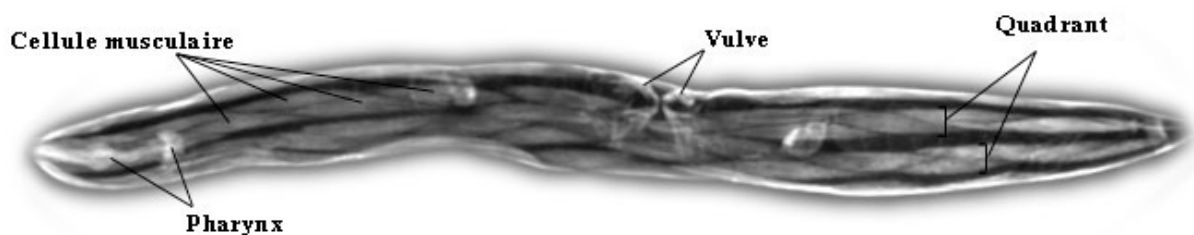


**Figure 16 : Représentation schématique de l'organisation des cellules musculaires, des cordes nerveuses et des jonctions neuromusculaires de *C. elegans*.** A-B. Coupe transverse au niveau du centre d'un animal adulte. La simplicité d'organisation et les principales caractéristiques anatomiques de l'adulte hermaphrodite sont mises en évidence sur cette coupe transversale: cuticule, hypoderme en grande partie syncytiale, deux cordes nerveuses (ventrale et dorsale), quatre quadrants musculaires autour d'une cavité pseudocœlomique contenant les gonades et l'intestin. Une membrane basale borde le pseudocœlome et recouvre tout l'hypoderme et les cordes nerveuses. Les cellules musculaires possèdent des prolongements (muscle arms) qui atteignent les cordes nerveuses où se situent les synapses neuromusculaires. VNC: Corde ventrale, Hyp : Hypoderme, DC : Corde dorsale. C. Bras musculaires atteignant l'axone d'un motoneurone et formant des jonctions neuromusculaires (muscle plate). Flèche : synapse (jonction neuromusculaire). *Images adaptées de <http://thalamus.wustl.edu/nonetlab/ResearchF/elegans.html>.*

### 3. Les muscles de *C. elegans*

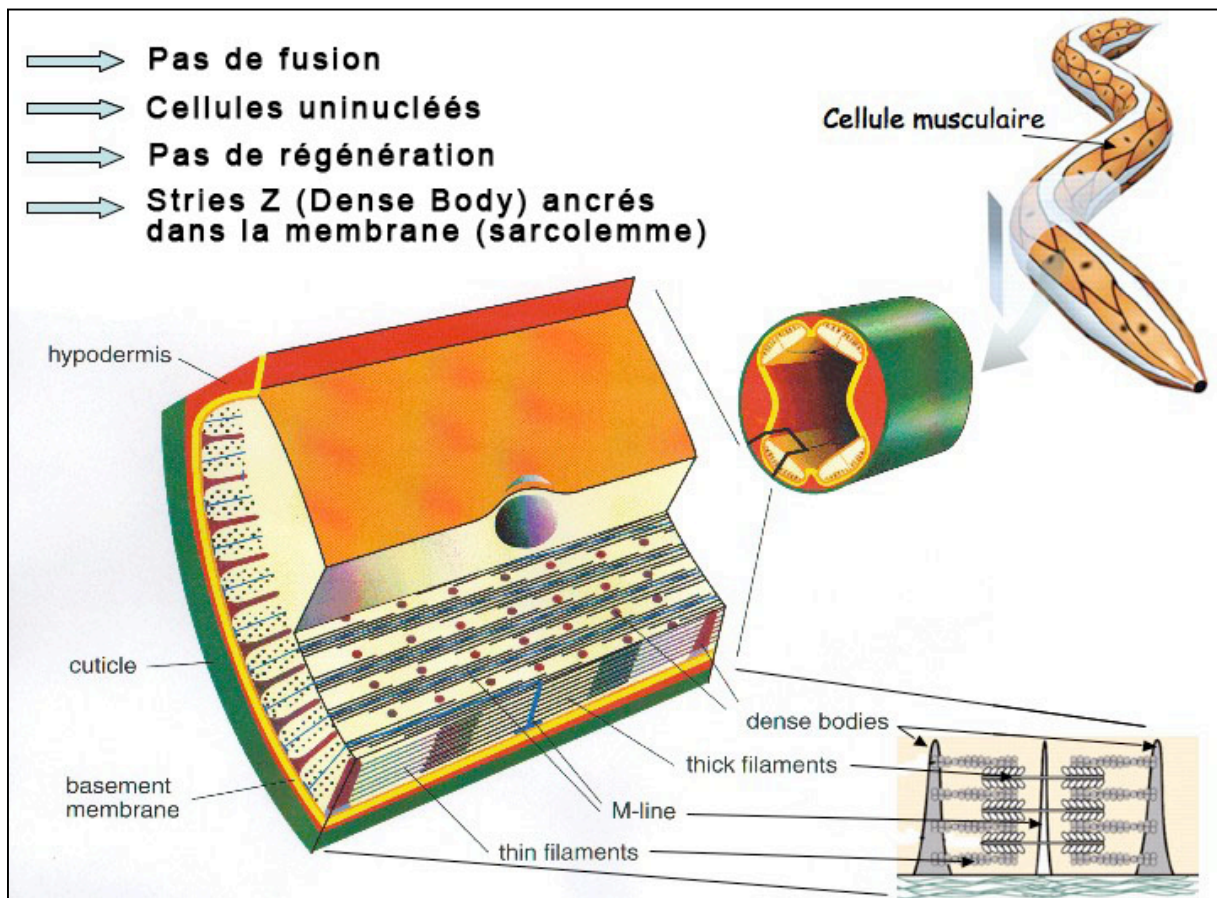
Malgré sa simplicité, *C. elegans* possède des muscles lisses et striés. Les muscles du pharynx, de l'intestin, de l'anus et de la vulve sont de type lisse alors que les muscles locomoteurs (body wall muscle) sont de type strié (**figure 17**) (**119, 122**) :

- Les muscles lisses :
  - les muscles du pharynx (20 cellules). Ils permettent à l'animal d'attraper et d'ingurgiter la nourriture ou tout autre élément présent dans son environnement.
  - les muscles entériques (2 muscles intestinaux et 2 muscles anaux). Ils sont essentiels au transit intestinal et à la défécation.
  - les muscles utérins (8 cellules) et vulvaires (8 cellules), présents chez l'hermaphrodite, permettent l'expulsion des oeufs. A la place, les mâles présentent 41 muscles sexuels spécialisés permettant l'accouplement.
  
- Les muscles striés :
  - Ce sont les muscles responsables de la locomotion permettant le mouvement en sinusoïde des animaux. Ils sont appelés "body wall muscles". Au nombre de 95, ces cellules, comme celles des vertébrés, ont un aspect strié en raison de la structure et de la répétition des unités contractiles, les sarcomères. Ces cellules se répartissent en quatre faisceaux (ou quadrants), eux-mêmes composés de deux rangées de cellules ; avec 23 cellules dans le quadrant ventral gauche et 24 cellules dans les autres quadrants (**Figure 16, figure 17, figure 18**) (**119, 122**).



**Figure 17** : *C. elegans* adulte coloré à la phalloïdine-rhodamine qui révèle les filaments d'actine cytosquelettiques. Deux quadrants sont visibles, se décomposant en une succession de cellules musculaires. Le pharynx et les muscles de la vulve sont aussi visibles.

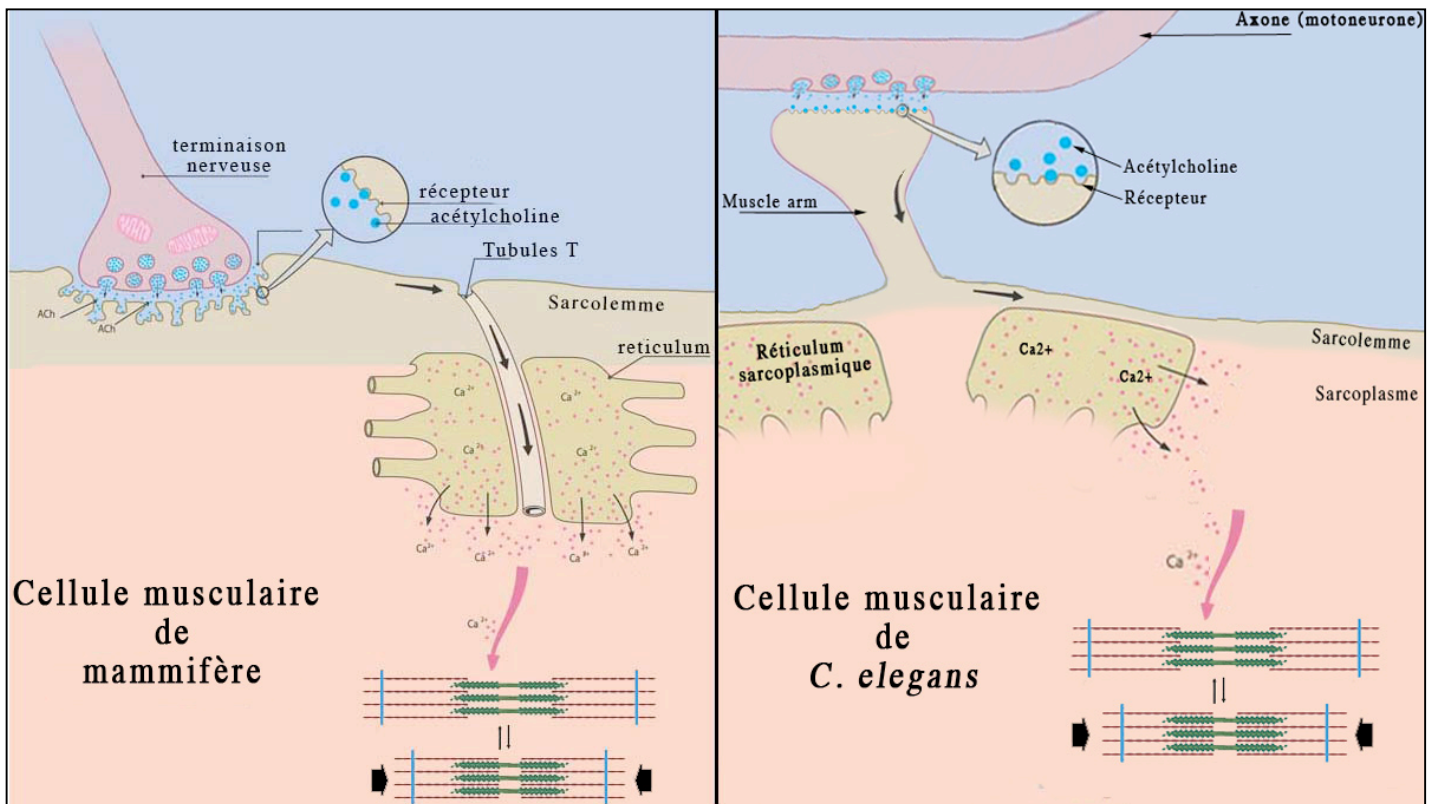
Les muscles striés de *C. elegans* sont proches des muscles striés des mammifères. Néanmoins ils diffèrent sur plusieurs points. Premièrement, les cellules musculaires ne fusionnent pas pour former des fibres musculaires, de plus en raison de l'absence de fusion, ces cellules restent uninucléées. Deuxièmement, il ne se forme pas de cellules satellites, par conséquent une cellule, perdue ou endommagée, ne pourra pas être remplacée. Enfin les "dense bodies" (équivalent des stries Z + costamères) sont directement ancrés au sarcolemme et à la membrane basale, et non reliés par des filaments intermédiaires au sarcolemme (**figure 18**).



**Figure 18 : Représentation schématique de l'organisation des cellules musculaires striées de *C. elegans*.** Les muscles locomoteurs de *C. elegans* se décomposent en 95 cellules musculaires, organisées en quatre quadrants parcourant le corps de l'animal de façon longitudinale. Les quatre quadrants se situent sous la cuticule et le derme. Leur structure est très proche des fibres musculaires striées des mammifères, cependant les cellules ne fusionnent pas, elles sont uninucléées et ne peuvent pas être régénérées. De façons similaires aux mammifères, l'actine est attachée aux équivalents des stries Z, que l'on appelle "dense bodies" et la myosine est attachée à la ligne M. Il faut noter que les dense bodies (stries Z + costamères) sont directement ancrés au sarcolemme et à la membrane basale. *Images adaptées de [www.wormatlas.org/](http://www.wormatlas.org/).*

#### 4. Couplage excitation / contraction chez *C. elegans*

Les structures et les signaux impliqués dans le couplage excitation/contraction des cellules musculaires striées de *C. elegans* sont comparables à ceux impliqués chez les mammifères (**fig. 6, 8, 9 et 10**). Néanmoins, plusieurs différences sont à noter. Tout d'abord, comme dit précédemment, ce sont les muscles qui projettent des structures, les bras musculaires, vers les axones des motoneurones pour former les jonctions neuromusculaires, et non l'inverse (**fig. 19**). Ensuite, il n'existe pas de structures équivalentes aux tubules T chez *C. elegans* ; cette absence d'invagination peut s'expliquer par une apposition directe du réticulum sarcoplasmique au sarcolemme, abolissant ainsi l'utilité des tubules (**fig. 19**) (119).



**Figure 19 : Structures impliquées dans le couplage excitation/contraction des cellules musculaires striées et de *C. elegans* comparativement aux mammifères.**

En terme de différence, il faut également noter que suite à une libération d'acétylcholine, l'activation des récepteurs cholinergiques génèrera un potentiel d'action capable de se propager le long du bras musculaire et du sarcolemme, non pas via des canaux

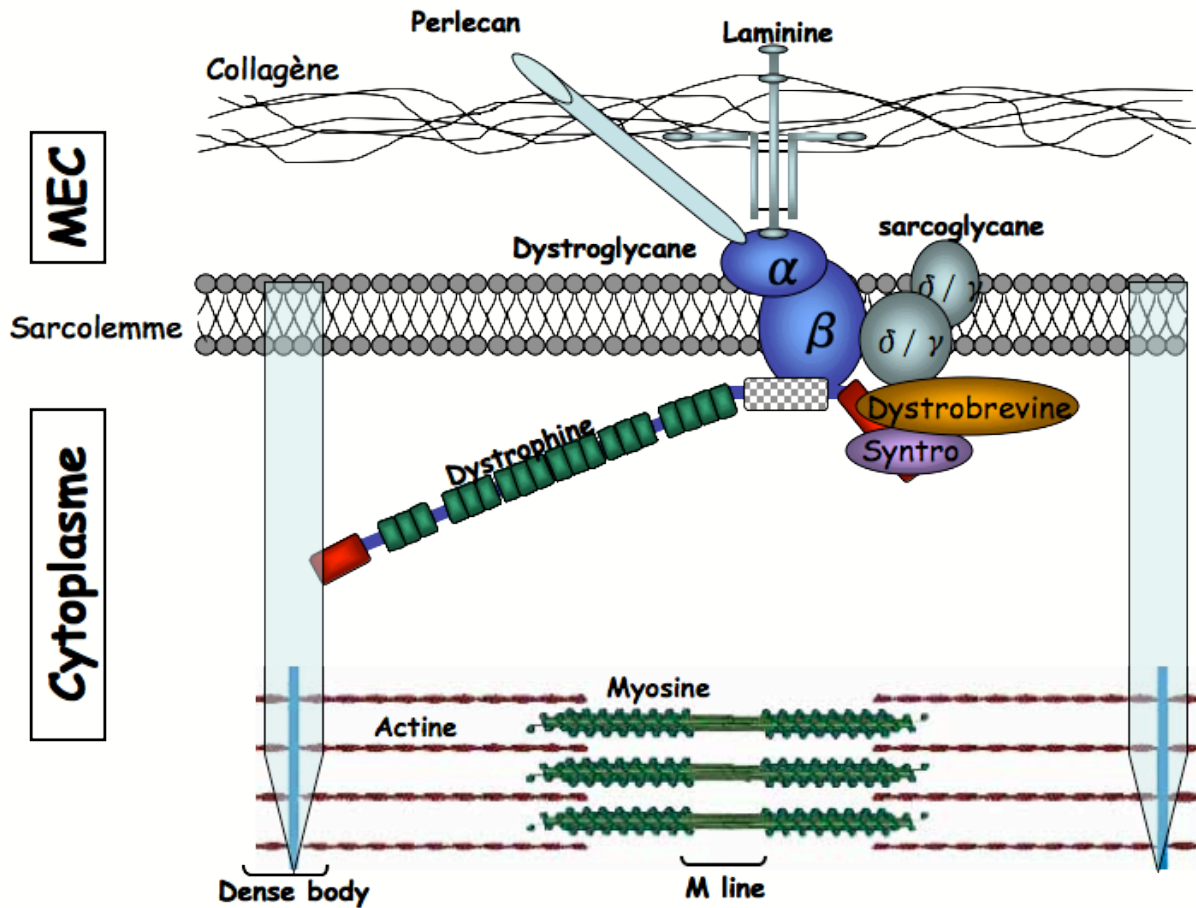


sodiques voltage-dépendants, mais via des canaux calciques voltage-dépendants de type L (123). Ces canaux calciques sont codés par le gène *egl-19* et sont similaires aux canaux calciques DHPR présentés précédemment (fig. 9). L'ouverture de ces canaux participe à l'augmentation de la concentration calcique sarcoplasmique. Néanmoins, comme chez les mammifères, l'essentiel du calcium libéré dans le sarcoplasme proviendra du réticulum via l'ouverture des canaux calciques de type RYR couplés aux canaux EGL-19 (DHPR) (fig. 9). Chez *C. elegans*, les canaux calciques de type RYR sont codés par le gène *unc-68* (124). L'augmentation de la concentration calcique sarcoplasmique entraînera un raccourcissement des sarcomères comme décrit dans la figure 10.

Il faut noter qu'il existe aussi un équivalent des canaux IP3R chez *C. elegans*, les canaux ITR-1 (Inositol Trisphosphate Receptor-1). Ils sont impliqués dans des phénomènes de contractions périodiques des muscles lisses du pharynx, de la vulve et de l'appareil excréteur du nématode (125-130). Ils n'ont par contre jamais été décrits comme impliqués dans le couplage excitation / contraction des muscles responsables de la locomotion de *C. elegans*.

## 5. Le DGC

Tout comme chez les vertébrés, on retrouve un complexe DGC (ou DAPC) agencé au niveau du sarcolemme (131). Comme mis en évidence sur la figure 20, sa composition est proche de celle retrouvée chez les mammifères.



**Figure 20 : Représentation schématique du complexe DGC chez *C. elegans*.** L'organisation du DGC, mis en évidence sur cette figure, est basée sur des comparaisons de séquences et des études génétiques (131). La plupart des composants du DGC ont un homologue chez *C. elegans*, à l'exception du sarcospane (SPN) et de la "neuronal nitric oxide synthase" (nNOS). Les homologues des  $\alpha$ - et  $\beta$ -sarcoglycane ne sont pas représentés en raison d'un rôle fonctionnel controversé chez *C. elegans* (131). Les homologues des  $\gamma$ - et  $\delta$ -sarcoglycane forment probablement des dimères (131). MEC : Matrice Extra Cellulaire, Syntro : Syntrophine.

## **IV. La myopathie de Duchenne et la Dystrophine**

### **1. La myopathie de Duchenne**

La myopathie de Duchenne (Duchenne Muscular Myopathy, DMD) est une maladie génétique entraînée par des mutations du gène codant la dystrophine **(132)**. Cette maladie décrite par Duchenne dans les années 1860 est la plus fréquente des dystrophies musculaires progressives. Cette myopathie est observée quasi exclusivement chez les garçons (appelés garçons DMD) en raison de la localisation du gène codant la dystrophine (chromosome X), et de son mode de transmission récessif. De plus, 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. Il existe cependant quelques rares cas de myopathie de Duchenne symptomatique chez des femmes porteuses. Ceci peut s'expliquer par l'inactivation aléatoire d'un des deux chromosomes X **(133)**.

La myopathie de Duchenne est classée en France comme maladie orpheline. Elle touche un garçon sur 3500 à la naissance **(134)**. Environ les 2/3 des mutations sont héritées, le tiers restant étant des néo-mutations **(135)**. Dans la majorité des cas, les mutations retrouvées chez les patients correspondent à des délétions (entre 60 et 65%). On retrouve aussi des phénomènes de duplications (6%) ; le reste des mutations identifiées correspondent à des mutations ponctuelles.

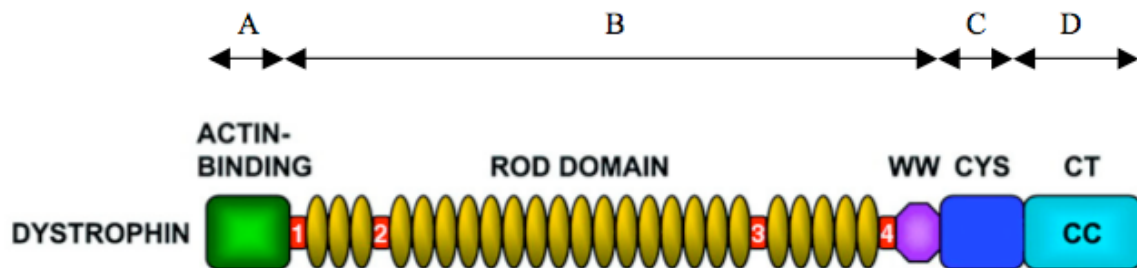
La maladie se traduit par des symptômes visibles au moment où les enfants apprennent à marcher. Des lésions histologiques sont décelables avant l'apparition des troubles moteurs, on retrouve également un taux élevé d'enzymes créatine kinase et carbonic anhydrase III dans le sang, évoquant la présence de lésions musculaires **(136-139)**. Les garçons atteints de la myopathie de Duchenne ont souvent un retard d'apprentissage de la marche et ne parviennent pas à courir. L'utilisation d'un fauteuil roulant devient nécessaire dès l'âge de 10 ans. Au fur et à mesure de l'adolescence, de plus en plus de muscles sont atteints, et les fonctions vitales commencent à se détériorer ; ils présentent alors des troubles respiratoires, alimentaires et finalement cardiaques qui conduisent à la mort du patient dans sa troisième décennie **(134, 140)**.

Il existe aussi une forme moins sévère, décrite en 1955 par P.E Becker, la Dystrophie Musculaire de Becker (DMB). Elle se met en place et évolue plus tardivement que la myopathie de Duchenne, de plus elle est dix fois moins fréquente **(141)**.

## 2. La Dystrophine chez les mammifères

Avec ses 2,6 millions de paires de bases, le gène codant la dystrophine est l'un des plus grands gènes de mammifères identifiés (environ la moitié du génome total d'*E.coli*), il représente à lui seul 1% de la longueur totale du chromosome X humain et présente 79 exons (142-144). Son ARN messager fait 14 kb et ne représente que 0,6 % de la séquence génomique correspondante (132). Ce gène présente d'énormes introns allant jusqu'à 170 kb (145).

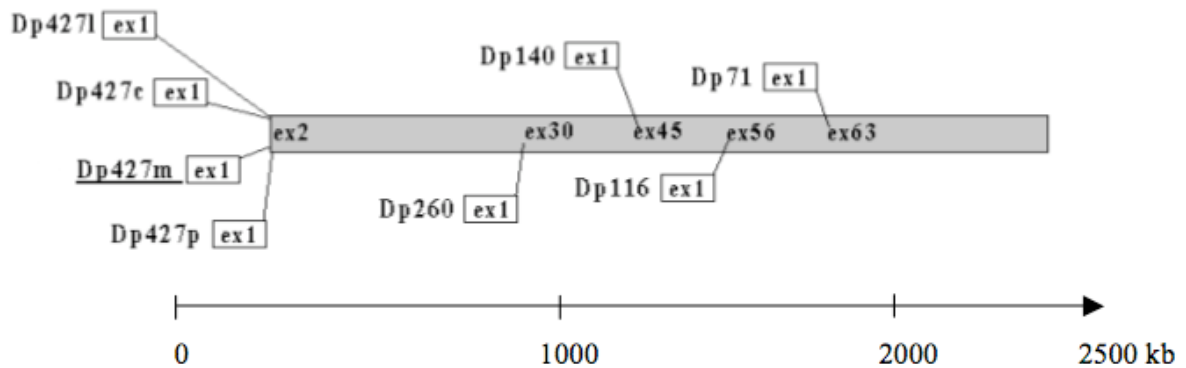
Ce gène code une protéine de 427 kDa lorsqu'il est transcrit et traduit dans son intégralité (figure 21). C'est la protéine centrale du complexe DGC (figure 12).



**Figure 21 : Représentation schématique de la structure de la protéine dystrophine.** La dystrophine peut se décomposer en quatre domaines (A, B, C et D). **A.** La partie N-terminale (240 acides aminés) présentant un domaine de fixation à l'actine cytoplasmique (carré vert) (146). **B.** Un domaine central (2400 a.a.) constitué d'une répétition de 24 motifs type spectrine, une molécule responsable de l'élasticité des globules rouges (sphères jaunes) (147). On retrouve ensuite un domaine WW où siègent des sites d'interactions protéiques (148). **C.** Un domaine riche en cystéines (280 a.a.) présentant une répétition de cystéines et qui pourrait former un site de fixation pour les cations divalents, tel que le zinc (149), mais aussi permettre la fixation à plusieurs protéines, notamment avec la calmoduline (Carré bleu foncé) (150). Il existe en plus, sur ce domaine, un site qui pourrait permettre la fixation de molécules de calcium (151) **D.** Un domaine C-terminale (420 a.a.) présentant un motif "coiled-coil" où siège des sites d'interactions avec les protéines du complexe DGC (carré bleu clair); dont les dystroglycanes, le complexe du sarcospane, les syntrophines, les dystrobrevines (figure 12) (152). Les petits carrés rouges représentent des zones charnières.

Le gène codant la dystrophine peut générer une grande variété de transcrits, à l'origine d'isoformes de différentes tailles ; ceci par trois procédés (pour revue **(109, 153, 154)**) :

- via des promoteurs alternatifs, tissus spécifiques (**figure 22**)
- via des phénomènes d'épissage alternatif (**154**).
- via l'addition de signaux polyA (**154**).



**Figure 22 : Les promoteurs alternatifs du gène de la dystrophine.** Chaque isoforme possède un premier exon propre. La nomenclature veut que l'on utilise l'abréviation Dp pour "dystrophin protein" suivie de leur poids moléculaire respectif et éventuellement une lettre pour préciser leur expression tissulaire. La forme Dp427m est la forme exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaques. On la retrouve aussi dans les cellules gliales du cerveau. *Image tirée de la thèse de Karine Grisoni.*

Il existe 4 isoformes longues (427 kDa), et 4 isoformes courtes de tailles différentes (pour revue **(109, 153)**)

- Isoformes longues:
  - o Dp427m est exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaques, mais aussi dans des cellules gliales du cerveau (**155**).
  - o Dp427l s'exprime dans les cellules lymphoblastoïdes (**156**).
  - o Dp427c s'exprime dans les neurones du cortex et dans l'hippocampe (**157**).
  - o Dp427p s'exprime dans le cortex, les muscles squelettiques et plus faiblement dans les muscles cardiaque (**158**).
- Isoformes courtes :
  - o Dp260 est exprimée dans la rétine, dans le cerveau et les muscles cardiaque (**159**).

- Dp140 est exprimée dans le système nerveux central et le rein (160).
- Dp116 est exprimée dans les cellules de Schwann (161).
- Dp71 est retrouvée dans de nombreux tissus non musculaires dont le cerveau et le foie (162).

Les isoformes de la dystrophine, ainsi que leurs variants, se retrouvent donc dans de nombreux tissus, dont les muscles, le cerveau et la rétine, ce qui est en accord avec les symptômes observés tels que la dégénérescence des fibres musculaires, un retard mental et un défaut de vision dans la pénombre. Avec la plupart des mutations retrouvées chez les patients DMD, la forme longue n'est pas produite, et dans certains cas les formes courtes sont aussi touchées (105, 163). Il est donc évident que la forme longue joue un rôle prépondérant dans la progression de la maladie.

Il faut noter qu'il existe, chez de nombreux vertébrés, un homologue de la dystrophine, l'utrophine, qui partage 80 % d'homologie avec la dystrophine (164). Cette homologie est d'autant plus forte au niveau des extrémités N- et C-terminale (165). Le gène de l'utrophine se situe sur le chromosome 6 et code une protéine de 395 kDa et plusieurs autres formes courtes (165, 166). L'utrophine est retrouvée dans de nombreux tissus, dont les différents types de muscles (167, 168). Cette protéine est souvent décrite comme une forme embryonnaire de la dystrophine, car la dystrophine n'est retrouvée qu'après la naissance alors que le gène de l'utrophine est déjà transcrit au stade embryonnaire (169). Néanmoins son expression perdure au stade adulte (170). Plusieurs projets de recherche visent à la surexprimer pour tenter de pallier le défaut de dystrophine chez les patients DMD (171-173).

### **3. Le rôle de la Dystrophine et de son complexe dans la myopathie de Duchenne**

La dystrophine est la pièce centrale du complexe DGC décrit plus haut. La désorganisation de ce complexe jouerait un rôle prépondérant dans la progression de la maladie. Plusieurs hypothèses sont défendues dans la littérature, on parle de rôle structural, métabolique et signalétique.

#### **3.1. Rôle structural**

Comme mis en évidence dans la **figure 12**, le DGC participe à l'interaction de la membrane plasmique avec les composants de la matrice extracellulaire et avec les protéines cytosquelettiques (notamment avec l'actine cytosquelettique). Petrof *et al* décrivent ce lien

comme une caractéristique essentielle permettant le maintien de l'intégrité membranaire lors des phénomènes de contraction (174). Ils ont montré que chez les souris déficientes en dystrophine, la membrane des muscles était plus sensible à des contraintes mécaniques, se traduisant par des ruptures du sarcolemme. Cette démonstration est de plus en accord avec le fait que l'on retrouve des lésions ponctuelles (lésions delta) de la membrane des fibres musculaires chez les patients DMD, et aussi en accord avec le taux élevé de créatine kinase dans le sang signalant une fuite importante du milieu intracellulaire de la cellule (139, 175).

### **3.2. Rôle métabolique**

Plusieurs études ont montré que les muscles des patients DMD et de certains modèles déficients en dystrophine présentaient des troubles du métabolisme calcique. Par exemple, Bertorini *et al* ont retrouvé une concentration de calcium intracellulaire anormalement élevée dans les fibres musculaires des garçons DMD (176, 177). Parallèlement, Mallouk *et al* ont mis en évidence des résultats similaires chez la souris dépourvue de dystrophine (178). Enfin l'équipe du docteur Laurent Ségalat a montré qu'il était possible de freiner l'apparition de la paralysie induite par l'absence de dystrophine chez le nématode *C. elegans* en diminuant les flux entrant de calcium dans la cellule musculaire (179, 180).

Le DGC pourrait participer, dans les cellules musculaires, à l'agencement et au fonctionnement des canaux calciques et des différents éléments jouant sur sa régulation. La désorganisation de ce complexe entraînerait une entrée anarchique de calcium qui résulterait en une concentration anormalement élevée dans le cytoplasme des cellules musculaires. Cette surcharge en calcium cytoplasmique pourrait entraîner des processus apoptotiques, notamment en activant des protéases calcium-dépendantes (notamment les calpaïnes) (181-183). Cette hypothèse est aussi appuyée par les résultats présentés dans ce travail de thèse.

### **3.3. Rôle signalétique**

Enfin, plusieurs protéines reliées, directement ou indirectement, avec le DGC ont une implication dans différentes voies de signalisation intracellulaire, permettant de réguler l'activité de certains gènes (**pour rappel, voir le chapitre dédié au DGC**). La désorganisation du DGC, engendrée par l'absence de dystrophine, pourrait alors perturber les voies de signalisation dans lesquelles ces protéines sont impliquées (184). Parmi ces protéines, on peut citer la syntrophine, Grb2, nNOS, et la calmoduline.

#### **4. Les différents modèles animaux et les souris *mdx* (muscular dystrophy X-linked)**

Plusieurs modèles animaux présentant des mutations dans le gène de la dystrophine sont disponibles à ce jour. On retrouve des modèles vertébrés comme les chiens GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), les chats HFMD (Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy), les souris *mdx* (muscular dystrophy X-linked) et le poisson zèbre *Danio rerio* (mutant sap). Il existe aussi des modèles invertébrés comme des mutants de la mouche *Drosophila melanogaster* et du nématode *C. elegans*. Ce dernier fera l'objet d'une présentation approfondie dans les paragraphes suivants.

Cette étude s'est limitée au modèle *C. elegans* et au modèle murin *mdx*, les autres modèles, bien que pertinents, ont été écartés pour des raisons de disponibilité et de coût. Néanmoins pour revue, voir **(185-187)**.

Il existe plusieurs souches de souris *mdx*. Historiquement les premières à avoir été identifiées sont les souris *mdxScSn*. Ces souris sont apparues spontanément dans un élevage **(188)**. Cette souche est nommée dans la littérature C57BL/10ScSn-Dmd<sup>mdx</sup>. Elle présente une mutation ponctuelle dans l'exon 23 (sur 79) du gène codant la dystrophine. Cette mutation entraîne la formation d'un codon STOP prématuré **(189)**. L'analyse des muscles de ces souris met en évidence une délocalisation des protéines du DGC, et à l'exception de quelques fibres révertantes, aucune trace de dystrophine n'est détectée **(190)**. Ces souris présentent une myopathie moins sévère que celle observée chez les patients DMD **(188)**. Le muscle le plus atteint et le plus étudié est le diaphragme, car par rapport aux autres muscles, c'est celui qui montre les atteintes les plus proches de celle retrouvées chez l'homme. C'est à dire une forte dégénérescence musculaire, une faible régénération et l'apparition de fibrose chez les individus âgés **(191)**. Ces souris présentent des phénomènes dégénératifs dès les premiers mois de vie, ce qui facilite les expériences. Certains auteurs ont montré qu'il était possible d'identifier des fibres nécrotiques dès le 15<sup>o</sup> jour après la naissance dans le diaphragme et dès le 16<sup>o</sup> jour dans les muscles des membres **(192, 193)**. Ces études sont tout de même controversées par le fait que d'autres laboratoires n'arrivent pas à déceler ces changements avant le 19<sup>o</sup> jour après la naissance **(194, 195)**. Néanmoins, il est admis que le taux de dégénérescence est important durant les 5 premières semaines suivant la naissance des animaux. Il a été évalué à plus de 30 % dans l'EDL (*extensor digitorum longus*) et légèrement moins dans le soleus, tout deux des muscles de la patte mais à contraction rapide et lente, respectivement **(196)**. Malgré ces atteintes, ces souris ne présente qu'un faible trouble moteur et ont une longévité normale. Ceci pour deux raisons essentielles, la première est que ces



animaux présentent un taux régénération très important des fibres musculaires (197). La deuxième est que l'on retrouve une expression très importante d'utrophine dans les muscles de ces souris, permettant de compenser la perte de dystrophine (198). En comparaison avec les patients DMD, l'absence d'impact sur leur durée de vie s'explique, en partie, par l'absence d'atteintes myocardiques (199). Enfin il faut noter que, en raison de leur faible fécondité, l'entretien de ces souris est difficile et contraignant.

Depuis l'identification des souris *mdxScSn*, quatre autres souches ont été produites par mutagenèse chimique dans le fond génétique C57BL/6 (200). Ces souches ont été nommées B6Ros.Cg-Dmd<sup>mdx2,3,4,5Cv</sup>. Les atteintes observées chez ces individus sont similaires aux atteintes observées avec la souche historique, mais ces animaux présentent l'avantage de donner une portée plus élevée, facilitant ainsi leur entretien (200, 201).

Comme décrit plus haut, les phénomènes dégénératifs ayant lieu chez les souris *mdx* sont en parties masqués par des processus régénératifs et une surexpression de l'utrophine. Différents projets ont alors été menés pour développer des souches combinant des mutations dans le gène codant la dystrophine avec des mutations de l'utrophine et des gènes impliqués dans les processus régénératifs.

Deconinck *et al.* ont développé une souris mutée pour la dystrophine et l'utrophine, ces souris présentent un phénotype plus proche de celui observé chez les hommes. Elles présentent un retard de croissance, une durée de vie moindre et des troubles associant perte de masse et dégénérescence musculaire (202).

Parallèlement, Megeney *et al.* ont réussi à combiner l'inactivation du facteur de différenciation myogénique MyoD (appartenant à la famille des MRF, Myogenic Regulatory Factor) dans le fond génétique des souris *mdxScSn* (203). Ces souris présentent un phénotype myopathique aggravé et une espérance de vie fortement diminuée. Il a été montré que cette augmentation des phénomènes dégénératifs était due à une diminution de l'activité régénérative au niveau musculaire, de plus c'est la seule souche à présenter des atteintes myocardiques (204).

Ces deux souches murines sont néanmoins peu utilisées en raison de leur très faible fécondité et de la complexité d'interprétation induite par la présence de mutations combinées.

## **5. Les traitements / La recherche**

La myopathie de Duchenne reste aujourd'hui une maladie mal comprise. Bien que le gène impliqué, la dystrophine, soit connu depuis plus de 20 ans et qu'il soit étudié dans de nombreux modèles, l'espoir d'un traitement curatif reste encore un horizon bien lointain. A ce jour les traitements sont uniquement palliatifs et malheureusement de faible efficacité. Ces

soins consistent essentiellement en une rééducation quotidienne pour tenter de ralentir la perte fonctionnelle des muscles, mais aussi pour pallier aux problèmes respiratoires et digestifs. Un médicament, la prednisone, est tout de même prescrit de façon systématique aux patients. Le mode d'action de ce glucocorticoïde est encore obscur, il aurait des propriétés anti-inflammatoires, myogéniques et stimulant la réparation des fibres endommagées. Malheureusement, un traitement sur le long terme entraîne aussi des effets indésirables, tels qu'une prise de poids excessive et un retard de croissance (205-207).

Un grand nombre de laboratoires et d'associations luttant contre les maladies rares, tels que l'AFM (Association Française contre les myopathies), redoublent d'efforts pour tenter de trouver des traitements. Plusieurs pistes sont explorées, dont certaines prometteuses comme la thérapie cellulaire et la thérapie génique qui permettrait, à terme, de remplacer la protéine manquante. Malheureusement ces techniques sont loin d'être maîtrisées. En attendant la mise au point de ces technologies, certains groupes, comme le nôtre, tentent de trouver des molécules pouvant ralentir la progression de la maladie. Evidemment non curatifs, ces traitements pourraient tout de même apporter une grande aide aux patients. La découverte de composés efficaces permettrait aussi d'identifier des voies métaboliques pouvant être impliquées dans les processus dégénératifs, et ainsi mieux comprendre cette maladie pour mieux la soigner.

Voici les grands axes de recherche étudiés à ce jour :

- **La thérapie génique, ou comment remplacer le gène muté**

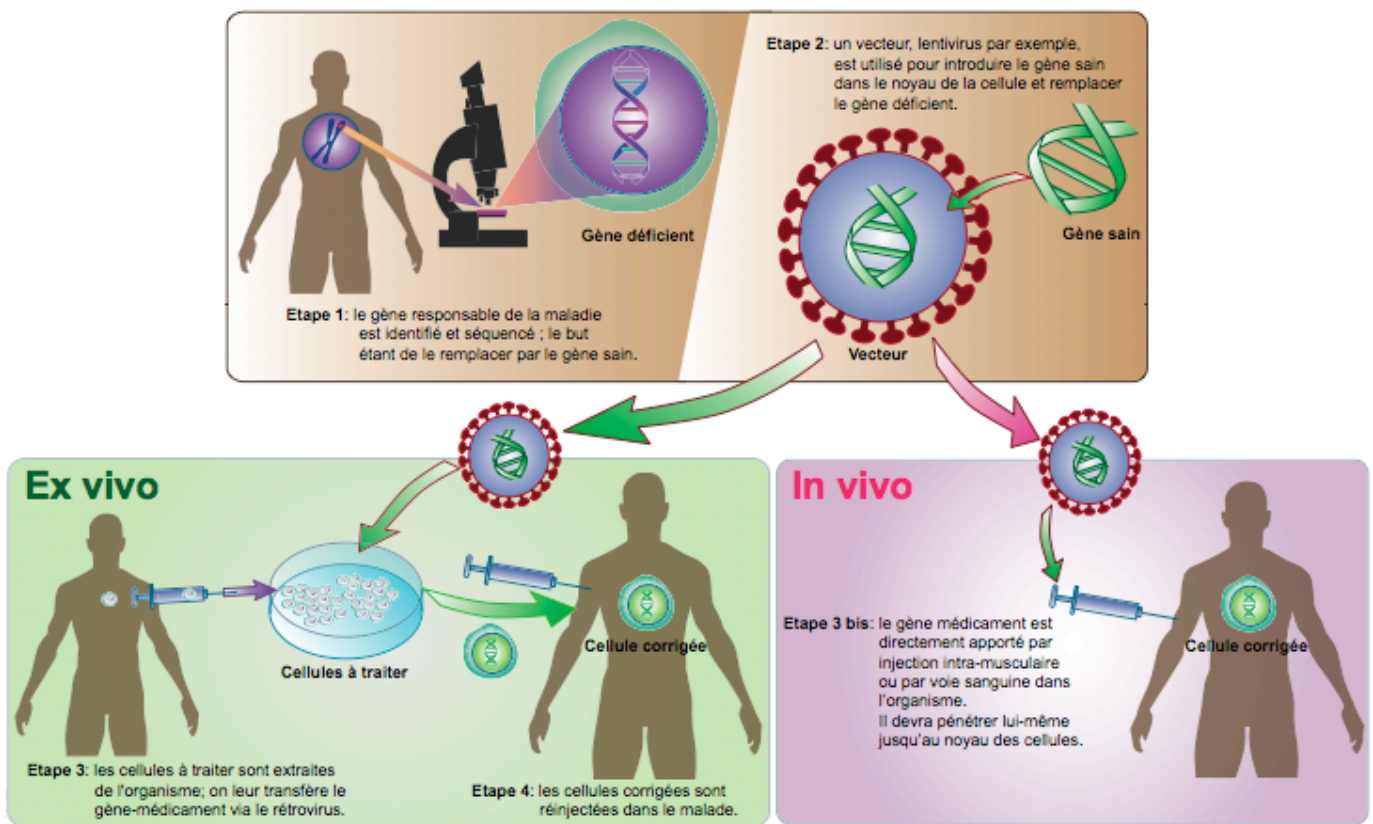
La thérapie génique consiste en la réintroduction du gène déficient dans l'organisme ou le tissu atteint (**figure 23**). Dans le cas de la myopathie de Duchenne, le but est de réintroduire la dystrophine dans les fibres musculaires pour permettre son expression. Malheureusement plusieurs inconvénients viennent ralentir la progression de ces travaux, i) il est difficile d'introduire le gène dans toutes les fibres musculaires, ii) les moyens de transport du gène (plasmide ou vecteurs viraux) doivent être stables et ne pas entraîner de réactions immunitaires, iii) la taille de la dystrophine pose un réel problème pour être véhiculée par cette méthode (pour revue, voir (208)).

Plusieurs moyens de transports sont utilisés à ce jour pour tenter de réintroduire le gène défectueux ; on peut citer par exemple les plasmides et les vecteurs viraux :

- Les plasmides ont l'avantage d'être faciles à produire mais présentent une faible efficacité de transfection. Plusieurs groupes ont réussi à faire exprimer la dystrophine dans des souris *mdx* en injectant ces constructions dans le système sanguin. Ils ont retrouvé, dans le meilleur des

cas, une expression dans 10 % des fibres musculaires (209-211). De plus ils ont rapporté une diminution de la dégénérescence et une absence de réaction immunitaire. Cette technique a aussi fait l'objet d'une étude clinique et à montré qu'elle pouvait être bénéfique, elle est tout de même loin d'être suffisante (212).

- En comparaison, les vecteurs viraux tels que les adénovirus, les rétrovirus et les adeno associated virus (AAV) permettent d'augmenter l'efficacité de pénétration de l'ADN dans les fibres et de cibler les fibres musculaires. Par contre ils entraînent dans bien des cas une réaction immunitaire et ne permettent pas pour la plupart de transporter une séquence de la taille de la dystrophine (213). Pour pallier à ce dernier problème certaines études tentent de réintroduire une dystrophine tronquée (minidystrophine) (214, 215).



**Figure 23 : La thérapie génique ou comment remplacer le gène muté.** Images adaptées de la bibliothèque de l'AFM.

- **La thérapie cellulaire ou comment remplacer les cellules abîmées**

La thérapie cellulaire consiste à réintroduire le gène défectueux, non pas par des vecteurs contenant la séquence d'intérêt, mais en introduisant des cellules dites "saines", c'est à dire qui contiennent une séquence non mutée (figure 24). Les premiers types cellulaires à avoir été utilisés sont les myoblastes, mais n'ont pas conduit à une amélioration des atteintes car peu de

ces cellules survivent, et de plus elles entraînent une réponse immunitaire (216, 217). Même si des améliorations ont été apportées à cette technique et qu'une étude clinique a montré des résultats prometteurs, la difficulté d'administrer ces cellules par voies systémiques limite son potentiel (218). Depuis ces premiers essais, différents types de cellules souches sont étudiés et utilisés pour tenter d'améliorer l'état dystrophique des souris *mdx* (219-224). Les résultats de ces études sont encore à développer mais laissent entrevoir des nouvelles possibilités dans le traitement des dystrophies musculaires (pour revue, voir (208, 225)).

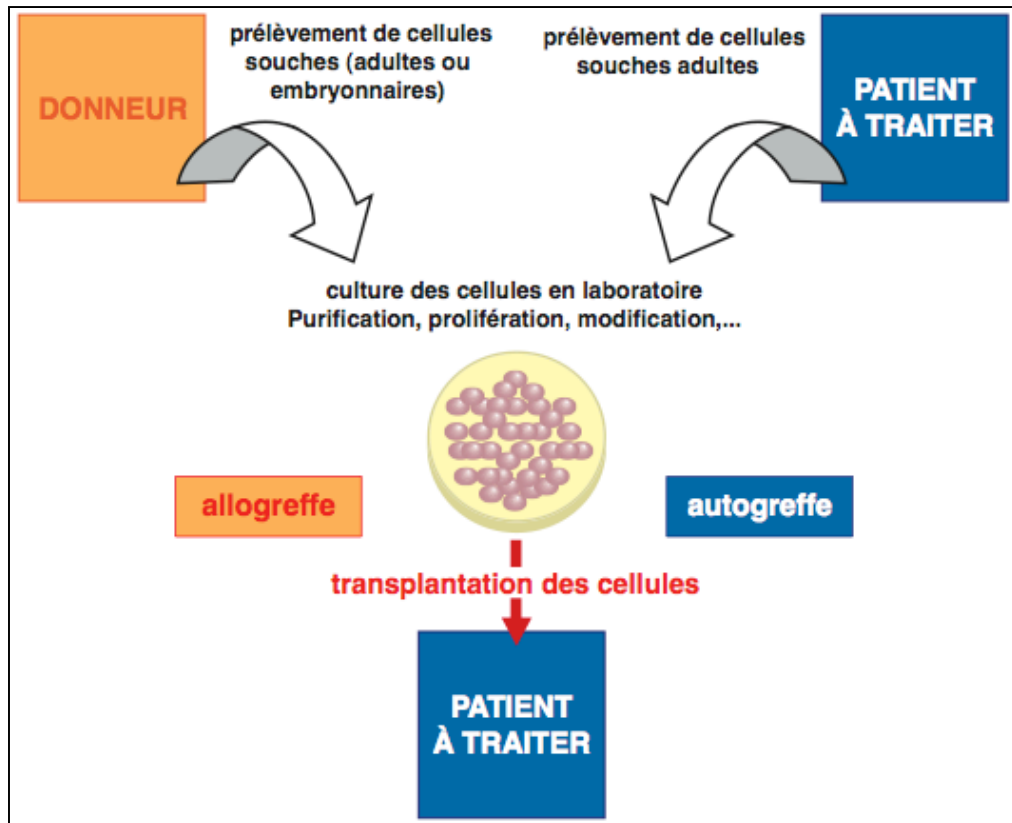


Figure 24 : La thérapie cellulaire. Image adaptée de la bibliothèque de l'AFM.

- Le saut d'exon ou comment réparer le gène endogène

Le saut d'exon a pour objectif de rattraper un cadre de lecture fonctionnel en éliminant un ou plusieurs exons de l'ARN muté (figure 25) (226). Certes, la dystrophine produite est plus courte, mais elle garde une certaine fonctionnalité. Pour induire un saut d'exon, les chercheurs utilisent des oligonucléotides anti-sens spécifiques des exons qu'ils cherchent à exclure. Ces oligonucléotides anti-sens sont, soit des molécules synthétiques, soit le produit d'un minigène apporté dans la cellule par un vecteur viral AAV. Cette technique a fait l'objet de plusieurs études cliniques (227-231) et les résultats obtenus sont prometteurs (pour revue, voir (208)).

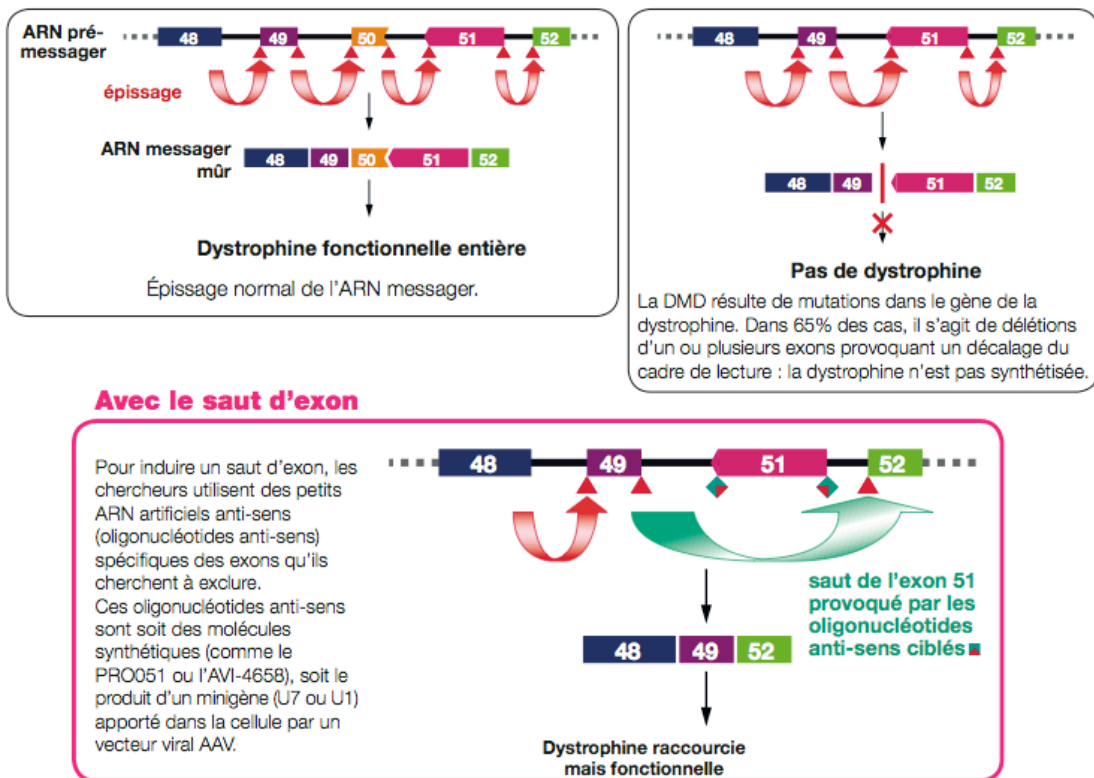


Figure 25 : Le saut d'exon ou comment réparer le gène endogène.

Image adaptée de la bibliothèque de l'AFM.

- **La translecture de codon stop**

Un autre moyen de permettre l'expression de la dystrophine chez certains patients DMD, sans avoir à réintroduire un gène exogène, est de permettre à la machinerie cellulaire de ne pas tenir compte des codons stop prématurés engendrés par les mutations. Ainsi la protéine est produite dans sa totalité sans tenir compte des codons stop prématurés (figure 26). Il faut noter que cette technique ne peut être employée que dans le cas de mutation ponctuelle, c'est-à-dire ne changeant pas le cadre de lecture (environ 15 % des cas (232)). Ainsi, le composé PC124, administrable de façon orale, a montré qu'il pouvait entraîner la translecture de

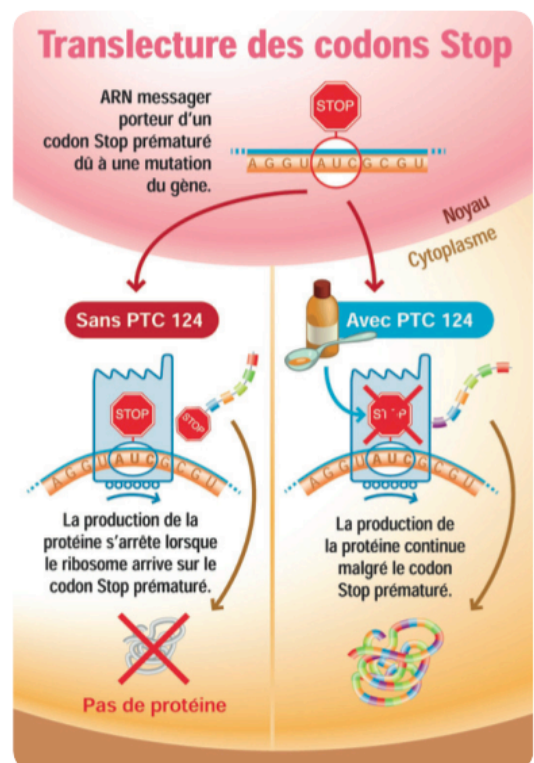


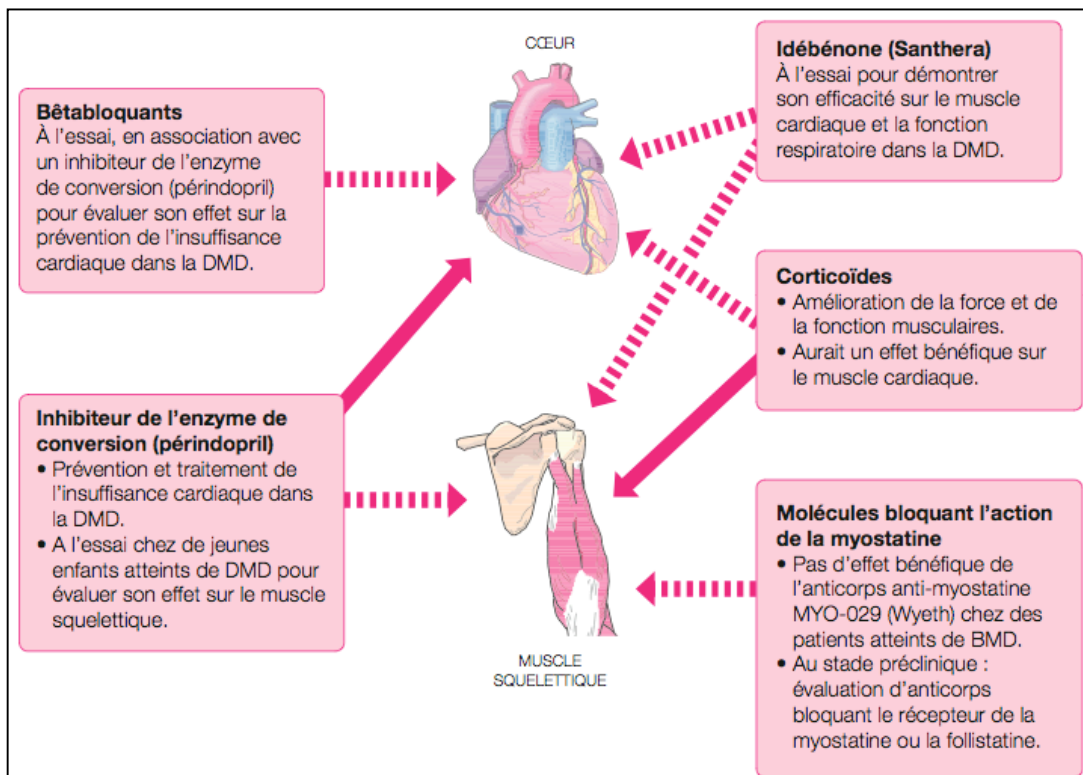
Figure 26 : La translecture de codon stop. Image adaptée de la bibliothèque de l'AFM.

codons stop prématurés sans impact sur les codons stop dits naturels (233, 234).

- **Autres pistes envisagées**

Comme décrit précédemment, l'utrophine ressemble beaucoup à la dystrophine et peut, lorsqu'elle est surexprimée, permettre de compenser légèrement l'absence de dystrophine (235). Depuis cette démonstration, plusieurs approches pharmacologiques ont été testées pour tenter de surexprimer l'utrophine. On peut citer l'héréguline, qui est un facteur de régulation de l'utrophine, et l'injection de L-arginine qui provoque elle aussi une augmentation de l'expression d'utrophine mais en jouant sur un composant du DGC (nNOS) (172, 173).

Il existe aussi plusieurs composés chimiques susceptibles de freiner les atteintes observées chez les patients DMD, comme des composés i) réduisant les inflammations et la protéolyse des muscles, ii) stimulant le métabolisme musculaire ou la régénération, iii) réduisant les atteintes cardiaques (figure 27) (pour revue, voir (236-238)).



**Figure 27 : Les traitements chimiques actuels et/ou en essais.** Flèches pleines : effet démontré, Flèches pointillées : à confirmer. Image adaptée de la bibliothèque de l'AFM.

La prednisone, présentée précédemment, est le seul traitement prescrit actuellement aux patients DMD.

De récentes études ont aussi démontré qu'il était possible d'améliorer la force des patients DMD en inhibant les protéases calcium-dépendantes, dont les calpaines (239). Malheureusement, cette amélioration n'est pas accompagnée d'un gain locomoteur.

Plusieurs études ont également montré qu'il était possible de compenser la perte de fibres musculaires par des facteurs de croissance ou des anabolisants. Le but est d'augmenter le nombre de fibres initiales pour en prévenir la perte. Les anabolisants entraînent beaucoup d'effets indésirables, par contre l'utilisation de facteurs de croissance semble prometteuse, mais uniquement basées sur des études murines (240, 241).

Enfin les derniers traitements chimiques envisagés à ce jour ont pour cible la régénération des fibres. Par exemple, l'inhibition de la myostatine (inhibiteur de la différenciation et de la prolifération des muscles) chez les souris *mdx* permet d'augmenter leur force et de diminuer la dégénérescence musculaire (242).

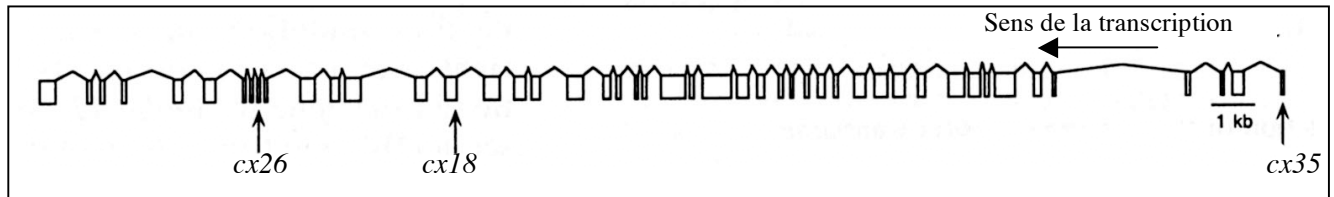
## **6. La dystrophine chez *C. elegans***

L'homologue de la dystrophine chez *C. elegans* a été décrit pour la première fois en 1998 (26). Il se nomme *dys-1*, et présente 46 exons sur une longueur de 31 kb (figure 28). Il est localisé sur le chromosome I et code une protéine de 3674 acides aminés. La dystrophine, chez *C. elegans*, a uniquement été observée dans les cellules musculaires, dont les muscles locomoteurs (body wall muscles), les cellules de la vulve et du pharynx. Enfin, il n'existe pas d'homologue de l'utrophine chez *C. elegans*.

Tout comme son homologue mammifère, la dystrophine chez *C. elegans* présente quatre domaines structuraux, dont un domaine N-terminal de type alpha-actinine, un domaine central composé d'une répétition de motifs type spectrine comprenant aussi un domaine WW, un troisième domaine riche en cystéines et un domaine C-terminal avec deux régions type coiled-coil (26). Les domaines riches en cystéines et C-terminal présentent une forte homologie avec la dystrophine humaine (243). Ils correspondent aux domaines qui interagissent avec la  $\beta$ -dystroglycane, la syntrophine et l' $\alpha$ -dystrobrevine chez les mammifères.

## 7. Mutations du gène *dys-1* et conséquences chez *C. elegans*

L'équipe de Laurent Ségalat a généré plusieurs allèles du gène *dys-1*, dont trois caractérisés moléculairement, *cx18*, *cx26* et *cx35*. Les allèles *cx18* et *cx26* présentent des mutations ponctuelles générant un codon stop prématuré aux acides aminés 2721 (exon 33) et 3237 (exon 39) respectivement (**figure 28**). L'allèle *cx35* correspond à une délétion de deux paires de bases modifiant le cadre de lecture et générant un codon stop au deuxième codon.



**Figure 28 : Gène codant la dystrophine chez *C. elegans* et mutations générés au laboratoire.** Les rectangles représentent les exons. Le gène *dys-1* comprend 46 exons répartis sur 31 kb. *Image adaptée de Bessou et al. 1998 (26).*

En raison de la présence de promoteurs internes chez les mammifères, nous avons choisi d'exclure l'allèle *cx35*. Nous avons alors choisi de travailler avec l'allèle *cx18* qui est considéré comme un mutant nul.

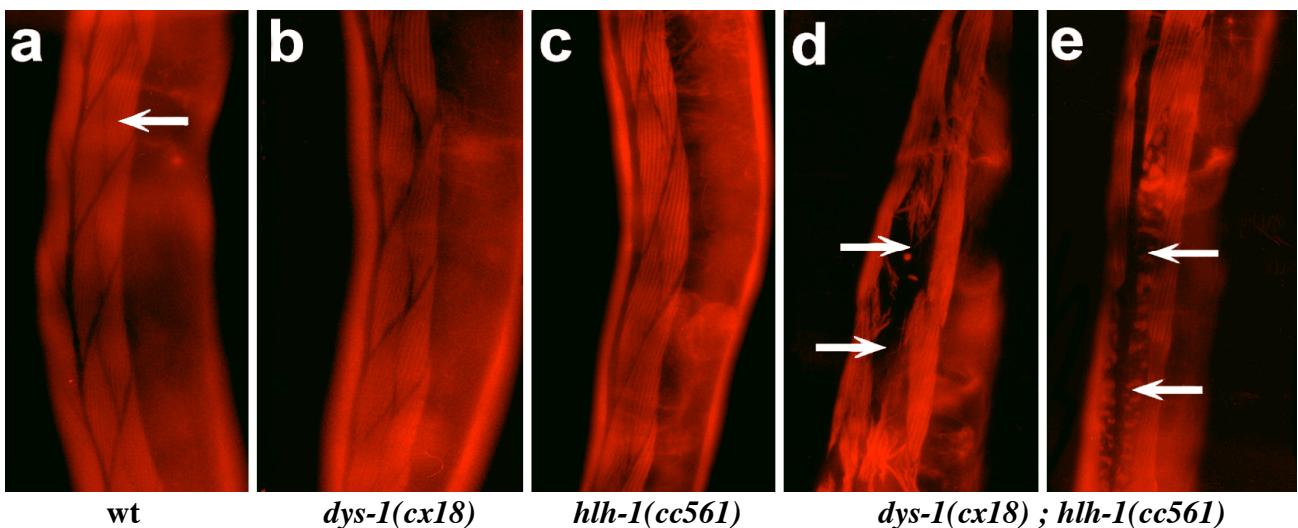
Ces mutants *dys-1(cx18)* présentent un phénotype d'hyperactivité et d'hypercontraction, mais la dégénérescence musculaire est rarement observée, se traduisant chez quelques animaux adultes par la perte d'une ou deux cellules musculaires. Le phénotype d'hyperactivité et d'hypercontraction a été attribué à un surplus d'acétylcholine au niveau des jonctions neuromusculaires, ceci a été confirmé électrophysiologiquement, biochimiquement et pharmacologiquement (**26, 244**). L'approche pharmacologique a consisté à tester la sensibilité des animaux à l'aldicarb, composé utilisé chez le ver comme indicateur de la transmission cholinergique (**7, 26, 245**). Les animaux mutants ont montré une résistance à ce traitement, suggérant un taux plus élevé d'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire par rapport aux animaux sauvages. Cette observation a été confirmée par des études électrophysiologiques sur les muscles du pharynx (**26**). Enfin, il a été montré biochimiquement que ces animaux présentaient une diminution de l'activité acétylcholinestérase (**244**).

Il faut noter que l'on pouvait retrouver le phénotype sauvage en introduisant un transgène contenant la dystrophine humaine (**26**). Cette expérience démontre que la dystrophine de *C. elegans* partage au moins une partie des fonctions de la dystrophine humaine. Enfin, une étude visant à analyser les gènes dérégulés chez les mutants *dys-1(cx18)* et *dys-1(cx35)* a mis en évidence un profil similaire aux dérégulations observées chez les patients DMD (**246**).



Ainsi, ont été identifiés des gènes de signalisation intracellulaire, de communication entre cellules et des gènes appartenant à la matrice extracellulaire. Par contre, les gènes participant au niveau énergétique de la cellule, qui sont les plus dérégulés chez les humains, apparaissent peu impactés chez *C. elegans*. Les auteurs attribuent cette différence au processus de régénération présent chez l'homme et absent chez *C. elegans* (246).

L'objectif principal de nos recherches vise à trouver des moyens pour lutter contre la progression de la maladie chez l'homme. Malheureusement, comme décrit ci-dessus, le phénotype de ces animaux ne se traduit pas par une dégénérescence importante. Il est donc difficile, avec ces souches, de visualiser un effet bénéfique sur les muscles. Suite aux travaux de Megeney *et al.*, qui ont mis en évidence un phénotype aggravé chez les souris *mdx* en absence du facteur myogénique MyoD (203), l'équipe de Laurent Ségalat a combiné une mutation faible et thermosensible du gène *hll-1* avec l'allèle *dys-1(cx18)*. La faible dégénérescence des mutants *dys-1(cx18)* a alors été considérablement accrue, se traduisant par une dégénérescence progressive des muscles conduisant à une paralysie au stade adulte (figure 29) (247). Depuis, l'équipe utilise ce double mutant en routine pour tenter de trouver des pistes thérapeutiques, et elle a notamment validé ce mutant en montrant que l'on pouvait ralentir la dégénérescence observée en traitant les animaux par de la prednisone, le seul traitement donné actuellement en soin palliatif aux patients DMD (3). C'est cette souche qui est utilisée dans les cribles pharmacologiques concernant la myopathie de Duchenne.



**Figure 29 : Dégénérescence des cellules musculaires striées des vers *dys-1(cx18) ; hll-1(cc561)*.** Photos d'animaux adultes observés après une coloration rhodamine-phalloïdine révélant l'actine au sein des cellules musculaires. Sur ces clichés, aucune cellule musculaire n'est absente chez le sauvage wt (a), le mutant *dys-1(cx18)* (b) et le mutant *hll-1(cc561)* (c). Par contre les clichés du double mutant *dys-1(cx18) ; hll-1(cc561)* (d-e) mettent en évidence une désorganisation de l'actine et

l'absence de certaines cellules musculaires, résultante de la dégénérescence. Flèche : cellule musculaire.

Chez *C. elegans*, *hll-1*, l'homologue du facteur de transcription myogénique des mammifères MyoD, est exprimé exclusivement dans les cellules des muscles striés et leurs précurseurs (248). Son expression commence dès le stade embryonnaire et perdure jusqu'au stade adulte. En son absence, les animaux présentent une paralysie et meurent au premier stade larvaire L1 (249). Les larves de ces mutants présentent tout de même des cellules engagées dans la lignée musculaire puisqu'il est possible de visualiser des filaments de myosine. La fonction d'HLH-1 semble donc sensiblement différente de son homologue mammifère puisqu'il n'est pas indispensable à la détermination des lignées musculaires (250). Il faut noter que les mutants thermosensibles *hll-1(cc561)* présentent un phénotype normal à 15°C et que toutes les expériences faites avec le double mutant s'effectuent à cette température permissive. Le mécanisme qui mène à une augmentation de la dégénérescence en combinant les deux mutations n'est pas élucidé. Notre hypothèse est que la mutation faible *hll-1(cc561)* fragilise les cellules musculaires qui deviennent beaucoup plus sensibles à l'absence de dystrophine.

Evidemment la présence d'une mutation supplémentaire complexifie les conclusions de nos études. Néanmoins, nous pouvons vérifier rapidement si les molécules identifiées ont un effet sur l'absence de dystrophine dans un contexte simple mutant *dys-1(cx18)*. La faible dégénérescence de cette souche nous oblige par contre à travailler avec un grand nombre d'individus.

**L**es deux chapitres suivants présentent l'amyotrophie spinale et le syndrome de Schwartz-Jampel, ainsi que les gènes qui leur sont liés. Ils introduisent également les homologues de ces gènes chez *C. elegans* et les conséquences de leurs inactivations. Ils resteront tout de même succincts, car l'objectif de cette thèse n'est pas d'en comprendre les mécanismes en détail, mais de permettre la mise au point de modèles utilisables en criblage, et tenter de trouver des molécules actives ralentissant les troubles observés chez ces derniers.

## **V. Amyotrophie spinale / SMN (Survival Motor Neuron)**

### **1. L'amyotrophie spinale**

Les amyotrophies spinales, communément appelées SMA (Spinal Muscular Atrophy), forment un groupe de maladies héréditaires à transmission autosomique récessive. Elles ont une incidence de 1/10.000 naissances et touchent aussi bien les garçons que les filles (251). Elles se traduisent par des altérations plus ou moins importantes selon le type de SMA, allant du type I, le plus sévère, au type IV (252). Ces altérations consistent essentiellement en une dégénérescence des motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière et en une atrophie musculaire. Elles sont dues à une délétion homozygote du gène *SMN* (Survival of Motor Neuron). Ce gène code une protéine exprimée de façon ubiquitaire, mais avec une expression plus ou moins importante en fonction des tissus (253, 254). Ainsi chez une personne "saine", on la retrouve en grande quantité dans la moelle épinière et dans le tissu musculaire (255). De plus, il est admis que le niveau de diminution de protéine SMN observé dans ces tissus est étroitement lié avec la sévérité de la maladie. Par contre, le rôle de cette protéine est très mal compris. Par exemple, la diminution de son expression dans les autres tissus comme le coeur ou le foie n'entraîne pas de troubles détectables chez les patients atteints de SMA (patients SMA). Il a tout de même été montré que *SMN* est impliqué dans la maturation de certains ARN indispensables au maintien et à la survie du motoneurone (256).

A ce jour, les grandes questions concernant cette maladie sont toujours sans réponse, ainsi de nombreuses équipes cherchent à déterminer les mécanismes liés à l'apparition et l'évolution de cette maladie. Ils essaient aussi de déterminer si le point de départ est nerveux ou musculaire. Malheureusement les résultats sont souvent difficiles à interpréter à l'image des modèles murins développés en France. En effet, afin d'identifier le point de départ de la maladie, le gène *SMN* a été invalidé par un système tissu spécifique (Cre/loxP)

indépendamment dans les muscles et dans les neurones (**257, 258**). De façon surprenante, ces deux modèles présentent des symptômes proches de ceux retrouvés chez les patients SMA sans pour autant présenter de dégénérescence motoneuronale. Les troubles observés avec le modèle murin ciblant les neurones semblent tout de même plus proches des troubles observés chez les patients SMA (**259**). Ainsi les motoneurones ne dégèrent pas, mais présentent des anomalies morphologiques et les muscles sont en partie dénervés, alors que le modèle ciblant les muscles se limite à des atteintes musculaires de type dystrophique. Il est donc probable que les troubles observés chez les patients aient plusieurs origines.

Finalement, plusieurs hypothèses ont vu le jour. Ces hypothèses, décrites plus bas, suggèrent que les problèmes observés sont la résultante d'un défaut de développement lors du stade embryonnaire, une défaillance de facteurs de croissance, et une relation nerf-muscle perturbée.

Les atteintes les plus invalidantes et conduisant au décès des patients SMA sont l'insuffisance respiratoire et les complications ostéoarticulaires. L'insuffisance respiratoire résulte essentiellement de la paralysie des muscles intercostaux, de la déformation de la cage thoracique et du rachis. Les troubles ostéoarticulaires se traduisent par une déformation et une raideur des articulations. Ces raideurs sont une conséquence directe de la paralysie. En absence de mouvement les parties molles des articulations, comprenant les tendons, les muscles, les capsules et les ligaments, se rétractent et déforment petit à petit les structures articulaires correspondantes, de plus, la croissance osseuse aggrave leurs conséquences.

En fonction de la gravité des atteintes, les SMA sont regroupées en 4 types :

- Type I :

Le type I (SMAI) ou maladie de Werdnig-Hoffmann est la forme la plus sévère. Les signes cliniques sont visibles dès le stade embryonnaire. Les nouveau-nés de ce type nécessitent une assistance respiratoire en raison de leur degré de faiblesse. Leurs muscles intercostaux et respiratoires sont très atteints et entraînent une insuffisance respiratoire responsable de la mort de plus de 80 % des enfants dès la première année. Seule une assistance respiratoire quotidienne permet d'allonger un peu leur durée de vie (**260, 261**).

- Type II :

Le type II (SMA II) représente la forme intermédiaire. Les enfants commencent à présenter des troubles entre le 3<sup>e</sup> et le 15<sup>e</sup> mois et décèdent entre la 4<sup>e</sup> année et l'adolescence, sans avoir pu apprendre à marcher. Leurs atteintes se traduisent par une grande faiblesse touchant plus les jambes que le tronc ou les bras, bien que leur degré d'atteinte varie d'un

patient à l'autre. Les travaux d'Araki *et al.* suggèrent que le stress oxydatif et la mort cellulaire par apoptose joueraient un rôle majeur dans la neurodégénérescence observée chez ces patients (262).

- Type III :

Le type III (SMA III) ou maladie de Kugelberg-Welander prend place entre l'âge de 2 et 17 ans. Les patients SMA III peuvent généralement marcher et leur durée de vie dépend en grande partie de l'assistance qui leur est fournie.

- Type IV :

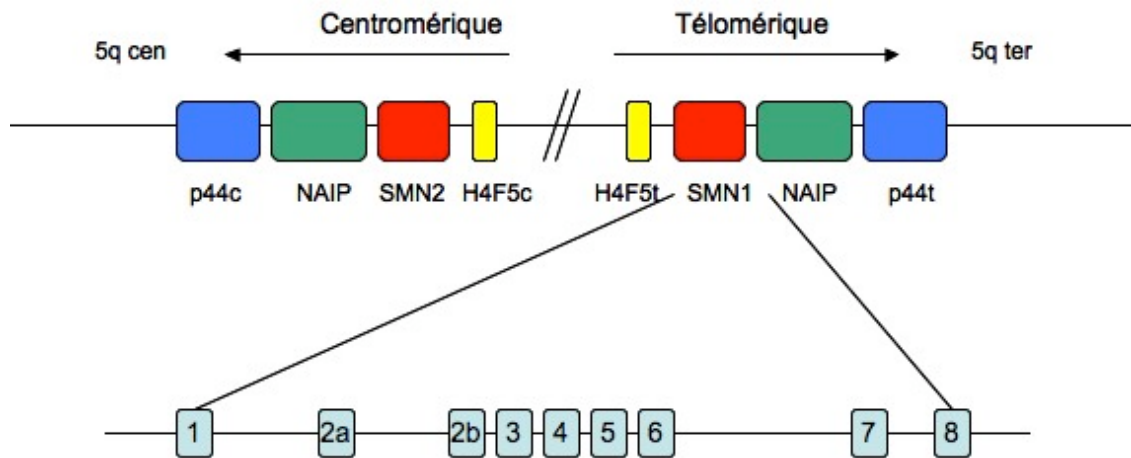
Chez ces patients, la maladie apparaît tardivement et est de moindre gravité. Elle restait d'ailleurs longtemps classée comme n'étant pas une SMA. Cependant, en montrant que ces patients présentaient des délétions du gène *SMN*, les cliniciens ont ajouté un quatrième type à la classification des SMA (SMA IV), appelé aussi forme adulte.

## 2. SMN

### 2.1. Le gène *SMN*

Le gène responsable des SMA est appelé *SMN* (Survival of Motor Neuron). Il est situé sur le bras long du chromosome 5, sur une région centromérique très complexe qui présente une duplication inversée d'environ 500 kb (263-267). Ce locus contient 4 gènes, le gène *SMN*, un gène codant la protéine *NAIP* (Neuronal apoptosis inhibitory protein), un gène codant la protéine *P44* (sous-unité d'un facteur de transcription) et le gène *H4F5* dont la fonction est encore inconnue (267-269). En raison de la duplication, ces gènes sont présents en deux copies, une télomérique et une autre centromérique (**figure 30**). La copie télomérique de *SMN* est nommée *SMN1* et la copie centromérique *SMN2*. L'analyse de leurs régions codantes met en évidence une forte conservation, suggérant que la duplication est un événement récent de l'évolution (267, 270).

Le gène *SMN1* comporte 9 exons répartis sur 27 kb, il donne lieu à un transcrit de 1,7 kb (271, 272). Ce gène est muté chez 95 % des patients, et la plupart des mutations se situent dans les régions très conservées des exons 6 et 7 (273-275). Il diffère de sa copie centromérique *SMN2* par cinq paires de bases dont une située sur l'exon 7 qui entraîne l'exclusion de cet exon lors de l'épissage de l'ARNm de *SMN2* (276). Le transcrit de *SMN2* (sans exon 7) code une protéine raccourcie de 16 résidus du côté carboxyterminal (277). Il en résulte une protéine instable incapable de compenser l'absence de protéine *SMN1* (278).

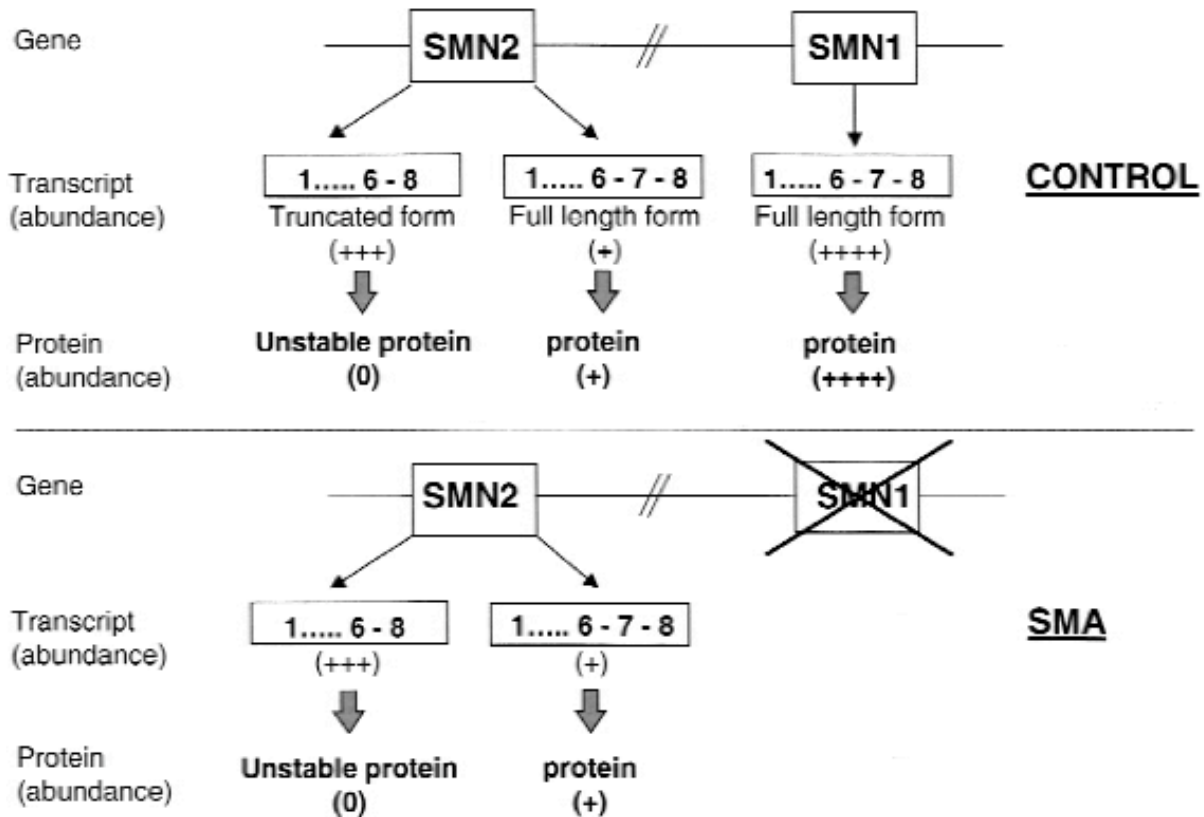


**Figure 30 : Structure du locus q11.2-13.3 du bras long du chromosome 5 et du gène *SMN*.** Les mutations retrouvées chez les patients SMA sont le plus souvent des délétions portant sur l'exon 7 (95 % des cas). D'après Lefebvre et al. (267).

*SMN2* peut être exprimé normalement sans empêcher la maladie lorsque *SMN1* est muté. A l'inverse, *SMN2* peut présenter des mutations sans entraîner la maladie quand *SMN1* est exprimé normalement. Par contre, ces gènes n'ont jamais été vus mutés simultanément, suggérant un effet létal quand les mutations sont combinées.

Il faut noter que *SMN2* peut, dans une faible proportion, donner lieu à une protéine normale, incluant l'exon 7 (**fig. 31**). Cette faible expression compense alors légèrement les conséquences de la défaillance de *SMN1*. De plus, *SMN2* est souvent retrouvé en plusieurs copies, augmentant le nombre de protéines SMN normales ; mais malheureusement même avec une forte proportion de protéines normales issues de *SMN2*, l'activité transcriptionnelle de base du gène *SMN2* reste faible par rapport à *SMN1*, diminuant ainsi son impact (**fig. 31**) (279, 280).

Enfin, il existe une étroite corrélation entre la sévérité de la maladie (Type I, II, III et IV) et la quantité de protéines intactes retrouvées dans les tissus (281, 282). En se basant sur cette observation, plusieurs équipes de recherche tentent de mettre au point des techniques permettant de réguler la transcription du gène *SMN2* afin d'augmenter son expression, mais aussi de promouvoir l'apparition de la forme stable (283).



**Figure 31 : Bases génétiques des amyotrophies spinales.** Les gènes sont représentés par des carrés. Chez les patients saints (panneau du haut), le gène *SMN1* est transcrit dans son intégralité et le gène *SMN2* est transcrit majoritairement en une forme tronquée excluant l'exon 7 et minoritairement en intégralité. La forme tronquée donne une protéine instable et non fonctionnelle. Chez les patients SMA, seul le gène *SMN2* est transcrit ; le degré de la maladie est alors directement relié à la quantité de protéine intacte (incluant l'exon 7) produit par ce gène. *Image adaptée de Nicole et al. (2002) (259).*

Enfin, malgré une génétique très complexe, cette maladie peut être apparentée à une maladie perte de fonction.

## 2.2. La protéine SMN

La protéine SMN, dans sa forme intacte, est composée de 294 a.a. avec une masse moléculaire de 38 kDa. Elle ne présente aucune homologie significative avec des protéines déjà connues (267). La majorité des délétions observées sur le gène *SMN1* impacte la région C-terminale de la protéine, suggérant un rôle prédominant de cette région dans son activité

(267). De plus cette région est hautement conservée entre les espèces, allant de la levure à l'homme, en passant par le nématode *C. elegans*. Cette région présente une séquence qui est connue pour lier l'ARN (284).

La protéine SMN est présente dans toutes les cellules de l'organisme, on la retrouve aussi bien dans le cytoplasme et dans le noyau. A la différence d'une localisation diffuse dans le cytoplasme, dans le noyau cette protéine est regroupée dans des structures appelées *gems* (gemini of coiled bodies) dont la fonction reste très obscure (256).

Quel que soit sa localisation, nucléaire ou cytoplasmique, la protéine SMN s'associe à un complexe macromoléculaire composé de protéines SIP (SMN Interacting Protein), aussi appelées gémine, et plusieurs autres protéines, dont les protéines Sm (256, 285) (pour revue, voir (286)). Ce complexe intervient dans la biogenèse des spliceosomes, ensembles ribonucléiques impliqués dans la maturation des ARNm, dont certains, probablement indispensables à la survie du motoneurone (284, 287). Pour rappel, les spliceosomes sont formés dans le cytoplasme par association de snRNP (complexe ribonucléique associant des protéines et des petits ARN nucléaires, les snRNA) et de complexe SMN-SIP ; une fois formés dans le cytoplasme, les spliceosomes migrent dans le noyau pour s'associer aux ARNm et réaliser leur épissage (pour revue, voir (286)). De nombreuses questions restent cependant non élucidées quant à l'implication de ces phénomènes dans la dégénérescence motoneuronale.

SMN entre aussi en interaction avec d'autres protéines. Il a par exemple été montré que SMN interagit de façon synergique avec une protéine anti-apoptotique, Bcl-2 (B-cell leukemia oncogene-2) (288, 289). La réduction ou l'absence de l'activité anti-apoptotique du couple synergique SMN / Bcl-2 pourrait participer à la dégénérescence des motoneurones et donc à la mise en place des SMA (289). Encore une fois, c'est l'extrémité C-terminale de SMN qui semble indispensable à cette fonction anti-apoptotique (290). Il a aussi été montré que SMN et Bcl-2 se situent dans la région post-synaptique des jonctions neuromusculaires (côté musculaire). La protéine SMN normale située en post-synaptique pourrait alors participer au maintien de ces jonctions. Chez les patients SMA, on retrouve une diminution très importante de SMN au niveau de ces jonctions, ce qui est aussi probablement lié au phénotype de dégénérescence (291).

Comme décrit précédemment, il existe plusieurs seuils de gravité dans les SMA, classés en quatre types. Ce seuil de gravité est inversement proportionnel à la quantité de protéine SMN retrouvée dans les tissus (Tableau 2) (256, 282). De façon inexplicable à ce jour, c'est dans la moelle épinière que le taux d'expression protéique est le plus affecté. Dans les cas de type I, on retrouve dans ces tissus moins de 1/100 de la quantité évaluée chez les



enfants sains. De plus cette observation est corrélée avec le fait que l'on retrouve un nombre moins important de *gems* dans les fibroblastes de ces patients (281). En conclusion, ces auteurs suggèrent une forte corrélation entre la sévérité de la maladie et la diminution du taux d'expression de la protéine SMN dans les motoneurones mais aussi avec la quantité de *gems* présents dans les fibroblastes.

Phénotype	Taux d'expression de SMN (%)
Formes sévères (Type I)	5 à 20 %
Formes intermédiaires (Type II)	30 à 80 %
Formes modérées (Type III & IV)	Taux équivalent aux personnes saines

**Tableau 2 : Phénotypes et taux d'expression de la protéine SMN extraite de lignées lymphoblastoïde.**

### **Conclusion :**

Le déficit de la protéine SMN au niveau de la moelle épinière serait donc lié à une dégénérescence motoneuronale chez les patients. Parallèlement, le déficit de la protéine SMN au niveau musculaire pourrait conduire à un phénotype dystrophique. Par contre, cette diminution dans les autres tissus, tout de même moins importante, ne se traduit pas par des altérations visibles. A ce jour plusieurs explications sont émises, mais aucune réellement démontrées. Par exemple, les processus de maturation des ARNm sont variables selon les tissus, ainsi le phénomène de maturation au sein des motoneurones ou du muscle serait spécifique et plus dépendant de la protéine SMN. Une autre explication repose sur la relation entre SMN et des protéines anti-apoptotiques, cette interaction serait cruciale dans les tissus atteints, leur absence laisserait libre cours aux protéines pro-apoptotiques ; une dégénérescence progressive s'en suivrait.

### **3. Les modèles**

Comme pour les autres maladies, le développement de modèles animaux mimant les SMA présente un moyen de comprendre plus facilement et rapidement les mécanismes liés à la dégénérescence motoneuronale mais aussi d'explorer différentes voies thérapeutiques. Malheureusement cette stratégie est cruellement limitée par le fait que seuls les hommes présentent deux copies du gène *SMN*, *SMN1* et *SMN2*. En effet la perte totale de protéines *SMN* est non viable. Ainsi l'inactivation du gène par knock-out chez la souris aboutit à des formes précocement létales et donc inutilisables pour les essais thérapeutiques. Afin de contourner cette limitation, les chercheurs se sont engagés dans trois directions : i) introduire

une copie du gène *SMN2* humain chez les souris homozygotes *SMN* *-/-* (**292, 293**), ii) réduire le niveau d'expression du gène *SMN* endogène dans des souris sauvages (**294**), iii) générer des souris présentant des délétions précises de l'exon 7 (**257, 258**).

Ces différents modèles sont disponibles à ce jour et utilisés pour l'étude de cette maladie. N'ayant pas encore entrepris de tests sur les modèles murins, je ne les présenterai pas plus en détails.

#### **4. Les traitements / La recherche**

A ce jour il n'existe aucun traitement pour les SMA. Les soins consistent à prévenir et à gérer les effets direct et indirect de la perte progressive des unités motrices. Les soins se concentrent sur l'appareil respiratoire chez les patients de type I, ainsi dès les premiers signes d'infections les cliniciens prescrivent des antibiotiques et tentent de désencombrer leurs voies pulmonaires tout en leur délivrant une assistance respiratoire. Pour les malades de type II et III, une pratique régulière d'exercice peut ralentir les atteintes respiratoires. Un programme de rééducation intensif et quotidien de l'ensemble du corps est aussi nécessaire pour tenter de conserver la mobilité des articulations et une force musculaire suffisante.

En ce qui concerne la recherche thérapeutique, plusieurs voies sont explorées à ce jour :

La piste la plus prometteuse à ce jour consiste à développer des composés susceptibles de stimuler l'expression du gène *SMN2*. Cette stratégie nécessite néanmoins que les molécules identifiées comme stimulant l'activité transcriptionnelle de *SMN2* le fassent de façon spécifique, c'est-à-dire qu'elles n'aient pas d'activité sur d'autres gènes qui pourraient être "indésirables". Plusieurs équipes ont mis au point des cribles *in vitro* permettant de mesurer l'activité du promoteur *SMN2* (**283, 295**). Malheureusement, les composés identifiés dans ce type de crible doivent subir de nombreux tests avant d'être validés et poursuivis en tests cliniques.

De la même manière, partant du principe que *SMN2* produit deux types de protéines, l'une majoritaire et instable et l'autre minoritaire mais intacte, des cribles sont mis en place pour identifier des composés susceptibles de promouvoir l'expression de la forme minoritaire (contenant l'exon 7) (**296, 297**). Là encore, ces composés devront rester spécifiques des ARNm de *SMN2* (**298**). Issue de cette stratégie on peut citer l'acide valproïque qui est évalué en essai pilote (**298-300**).

Une autre piste envisagée consiste à moduler les processus de survie du motoneurone. Ainsi, des cribles hauts débits, basés sur des neurones en cultures, sont mis en place. Ils permettront à terme d'identifier des composés susceptibles de maintenir ces cellules en vie et

permettront ainsi d'identifier des cibles thérapeutiques (301). Plusieurs composés ont été identifiés par cette approche, dont le riluzole, mais n'ont pour l'instant pas montré d'efficacité lors des tests cliniques (302-304).

Enfin les thérapies cellulaire et génique sont à ce jour peu explorées, de plus en l'état actuel de la recherche, il est difficile de déterminer si les efforts doivent s'orienter vers les motoneurons ou vers les fibres musculaires. Des chercheurs ont tout de même réussi à observer un nombre de gems équivalent, voire supérieur, à celui des individus sains après avoir introduit une copie du gène SMN dans des fibroblastes issus de patients SMA (305).

## **5. SMN chez *C. elegans***

Chez *C. elegans*, l'homologue de SMN1 est présent en une seule copie et nommé *smn-1* (306). A ce jour ce gène est peu étudié chez le nématode. Sa séquence présente de fortes homologies avec la séquence humaine, notamment au niveau des zones conservées entre les différentes espèces, suggérant une conservation des fonctions essentielles telles que la capacité de se lier aux ARN et à certaines protéines anti-apoptotiques (306). *smn-1* est constitué de 5 exons et de 4 petits introns pour une taille de 745 pb, le tout codant une protéine de 207 acides aminés (figure 32).

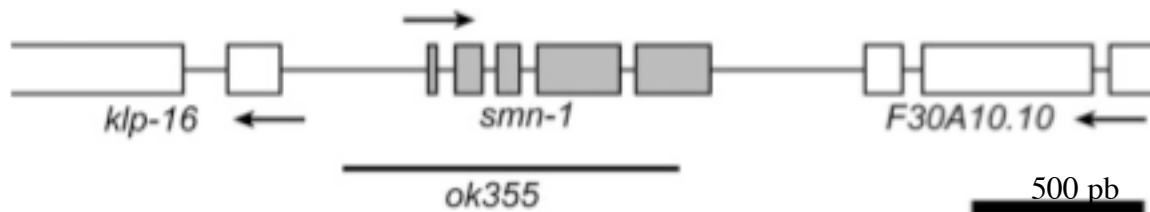
L'utilisation d'un gène rapporteur fusionné à la séquence complète du gène *smn-1* (incluant le promoteur) a permis d'étudier son expression. Au stade embryonnaire, *smn-1* s'exprime de façon diffuse dans le cytoplasme de la plupart des cellules, et de façon très importante dans tous les noyaux (306). Chez l'adulte, *smn-1* présente une forte expression dans les noyaux de la plupart des cellules dont les neurones, les muscles, l'épiderme, les cellules excrétrices et les cellules germinales ; par contre seuls les neurones et les cellules excrétrices ont montré une expression cytoplasmique significative (306). L'ARNm de *smn-1* et la protéine SMN1 ont aussi été détectés dans les tous premiers stades du développement, suggérant une origine maternelle de ce transcrit et de cette protéine.

## **6. Mutations du gène *smn-1* et conséquences chez *C. elegans***

Les premières tentatives d'inactivation de *smn-1* chez *C. elegans* ont été conduites par injection d'un transgène entraînant la diminution des transcrits *smn-1* par ARN interférence (306). Les animaux transgéniques obtenus se caractérisent par une forte létalité embryonnaire, suggérant un rôle important de cette protéine lors des premiers stades du développement. Comme décrit plus haut, chez l'homme, SMN interagit avec une protéine anti-apoptotique nommée BCL-2, et cette interaction pourrait être impliquée dans le phénomène de

dégénérescence motoneuronale (289). Chez le nématode, l'homologue de *bcl-2* se nomme *ced-9*, et joue un rôle important dans le contrôle des phénomènes apoptotiques des cellules somatiques, mais aussi des cellules germinales (307). Or, il a été montré que les processus apoptotiques sont essentiels à la mise en place et au maintien des cellules germinales (308). L'inactivation de *smn-1* pourrait donc participer au dérèglement de *ced-9*, ce qui expliquerait la létalité embryonnaire observée chez les animaux traités par RNAi anti-*smn-1* (306). En parallèle de ce rôle anti-apoptotique, la perte de la protéine SMN pourrait entraîner des défauts dans les processus de maturation des ARNm essentiels aux premiers stades du développement.

Plus récemment, une mutation de *smn-1* a été caractérisée (309). Cette mutation correspond à une délétion de 975 pb s'étalant sur 246 pb en amont du gène *smn-1* et couvrant la quasi totalité du gène, seul 87 pb en 3' incluant le codon stop sont conservés ; cet allèle se nomme *ok355* (fig. 32) (309).



**Figure 32 : Représentation schématique de l'allèle *ok355* du gène *smn-1* (309).** Les parties codantes sont schématisées par des carrés, et les flèches représentent le sens de lecture. La délétion *ok355* couvre la quasi totalité du gène *smn-1* et probablement une partie des séquences régulatrices du gène *klp-16*. Image adaptée de Briese et al. (2009).

Cette mutation est considérée comme nulle et entraîne une forte létalité embryonnaire à l'état homozygote. Un mutant portant l'allèle *ok355* est disponible au CGC sous le nom de LM99 [*smn-1(ok355)/hT2[bli-4(e937) qIs48]* (I; III)]. L'allèle *ok355* est maintenu sous une forme hétérozygote balancée. Les descendants homozygotes sont alors capables de passer les premiers stades du développement grâce aux ARNm *smn-1* et aux protéines SMN-1 hérités de la mère hétérozygote. Les descendants homozygotes présentent une durée de vie considérablement réduite, des défauts de mise en place des cellules germinales et des gonades, mais aussi des problèmes moteurs (309). En effet, la motricité de ces animaux décline progressivement à partir des derniers stades larvaires, les adultes finissent par être complètement paralysés. En comparaison, les animaux hétérozygotes ne semblent pas atteints.

Par contre l'analyse des neurones des animaux paralysés ne met pas en évidence de dégénérescence ou d'atteintes motoneuronales (309).

Afin de déterminer l'origine de cette atteinte motrice, Briese *et al.* (2009) ont injecté dans ces animaux un transgène capable d'exprimer SMN-1 spécifiquement dans le système nerveux. Ils ont observé une légère restauration du phénotype sauvage, suggérant un lien entre les troubles moteurs observés et l'absence de protéine SMN-1 dans le système nerveux (309). La même expérience a été réalisée avec un promoteur musculaire mais n'a montré que très peu d'effet ; il faut tout de même rester prudent avec ce genre de technique, car les transgènes non intégrés ne sont pas fidèlement transmis à l'ensemble des cellules des animaux, il en résulte une expression mosaïque qui est parfois difficile à interpréter (310). De plus ces auteurs ont noté une transmission des construits anormalement basse, laissant penser que ces constructions sont létales. Il est donc possible que ces vecteurs aient subi des modifications dans les lignées analysées.

L'utilisation de la souche LM99 dans le but d'identifier des molécules thérapeutiques, ou des gènes, susceptibles de restaurer le phénotype sauvage semble prometteuse, malheureusement cette stratégie est difficile à mettre en place pour deux raisons : i) la létalité entraînée par l'absence de protéine SMN-1 nous oblige à travailler avec la souche hétérozygote balancée, ce qui complexifie considérablement des analyses à grande échelle, ii) la délétion *ok355* s'étend en amont du gène *smn-1*, touchant les séquences régulatrices du gène *klp-16* (fig. 32), et nous ne pouvons pas affirmer à ce jour que la dérégulation de ce gène ne joue pas dans la mise en place des troubles moteurs observés (309). Ce point est plus amplement détaillé dans le chapitre dédié au développement des cribles.

## **VI. Syndrome de Schwartz-Jampel / Perlecan**

### **1. Le syndrome de Schwartz-Jampel**

La maladie de Schwartz-Jampel a été décrite pour la première fois en 1962 par Schwartz et Jampel, ce qui lui a valu son nom **(311)**. Elle a ensuite été décrite en détail par Aberfeld *et al.* en 1965 **(312)**.

Le syndrome de Schwartz-Jampel (SJS) est causé par des mutations dans le gène codant l'Héparane Sulfate Proteoglycan 2 (HSPG2) ou perlecan, une protéine de la membrane basale. Cette protéine est associée, comme la dystrophine, au DGC (via l' $\alpha$ -dystroglycane). A la différence de la dystrophine qui est située du côté cytoplasmique, le Perlecan, lui est localisé du côté de la matrice extracellulaire **(fig. 12) (313)**.

Les patients SJS présentent une myotonie, une raideur musculaire et des anomalies ostéo-articulaires, néanmoins leur durée de vie ne semble pas atteinte **(314)**. Seule une centaine de cas ont été rapportés dans la littérature à ce jour **(313)**. Les manifestations cliniques apparaissent précocement après la naissance. Les articulations sont raides, voire fixées, ce qui rend la marche incertaine et hésitante. L'installation de la raideur articulaire est progressive, atteignant son maximum au cours de l'adolescence. Le tableau clinique associe aussi une petite taille, un hirsutisme, une myopie, ainsi que plusieurs autres troubles **(SJS, MIM# 255800)**. La transmission est autosomique récessive **(313)**. La maladie semble se stabiliser après l'adolescence.

L'analyse par immunocytochimie d'une biopsie de peau ou de muscle d'un malade SJS montre une diminution d'expression du perlecan **(315)**. Quand cette expression est totalement abolie on parle alors de Dyssegmental Dysplasia Silverman-Handmaker **(DDSH; MIM# 224410)**, maladie qui ne sera pas abordée dans ce manuscrit.

## **2. Le Perlecan**

### **2.1. Structure**

Le gène codant le perlecan ou HSPG2 (Heparan Sulfate Proteoglycan 2) est situé sur le chromosome 1 (1p35-p36.1). Il est composé de 97 exons répartis sur 13.2 kb (**66, 316**). La protéine mature, sans sa partie N-terminale correspondant à un peptide signal de 21 a.a., est composée de 4370 a.a. pour un poids de 467 kDa. Au regard de sa structure, le perlecan peut être subdivisé en 5 domaines (I, II, III, IV, V) (**figure 33**) (**313**).

Le domaine I présente des sites riches en sérine permettant une liaison avec des chaînes HS (Heparan Sulfate) et un domaine SEA (Sperm protein, Enterokinase, Agrin) qui participe aussi aux liaisons avec les HS (**317, 318**).

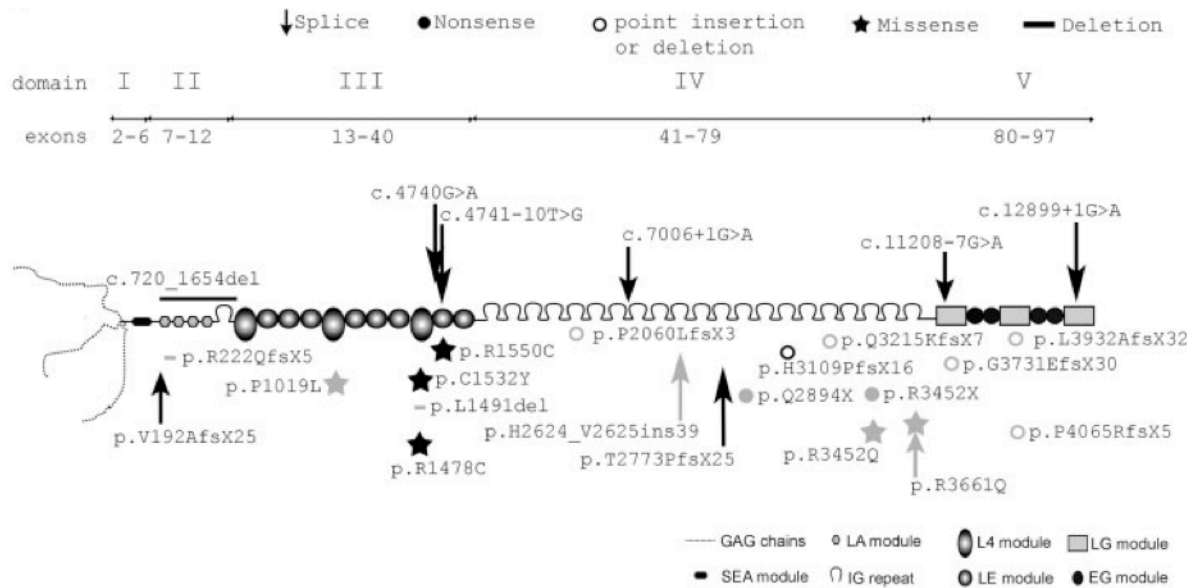
Le domaine II est composé d'une répétition d'unités riches en cystéine (LA module) qui ressemble aux domaines de fixations retrouvés dans les récepteurs LDL (Low-Density Lipoprotein receptor).

Le domaine III présente une forte homologie avec les chaînes  $\alpha$  des laminines. Il se compose d'une répétition d'unités LE (Laminin Epidermal growth factor-like) dont 3 présentant des modules globulaires dépourvus de cystéine (L4) (**319**). Chaque unité LE contient 6 à 8 cystéines qui forment trois ou quatre ponts disulfure.

Le domaine IV représente le domaine le plus important au niveau de la taille, et il se décompose en une série de 21 unités de type immunoglobuline (Ig).

Le domaine V est composé de trois unités type laminine G (LG) et de quatre unités appelées Epidermal Growth factor-like (EG). Il présente des similarités avec l'agrine présentée plus haut.

Diverses modifications peuvent être apportées à la protéine, tel l'ajout de chaînes d'Héparane Sulfate (HS) (**320**). Ces modifications sont dépendantes du type cellulaire où est exprimée cette protéine.



**Figure 33 : Représentation schématique du perlecan (HSPG2) et des mutations retrouvées à ce jour chez les patients atteints du syndrome de Schwartz-Jampel (313).** Le Perlecan peut être subdivisé en 5 domaines (I à V). Trois chaînes de glycosaminoglycane sont attachées à la partie N-terminale du domaine I. Les mutations grisées correspondent à des mutations identifiées à l'état hétérozygote alors que les mutations en gras correspondent à des mutations identifiées à l'état homozygote. *Image adaptée de Stum et al., (2006) (321).*

Les mutations responsables de cette maladie sont très diverses et sont réparties sur toute la longueur du gène, sauf sur le domaine I (**figure 33**). Il n'a pas été mis en évidence de corrélation génotype/phénotype (**313**). Il faut noter que le perlecan n'est pas complètement absent chez les patients SJS. L'analyse des mutations connues amène à penser qu'il s'agirait d'une expression de protéines tronquées, ne remplissant pas toutes ses fonctions.

## 2.2. Expression

Le Perlecan a été observé dans les membranes basales de tous les types cellulaires étudiés (**322, 323**). Il faut noter que, bien que ne présentant pas de réelles membranes basales, les tissus cartilagineux sont les tissus les plus riches en perlecan (**324-326**). Au niveau des muscles squelettiques, comme décrit dans la **figure 12**, le perlecan est retrouvé associé au DGC et aux protéines de la matrice extracellulaire.



### **2.3. Fonctions**

En raison de ses multiples sites de liaisons, plusieurs rôles lui ont été attribués ; le Perlecan jouerait notamment un rôle important dans l'architecture / interaction des membranes plasmiques / basales vis-à-vis du milieu environnement, mais aussi dans l'organisation des cellules entre elles et dans la signalisation via la modulation de facteurs de croissance (**figure 34**) (pour revue, voir **(327, 328)**).

Voici une description, non exhaustive, des sites de liaisons identifiés à ce jour sur chacun des domaines :

Le domaine I peut se lier, via ses chaînes HS (Heparane Sulfate), à de nombreux éléments tels que la laminine-1, la fibronectine, la fibriline-1 mais aussi au collagène de type IV et à des facteurs de croissance tels que FGF-2 (Fibroblast Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) **(326, 329-338)**. Par ces interactions le domaine I est impliqué dans des phénomènes d'adhésion et de mobilité cellulaire, dans l'architecture de la membrane basale (notamment au niveau de la jonction neuromusculaire), dans la chondrogénèse, mais aussi dans l'angiogénèse et la modulation de facteurs de croissance.

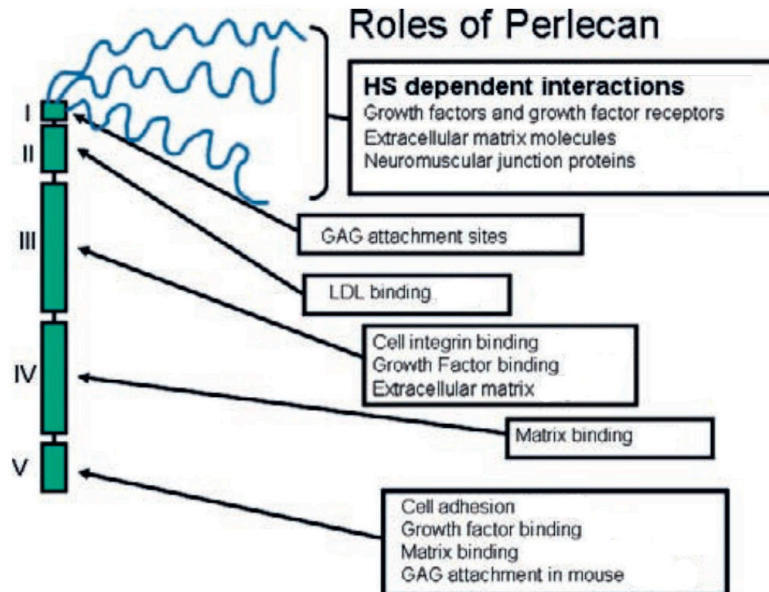
Le domaine II peut se lier à la fibriline-1 et aux VLDL (Very Low Density Lipoprotein) **(337, 339)**.

Le domaine III présente des sites de fixation pour des protéines de la matrice extracellulaire, pour l'intégrine et pour des facteurs de croissance tels que FGF7 et PDGF **(340-342)**. Il serait impliqué dans la modulation des facteurs de croissance et de l'angiogénèse.

Le domaine IV entretient des interactions avec la fibronectine, la fibuline-2, les héparines, PDGF et plusieurs autres éléments de la matrice extracellulaire **(334)**. Il est impliqué dans les phénomènes d'adhésion et de mobilité cellulaire, dans les processus d'angiogénèse, et il est aussi en relation avec les facteurs de croissance.

Le domaine V présente aussi un grand nombre de sites de liaison, dont des sites spécifiques du collagène de type XVIII et des fibulines **(332, 343-346)**. Il faut noter que ce domaine V interagit avec l' $\alpha$ -dystroglycane, et donc, avec le complexe DGC présenté en **figure 12 (347-349)**. Il est capable d'interagir avec les acétylcholinestérases présentes au niveau des jonctions neuromusculaires **(350)**. Il peut aussi interagir avec les intégrines présentes sur les membranes basales et moduler par leur intermédiaire des voies signalétiques spécifiques aux types cellulaires où il est exprimé **(324, 332, 336, 344, 351)**. Enfin, le domaine V est impliqué dans la disponibilité de certains facteurs de croissance (en servant de

récepteur de faible affinité), dans l'angiogénèse, dans l'ancrage de la cellule dans la matrice extracellulaire et dans la stabilité des membranes basales (332, 333, 344, 345, 347, 352).



**Figure 34 : Rôle du perlecan.** Les diverses fonctions du perlecan sont rendues possibles par sa capacité à se fixer à un nombre important de partenaires, jouant ainsi un rôle clé dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire et à leurs voisines, dans des processus du développement dont l'angiogénèse et la chondrogénèse mais aussi dans des cascades signalétiques dépendantes du type cellulaire où il est exprimé. HS : Héparane Sulfate, GAG : GlycoAmino Glycane, LDL : Low Density Lipoprotein. *Image adaptée de Knox et al. 2006 (328).*

Au regard des interactions présentées ci-dessus et des données obtenues *in vitro* et *in vivo*, comment expliquer les atteintes observées chez les patients ?

#### - Les troubles ostéoarticulaires

Le développement du cartilage et sa maintenance ainsi que l'ossification sont dépendants des interactions cellule-cellule, cellule-matrice et de la modulation de facteurs de transcriptions et de facteurs de croissance. Vu le nombre de partenaires du perlecan appartenant à chacune de ces classes, il est évident que, en son absence, ou avec une protéine ne pouvant plus interagir avec tous ses partenaires, ces processus seront considérablement

perturbés. Il est par contre très difficile, à ce jour, d'identifier les mécanismes qui sont touchés, plusieurs auteurs tentent tout de même de les décrire (313, 347, 353-358).

#### - Les troubles musculaires

En plus d'un rôle important dans le rapport qu'entretiennent les cellules entre elles et avec la matrice extracellulaire, le Perlecan est impliqué dans la localisation/disponibilité des acétylcholinestérases au niveau des jonctions neuromusculaires (67, 350). L'absence du Perlecan, ou de ses fonctions au niveau de ces jonctions, entraîne une diminution de l'activité acétylcholinestérase, et il en découle une présence prolongée d'acétylcholine dans les fentes synaptiques lors de la stimulation par le motoneurone. Ce phénomène pourrait expliquer certains troubles musculaires observés chez les patients, dont la myotonie.

Une autre hypothèse réside dans l'interaction entre le Perlecan et les laminines présentes en présynaptique et postsynaptique des jonctions neuromusculaires. En postsynaptique, cette interaction modulerait la localisation des récepteurs à l'acétylcholine. En présynaptique, elle pourrait être impliquée dans un dérèglement des canaux calcium responsables de la libération des vésicules d'acétylcholine (359, 360).

### 3. Les traitements

Il n'existe à ce jour aucun traitement contre le syndrome de Schwartz-Jampel. Il a tout de même été montré que des composés antileptique et antiarhythmique, tel que la carbamazépine (un anticonvulsivant tricyclique), permettraient de lutter contre la myotonie observée chez ces patients, mais ces effets restent faibles et malheureusement inefficaces contre les autres symptômes (361).

### 4. Les modèles

L'analyse du gène codant le perlecan de différents organismes, comme le nématode *C. elegans*, la mouche *Drosophila melanogaster*, la souris et l'homme, met en évidence une forte conservation de sa séquence au cours de l'évolution (339, 362-366). Les mutations du perlecan ont été étudiées chez trois animaux à ce jour, dont le nématode *C. elegans* (décrit plus bas), la mouche *Drosophila melanogaster* et la souris. Les mutations nulles (absence de fonction) ne sont viables dans aucun de ces organismes, suggérant un rôle essentiel de cette protéine pour le vivant. De plus, les phénotypes observés sont variables en fonction de la position de la mutation et de l'organisme étudié, ce qui souligne son rôle pluripotent.

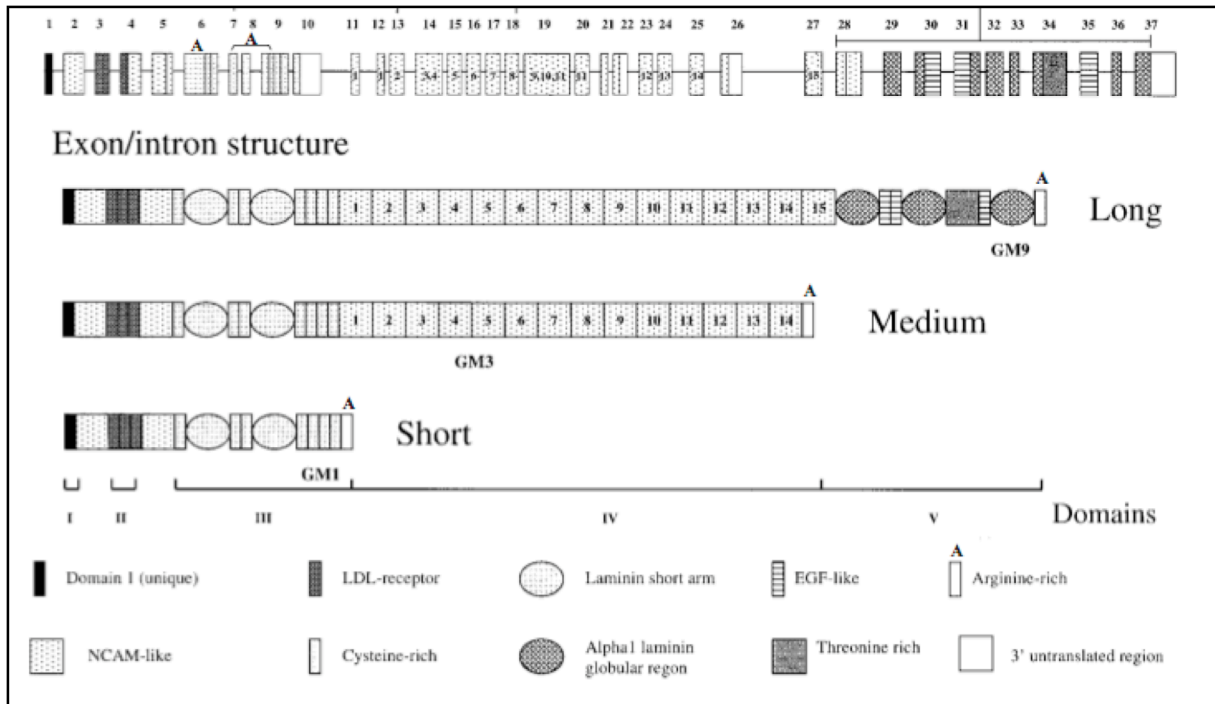
Chez la mouche *Drosophila melanogaster* l'homologue du perlecan a été identifié par un crible génétique. Ce mutant a été sélectionné pour son impact sur le développement des lobes optiques des animaux, d'où son nom, *Trol* (Terribly Reduced Optic Lobes) (366-368). *Trol* est exprimé durant toute la vie des mouches et a été observé dans un grand nombre de tissus, dont les cellules cardiaques, le mésoderme, les corps gras, dans les disques imaginaires, les cellules gliales et nerveuses (366, 368, 369). Il existe aujourd'hui plus d'une centaine d'allèles différents, allant de la létalité à des effets silencieux. Les effets les plus importants se traduisent par des anomalies de la prolifération des neuroblastes. Probablement par un lien avec la transition des différentes phases cellulaires via les facteurs de croissance mais aussi dans diverses voies régulatrices via ses différents partenaires (368, 370-372).

Chez la souris, l'inactivation du perlecan par knock-out entraîne une létalité embryonnaire due à des hémorragies. Ces hémorragies sont la résultante de la détérioration des membranes basales suites à divers stress mécaniques, appuyant les hypothèses émises sur son rôle structural vis à vis des membranes basales (373, 374). Les animaux capables de survivre aux premiers stades du développement présentent de sévères déformations osseuses, suggérant un rôle important dans la chondrogénèse (374). Les muscles semblent ne pas présenter d'anomalies majeures si ce n'est un défaut de localisation de l'acétylcholinestérase au niveau des jonctions neuromusculaires (375, 376). Des modèles présentant des anomalies moins sévères ont aussi été développés (321, 377). Stum *et al.* ont décrit une mutation ponctuelle très proche d'une mutation retrouvée chez un patient, ces souris présentent, entre autres, une myotonie due à une hyperexcitabilité des fibres musculaires. Les études réalisées avec cet animal démontrent que cette myotonie est directement liée à des problèmes d'acétylcholinestérase au niveau des jonctions neuromusculaires (321). Nous nous sommes rapprochés de cette équipe pour permettre les futures validations de molécules issues de nos cribles, mais le crible Shwartz-Jampel n'étant pas terminé, aucun partenariat n'a encore été engagé.

## **5. Le Perlecan chez *C. elegans***

L'homologue du gène HSPG2 chez *C. elegans* est nommé *unc-52* (82% d'homologie). *unc-52* est impliqué dans le développement des cellules musculaires, dans l'ancrage du disque Z (qui supporte les filaments d'actine) à la membrane basale et dans la régulation de la signalisation via des facteurs de croissance (378-380). Il existe plusieurs isoformes de la protéine, exprimées à différents stades du développement et dans différents tissus.

La **figure 35** ci-dessous schématise les 3 formes principales :

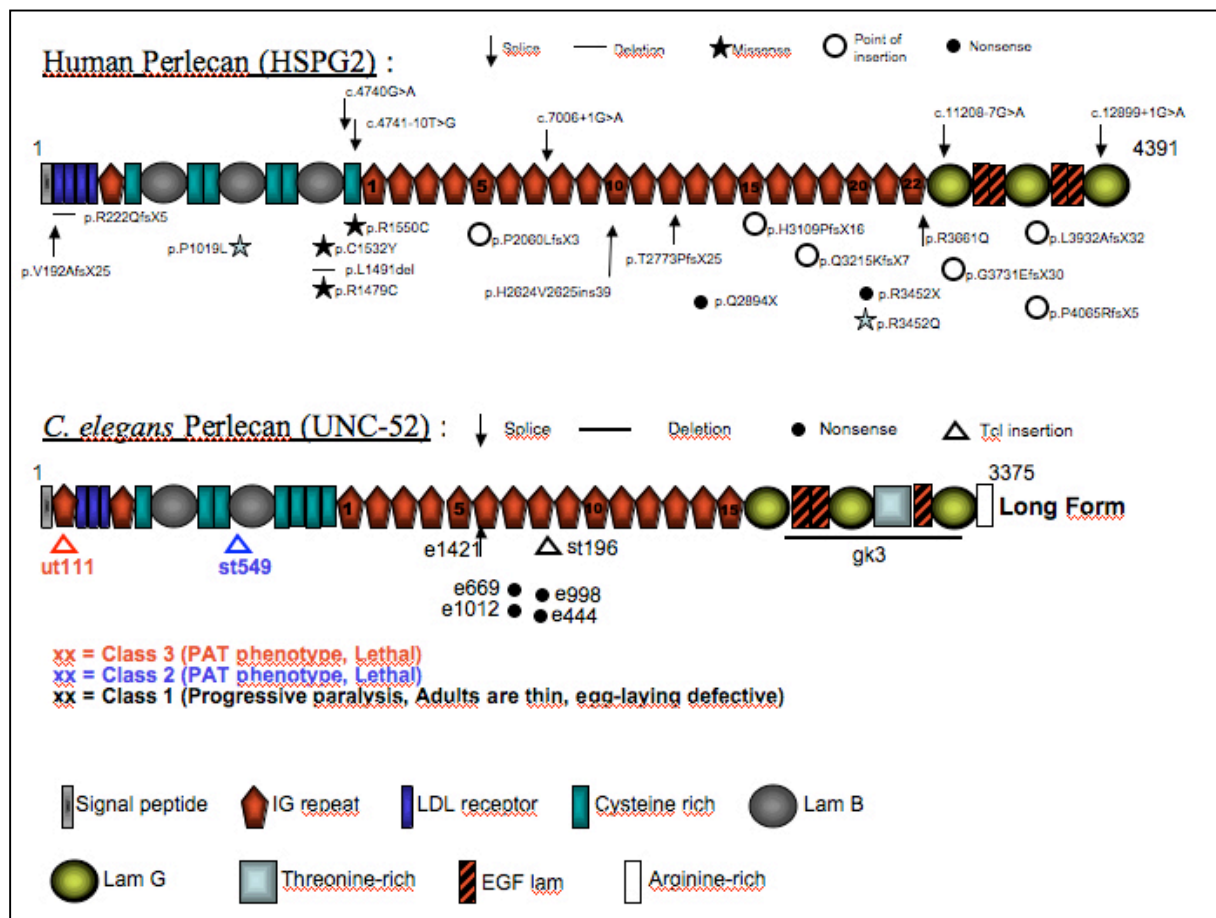


**Figure 35 : Schéma représentatif des différentes isoformes de UNC-52.** Image adaptée de Rogalski et al. (2001) (379).

Dans les embryons, la forme S est exprimée spécifiquement dans les cellules musculaires de la tête et de la queue, alors que les formes M et L ne sont présentes que dans les cellules musculaires responsables de la locomotion (Body wall muscle) (381). A l'état adulte, les formes M et L sont aussi retrouvées, en faible quantité, dans les cellules musculaires de la tête et de la queue (381).

## 6. Mutations du gène *unc-52* et conséquences chez *C. elegans*

Il existe différents allèles présentant des mutations du gène *unc-52* (figure 36). Les phénotypes liés sont variables en fonction de la zone mutée. Ces mutations peuvent être regroupées en trois classes (figure 36) (313, 378, 379).



**Figure 36 : Représentation schématique de la protéine HSPG2 et de son homologue *C. elegans* UNC-52 (les mutations connues sont schématisées) (313, 378, 379).**

Classe 1: Mutations touchant uniquement la forme M et L, les animaux présentent une paralysie progressive plus ou moins marquée en fonction de la position de la mutation, les larves sont très peu atteintes alors que les adultes sont sévèrement paralysés. Les animaux adultes sont également très fins et présentent des problèmes de ponte. Enfin un défaut d'accumulation des myofilaments a été observé dans les cellules musculaires responsables de la locomotion.

Classes 2 et 3 : Mutations proches du codon start, touchant les trois formes. Les formes M et L ne sont généralement pas détectées, la forme S est soit absente soit très faiblement exprimée. Ces mutations sont létales et se traduisent par un arrêt au stade embryonnaire (PAT phénotype, Paralyzed and Arrested elongation at Two fold).

Le choix de la souche utilisée dans nos cribles est détaillé dans le chapitre dédié au développement du crible Schwartz-Jampel.

# **MATERIELS ET METHODES DE CRIBLAGE**

## **MATERIELS ET METHODES DE CRIBLAGE**

### **I. Les molécules testées**

Les chimiothèques utilisées lors des différents cribles ont trois origines :

- i) une collection de 1120 composés, commercialisée par Prestwick Chemicals (Strasbourg, France). Ils sont, pour la plupart, déjà utilisés comme médicament chez l'humain, et couvrent un large éventail d'indications thérapeutiques,
- ii) une collection appartenant à la Faculté de Pharmacie du Campus d'Illkirch, la chimiothèque Patrimoine, constituée de 5040 composés,
- iii) une collection "locale" appartenant à l'ICBMS de Lyon (Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires) composée de 1760 composés.

Il faut noter que ces deux dernières collections chimiques font partie de la chimiothèque Nationale. La chimiothèque Nationale a été créée en 2003 et a pour but de fédérer les collections de produits de synthèse et d'extraits naturels existants dans les laboratoires publics français. La majorité des composés présents dans ces chimiothèques ont une masse moléculaire comprise entre 100 et 400 g/mol. Plusieurs critères ont orienté le choix de ces chimiothèques :

- i) utiliser, si possible, des molécules déjà validées en clinique pour permettre un accès rapide aux patients,
- ii) disposer de molécules à vocation thérapeutique,
- iii) disposer d'une grande diversité chimique pour essayer d'explorer le maximum de voies possibles.

La chimiothèque Prestwick répond aux deux premiers critères, et parallèlement les chimiothèques Patrimoine et ICBMS apportent une plus grande diversité chimique. De plus



l'utilisation de ces deux dernières entre dans un élan national ayant pour but de valoriser et caractériser les produits de la chimie médicinale universitaire française.

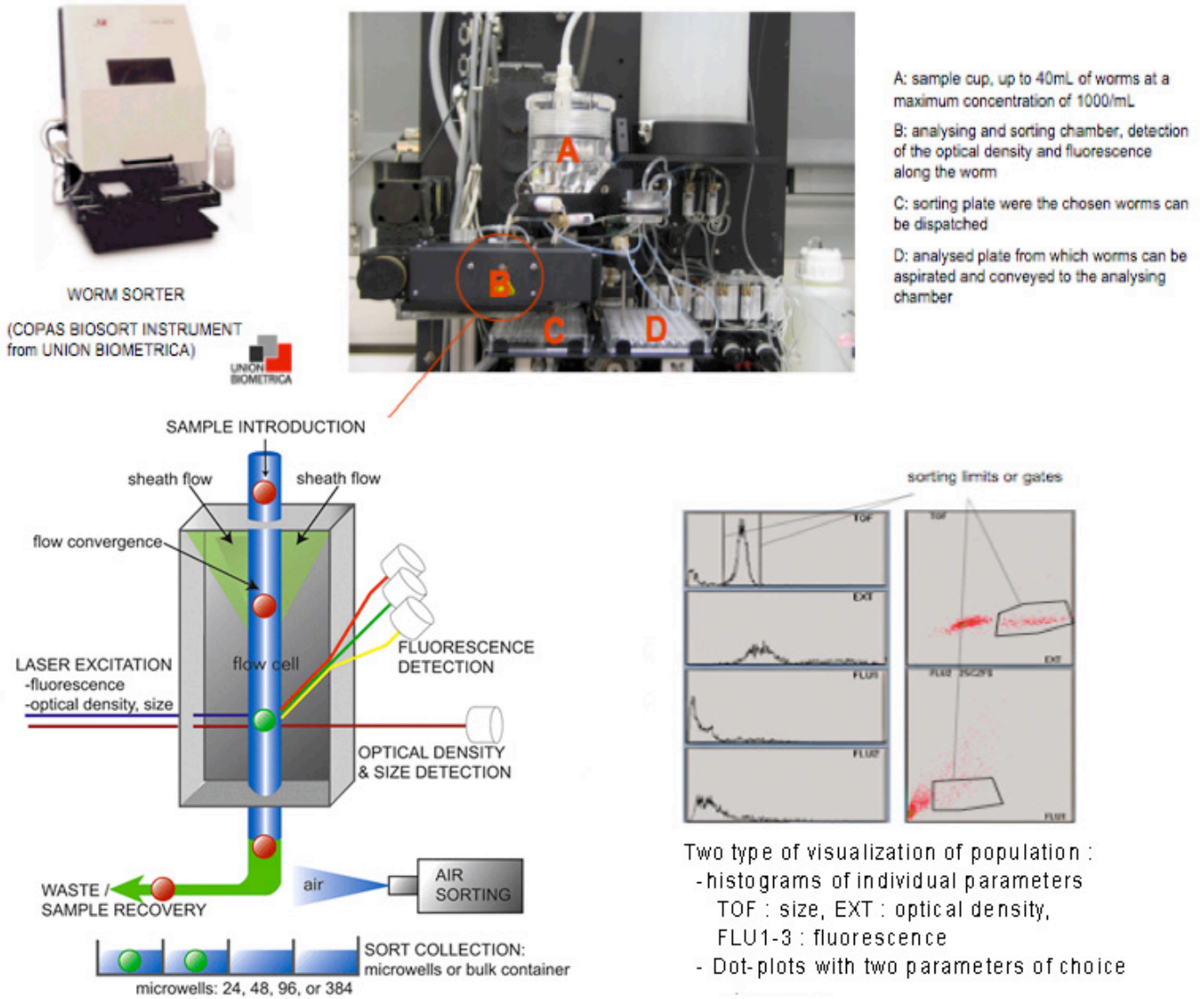
La chimiothèque Patrimoine et ICBMS se présentent en plaques 96-puits. Les colonnes correspondant aux extrémités des plaques sont vides (colonne 1 et 12), permettant un transfert vers des plaques de tests 96-puits sans gêner l'ajout de témoins. Les composés sont disponibles à raison de 30  $\mu$ l à  $10^{-2}$  M dans du DMSO (diméthylsulfoxyde). Le tout représente 63 plaques "Patrimoine" (5080 composés) et 22 plaques "ICBMS" (1760 composés).

Les composés de la chimiothèque Prestwick ont été fournis en poudre dans des tubes en verre lors de la 3<sup>e</sup> année du projet (la première version acquise par le laboratoire ne permettait pas de couvrir les nouvelles campagnes de criblages). Tous les composés ont été dissous à leur limite de solubilité et répartis dans des plaques 96-puits à l'image des plaques Nationales ; la concentration est donc différente pour chacun des composés.

## **II. Le trieur / analyseur de nématodes ou COPAS Biosort**

Au cours de la première année du projet, nous avons fait l'acquisition d'un robot trieur/analyseur de vers, le COPAS Biosort (Union Biometrica). A l'image d'un cytomètre de flux, cet appareil permet d'analyser et de trier des éléments (les nématodes) passant dans une chambre de lecture (**fig. 37**). Cette analyse est rendue possible par la présence de plusieurs lasers, capables d'analyser la taille, la densité optique et le profil fluorescent de chacun des éléments passant dans la chambre de lecture. Les profils des populations à trier sont représentés sous forme d'un dot plot, il suffit alors de définir des fenêtres de tris pour sélectionner les animaux à trier au sein de cette population. Nous pouvons alors facilement sélectionner des animaux "identiques" (âge et profil similaire) et ainsi inoculer les puits d'une plaque 96-puits de façon très homogène, reproductible et rapide. Cet outil est aussi très utile pour analyser le profil des animaux en fin de culture (les "read out"). En effet, même si le COPAS est essentiellement destiné à trier les animaux, il dispose aussi d'un module complémentaire, le "reflex", permettant d'aspirer les liquides contenus dans une plaque 96-puits et de réaliser une description numérique de tous les éléments traversant ses faisceaux optiques. Pour mettre en évidence et classer l'information recherchée, les jeux de données générés peuvent alors être traités informatiquement, avec des programmes adaptés. Dans notre cas, les différents programmes informatiques ont été créés via le logiciel "r" (<http://www.r-project.org/>).

Il faut noter que le crible DMD n'a pu bénéficier de cet outil, par contre il a été intégré avec les cribles SMN et Schwartz-Jampel.



**Figure 37 : Le COPAS Biosort.** Le COPAS Biosort ou "trieur de vers" est apparenté à un cytomètre de flux, mais dont les instruments sont adaptés au nématode *C. elegans*. Il permet de trier et/ou analyser une population de nématodes selon les critères définis par l'opérateur.

Image adaptée de site internet [www.unionbio.com](http://www.unionbio.com).

### **III. Développement des cribles**

Les cribles ont été mis au point en suivant deux objectifs principaux :

- i) Permettre de tester à une concentration unique, et en duplicat, les molécules présentes dans les chimiothèques Prestwick, Patrimoine et ICBMS dans les trois ans du projet. Nous avons environ 8000 molécules à tester par maladie, et ceci en duplicat. En considérant que chacun des essais devra comporter des témoins, nous avons donc un objectif de plus de 48000 points à effectuer sur trois ans. Pour permettre de réaliser les validations des composés positifs, les méthodes de criblage doivent donc permettre d'atteindre des débits minimums de plus de 1500 composés par mois.
- ii) Réunir les conditions expérimentales permettant de tester les composés aux concentrations les plus élevées possibles. En raison de la faible perméabilité de la cuticule du nématode, et de l'absence d'information concernant les cibles à traiter, notre stratégie consiste à tester les molécules à de fortes concentrations, et si besoin, à retester à de plus faibles doses les composés identifiés comme toxiques lors des cribles.

Pour la chimiothèque Nationale, nous disposons seulement de 30  $\mu$ l de composés, il faut donc bien définir les volumes à utiliser dans les différents cribles pour ne pas épuiser les stocks avant la fin des campagnes de criblage.

La concentration maximale que l'on peut tester avec la chimiothèque Nationale est imposée par son format de réception. En effet, les composés de la Chimiothèque Nationale sont dilués dans du DMSO à une concentration de  $10^{-2}$  M, or le nématode ne supporte pas plus de 2 % de DMSO dans le milieu, et pour ne prendre aucun risque, nous avons décidé de nous limiter à 1% DMSO. Une fois mélangées au milieu, les drogues sont donc diluées un minimum de 100 fois. Ce choix nous limite alors à une concentration de  $10^{-4}$  M finale.

Il faut noter que ce problème de concentration et de volume est moins problématique avec la chimiothèque Prestwick car nous avons pu l'obtenir en poudre, en quantité suffisante pour atteindre des doses comprises entre  $10^{-3}$  et  $10^{-2}$  M finale.

## 1. Le crible DMD

A mon arrivée au laboratoire, les souches *dys-1(cx18)* et *dys-1(cx18) ; hlh-1(cc561)* avaient déjà été développées et utilisées en routine pour étudier les différentes fonctions et les partenaires de la dystrophine, mais aussi pour tenter de comprendre les mécanismes de dégénérescence survenant en son absence. Lors de ces études, le groupe du Docteur Ségalat a conduit une expérience pilote visant à utiliser ce modèle dans des cribles pharmacologiques. Cet essai s'est traduit par des résultats enthousiasmants. En effet, sur 100 molécules testées en aveugle, la prednisone, le traitement de référence donné en soin palliatif aux patients DMD, a pu être identifiée pour ses effets bénéfiques sur notre modèle dégénératif *dys-1(cx18) ; hlh-1(cc561)*. Fort de cette preuve de concept, l'équipe de Laurent Ségalat a entrepris de cribler environ 800 composés appartenant à la chimiothèque Prestwick. Les résultats de ce crible primaire sont présentés dans le chapitre dédié aux résultats des différents cribles.

A l'époque, le protocole mis en place pour mesurer l'efficacité des molécules sur le modèle *dys-1(cx18) ; hlh-1(cc561)* ne pouvait dépasser la cadence de 30 composés par mois et nécessitait le travail d'une technicienne à temps plein. Ce crible a alors pris un peu plus de 2 ans et s'est achevé à mon arrivée. Il est donc évident que de telles conditions ne permettaient pas de remplir notre objectif ; c'est-à-dire pour la Myopathie de Duchenne, cribler les molécules appartenant à la Chimiothèque Nationale (~ 7000 composés) en moins d'un an. Mon travail, en plus de travailler sur la validation et l'analyse des composés initialement identifiés, a donc été d'adapter les conditions expérimentales pour permettre de tester rapidement les composés de la Chimiothèque Nationale. De plus, ce travail devait servir de base pour permettre de définir les éléments et les conditions nécessaires au criblage des mêmes molécules (comprenant les composés Prestwick) sur plusieurs autres maladies, dont l'amyotrophie spinale et le syndrome de Schwartz-Jampel.

Le protocole initialement établi au laboratoire se décomposait en plusieurs phases, dont quatre particulièrement fastidieuses et inadaptées à un large crible pharmacologique :

- **La préparation des milieux et les conditions de culture:** Les drogues étaient mélangées au milieu gélosé traditionnellement utilisé pour cultiver *C. elegans* (NGM, Nematode Growth Media), dans des boîtes de pétri de 60 mm. La quantité de milieu utilisée était donc importante (10 ml). Par conséquent, pour respecter la stratégie de criblage (test à  $10^{-4}$  M final pour la chimiothèque Nationale), nous aurions eu besoin de 100  $\mu$ l de composés par point d'analyse. Or, les composés

présents dans la Chimothèque Nationale sont "rares", peu abondants, et destinés à l'ensemble de la communauté scientifique ; il est donc important de ne pas les gâcher.

- **L'ensemencement des individus à traiter** : Pour obtenir des données homogènes et suffisantes, nous devons disposer en fin de culture d'animaux de même âge et en nombre suffisant (minimum 30 animaux par condition). Pour répondre à ce besoin, l'ensemencement se réalisait par un dépôt manuel d'animaux adultes (F0) sur chacune des boîtes obtenues. Le lendemain, ces animaux F0 étaient retirés un à un, laissant sur le milieu gélosé les oeufs pondus sur la nuit. Ces oeufs correspondent à la génération F1 à analyser au stade adulte.

- **La mise en évidence des tissus musculaires** : Après un temps d'incubation approprié, les animaux F1 étaient récupérés manuellement, lavés et colorés pour révéler les filaments d'actine (coloration phalloïdine-rhodamine) (**figure 29**). Cette méthode est longue et coûteuse.

- **Le comptage manuel du nombre de cellules musculaires manquantes** : Les animaux colorés étaient ensuite montés entre lames et lamelles et observés au microscope. Le nombre de cellules musculaires absentes permettait alors de quantifier la dégénérescence et d'établir un classement (pour rappel, voir la **figure 29**).

Le but des optimisations sur le modèle DMD consistait donc à :

- Miniaturiser les essais et ainsi diminuer la quantité de drogues à utiliser.
- Réduire le nombre d'étapes nécessaires à la mise en évidence de la dégénérescence musculaire.

Ce travail de mise au point est long et demande de nombreuses étapes pour être validé. Les différents résultats obtenus lors de l'optimisation de chaque étape ne seront pas présentés pour alléger le manuscrit, néanmoins les stratégies développées et utilisées lors du crible sont décrites dans les paragraphes suivants. Le protocole établi à la suite des optimisations est présenté en **annexe 1**.

Pour rappel, les animaux *dys-1(cx18)* ; *hlh-1(cc561)* présentent une perte progressive et quantifiable de cellules musculaires se traduisant par une paralysie à l'âge adulte (**247**). Ce

modèle expérimental présente deux difficultés pour le criblage : premièrement, les cultures doivent être parfaitement synchrones pour éviter d'obtenir de faux positifs qui seraient dus à un décalage temporel (animaux plus jeunes); deuxièmement, le test ne peut être réalisé en culture liquide car aucune dégénérescence n'a pu être détectée dans les essais basés sur ce type de milieu. Il est probable que cette absence de dégénérescence en milieu liquide soit due à une absence de contraintes physiques lors des mouvements des animaux ; il a d'ailleurs été montré que le phénotype de dégénérescence est dépendant de l'activité musculaire des animaux (180, 382).

- **Les conditions de culture et la préparation des milieux :**

Ne pouvant travailler en culture liquide et désirant réduire les volumes utilisés au minimum, nous avons tenté de travailler avec un milieu gélosé en plaques 96-puits. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à réunir les conditions nécessaires à la culture d'un nombre suffisant de nématodes (>30) par puits dans ces conditions. Nous nous sommes alors rabattus sur une culture en plaque 24-puits avec 1 ml de milieu (NGM) par puits. Cette approche nous oblige à utiliser 10  $\mu$ l de composés à 10<sup>-2</sup> M pour respecter les règles fixées (1 % DMSO, concentration finale maximale).

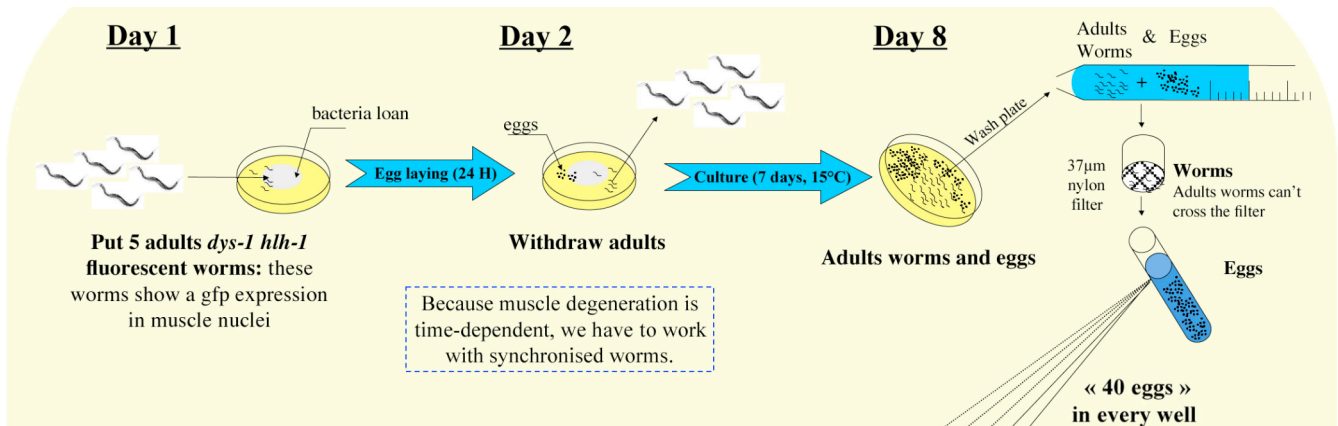
Nous n'avons pas pu réduire la quantité de milieu à moins de 1 ml sans rencontrer des problèmes liés à l'évaporation. En effet, l'eau contenue dans les milieux s'évapore au fur et à mesure de la culture, et cette évaporation est d'autant plus importante que les puits sont proches des bords de la plaque ; par conséquent, les sels, les composés et le DMSO finissent par se concentrer de façon différente en fonction de la position des puits. Les résultats obtenus lors de ces essais étaient hétérogènes, allant de la mort de certains individus à des retards de croissance en fonction des puits.

Les composés ont finalement été mélangés à raison de 10  $\mu$ l à 10<sup>-2</sup> M pour 1 ml de milieu de culture. Ils ont donc été testés à 10<sup>-4</sup> M final.

- **L'ensemencement des individus à traiter :**

En absence du robot trieur (COPAS Biosort), l'élimination de cette étape fastidieuse et consommatrice en temps de manipulation n'était pas simple. Après plusieurs tentatives nous avons développé une méthode basée sur une filtration sur nylon, schématisée sur la **figure 38**. Cinq adultes double mutants sont déposés sur une boîte de culture traditionnelle le jour 0, les animaux sont alors retirés le lendemain (J1), laissant sur les boîtes 200 à 300 oeufs stadés. Cinq jours plus tard (15°C), les oeufs sont devenus des adultes en pleine ponte. A raison d'une centaines d'oeufs par adulte, nous obtenons plus de 20000 oeufs avec une seule boîte de culture. Après avoir été lavés, les oeufs sont séparés des adultes via un filtre 37  $\mu$ m.

Finalement, il suffit d'inoculer 50  $\mu$ l, par puits, de la solution ainsi préparée pour obtenir 40 à 60 individus stadés en fin de culture. Cette technique reste tout de même imparfaite et surtout approximative si on la compare aux ensemencements réalisés par le robot trieur lors des cribles suivants.



**Figure 38 : Préparation d'un grand nombre d'oeufs stadés (15°C).**

- **La mise en évidence des tissus musculaires et évaluation de la dégénérescence :**

En fin de culture, les muscles des animaux étaient systématiquement colorés avec un marqueur de l'actine (phalloïdine), et observés au microscope pour quantifier la dégénérescence. Comme dit précédemment, cette étape est longue et coûteuse. Pour l'éliminer, nous avons alors tenté de mettre en évidence la musculature des animaux *in vivo* par fluorescence. Malheureusement, aucune lignée capable d'exprimer des marqueurs fluorescents dans le cytoplasme des cellules musculaires n'a pu être obtenue, suggérant un effet létal ou incompetent des constructions utilisées. Nos efforts se sont alors rapidement tournés vers une souche préalablement obtenue au laboratoire, la souche LS761. Cette souche est issue d'un croisement entre notre double mutant *dys-1(cx18)*, *hlh-1(cc561)* et la souche PD4251 qui est capable d'exprimer la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) spécifiquement dans les noyaux et les mitochondries des cellules musculaires des animaux. Les animaux PD4251 présentent un fond génétique sauvage dans lequel ont été intégrés deux transgènes : *pSAK2*, *myo-3::GFP* permettant l'expression de GFP dans les noyaux des cellules musculaires et *pSAK4*, *myo3::GFP* permettant l'expression de GFP dans les mitochondries de ces mêmes cellules. La souche LS761 présente donc des cellules musculaires avec des mitochondries et des noyaux fluorescents (**fig. 39**). La GFP localisée dans les mitochondries n'est quasiment pas détectable avec les outils traditionnellement utilisés au laboratoire, seul un microscope confocal a permis d'observer précisément sa

distribution. Par contre, la GFP localisée dans les noyaux est tout à fait visible à un simple grossissement de 40 fois.

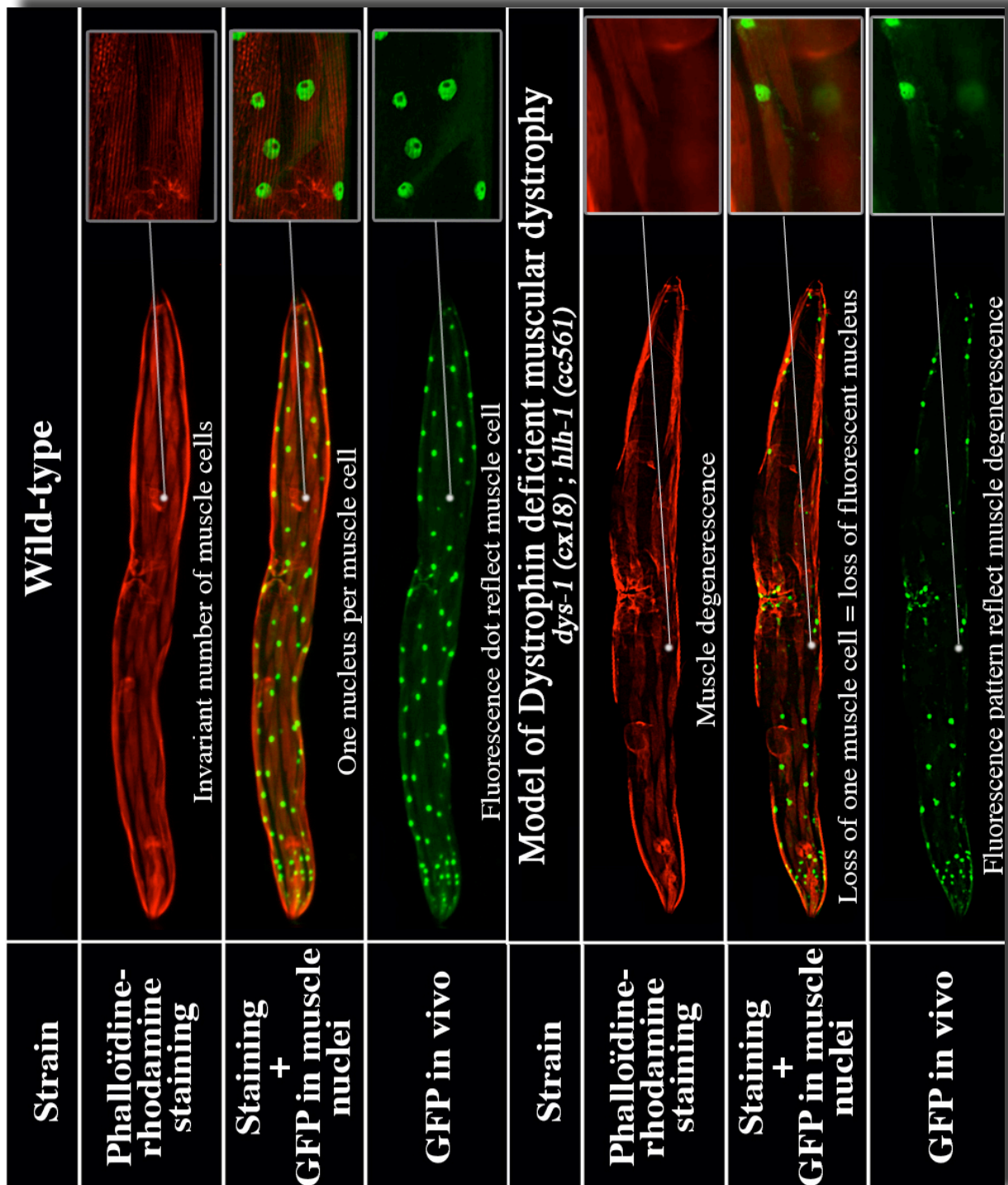


Figure 39 : Expression de la protéine GFP dans les noyaux des cellules musculaires de *C. elegans*. Comme mis en évidence sur cette figure, le profil GFP des animaux reflète leur musculature. Par conséquent, l'évaluation de l'état de dégénérescence de notre souche *dys-1(cx18) ; hlh-1(cx18)* peut se faire *in vivo* via une loupe à fluorescence. Nous pouvons alors évaluer, simultanément, la motricité des animaux et l'état de leur musculature.



Des analyses cinétiques, non présentées dans ce manuscrit, ont montré que la diminution de la fluorescence d'origine nucléaire est corrélée avec l'apparition des atteintes musculaires. De plus, le nombre de spots fluorescents (= noyaux) observés dans les souches PD4251 et LS761 est représentatif du nombre de cellules musculaires présentes dans l'animal, et ceci pour quatre raisons essentielles :

- i) Les cellules musculaires des nématodes sont présentes en nombre invariant.
- ii) Les cellules sont uninucléées.
- iii) Les cellules ne fusionnent pas.
- iv) Il n'existe pas de processus régénératif chez *C. elegans*. Par conséquent une cellule abîmée, ou absente, ne sera pas remplacée.

L'utilisation de la souche LS761 permet donc d'observer l'état de la musculature des animaux sans réaliser de coloration spécifique. De plus, cette observation peut se réaliser *in vivo*.

Finalement, pour évaluer le potentiel des composés testés, nous évaluons qualitativement la motricité et le profil fluorescent des animaux en culture par l'intermédiaire d'une loupe à fluorescence (LUMAR V12 de LEICA). Les composés les plus actifs sont alors sélectionnés pour des analyses supplémentaires.

L'ensemble des améliorations apportées au protocole initial a permis d'atteindre un débit de plus de 1600 composés par mois, multipliant par plus de 50 les débits du procédé initial. Chaque plaque 24-puits présente 20 puits tests et 4 puits témoins dont 2 consacrés au témoin négatif (souche LS761 traitée avec le solvant, ici le DMSO) et 2 consacrés au témoin positif (souche LS761 traité à la méthazolamide, un composé préalablement identifié dans la chimiothèque Prestwick).

La **figure 40** ci-après schématise les différentes étapes de ce nouveau protocole. Les détails de ce dernier peuvent être consultés dans les annexes.

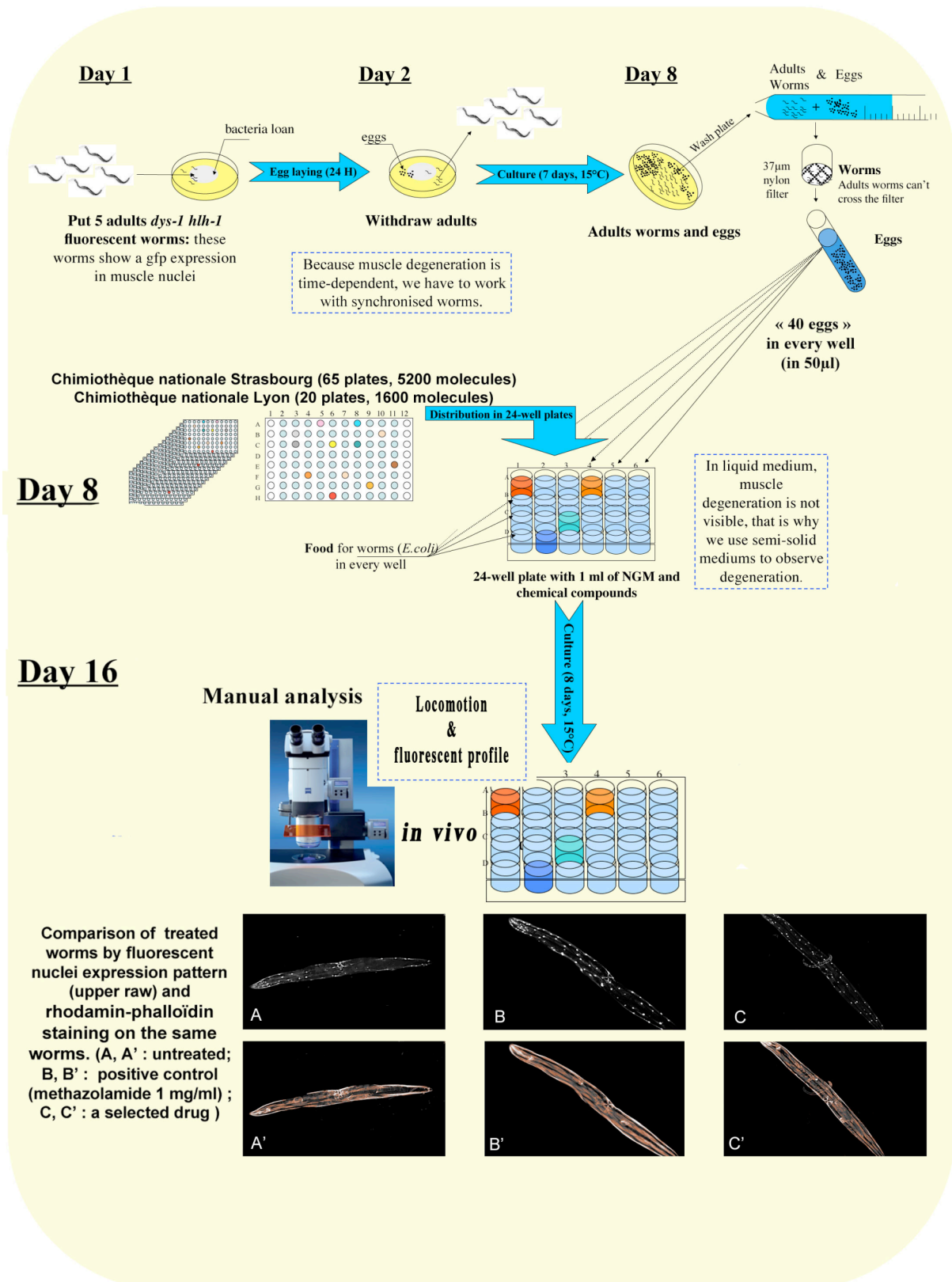


Figure 40 : Protocole permettant d'évaluer la dégénérescence musculaire des animaux *dys-1(cx18) ; hlh-1(cc561)* avec un débit >1500 composés par mois.

## 2. Le crible SMA

Ce chapitre présente la mise au point du crible visant à tester les différentes molécules des chimiothèques Prestwick, Nationale et ICBMS, pour leurs capacités à réduire les atteintes observées après inactivation du gène *smn-1* chez le nématode.

Comme présenté dans l'introduction bibliographique, le gène *smn-1* chez *C. elegans* partage une forte homologie avec son homologue humain *SMN1*, notamment au niveau des domaines connus pour se lier aux ARNm et à certaines protéines antiapoptotiques, tel que *bcl-2* (*ced-9* chez *C. elegans*). Antérieurement, deux approches ont été entreprises pour inactiver le gène *smn-1* :

- i) par RNA interférence via l'injection d'un plasmide *smn-1* spécifique.
- ii) par knock out grâce à l'allèle *ok355*.

Dans les deux cas, les animaux présentent des défauts de fertilité (dus à un défaut de mise en place des gonades), couplés à une létalité embryonnaire des quelques oeufs pondus. La présence de la délétion *ok355* à l'état homozygote entraîne en plus des défauts de motricité apparaissant de façon progressive avec l'âge des individus (309).

Néanmoins, l'utilisation de mutants portant l'allèle *ok355* a été exclue, et cela pour deux raisons : i) la létalité entraînée par l'absence de protéine SMN-1 nous oblige à travailler avec la souche hétérozygote balancée (LM99), ce qui complexifie considérablement la mise au point des essais, ii) la délétion *ok355* s'étend en amont du gène *smn-1*, touchant les séquences régulatrices du gène *klp-16* (fig. 32) ; or, nous ne pouvons affirmer à ce jour que la dérégulation de ce gène ne joue pas un rôle dans les troubles moteurs observés (309).

A l'inverse, l'utilisation des techniques RNAi permet de cibler spécifiquement *smn-1*, et ainsi diminuer la quantité de protéine SMN-1 sans pour autant l'abolir complètement. De plus, en délivrant les doubles brins d'ARN au travers de la nourriture au lieu d'utiliser des techniques d'injection, nous pouvons travailler, sans contraintes, avec des animaux à fond génétique sauvage qui seront traités après les premiers stades du développement et durant le reste de leur vie. La létalité embryonnaire touchera alors uniquement la descendance. Il faut tenir compte que ces atteintes semblent éloignées des troubles observés chez les patients SMA. Néanmoins, partant du principe que la dégénérescence observée chez les patients SMA est essentiellement due à une perte de fonction en raison de la diminution de la quantité de protéine SMN, et que le phénotype de létalité embryonnaire chez *C. elegans* est décrit comme dépendant des deux fonctions supposées critiques chez SMN : i) sa capacité à se lier aux ARN, ii) sa relation avec les composés anti-apoptotiques (306, 307); nous pouvons nous attendre à mettre en évidence des composés susceptibles de compenser ses fonctions. Enfin,

vu que les techniques RNAi chez *C. elegans* n'entraînent qu'une inactivation partielle des gènes ciblés, nous pouvons aussi nous attendre à identifier des composés capables de promouvoir l'expression d'une quantité plus importante de SMN-1.

Nous avons alors entrepris d'inactiver *smn-1* en donnant à manger aux animaux des bactéries préalablement transformées avec un plasmide capable de produire un double brin d'ARN spécifique du transcrite *smn-1*. Cette technique est couramment utilisée chez *C. elegans*, et aboutit à une réduction du transcrite endogène complémentaire des doubles brins produits par les bactéries ingérées (22). Le clone contenant le plasmide spécifique de *smn-1* a été obtenu via la banque de clones RNAi dont nous disposons (geneservice). La construction présente dans ce clone a été vérifiée avant les essais, par contre nous avons été incapables de mesurer le niveau de diminution de l'ARNm *smn-1* dans les animaux traités. En effet, le double brin d'ARN produit par le vecteur recouvre la quasi totalité du transcrite endogène *smn-1*, il n'a donc pas été possible de dessiner des amorces spécifiques du transcrite *smn-1* endogène.

Finalement les essais menés avec ce clone bactérien ont permis de reproduire le phénotype de stérilité et de létalité embryonnaire observé par Miguel-Aliaga (1999) (306). De plus, ce phénotype est très pénétrant, les animaux traités dès le stade larvaire sont pour la plupart stériles ou produisent de rares oeufs incapables de se développer.

Il faut noter que, par rapport aux observations de Miguel-Aliaga *et al.*, nous avons aussi observé un défaut de développement des individus lors des traitements RNAi, se traduisant par un fort retard de croissance couplé à des animaux de taille légèrement réduite au stade adulte.

Nous avons donc plusieurs paramètres permettant de mesurer le degré d'atteinte des animaux dont le gène *smn-1* est inactivé :

- i) la capacité des animaux à produire une descendance,
- ii) la taille des animaux et leur vitesse de croissance.

Lors des mises au point, nous avons décidé de nous concentrer sur le phénotype de stérilité et de létalité embryonnaire car ils sont simples à évaluer manuellement. Néanmoins, nous avons acquis le robot trieur/analyseur au cours de la mise en place de ce crible ; nous avons alors couplé cette observation manuelle à une analyse automatisée des éléments présents dans les puits. Les fichiers générés par l'automate, après traitement avec un

programme approprié (**annexe 3**), nous renseignent sur la taille des individus et le nombre approximatif de larves présentes dans les puits. Les défauts de vitesse de croissance sont, par contre, difficiles à évaluer avec les conditions définies dans le protocole final.

Finalement, les différents essais réalisés ont permis de définir les conditions nécessaires à une culture en plaque 96-puits à raison de 150  $\mu$ l de milieu liquide par puits. Il faut noter que par rapport aux cultures classiques sur milieu gélosé, la culture des animaux en liquide demande une parfaite maîtrise des conditions expérimentales. En effet, le volume final, l'agitation, la disponibilité de l'oxygène, la concentration en cholestérol et en nourriture sont des éléments critiques qui peuvent conduire à de grandes variations en fin de culture, tel que des différences de vitesse de croissance, des variations de la densité optique des animaux, des dépôts bactériens gênant l'analyse et même la mort de populations entières. Les conditions et le matériel donnant les meilleurs résultats sont consultables en **annexe 2**, et utilisables librement pour réaliser ce type de culture avec ou sans RNAi.

En vue de faciliter l'analyse automatique, la souche sauvage utilisée lors de la mise au point des essais a été remplacée par la souche PD4251 précédemment présentée. Cette souche présente l'avantage de se comporter comme la souche sauvage tout en permettant une meilleure identification des individus présents dans les puits lors de l'analyse automatique. En effet, le robot trieur/analyseur enregistre des informations pour tout élément traversant ses faisceaux optiques, et malheureusement ce type de culture génère beaucoup de débris, notamment des flocculats bactériens, identifiés comme des éléments à analyser, faussant ainsi l'analyse. La présence de la fluorescence nous permet donc de discriminer les nématodes (fluorescents) parmi tous les éléments enregistrés par l'automate.

Pour réaliser les essais, 1,5  $\mu$ l de composés à  $10^{-2}$  M sont ajoutés dans les 150  $\mu$ L de culture. Les composés du pool National sont donc testés à raison de  $10^{-4}$  M final, et ceci en duplicat.

Afin de disposer d'un témoin positif, différentes molécules suspectées pour leur potentiel contre les SMA, dont l'acide valproïque et le riluzol, ont été testées. Malheureusement aucune n'a présenté d'effet bénéfique sur notre modèle. En absence de composés actifs, nous avons alors utilisé la souche PD4251 sans traitement RNAi comme témoin positif. Ces animaux sont nourris avec les mêmes bactéries servant à réaliser le RNAi (souche L4440), la seule

différence est que le vecteur inductible porté par ces bactéries est vide, et ne produit donc pas d'ARNdb.

Enfin, pour s'assurer que les processus RNAi sont efficaces lors du criblage, nous inactivons le gène *pos-1* par les mêmes procédés RNAi. Le gène *pos-1* est un gène bloquant les premières divisions cellulaires lorsqu'il est inactivé et couramment utilisé comme témoin d'efficacité RNAi par la communauté scientifique travaillant sur *C. elegans*.

Au final, le procédé consiste à traiter de très jeunes animaux (premier stade larvaire) jusqu'au stade adulte. Une fois la maturité sexuelle atteinte, nous analysons leur capacité à donner une descendance viable, ce qui pourrait témoigner d'une compensation des fonctions SMN-1 par le traitement. En parallèle nous analysons la taille des individus grâce à un traitement informatique des jeux de données générés par le robot (programme consultable en **annexe 3**). Le programme a été écrit avec l'aide de Mohamed Triba, un post-doctorant de notre équipe.

Le protocole mis en place est consultable en **annexe 2** et schématisé dans la **figure 41** qui suit. Il permet un débit de plus de 2000 composés par mois et consiste à :

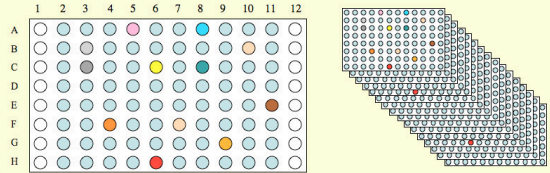
- Préparer les plaques de culture contenant
  - 80 puits tests (RNAi *smn-1* + drogue)
  - 4 puits témoins d'efficacité RNAi (RNAi *pos-1* + DMSO)
  - 4 puits témoins négatifs (RNAi *smn-1* + DMSO)
  - 8 puits témoins positifs (Vecteur vide + DMSO).
- Déposer trois larves 11 PD4251 par puits, via le robot trieur/analyseur.
- Incuber les plaques 6 jours selon les conditions définies dans le protocole (Maturité sexuelle au 5<sup>e</sup> jour) (**annexe 2**).
- Observer manuellement chaque plaque, et identifier les puits présentant une descendance.
- Analyser ces mêmes plaques avec le COPAS.
- Traiter les jeux de données via le programme élaboré au laboratoire pour comparer la taille des individus (**Annexe 3**).

**Day 0**

prepare plates: In each well

- 300µL of RNAi bacteria in M9 plus cholesterol (growing medium)
- 3µL of drugs from the chemical libraries in columns 2 to 11 (80 drugs tested per plate)
- split in two duplicate plates, each containing 150µL of growing medium+drug per well
- worm sorter sorts 3 PD4251 young larvae (L1) per well

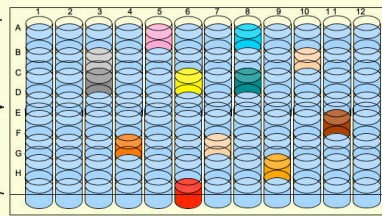
National chemical library (65 plates, 80 drugs per plate)  
 Lyon chemical library (20 plates, 80 drugs per plate)  
 Prestwick Chemical library (14 plates, 80 drugs per plate)



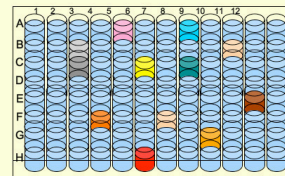
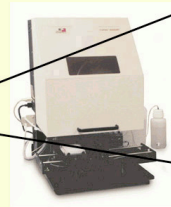
RNAi culture (*smn-1*, *pos-1*, or empty vector)

3 worms PD4251 (L1) per wells

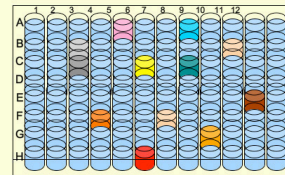
A1 to D1: *pos-1* RNAi bacteria = RNAi control  
 E1 to H1: *smn-1* RNAi bacteria without drug = *smn-1* control



A12 to H12: RNAi bacteria with an empty vector = wild-type control



Duplicate



6 days at 23°C, 650-700 rpm

**Day 6** observe and analyse plates:

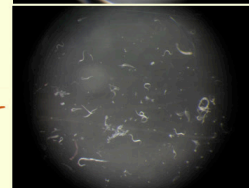
- Verify the controls are OK:
  - no offspring in *pos-1* RNAi treated wells
  - no offspring in *smn-1* RNAi treated wells
  - 30 to 70 L2 to L3 2nd generation offspring in positive control wells
- Observe test wells and identify wells with offspring
- Analyse the number and length of the objects present in the wells with the worm sorter

No effect



No offspring

Hit



offspring

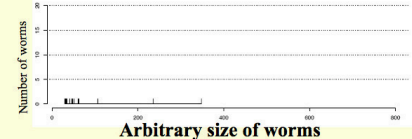
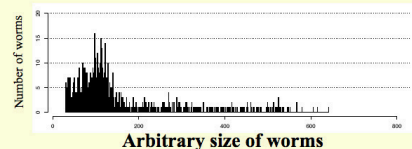
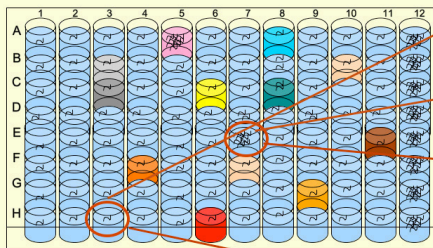


Figure 41 : Représentation schématique du crible SMA.

### 3. Le crible Schwartz-Jampel

Comme pour les autres maladies, ce chapitre présente le modèle et la stratégie mise en place pour rechercher des composés chimiques susceptibles de compenser les atteintes liées à un défaut de Perlecan, la protéine impliquée dans le syndrome de Schwartz-Jampel.

Comme présenté en introduction et dans les **figures 35 & 36**, le gène *unc-52*, l'homologue *C. elegans* du perlecan, s'exprime sous trois isoformes de longueur variable, une forme courte nommée S, une forme moyenne M et une forme longue L. Ses mutations peuvent être classées en 3 classes en fonction de la forme qu'elles touchent et du phénotype qu'elles induisent.

Classe 1: Mutations touchant uniquement les formes M et L, les animaux présentent une paralysie progressive plus ou moins marquée. Les animaux adultes, en plus d'être paralysés, sont très fins et pondent très peu d'oeufs.

Classes 2 et 3 : Mutations proches du codon start, touchant les trois formes. Ces mutations sont létales à l'état homozygote et se traduisent par un arrêt au stade embryonnaire (PAT phénotype).

L'utilisation des allèles appartenant aux classes 2 et 3 n'a pas été envisagée en raison de la létalité qu'ils induisent. Cette létalité nous aurait forcé à travailler avec une souche hétérozygote, ce qui aurait complexifié la mise au point et le déroulement des cribles. Nous nous sommes alors intéressés aux mutants de classe 1. Les allèles *e1421*, *e998* et *e444* sont connus pour entraîner une paralysie sévère par rapport aux autres allèles disponibles de cette même classe (**379, 383**). Nous avons alors entrepris de phénotyper ces souches pour déterminer laquelle serait la plus appropriée pour réaliser le criblage.

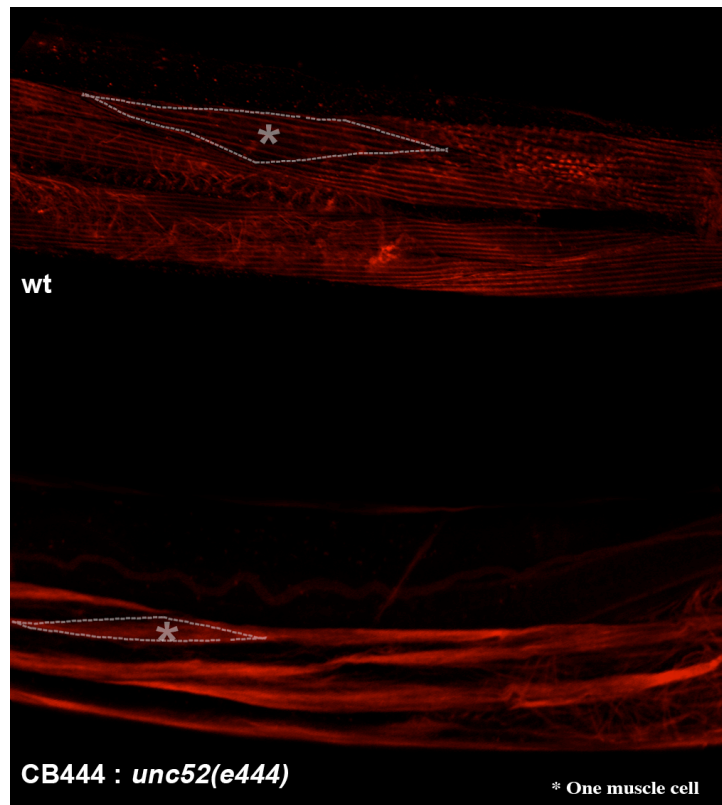
Après avoir observé le phénotype des souches CB1421 (allèle *e1421*), CB998 (allèle *e998*) et CB444 (allèle *e444*), nous avons retenu la souche CB444 car son phénotype était plus marqué et plus homogène lors de nos essais préliminaires. La mutation non-sens *e444* se traduit par une protéine tronquée en son milieu (R1811X) (**fig. 36**).

Cultivés sur un milieu solide, ces animaux se développent à la même vitesse que les vers sauvages. Par contre, ces mutants sont plus courts, plus fins et plus transparents. Ils présentent une locomotion normale jusqu'au stade L4 (dernier stade larvaire avant l'âge adulte). Au stade L4, les animaux deviennent progressivement paralysés jusqu'à être incapables de se déplacer



au stade adulte, leur tête et leur queue restant mobiles. Ces observations sont concordantes avec les observations de Mullen *et al.* (1999), qui montrent que dans cette souche, UNC-52 est très faiblement exprimé voire absent dans les cellules musculaires longitudinales alors qu'il est détecté sous la forme S dans les cellules musculaires de la tête et de la queue (381).

Les images suivantes, obtenues par microscopie après une coloration phalloïdine sur des animaux adultes, mettent en évidence les muscles de la souche CB444 (*unc52(e444)*) (fig. 42).

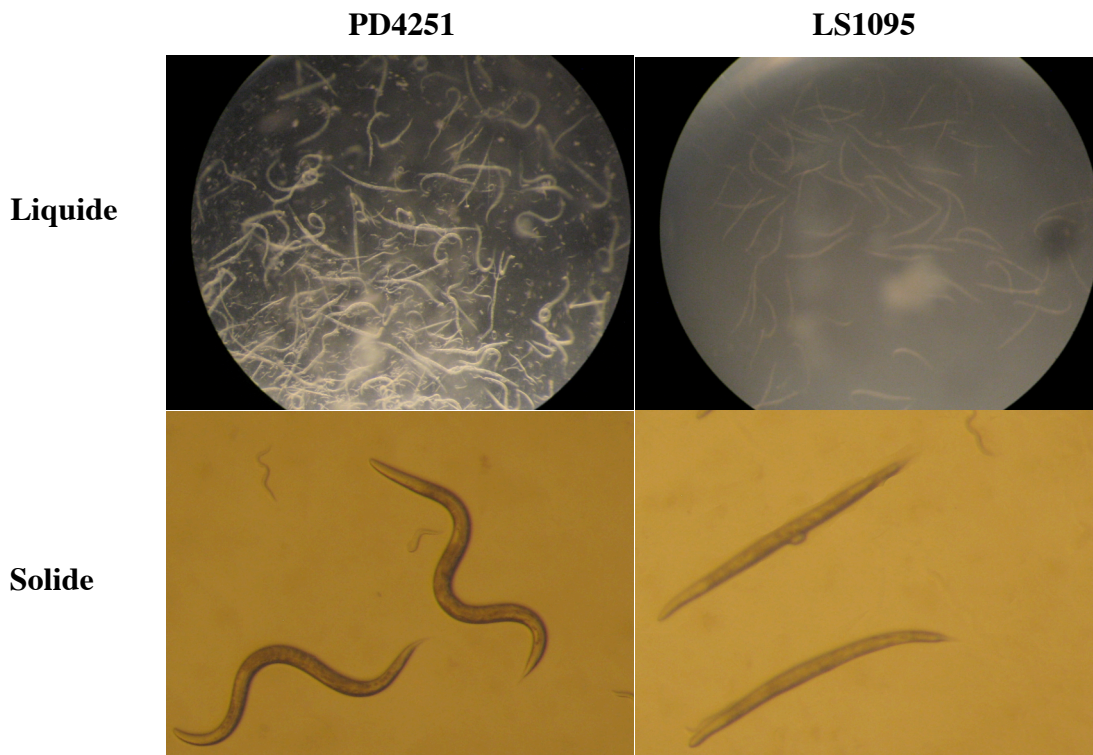


**Figure 42 : Image représentative des muscles d'un animal adulte sauvage et d'un mutant CB444, observé en microscopie confocale après une coloration phalloïdine. Les cellules musculaires des animaux adultes CB444 apparaissent désorganisées et détachées les unes des autres. \* : une cellule musculaire.**

Par rapport aux animaux sauvages, les cellules musculaires responsables de la motricité des mutants CB444 apparaissent très fines, reflétant un problème d'organisation de l'actine. De plus, au stade adulte ces cellules semblent se détacher les unes des autres, le muscle perd alors tout rôle fonctionnel. Rogalski *et al.* ont aussi montré que les mutants de

classe 1 présentent des problèmes d'organisation des sarcomères avec des "dense bodies" fracturés (383). Ces observations sont en accord avec les hypothèses attribuant un rôle structural et stabilisateur du perlecan au niveau des interactions cellule-cellule et cellule-matrice (380, 384, 385). L'impact de ces mutations sur l'activité des acétylcholinestérases n'a pas été étudié chez *C. elegans*.

En culture liquide, le temps de génération de ces mutants reste inchangé par rapport aux vers sauvages, par contre la différence de taille observée en solide n'a pas été détectée dans les conditions testées. La paralysie s'installe au même stade du développement (L4), néanmoins, cette paralysie est plus difficile à observer en milieu liquide. Les animaux oscillent de façon très similaire aux animaux sauvages, probablement en raison de l'absence de contraintes imposées par le milieu. Pour se rendre compte de leurs atteintes, les animaux doivent être transférés sur un milieu solide (fig. 43). Leurs mouvements (sinusoïdes) sont alors extrêmement désordonnés, voire inexistants, et les animaux ont peine à se déplacer. Tout comme décrit précédemment, leur tête et leur queue restent mobiles.



**Figure 43 : Animaux adultes au 4<sup>e</sup> jour de culture liquide à 23°C.** Les animaux LS1095 ont une mobilité proche des témoins PD4251. Déposés sur des milieux solides (NGM), la différence de mobilité est facilement observable. A partir du 5<sup>e</sup> jour à 23°C, les mutants sont quasiment incapables de se déplacer.

Dans le but de permettre une quantification automatisée du degré d'atteinte des animaux, nous avons croisé la souche CB444 avec la souche PD4251. La souche obtenue a été nommée LS1095. L'analyse de son profil fluorescent met en évidence une importante différence d'intensité de fluorescence des noyaux des cellules musculaires par rapport à ceux de la souche sauvage transformée par les mêmes plasmides (**Fig. 44**). Cette différence de fluorescence est observable aussi bien en solide qu'en liquide. Par contre la fluorescence des noyaux des cellules musculaires de la tête, de la queue et de la vulve restent relativement bien marquées, ce qui est en accord avec les descriptions précédentes (**379**).

Tout comme la paralysie et les atteintes musculaires, cette différence de fluorescence observée entre les animaux sauvages et les mutants n'est pas détectable durant les premiers stades larvaires. Elle apparaît au stade L4 et croît progressivement avec l'âge des individus. La fluorescence de noyaux musculaires reflète donc la progression des atteintes. Par contre, une fois à maturité sexuelle (au 5<sup>o</sup> jour dans nos essais), cette différence finit par s'atténuer et ne reflète plus la progression de la maladie (**fig. 45 et 46**). En effet, les atteintes musculaires, au stade adulte, empêchent l'animal de pondre ses oeufs, par conséquent, ces derniers s'accumulent et finissent par se développer au sein du nématode (**fig. 46**). La fluorescence des larves est alors prise en compte par le robot et fausse ainsi l'analyse des spectres fluorescents de chaque individu.

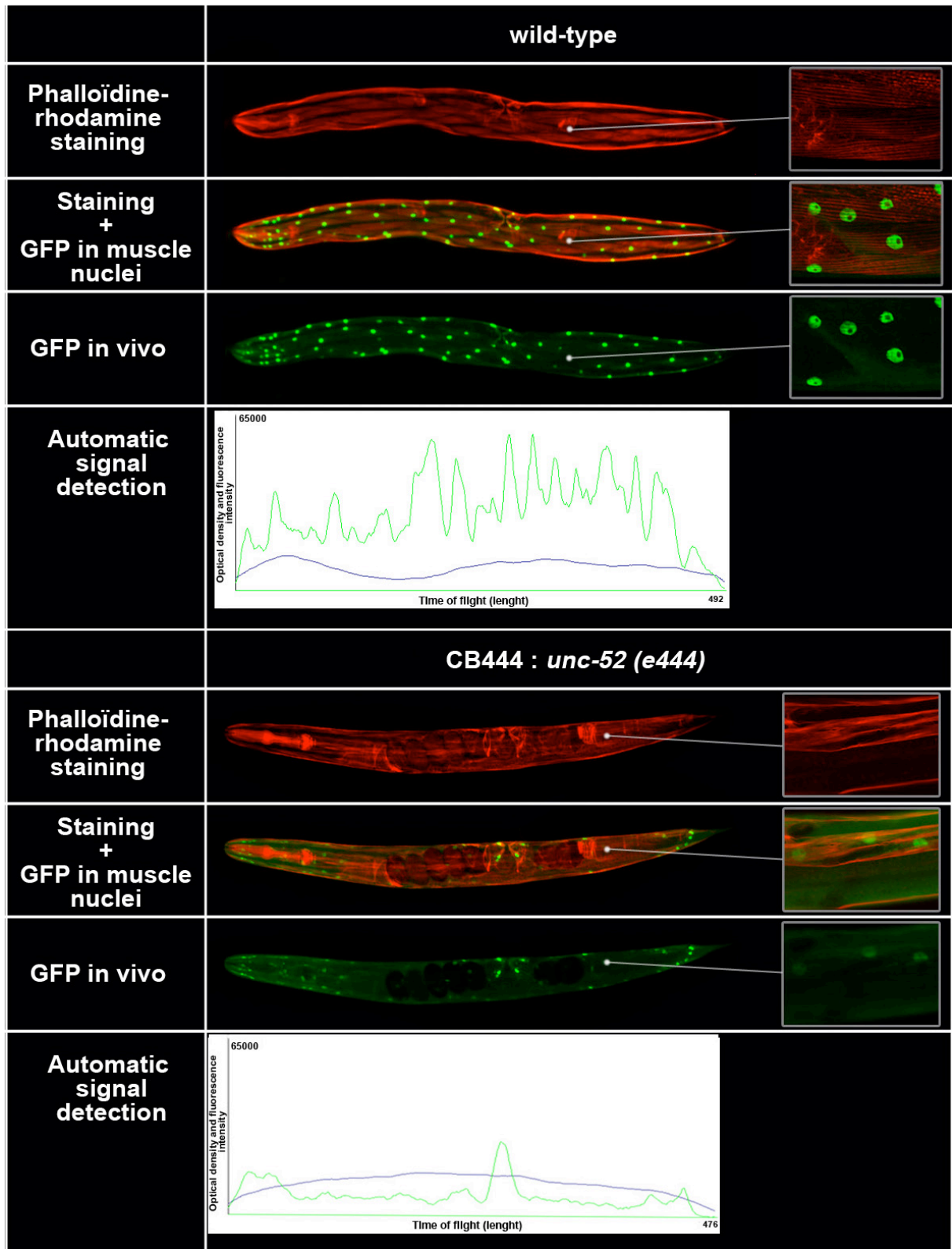
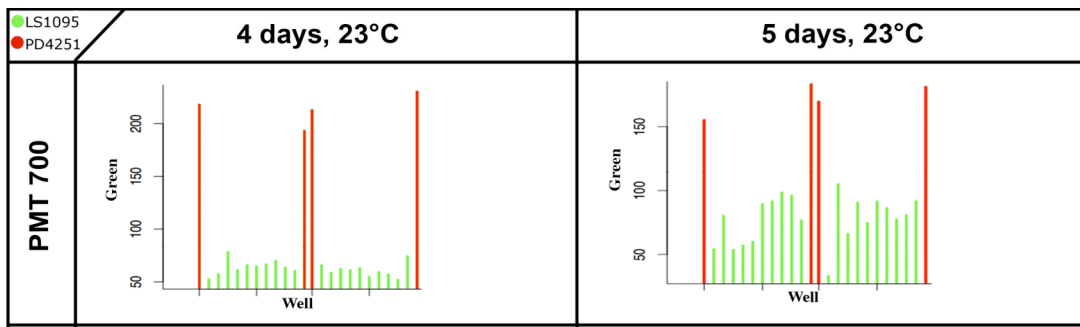
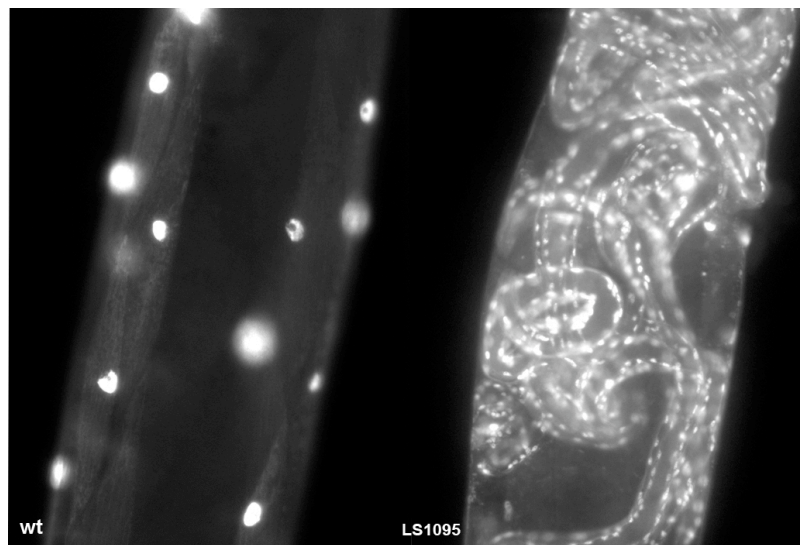


Figure 44 : Comparaison d'animaux adultes PD4251 et LS1095 (*unc-52(e444)*). Les panneaux blancs représentent les spectres de densité optique (ligne bleu) et de fluorescence (ligne verte) des animaux observés.



**Figure 45 : Comparaison de la moyenne d'intensité de fluorescence des animaux adultes présents dans les puits d'une plaque de culture définie dans l'annexe 4.** La fluorescence globale des animaux adultes LS1043 est beaucoup plus faible que la fluorescence des animaux PD4251, cette différence s'atténue à partir du 5<sup>e</sup> jour de culture en raison des animaux accumulés dans le ventre des mutants. Au 4<sup>e</sup> jour, les animaux sont essentiellement de jeunes adultes ; au 5<sup>e</sup> jour, des adultes en pleine ponte.



**Figure 46 : Image représentative du profil fluorescent d'animaux observés au 6<sup>e</sup> jour de culture à 23°C.** Les animaux mutants LS1095 sont alors envahis par leur progéniture. La fluorescence de ces larves est alors prise en compte dans la mesure, biaisant ainsi les conclusions des analyses.

Finalement, à condition d'analyser les animaux avant leur capacité à se reproduire, la mesure du profil fluorescent des mutants est un paramètre permettant de mesurer l'impact des drogues. De plus, cette mesure peut se faire quantitativement et automatiquement via le COPAS.

Pour la mise au point des essais en plaques 96-puits, nous avons adapté le protocole SMA initialement établi au laboratoire. Les différentes étapes de ces mises au point ne seront pas détaillées, mais le protocole final est consultable en **annexe 4** et schématisé sur la **figure 47**. Tout comme dans le crible SMA, les composés de la chimiothèque Nationale sont testés à raison de 1,5  $\mu$ l pour 150  $\mu$ L de milieu de culture, ils sont alors évalués à  $10^{-4}$  M final. Le traitement consiste à exposer les animaux aux produits chimiques dès leur naissance et jusqu'au jour de l'analyse. Dans les conditions définies par ce protocole, les animaux analysés sont des jeunes adultes tout juste à maturité sexuelle et ne présentant pas de larves développées dans leur ventre.

Nous avons alors testé l'effet de la carbamazépine, un anti-cholinergique utilisé à plusieurs reprises comme agent anti-myotonique dans le traitement du syndrome de Schwartz-Jampel (**361, 386**). Nous n'avons vu aucun effet sur la paralysie ou sur l'intensité de fluorescence observée dans les vers LS1095, que ce soit en milieu solide ou liquide. Différents essais ont été réalisés avec des concentrations finales allant de  $10^{-3}$  à  $10^{-5}$ M. Malheureusement, il est difficile de déterminer si le composé diffuse bien dans l'animal. L'absence d'efficacité peut donc être due à une absence de pénétration. En absence de molécules efficaces nous utiliserons la souche PD4251 comme témoin positif. La souche LS1095, traitée avec le DMSO 1%, servira de témoin négatif.

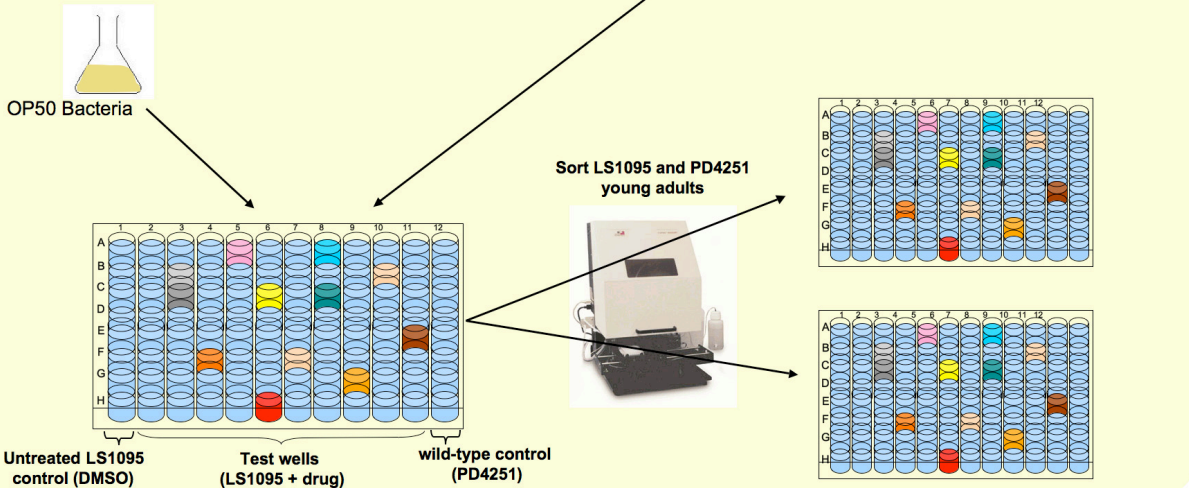
En ce qui concerne l'analyse, pour mettre toutes les chances de notre côté, nous couplons l'enregistrement automatique des profils GFP des animaux à une évaluation qualitative de leur motricité une fois transférés sur milieu gélosé. Les données des différents profils GFP sont traitées avec un programme élaboré au laboratoire avec l'aide de Mohamed Triba. Ce programme est consultable en **annexe 5**. Il consiste à identifier les éléments correspondants aux adultes dans chacun des puits, puis il établit des graphiques, à l'image de la **figure 45**, permettant de comparer les puits entre eux. Il permet aussi d'établir graphiquement des "dot plot" (taille des éléments triés en fonction de leur intensité globale de fluorescence) des éléments présents dans les puits de chacune des plaques. Nous travaillons encore actuellement sur ce programme pour permettre d'établir des listes automatiques des puits présentant les animaux mutants traités ayant les caractéristiques numériques les plus proches du témoin PD4251.

Finalement, cette méthode de criblage permet un débit de plus de 1500 composés par mois. Il faut noter que l'observation manuelle de la motricité est un facteur limitant pour ce crible. De plus cette observation est souvent ambiguë en absence d'effet frappant. Néanmoins, tant que nous n'avons pas trouvé de composés actifs et confirmé qu'un effet bénéfique se traduira bien par une augmentation de la fluorescence globale, nous préférons conserver un test fonctionnel.

**Day 0 Prepare plates**

- > 300µL of OP50 bacteria in M9 plus cholesterol (growing medium)
- > 3µL of drugs from the chemical libraries in columns 2 to 11 (80 drugs tested per plate)
- > split in two duplicate plates, each containing 150µL of growing medium+drug per well
- > worm sorter sorts 3 LS1095 young adult worms in columns 1 to 11 and 2 PD4251 young adult worms in column 12

National chemical library (65 plates, 80 drugs per plate)  
 Lyon chemical library (20 plates, 80 drugs per plate)  
 Prestwick chemical library (14 plates, 80 drugs per plate)



4 days at 23°C, 650-700 rpm

**Day 4 Observe and analyse plates**

- > Transfert plate 1 in solid media and evaluate the locomotion rate of each population
- > Analyse the fluorescent profile of animals in each well of the plate 2 with the worm sorter coupled to informatics program.

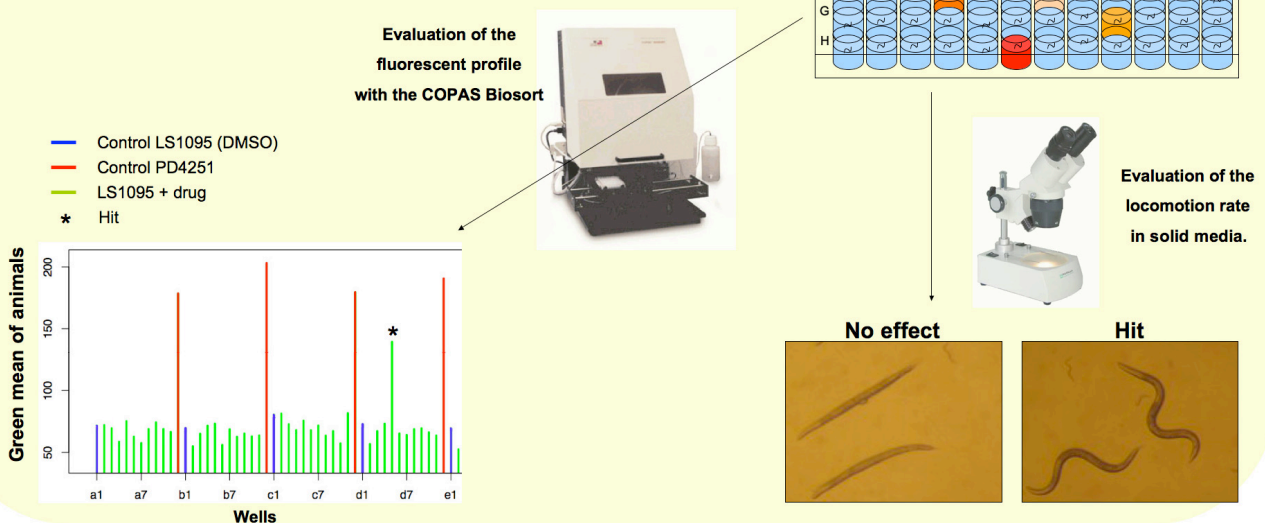


Figure 47 : Représentation schématique du crible Schwartz-Jampel.

# **RESULTATS**



# RESULTATS

Ce chapitre présente les résultats obtenus lors des campagnes de criblage sur les trois modèles présentés plus haut. En raison du nombre de données générées, l'ensemble des résultats ne peut être retranscrit intégralement, seules les données pertinentes et utiles dans la compréhension de ce manuscrit seront présentées.

## I. Résultats des cribles

### 1. Le crible DMD

#### 1.1. Chimiothèque Prestwick

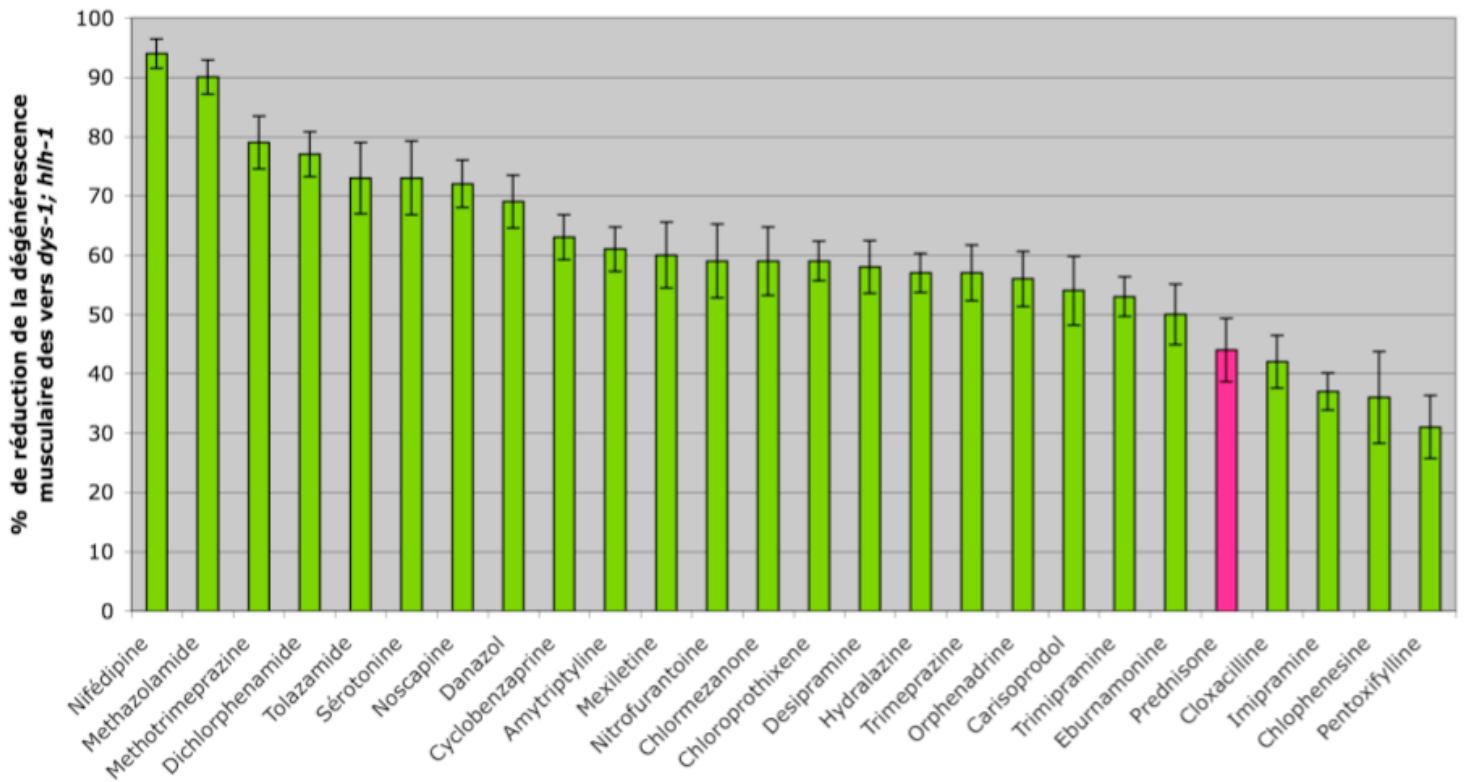
Comme expliqué dans le chapitre dédié au développement des cribles, le criblage des composés Prestwick sur notre modèle DMD a été réalisé avant mon arrivée. Mon rôle s'est limité à participer à l'analyse des données générées et à tenter de comprendre les mécanismes d'action des touches les plus prometteuses.

Par souci de clarté, les résultats obtenus lors de ce crible primaire sont présentés dans les paragraphes suivants.

A l'époque, la chimiothèque Prestwick était composée de 800 molécules. Sur les 800 molécules testées, 26 ont été retenues pour leur capacité à diminuer la dégénérescence musculaire chez le mutant *C. elegans dys-1(cx18) ; hlh-1(cc561)*.

Parmi ces 26 composés, on retrouve (**figure 48 et tableau 3**) :

- 8 composés impliqués dans la voie sérotoninergique, dont la sérotonine proprement dite et des composés entraînant soit une augmentation de son signal, soit une inhibition de sa recapture. Ces composés sont essentiellement représentés par des composés tricycliques.
- 5 composés décrits comme relaxants musculaires, représentés majoritairement par des benzodiazépines.
- 2 inhibiteurs d'anhydrases carboniques appartenant aux sulfonamides.
- 4 molécules connues pour leurs effets vasodilatateurs et pour certaines ayant une action sur les canaux ioniques.
- 2 antibiotiques.
- 5 molécules à effets divers, dont la prednisone et le danazol. Le danazol est un anabolisant participant à l'augmentation de la masse musculaire.



**Figure 48 : Résumé des composés issus de la chimiothèque Prestwick ayant un effet bénéfique sur notre modèle DMD.** 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. (Standard Deviation of the Mean), qui porte sur l'ensemble des tests effectués pour chaque molécule. La prednisone est représentée en rose.

Nom	Classe pharmaceutique, action principale ou indication thérapeutique
<b>Voies Sérotoninergique</b>	
Sérotonine	Neuromédiateur qui peut agir comme neurohormone ou 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, 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
<b>Inhibiteurs d'anhydrases carboniques</b>	
Dichlorphenamide	Inhibiteur d'anhydrase carbonique, Indiqué comme diurétique, Action sur le SNC mal connue
Methazolamide	Inhibiteur d'anhydrase carbonique, Indiqué comme diurétique
<b>Relaxants musculaires</b>	
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
<b>Vasodilatateurs et inhibiteurs de canaux ioniques</b>	
Nifedipine	Vasodilatateur, Inhibiteur canaux calciques dépendants du voltage
Hydralazine chlorhydrate	Anti-hypertenseur, Vasodilatateur périphérique par inhibition des récepteurs adrénergiques
Pentoxyfilline	Vasodilatateur périphérique, Inhibition phosphodiesterase ; Stimulant du système nerveux central, entraînerait baisse TNFalpha
Eburnamonine	Vasodilatateur cerebral (mécanismes mal connus)
<b>Antibiotiques</b>	
Cloxacilline sodique	Antibiotique antibactérien, Provoque notamment la mort cellulaire
Nitrofurantoïne	Antibiotique antibactérien, Provoque inhibition de la synthèse protéique
<b>Divers</b>	
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, participe à la baisse de la glycémie

**Tableau 3 : Listes des molécules réduisant la dégénérescence du modèle nématode DMD.**

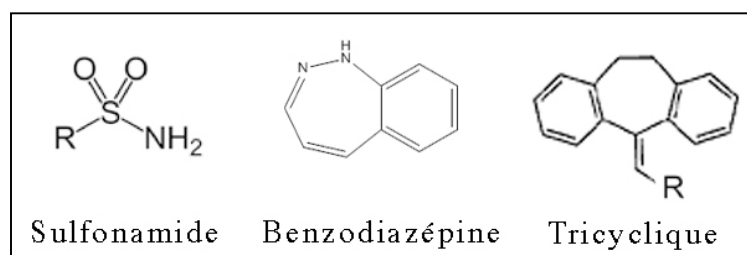
Ces informations sont tirées de <http://www.biam2.org/www/Isub.html>.

## 1.2. Chimiothèque Patrimoine et ICBMS

Les molécules de la chimiothèque Patrimoine et ICBMS (6800 composés) ont été criblées durant l'année 2007 grâce au protocole décrit en **annexe 1** (test à  $10^{-4}$  M final). Un peu plus de 180 molécules ont été sélectionnées lors du crible primaire et ont été retestées courant 2008. Les tests secondaires ont consisté à reproduire les résultats observés lors du premier crible, puis à réaliser des études effet-doses sur les hits confirmés ( $500\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$  et  $1\mu\text{M}$ ). En raison du caractère rare de ces composés, nous n'avons reçu que quelques mg pour effectuer les tests supplémentaires, nous avons alors limité les tests à des concentrations inférieures à  $500\mu\text{M}$  finale. Pour les molécules confirmées, des essais supplémentaires ont été menés avec la souche *dys-1(cx18)* pour confirmer que l'effet observé était dépendant de l'absence de dystrophine et non de la mutation *hlh-1(cc561)* aussi présente dans la souche.

Pour la chimiothèque Patrimoine, nous avons alors obtenu 27 molécules présentant des effets bénéfiques. Pour la chimiothèque de Lyon (ICBMS), les tests secondaires ont confirmé l'activité de 3 composés.

De manière intéressante, l'examen des molécules confirmées fait ressortir des structures chimiques déjà identifiées lors du crible des 800 molécules de la chimiothèque Prestwick. Nous retrouvons ainsi des molécules apparentées aux tricycliques, aux sulfonamides et aux benzodiazépines (**figure 49**).



**Figure 49** : Squelette chimique retrouvé dans les sulfonamides, les benzodiazépines et les tricycliques.

Le **tableau 4**, ci-dessous, présente un récapitulatif des résultats obtenus avec la chimiothèque Patrimoine :

*dys-1(cx18),  
h1h-1(cc561)*

Composés	Crible	Retest		Validation (Coloration phalloïdine)	
	Fluo / Motricité 100µM	Fluo / Motricité Retest 100µM	Fluo / Motricité Retest 500µM	Comptage muscle 100µM (+/- sem)	Comptage muscle 500µM (+/- sem)
DMSO1 (1%)	C3	C3	C3	4,9 +/-0,20	4,9 +/-0,20
MET (0,5mg/ml)	A2	A2	A2	1,2 +/-0,13	1,2 +/-0,13
02-13-D02	A1	B2	B2	1,4 +/-0,21	1,9 +/-0,24
02-31-H08	A2 IRC	A1 LRC	Létale	2,5 +/-0,11	N/A
03-03-B05	A1 IRC	B+1- Var	A1 RC	2,7 +/-0,29	N/A
01-02-B8	B-2+ Intest	B2 Intest	A-2	2,8 +/-0,21	3 +/-0,12
01-18 A9	B2	B-2	N/D	2,9 +/-0,22	N/D
01-02-F11	C+3+	B-3	B2	2,9 +/-0,26	2,8 +/-0,33
02-12-F07	A3 arret œufs	A2- arret œufs	C3	2,9 +/-0,11	N/D
05-02-B03	B+2+	B2-	RC	3,0 +/-0,31	N/A
01-17 G11	B-2	B2	N/D	3,0 +/-0,21	N/D
04-01-C04	B3	B2	B2+	3,1 +/-0,37	3 +/-0,24
02-08-D07	B-2	B-2-	B3+	3,2 +/-0,32	2,1 +/-0,12
02-10-B02	A3	B2	B3+	3,2 +/-0,13	3,1 +/-0,41
02-15-D07	B2	B-2	Létale	3,3 +/-0,34	N/A
01-05-D09	B1-	A-2	B2 IRC	3,5 +/-0,19	N/A
02-20-F07	B+2+	B-2+ IRC	Létale	3,4 +/-0,22	N/A
01-17 F9	B-2	B-2-	N/D	3,4 +/-0,33	N/D
02-02-B09	B2 IRC	B-2-	B2 Var	3,5 +/-0,39	3,3 +/-0,51
LPS 01-01-C2	B+2+	B2 IRC	B3	3,7 +/-0,12	4,2 +/-0,33
01-07-H06	A+1+	B-2- IRC	Létale	3,8 +/-0,37	N/A
01-18 A10	B2-	B2-	N/D	3,8 +/-0,27	N/D
01-02-F3	B+2 arret œufs	A2 arret œufs	A1 arret œufs	3,8 +/-0,11	3,5 +/-0,33
02-28-H03	B-1 hyperactifs	C1 hyperactifs	C+3+ RC	3,9 +/-0,43	N/A
01-03-C3	C+3	A-2	B-2- IRC	3,9 +/-0,09	N/A
02-03-C10	B3	B2 IRC	Létale	3,9 +/-0,29	N/A
02-06-A06	B2+	B-2	B3-	3,9 +/-0,21	4,0 +/-0,31
02-31-G07	B2	B2	B2	4,0 +/-0,24	4,1 +/-0,23
02-08-F02	B-2-	B-3+	A3	4,0 +/-0,33	2,3 +/-0,19

DMSO1 = Temoin Négatif		Var	Profil fluovolatile
MET = Temoin positif		+	profil tirant vers la classe supérieure
		-	profil tirant vers la classe inférieure
Fluo (Profile) :		RC	Retard de croissance
A	Tres bon	LRC	Léger retard de croissance
B	bon	arret oeufs	Descendance bloquée au stade œuf
C	moyen	Létale	Mort des individus déposés
Motricité		Intest	Coloration intestinale
1	Tres bon	N/D	Not determined
2	Bon	N/A	Not applicable
3	Moyen	sem	Standard deviation of the mean

**Tableau 4 : Synthèse des résultats obtenus avec la chimiothèque de Patrimoine.** Les tests sur le simple mutant *dys-1(cx18)* ne sont pas représentés car seuls les composés présentant une activité sur ce dernier sont représentés.

Le tableau ci-dessus présente le classement de 27 molécules issues de la Chimiothèque de Strasbourg, allant de la plus efficace à la moins efficace. Ce classement est basé sur les observations faites à 100 µM. Lors des effets doses, aucune molécule n'a présenté d'amélioration aux faibles concentrations (1 et 10µM). A 500 µM le classement ci-dessus reste inchangé sauf pour les composés 02-08-F02 et 02-08-D07 qui présentent une nette amélioration de leurs réponses (**tableau 5**), se classant en tête de liste.

En analysant ces résultats, nous observons que la plupart des composés retenus n'entraînent que de faibles améliorations du phénotype, avec parfois une hétérogénéité entre

le profil moteur et le nombre de cellules absentes, et ce quelques soient les doses testées. Seuls les composés 02-13-D02 (Benzodiazépine), 02-08-F02 et 02-08-D07 (Sulfonamides) donnent des résultats encourageants pour la suite ; c'est-à-dire une amélioration combinée de la motricité et de l'état des muscles, mais aussi un squelette chimique de type "drug-like". Le terme drug-like signifie que les composés répondent à la règle des 5 de Lipinski (387). En clair, les molécules doivent répondre à plusieurs critères dont :

- un masse moléculaire  $\leq 500$  Da
- un coefficient de partage octanol/eau (LogP)  $\leq 5$  (LogP renseigne sur le caractère lipophile des squelettes chimiques)
- nombre de sites accepteurs d'électrons  $\leq 10$
- nombre de sites donneurs d'électrons  $\leq 5$
- pas plus de cinq cycles fusionnés

La règle des cinq a été mise au point à partir de composés administrables par voie orale ayant passé avec succès la phase II des tests cliniques (d'où le nom drug-like, "comme une drogue"). Les composés ne validant pas au moins deux des critères précédant ont de très fortes chances d'avoir des problèmes d'absorption ou de perméabilité chez l'homme.

Pour ce qui est des touches issues de la chimiothèque ICBMS, seuls 3 composés ont été validés après les différents tests secondaires, les résultats importants sont représentés dans le **tableau 5** :

Composés	Crible	Retest		Validation (coloration phalloïdine)	
	Fluo / Motricité 100µM	Fluo / Motricité Retest 100µM	Fluo / Motricité Retest 500µM	Comptage muscle 100µM	Comptage muscle 500µM
DMSO 1%	C3	C3	C3	4,4 +/- 0,26	4,4 +/- 0,26
Met 0,5mg/ml	A-2	A-2	A2	1,3 +/- 0,10	1,3 +/- 0,10
16-D04	B+2+	B+2+	RC	2,9 +/- 0,10	N/A
10-D09	B2	B+2+ RC	RC	3 +/- 0,17	N/A
01-C03	A-2	B2- Var	C3	3,5 +/- 0,39	N/D

**Tableau 5 : Synthèse des résultats obtenus avec la chimiothèque ICBMS.**

- Le composé 01-C03, malgré un bon score en fluorescence, n'a pas été retenu car les gains observés lors des comptages musculaires étaient trop faibles et trop variables, quelles que soient les doses.

- Le composé 10-D09 présente un nouveau squelette chimique, mais ne répond pas à la règle de Lipinski.

- Le composé 16-D04 est apparenté à la classe des tricycliques.

Après avoir analysé ces résultats avec les responsables des différentes chimiothèques, nous avons décidé d'approfondir notre prospection en testant une série d'analogues des familles présentes dans ces listes, dont les sulfonamides, les tricycliques et les benzodiazépines. Nous avons alors testé 23 composés supplémentaires. Les résultats sont présentés dans le **tableau 6**, ci-dessous :

<i>dys-1(cx18),hlh-1(cc561)</i>	Fluo / Motricite 1mM	Fluo / Motricite 0,1mM	Comptage muscle 1mM (+/-SEM)	Comptage muscle 0,1mM (+/-SEM)
DMSO	C3	C3	4,5 +/-0,19	4,5 +/-0,19
Met (0,5mg/ml)	B2	B2	0,7 +/-0,24	0,7 +/-0,24
1	IRC B2	C3	3,5 +/-0,32	5 +/-0,34
2	Létale	B2-	N/A	2,6 +/-0,31
3	Létale	B-2-	N/A	3,2 +/-0,27
4	Insoluble	C+3+	N/A	5 +/-0,28
5	Létale	IRC C+3+	N/A	IRC N/D
6	RC A-2-	B-3+ Var	3,3 +/-0,28	4 +/-0,3
7	Létale	B-2-	N/A	2,4 +/-0,25
8	RC	IRC C3	RC N/D	IRC N/D
9	B2	C3	3,5 +/-0,23	3,6 +/-0,37
10	B-2	C3	3,5 +/-0,19	4,1 +/-0,39
11	Insoluble	C3	N/A	4,3 +/-0,41
12	Insoluble	IRC C3	N/A	4,2 +/-0,4
13	RC	C+3+	RC N/D	2,5 +/-0,24
14	Létale	C+3+	N/A	4,9 +/-0,25
15	C+3	C+3+	4,1 +/-0,34	4,2 +/-0,26
16	IRC B-2	C3	3,7 +/-0,27	4,4 +/-0,26
17	IRC B-2-	C3	5,2 +/-0,33	4,8 +/-0,22
18	RC	C3	RC N/D	4,4 +/-0,29
19	RC	C3	RC N/D	4,3 +/-0,15
20	Insoluble	C3	N/A	4,1 +/-0,3
21	Létale	C3	N/A	5,1 +/-0,2
22	B+2+	B-2-	3 +/-0,25	3,7 +/-0,35
23	Insoluble	C3	N/A	3,8 +/-0,25

**Tableau 6 : Synthèse des résultats obtenus avec les analogues des composés identifiés dans la Chimiothèque Patrimoine.**

Profil fluorescent : A= Bon B= Moyen C= Mauvais

Motricité : 1= Bon 2= Moyen 3= Mauvais

+ : tire vers la classe supérieure

- : tire vers la classe inférieure

Var : Variable

XX: Composé toxique

XX: Composé positif

N/D: Not determined

N/A: Not applicable

(I)RC: (léger) Retard de croissance

Parmi les composés testés, les composés 2, 3, 7, 9, 10, 13 et 22 présentent un effet significatif chez le ver. Ces composés appartiennent aux trois familles chimiques présentées ultérieurement et montrent, encore une fois, leur potentiel thérapeutique chez le nématode.

Il faut noter que les molécules identifiées dans le pool National ne sont pas des molécules validées en clinique, et que très peu d'informations sont disponibles à leur sujet. Par conséquent, de nombreuses et coûteuses étapes sont nécessaires avant de poursuivre leur développement. Pour décider de la suite à donner à ces molécules, nous avons alors convenu d'attendre les résultats des campagnes de validation conduites sur les souris *mdx* avec les composés Prestwick appartenant à ces familles.

### 1.3. Analyse des résultats et discussion

Finalement, nous avons réussi à dégager plusieurs molécules actives sur le modèle *dys-1(cx18)* ; *hlh-1(cc561)*. L'analyse des différents résultats met en évidence une relation forte entre, la suppression du phénotype de notre souche DMD, et l'exposition à des composés présentant un squelette chimique apparenté aux tricycliques, aux sulfonamides et aux benzodiazépines. Le but de ces cribles est principalement de générer des composés candidats susceptibles d'être efficaces chez l'homme ; l'étape suivante est alors de vérifier leur efficacité dans un modèle plus complexe, tel que le modèle murin *mdx*. En fonction des résultats obtenus sur la souris, il sera discuté des possibilités d'un transfert chez l'homme.

Il faut noter que nous avons initié l'analyse des composés Prestwick sur le modèle murin *mdx* avant la fin du crible des molécules de la chimiothèque Nationale. Par conséquent, vu que cette dernière n'a pas généré de nouvelles familles chimiques intéressantes pour une application thérapeutique, nous attendons les résultats de ces campagnes de validation pour décider des suites à donner aux composés du pool National. Il a tout de même été envisagé de faire de l'optimisation chimique, et de tenter de créer des analogues présentant des motifs d'ancrage (pour une purification des cibles potentielles).

En ce qui concerne la campagne de validation des composés Prestwick sur le modèle murin *mdx*, les composés regroupés dans les tricycliques et les benzodiazépines sont analysés par des groupes basés à Nantes et à Evry, et supervisé par Maïté Carre-Pierrat dans notre laboratoire. Les résultats préliminaires sont encourageants et devraient être publiés courant 2010. N'ayant pas participé à ce travail, le détail de ces analyses ne sera pas présenté.

Mon travail a par contre consisté à superviser les analyses conduites avec la classe des sulfonamides, dont la méthazolamide et la dichlorphénamide. Ces molécules ont été testées en collaboration avec le laboratoire de Hanns Lochmuller, à Munich. Les résultats obtenus avec ces molécules sur le modèle murin sont présentés plus loin dans ce manuscrit, en association avec l'identification de leurs cibles chez *C. elegans*.

Enfin, il faut noter que, comparativement aux résultats Prestwick, nous avons obtenu proportionnellement moins de hits avec les composés de la chimiothèque Nationale. En effet, le crible effectué avec les composés Prestwick a généré 26 hits confirmés pour 800 molécules testées, alors que seulement 30 hits ont été obtenus sur les 6800 composés issus de la chimiothèque Nationale, dont seulement 5 considérés comme intéressants (réponse homogène et squelette chimique type "drug like").



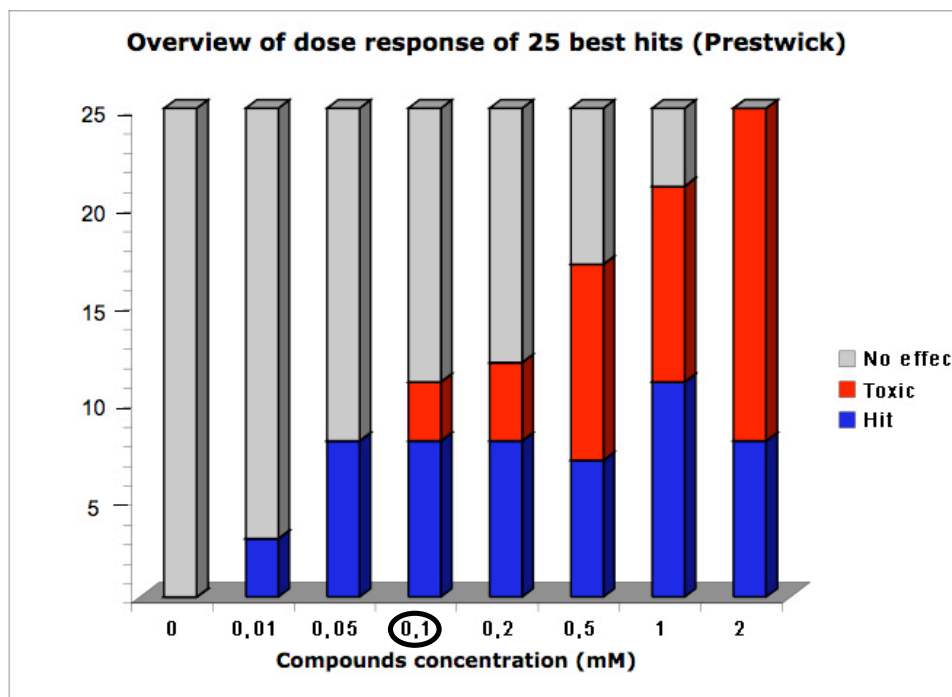
Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence :

- i) Les composés Prestwick sont tous des molécules approuvées et connues pour leur bioactivité, alors que ceux de la chimiothèque Nationale sont des produits de synthèse ou des extraits naturels. Il est donc fort probable qu'un grand nombre d'entre eux ne présente pas d'activité biologique.
- ii) A la différence du crible Prestwick, les composés trouvés toxiques à la concentration testée ( $10^{-4}$  M pour la Nationale) ne sont pas retestés à de plus faibles concentrations, certaines familles chimiques intéressantes et très actives sont peut être à identifier parmi ces composés. Nous envisagerons de les retester lorsque les différentes campagnes de criblage seront terminées. Nous pourrons alors faire le bilan sur les volumes et le temps nécessaires pour établir une campagne de retest.
- iii) Une dernière explication vient de la stratégie de criblage. Les composés de la chimiothèque Nationale sont testés à  $10^{-4}$  M final alors que les composés Prestwick sont testés à des doses supérieures (solubilité maximale dans les solutions mères, diluées 100 fois dans le milieu lors des tests). Au final, la plupart des composés ont initialement été testés dans une gamme comprise entre  $10^{-3}$  M et  $10^{-2}$  M, c'est-à-dire 10 à 100 fois plus concentrés. Comme expliqué dans les lignes suivantes, un certain nombre de composés ont alors probablement été ratés en raison d'une absence d'effet détectable à  $10^{-4}$  M.

Pour essayer d'évaluer l'impact de la stratégie de criblage ( $10^{-4}$  M) conduite avec la chimiothèque Nationale sur les résultats obtenus, des tests effet-doses dans les mêmes conditions ont été réalisés avec les 25 meilleures molécules obtenues lors de la campagne Prestwick. A l'image du crible réalisé avec les composés de la chimiothèque Nationale, pour chaque composé testé (ici à plusieurs concentrations), trois réponses sont possibles:

- i) absence d'effet détectable, le composé n'est pas retenu pour des tests supplémentaires,
- ii) effet observable, le composé est retenu pour des tests supplémentaires,
- iii) effet toxique, le composé n'est pas retenu, mais peut être retesté à une concentration plus faible.

La répartition des réponses obtenues, en fonction de la concentration des différents composés testés, est représentée sur la **figure 50**.



**Figure 50 : Répartition de l'effet des hits Prestwick en fonction de leur concentration dans les conditions définies en annexe 1.** Lors de cette analyse, à l'image du crible effectué avec la chimiothèque Nationale, trois types de réponses sont possibles, aire grise : absence d'effet détectable, les molécules sont abandonnées ; aire bleu : effet détectable, les molécules sont retenues pour des analyses supplémentaires ; aire rouge : toxique, les molécules peuvent être retestées à de plus faibles concentrations. Valeur entourée :  $10^{-4}$  M.

Cette figure montre que si les composés Prestwick avaient été testés à  $10^{-4}$  M (valeur entourée en abscisse), seul 1/3 (8/25) des composés bénéfiques sur le modèle nématode aurait été identifié lors du premier passage, et potentiellement 3 autres lors des retests des composés toxiques.

Il est probable que chaque chimiothèque se comporte de manière différente en fonction des doses testées. Néanmoins, en considérant que la chimiothèque Nationale se comporte de la même façon que la chimiothèque Prestwick, nous avons alors raté 2/3 des composés actifs, avec certains potentiellement indetifiables dans les composés toxiques à  $10^{-4}$  M.

Enfin, cette analyse montre aussi qu'il est difficile de déterminer une concentration test idéale. Pour perdre le moins d'information possible, la stratégie idéale semble être de tester les molécules à plusieurs doses différentes, ou, dans le cas d'un nombre de points d'analyses limités, de tester les composés aux plus fortes concentrations possibles, puis de retester les composés toxiques.

## 2. Le crible SMA

Malgré le fait que le crible de molécules approuvées (Prestwick) soit notre objectif principal, celles-ci n'ont pu être testées avant la troisième année du projet en raison de complications administratives qui ont bloqué leurs achats. C'est pourquoi l'avancée des recherches est plus aboutie avec les composés de la Chimiothèque Nationale.

### 2.1. Chimiothèque Patrimoine & ICBMS

Les chimiothèques, de Strasbourg et de Lyon, ont été testées à une concentration de  $10^{-4}$   $\mu$ M finale. Les analyses, basées sur la capacité des animaux à entraîner une descendance, ont dégagé un total d'environ 400 hits lors du premier passage. L'analyse de la taille des individus, via l'enregistrement réalisé par le COPAS, n'a pas conduit à identifier des hits supplémentaires.

Un second passage de ces hits, à la même dilution, a réduit cette liste à 20 composés (17 composés provenant de la chimiothèque de Strasbourg et 3 de la chimiothèque de Lyon).

Des tests effet-doses ont ensuite été réalisés, à raison de quatre répétitions par concentration. De plus, afin de déterminer si la suppression du phénotype lors de l'ajout des drogues est reliée à une compensation de la perte de fonction de SMN-1, ou reliée à un effet parasite sur la technique RNAi utilisée ; nous réalisons des contrôles d'efficacité RNAi avec le gène *pos-1*. En clair, si les molécules testées suppriment le phénotype *smn-1* et le phénotype *pos-1*, alors il est probable qu'elles inhibent les processus RNAi utilisés pour inactiver les gènes d'intérêt. Le détail des résultats est présenté dans le **tableau 7**.

		1mM	100µM	10µM	1µM
02-01-E6	Smn-1	0	0	0	0
	Pos-1	0	0	0	0
02-01-F4	Smn-1	0	0	0	0
	Pos-1	0	0	0	0
02-03-E9	Smn-1	0	0	0	0
	Pos-1	0	0	0	0
02-03-F11	Smn-1	Létale	4	3	1
	Pos-1	Létale	4	0	0
02-04-E8	Smn-1	0	0	0	0
	Pos-1	0	0	0	0
02-04-F5	Smn-1	0	0	0	0
	Pos-1	0	0	0	0
02-04-G10	Smn-1	0	0	0	0
	Pos-1	0	0	0	0
02-06-F11	Smn-1	4	2	2	1
	Pos-1	4	4	0	0
02-07-E9	Smn-1	0	1	0	2
	Pos-1	0	0	0	0
02-10-A2	Smn-1	0	1	1	1
	Pos-1	0	1	0	0
02-10-B9	Smn-1	Létale	Létale	0	0
	Pos-1	Létale	Létale	0	0
02-10-F11	Smn-1	Létale	Létale	0	0
	Pos-1	Létale	Létale	0	0
02-30-F4	Smn-1	0	1	2	2
	Pos-1	3	2	0	0
02-32-H2	Smn-1	2	3	0	1
	Pos-1	0	0	0	0
02-33-H2	Smn-1	Létale	0	3	3
	Pos-1	Létale	0	0	0
05-01-C11	Smn-1	Létale	4	3	1
	Pos-1	Létale	4	0	0
9-F4	Smn-1	0	3	1	2
	Pos-1	0	3	0	0
4-B6	Smn-1	3	3	2	2
	Pos-1	2	4	0	0
10-D9	Smn-1	1	2	1	3
	Pos-1	1	1	0	0

**Tableau 7 : Présentation et validation des hits obtenus avec les composés de la chimiothèque Nationale.** *smn-1* : ajout de double brin d'ADN spécifique du gène *smn-1*. *pos-1* : Ajout de double brin d'ADN spécifique du gène *pos-1* (Contrôle RNAi). Nous réalisons du RNAi anti-*pos* comme contrôle afin de s'assurer que les réponses observées sont spécifiques du RNAi anti-*smn*.

Le **tableau 7**, ci-dessus, indique pour chaque expérience le nombre de réponses positives obtenues sur les quatre répétitions différentes. C'est-à-dire le nombre de fois où l'ajout du composé a aboli le phénotype induit par le RNAi (*smn-1* ou *pos-1*), la meilleure

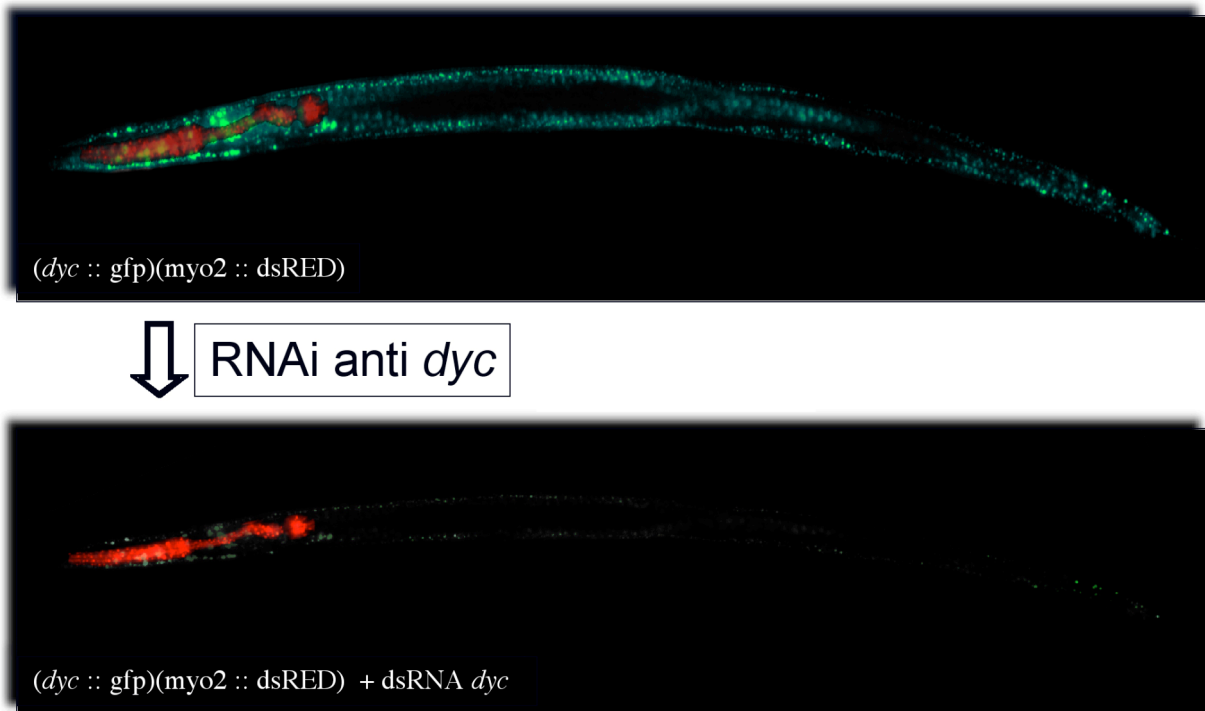
réponse possible étant 4. Les 17 premières molécules proviennent de Strasbourg et les 3 dernières de Lyon.

On voit que seuls les trois composés surlignés en rouge (02-03-F11, 02-06-F11, 05-01-C11) ont donné des résultats homogènes et reproductibles ; en effet, d'autres composés tels que le 02-32-H2 ou le 9-F4 répondent positivement mais ces réponses sont très hétérogènes et difficilement reproductibles. Malheureusement, ces trois composés (02-03-F11, 02-06-F11, 05-01-C11) réduisent aussi le phénotype induit par l'ajout de double brin d'ADN spécifique du gène *pos-1*. Il est donc probable que la réponse observée ne soit pas liée à une compensation de la perte de fonction *smn-1*, mais plutôt à une inhibition des processus RNAi. Des expériences complémentaires ont été réalisées pour confirmer cette hypothèse (voir ci-dessous).

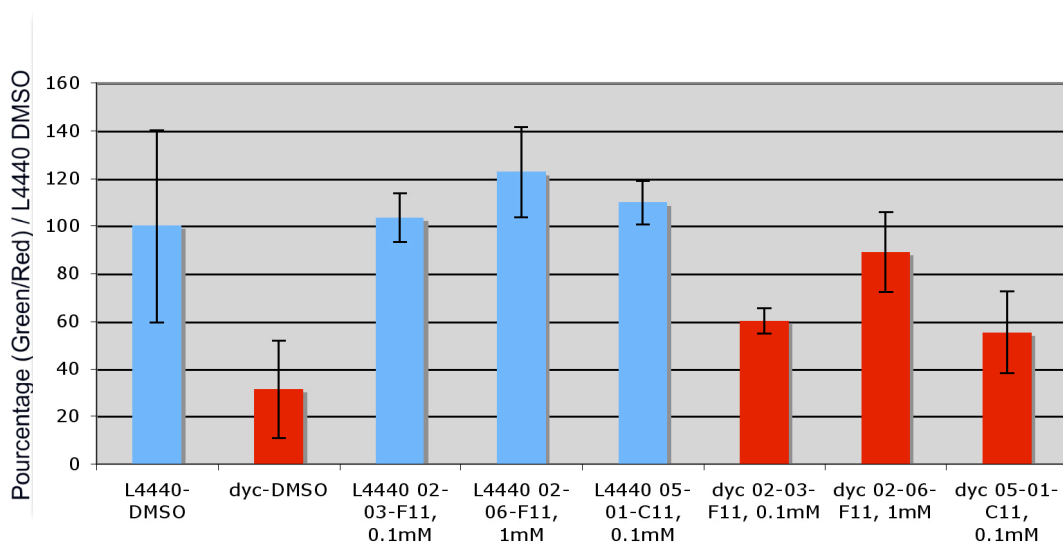
Nous avons donc poussé plus loin les investigations pour comprendre les résultats observés. Nous avons mesuré l'inhibition de l'efficacité du RNAi chez *C. elegans* dans un second système (préalablement obtenu au laboratoire). Nous avons pris une souche présentant deux fluorescences distinctes dues à des transgènes différents. L'un produit une protéine fluorescente émettant dans le vert (protéine DYC fusionnée à la GFP) et l'autre une protéine fluorescente émettant dans le rouge (DsRed). Nous avons alors entrepris d'inhiber spécifiquement la fluorescence verte par RNAi (RNAi anti-*dyc*) (**fig. 51**). La fluorescence rouge, non inhibée, nous sert alors de témoin pour comparer les animaux.

Comme montré sur les clichés ci-dessous (**fig. 51**), l'ARNdb anti-*dyc-1* est censé éteindre spécifiquement la fluorescence verte. Si un composé est capable d'inhiber les processus RNAi, alors l'extinction spécifique du signal vert ne se fera plus, ou de façon moins importante, pour un signal rouge constant.

Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 52** qui suit.



**Figure 51 : Représentation schématique du modèle utilisé pour évaluer le potentiel anti-RNAi des composés identifiés dans le crible SMA.** Les animaux utilisés présentent deux protéines fluorescentes distinctes, verte et rouge, nous inhibons spécifiquement la fluorescence verte. Une fois les profils enregistrés avec le COPAS, le rapport de la fluorescence verte globale sur la fluorescence rouge globale nous renseigne sur l'efficacité des processus RNAi.



**Figure 52 : Evaluation de l'impact sur les processus RNAi des composés identifiés dans le crible SMA.** Les barres (+/- écart type) représentent le rapport entre la fluorescence verte et la fluorescence rouge de chaque population, en pourcentage par rapport à la valeur observée chez les animaux témoins traités au DMSO. L4440-DMSO : Pas de RNAi (Vecteur vide + Solvant), *dyc*-DMSO: Témoin positif (Vecteur exprimant double brin d'ADN capable d'éteindre la fluorescence verte + Solvant), L4440 drogue : Vecteur vide + drogue, *dyc*-drogue : Vecteur exprimant un double brin d'ADN capable d'éteindre la fluorescence verte + drogue.

Cet histogramme met en évidence la diminution de la fluorescence verte par rapport à la fluorescence rouge, qui reflète la diminution du nombre de protéines recombinantes *dyc-1::gfp* par rapport à la protéine témoin DsRed non inhibée.

La comparaison des barres “L4440-DMSO” et “dyc-DMSO” montre une diminution du signal d’environ 4 fois lorsque l’on ajoute un double brin spécifique du gène *dyc-1* ; les processus RNAi sont donc efficaces.

En présence de drogues et sans RNAi anti-*dyc* (barres bleues), le signal n’est pas significativement modifié. Les drogues n’ont donc pas d’effets significatifs sur ce rapport en absence de RNAi.

Par contre en présence de RNAi anti-*dyc* (barres rouges), l’ajout de ces drogues tend à ramener ce rapport vers les valeurs du témoin L4440-DMSO. Par conséquent, ces expériences supplémentaires confirment que les trois composés testés entraînent une diminution de l’efficacité de la technique RNAi utilisée, et donc probablement une inhibition des processus RNAi chez *C. elegans*. Si les propriétés inhibitrices des processus RNAi de ces molécules sont transversales aux mammifères, leur utilisation pourrait être tout de même utile, et notamment dans le domaine thérapeutique. Néanmoins, ce débat n’a pas de place dans ce mémoire ; de plus les résultats préliminaires obtenus avec des cellules erythroleucémiques de souris ne sont pas encourageants.

Finalement, les gains observés avec les 3 molécules répondant positivement et de manière reproductible dans nos cribles ne sont donc pas dus à une compensation de l’absence de protéine SMN, mais à une probable inhibition des processus RNAi.

En conclusion, à ce jour , les cribles réalisés avec la chimiothèque de Strasbourg et celle de Lyon n’ont pas permis d’identifier de molécules apportant un gain notable et spécifique chez le ver.

## **2.2. Chimiothèque Prestwick**

Initialement, nous avons prévu de ne tester les composés Prestwick qu'à une seule concentration (solubilité maximale, diluée 100 fois dans le milieu). Mais en raison des conclusions du crible DMD nous avons décidé de changer de stratégie. Nous réalisons un criblage à deux doses, et les composés toxiques seront systématiquement retestés. La dose considérée comme maximale est conservée et nous avons rajouté un point correspondant à 0,2 X de cette dose maximale. Les concentrations testées sont donc différentes pour chaque composé.

A l'issue du crible primaire (basé sur la capacité des animaux à donner une descendance), 234 molécules ont été retenues et retestées à quadruplicat. A l'issue de ce criblage secondaire, seuls 22 composés ont été confirmés. Ces composés sont présentés dans le **tableau 8** qui suit. L'analyse approfondie de ces molécules, comprenant l'étude de leur impact sur les processus RNAi, est prévue pour début 2010. En absence de ces données, nous ne pouvons discuter de leur intérêt et de leur potentiel thérapeutique.



Compounds ID	Positive response/ assay (Total score)		Chemical Name	Known target(s) / Indication
	1X	0,2X		
PCLB-03E10	4/4 (6)	2/4 (3)	Metoclopramide monohydrochloride	Dopamine D2 receptors antagonist, 5-HT3 receptor antagonist/5-HT4 receptor agonist
PCLB-04A06	4/4 (5)	N/A	Dropropizine	Cough suppressant
PCLB-04C03	4/4 (5)	N/A	Triprolidine hydrochloride	H1 (histamine) receptors antagonist
PCLC-06E09	4/4 (9)	N/A	Hydroxytacrine maleate	Cholinesterase inhibitor (Use for Alzheimer)
PCLD-08A08	4/4 (6)	N/A	Aconitine	TTX-sensitive Na <sup>+</sup> channels agonist
PCLD-08B09	4/4 (9)	N/A	Corynanthine hydrochloride	N/D
PCLD-08E03	4/4 (5)	N/A	Ajmaline	Antiarrhythmic agent
PCLJ-04E11	0/4 (0)	4/4 (9)	Sulfinpyrazone	N/D
PCLM-04G10	4/4 (6)	4/4 (5)	Amodiaquin dihydrochloride dihydrate	Antimalarial and anti-inflammatory agent
PCLM-05A10	4/4 (10)	4/4 (6)	Tacrine hydrochloride hydrate	Cholinesterase inhibitor (Use for Alzheimer)
PCLM-05C06	4/4 (6)	N/A	Clenbuterol hydrochloride	Non-steroidal Beta2 adrenergic agonist
PCLN-07G10	N/A	4/4 (4)	Trimetazidine dihydrochloride	N/D
PCLN-08A02	4/4 (6)	3/4 (4)	Tubocurarine chloride pentahydrate	Nicotinic receptors inhibitor
PCLN-08F04	4/4 (7)	3/4 (4)	Harmine hydrochloride	MAO-A inhibitor
PCLN-10B08	1/4 (3)	4/4 (5)	Atractyloside potassium salt	Inhibiteurs de la chaîne respiratoire (Mito)
PCLN-10D02	4/4 (12)	2/4 (5)	Terazosin hydrochloride	Alpha 1 antagonist
PCLO-11C08	2/4 (4)	4/4 (7)	Proprantheline bromide	Antimuscarinic agent, smooth muscle relaxant
PCLO-11D08	N/A	4/4 (7)	Carbenoxolone disodium salt	Use for oesophageal ulceration and inflammation
PCLO-11F02	N/A	4/4 (7)	Paroxetine Hydrochloride	Antidepressor, serotonin recapture inhibitor
PCLO-12G07	N/A	4/4 (4)	Altretamine	Antineoplastic agent
PCLO-13B02	4/4 (10)	2/4 (3)	Remoxipride Hydrochloride	Antagonist Receptor Dopamine D2
PCLO-14C02	N/A	4/4 (7)	Phensuximide	Anticonvulsant

**Tableau 8 : Synthèse des hits SMA confirmés lors du criblage secondaire.** 1X et 0,2X : nombre de réponses positives -descendance viable- en fonction du nombre d'essais à la concentration de 1X et 0,2X. Le chiffre entre parenthèse reflète le degré de réversion du phénotype de stérilité (sur 12) ; une valeur proche de 0 équivaut à une très faible réversion -très faible descendance viable-, alors qu'une valeur proche de 12 correspond à une réversion quasi totale -descendance équivalente au témoin sauvage-. N/D : Not Determined, N/A : éliminé lors du crible primaire.

### 2.3. Analyse des résultats et discussion

Aucune molécule active sur le modèle SMA n'a pu être identifiée parmi les molécules du pool National, néanmoins certains composés sont peut être à identifier parmi les composés toxiques. De plus, en comparant la toxicité observée lors du crible DMD et SMA, on s'aperçoit que la toxicité de certaines molécules est dépendante du modèle utilisé (**tableau 9 et 10**). Ces molécules sont donc potentiellement intéressantes, car leur mécanisme d'action est probablement relié aux mécanismes dérégulés dans le modèle correspondant. Même si ces composés ne présentent pas d'effets bénéfiques à de plus faibles doses, leurs études pourraient participer à la compréhension des mécanismes impliqués dans les phénotypes *dys-1-* et *smn-1-* dépendant. A ce jour, il n'a pas été entrepris d'études supplémentaires avec ces composés. Ils seront probablement retestés à de plus faibles concentrations si les molécules identifiées dans le pool Prestwick ne donnent pas de résultats satisfaisants.

plaques chimiothèques	léthalité modèle DMD	léthalité modèle SMA
<b>ICBMS 10-4 M</b>		
<b>1</b>	<b>A9,B5</b> ,E11,F4,F5, <b>F8,G9,G10</b>	A2, <b>A9,B5</b> ,E5,F7, <b>F8</b> ,G3,G4, <b>G6,G9,G10</b>
<b>2</b>	<b>F10</b> ,G8	C4,G2
<b>3</b>	<b>D8,D10,F8,H7</b>	<b>D10</b> ,F9, <b>H7</b>
<b>4</b>	<b>A10,A11,B2,B3</b>	<b>A10,A11,B2,B3</b> ,B8,D4,F10,G2,G8,H2
<b>5</b>	A2,A8, <b>B11,D5</b> ,D9,E3	<b>B11</b> ,C11, <b>D5</b>
<b>6</b>	E5,G4,H8	D9,E3,F3
<b>7</b>	A4, <b>D10</b>	C4,C5,C7,C10,C11, <b>D10</b>
<b>8</b>	B2	E10,F3
<b>9</b>		
<b>10</b>	A5,A8,A9,A11, <b>D6,D7,D8,E3</b>	<b>C6,C8,D6,D7,D8</b> ,D11, <b>E3</b> ,E4, <b>H10</b>
<b>11</b>	B6, <b>F2,G11</b> ,H3	<b>F2</b> ,H6
<b>12</b>	B9	
<b>13</b>		G3
<b>14</b>	<b>A2</b> ,A4,A7,B4,C4,D5,D11,F6, <b>H2</b>	<b>A2</b> ,B2, <b>E5,H2</b>
<b>15</b>	A6,E3,H7	C2,D2, <b>D3</b> ,E2
<b>16</b>	A8	E4
<b>17</b>	G6,H8	G10
<b>18</b>	<b>F3</b> ,G7	B11, <b>F3</b>
<b>19</b>	<b>B11</b> ,C7,G9, <b>G10,G11</b> ,H2	<b>B11,G10,G11</b>
<b>20</b>	<b>C11,E5,E7,E8,F2,G3</b> ,H7	<b>C10,C11,E5,E7,E8,F2,G3</b>
<b>21</b>	<b>B3</b>	<b>B3</b>
<b>22</b>	<b>D8,E11</b>	<b>D8,E11,F10</b>

**Tableau 9 : Toxicité des molécules criblées à  $10^{-4}$  M appartenant à la chimiothèque ICBMS en fonction du modèle utilisé.** Les composés en rouge ont un effet léthal sur les deux modèles, les composés en noir entraînent une léthalité spécifique du modèle utilisé.

plaques chimiothèques	léthalité modèle DMD	léthalité modèle SMA
<b>Patrimoine 10<sup>-4</sup> M</b>		
01-01	B6,F2,H6	
01-02	B10, <b>E7</b>	<b>E7</b> ,H9
01-03	<b>A9,H6</b>	<b>A9</b> ,C2,H3, <b>H6</b>
01-04	<b>B8,H6</b>	B2, <b>B8</b> , E5, <b>H6</b>
01-05	<b>A3,A5,A7</b> ,A8,B4, <b>B8</b> ,B10, <b>C3</b> ,C7,D10,E10,G4, <b>G9</b>	<b>A3,A5</b> ,A6, <b>A7,B8,C3</b> ,F5,G7, <b>G9</b>
01-06		E8,E10
01-07	A6, <b>C10</b> ,D3,D9	A10, <b>C10</b> , C11,D8,D10
01-08	A10,B2	
01-09		
01-10	A5, <b>B4</b> ,B6,C2, <b>C9</b> ,D7,G6	A4, <b>B4</b> ,B7, <b>C9</b> ,F5
01-11	<b>A2</b> ,D2,D3,F4,F5, <b>F8</b> ,G7, <b>G9</b> ,H6, A3,A4	<b>A2</b> ,C3,C4,E5,E6, <b>F8,G9</b>
01-12	H4	E4,F10,F11
01-13	<b>E11</b>	D10,E10, <b>E11</b> ,F2
01-14	C6	C5,E2,F5,H8
01-15	A4,A5,B7,D2,H2,H10	B5
01-16		B7,C2,D4,D11,E5
01-17	B8, <b>C6</b> ,C8,F3,F9,G4,G10	<b>C6</b> ,H8
01-18		
02-01		
02-02	E11	E8,G8,H6
02-03	B3,B8,B10,B11,D2,F11, <b>H7</b>	<b>H7</b>
02-04	A7,C10, <b>D3</b> ,D6,G4	<b>D3</b>
02-05	A2,C9,E4,E9,G10,H3	F9
02-06	A10,F4,G5,H5	
02-07		
02-08		E2
02-09	B6,C2,D2,F7	C9,D5,D9,D10,H3
02-10		E8,E9,E11,H9
02-11		
02-12	G5	G11
02-13	A2,A6,A10,B3,D6,D9,F6,H11	
02-14	B2,H11	
02-15	F8,F9,F10	C7,C8
02-16	<b>A5,B8</b> ,G6,H8	<b>A5</b> ,A7,B4,B5,B6,B7, <b>B8</b> ,G5,H2,H11
02-17		A2,A6,B4,D10
02-18		
02-19	A10,C2,C4,F10,G8	D3
02-20	<b>A8</b> ,H8	<b>A8</b>
02-21	F6,G6	B6
02-22	C4,G3	
02-23	A5, <b>C5</b> ,C11,H3,H9	<b>C5</b>
02-24	A7,E4,G9,H2,H11	A3,D11
02-25	B5,D10	H8
02-26	<b>C8</b>	<b>C8</b>
02-27		G11
02-28		
02-29	<b>D4</b>	<b>D4</b>
02-30	D3,G8	A3,C4,G2
02-31	C2	D2,G2,H2
02-32	B6, <b>B7,B11</b> ,E3,E4,H5,H9	<b>B7,B11</b> ,E8
02-33		
03-01	E9	
03-02	<b>B4</b> ,B9, <b>C10</b> ,C11,E10, <b>G4</b>	<b>B4,C10,G4</b> ,H6
03-03	<b>B5,C5</b> ,E4,F9	<b>B5,C5</b> , C8, E8, E10
03-04		
03-05	A7,D7	
03-06		D7,D8
04-01	<b>B5,C9</b> ,D6, <b>E7</b>	<b>B5,C9</b> ,E3, <b>E7</b>
05-01	<b>A11</b> ,E9	B5,B7,A10, <b>A11</b> ,C2,C3,F4,F10,F11
05-02		D9
LGPS01	<b>C2</b> ,G11	<b>C2</b>
LPGS02	<b>A2,B4,E9,G11</b> ,H5	<b>A2,B4,E9,G11</b>
LPGS03	<b>D5</b>	<b>D5</b> ,D8,C11

Tableau 10 : Toxicité des molécules criblées à 10<sup>-4</sup> M appartenant à la chimiothèque Patrimoine en fonction du modèle utilisé. Les composés en rouge ont un effet léthal sur les deux modèles, les composés en noir entraînent une léthalité modèle spécifique.

### 3. Le crible Schwartz-Jampel

Il faut noter que la fin du crible primaire du pool National effectué avec le modèle SMA a concordé avec l'arrivée d'une technicienne, Jessica Cisek, qui est maintenant autonome et réalise les essais de criblage. Mon travail, sur le modèle Schwartz-Jampel, a consisté à mettre en place les procédés et à superviser les essais. Il faut noter que ce crible est toujours en cours, le délai de livraison des composés Prestwick, le changement de stratégie de criblage (2 doses), et les différents projets entrepris pour identifier les modes d'action des composés DMD, ont entraîné de sérieux retards sur le déroulement de ce crible.

#### 3.1. Chimiothèque Prestwick

Comme expliqué plus haut, les composés Prestwick sont testés à deux concentrations différentes, 1x correspondant à la concentration maximale obtenue au laboratoire et 0,2x.

A ce jour, 800 composés sur les 1120 Prestwick ont été criblés à deux doses. Le **tableau 11**, qui suit, présente les composés identifiés comme positifs à l'issue de l'analyse des profils fluorescents des différentes populations ; c'est-à-dire les populations traitées présentant un profil fluorescent significativement différent des animaux LS1095 traités au solvant correspondant, et se rapprochant du profil fluorescent des animaux sauvages PD4251.

L'analyse fonctionnelle, basée sur la locomotion, sera confrontée à ces résultats à la fin de la campagne de criblage.



## **II. Identification des voies d'action**

Le but premier de la mise en place des différents cribles est de trouver des composés transposables à l'homme pour soigner les maladies présentées en introduction. Néanmoins, la compréhension des mécanismes d'action de chaque hit pourrait nous permettre de mettre en évidence des points clés dans la physiopathologie de ces maladies, et ainsi mieux les comprendre pour mieux les traiter. De plus, en travaillant sur plusieurs maladies neuromusculaires se traduisant, entre autres, par une atrophie musculaire, nous espérons identifier différents mécanismes, communs et maladie spécifique, impliqués dans ces atteintes.

Mon travail de thèse ne s'arrête donc pas à du développement de procédés permettant de trouver des traitements pharmacologiques. Cette approche s'insère en fait dans un effort mené de longue date par l'équipe du Docteur Ségalat, effort orienté vers la compréhension des mécanismes de dégénérescence apparaissant dans les maladies neuromusculaires, et plus précisément dans la myopathie de Duchenne.

Ainsi, en parallèle des travaux visant à dégager des molécules à potentiel thérapeutique, nous avons cherché à comprendre les mécanismes d'action des composés les plus prometteurs. Ne disposant pas encore de molécules intéressantes, ou validées, sur le modèle SMA et Schwartz-Jampel, mon travail s'est essentiellement concentré sur les mécanismes reliés aux molécules identifiées dans le crible DMD.

Comme dit plus haut, les molécules obtenues dans le crible DMD sont essentiellement représentées par trois familles chimiques, les sulfonamides, les tricycliques et les benzodiazépines. Tirant profit des informations disponibles, nos approches ont tout d'abord consisté à sélectionner des gènes candidats, en fonction des cibles connues et de la structure de ces familles chimiques. Ce choix a aussi été guidé par la littérature et les différentes hypothèses communément admises comme pouvant être impliquées dans la progression des atteintes musculaires. Cette démarche peut rapidement conduire à l'identification des cibles biologiques, comme le met en évidence l'article sur les sulfonamides présenté dans la première partie de ce chapitre (**article 1**). Néanmoins, cette approche s'avère souvent longue et décourageante. Ainsi, aucun résultat réellement concluant n'a pu être obtenu avec les autres classes de molécules. En effet, les différentes cibles des médicaments actuels et les processus dégénératifs observés chez les patients DMD sont encore mal compris à ce jour, par conséquent, se baser uniquement sur les cibles connues, la littérature, et ce qui est supposé, peut ralentir, voire empêcher l'identification de pistes thérapeutiques innovantes. La quantité d'efforts développés par notre équipe pour comprendre l'implication du métabolisme de la

sérotonine dans la dégénérescence en est une preuve frappante (**article 2 et deuxième chapitre**).

En raison de ces résultats hétérogènes, nous avons alors cherché à mettre en place une méthode, transposable à l'ensemble des composés, permettant d'identifier rapidement des candidats potentiels à tester. Dans le cas des enzymes, des canaux et des récepteurs, les composés bioactifs exercent, généralement, leur activité au travers d'une interaction physique avec leur(s) cible(s). Cette interaction est souvent compliquée et fastidieuse à identifier par des approches de génomique ou de protéomique classiques. Si l'on dispose d'un composé chimique présentant un "tag" par exemple, on peut tout de même essayer de purifier rapidement les protéines interagissant avec le composé en ayant recours à des techniques de chromatographie d'affinité. Malheureusement, de tels analogues n'existent pas pour les molécules identifiées dans ce manuscrit. En nous rapprochant des responsables des différentes chimiothèques, nous avons envisagé de créer par synthèse plusieurs composés, analogues à nos hits, présentant différents "tag" (afin de purifier leur(s) partenaire(s) par chromatographie d'affinité). Malheureusement ce projet demande beaucoup de travail au niveau des procédés chimiques et aucun partenariat n'a encore été créé.

Nous avons alors envisagé de mettre au point une méthode innovante, robuste et transversale à l'ensemble des composés identifiés, permettant de révéler leurs impacts sur le métabolisme du nématode, et ainsi tenter de générer des candidats potentiels via l'identification des voies métaboliques touchées. Nous avons alors mis au point une méthode d'analyse permettant d'explorer l'ensemble du métabolome des nématodes par analyse de leur spectre RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), on parle d'analyse métabolomique. Cette approche est décrite dans la troisième partie de ce chapitre (**article 3 et 4**).

Les sections suivantes présentent donc la stratégie menée pour identifier les cibles des molécules apparentées aux sulfonamides, et leur validation sur le modèle murin *mdx*. Elles présentent ensuite les différentes étapes menées au laboratoire pour tenter de démêler les phénomènes impliqués dans les traitements reliés au métabolisme de la sérotonine. Enfin, un dernier chapitre présente l'approche globale développée en partenariat avec le centre de RMN à Très Haut Champs, dirigé par Lyndon Emsley, ayant pour but d'explorer le métabolome du nématode.

## 1. Les sulfonamides

Les médicaments appartenant aux sulfonamides, dont la méthazolamide et la dichlorphénamide, sont connus pour leur activité inhibitrice des anhydrases carboniques. Les anhydrases carboniques sont présentes dans tous les organismes vivants et dans toutes nos cellules ; ce sont des enzymes responsables de la conversion réversible du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) en ions bicarbonates. Chez l'homme, cette réaction participe, entre autres, à la régulation du pH intracellulaire et au transport / élimination du CO<sub>2</sub> présent dans l'organisme (**388, 389**).

Ces molécules sont utilisées dans la médecine actuelle pour:

- leurs propriétés diurétiques,
- traiter les glaucomes chroniques,
- réduire les épilepsies rebelles et certaines paralysies périodiques,
- prévenir le mal des montagnes.

Dans tous les cas de figure les mécanismes conduisant aux améliorations des atteintes observées sont encore mal compris à ce jour.

L'implication de ces enzymes dans la réponse aux sulfonamides a pu rapidement être testée grâce à la souplesse de la génétique de *C. elegans*. Comme le présente l'**article 1** qui suit, nous avons recherché dans le génome de *C. elegans*, les différents gènes susceptibles de coder des anhydrases carboniques. Six gènes putatifs ont été identifiés et testés par RNAi. Ces analyses ont montré que parmi les différents gènes testés, seule l'inhibition de CAH-4 est impliquée dans le sauvetage du phénotype de la souche *dys-1(cx18)* ; *hll-1(cc561)* lors des traitements par les sulfonamides. De plus, la méthode d'inactivation de ce gène et l'étude de son expression chez *C. elegans* suggèrent que le phénomène impliqué prend place dans les muscles. Wetzel *et al.* ont montré que l'inhibition des anhydrases carboniques, au niveau des muscles squelettiques, entraîne une diminution des flux calciques régis par le reticulum sarcoplasmique (**390**). Tenant compte du fait que les flux de calcium entrant dans le cytoplasme des cellules musculaires de *C. elegans* ont été reliés au phénotype de dégénérescence de la souche *dys-1(cx18)* ; *hll-1(cc561)*, nous supposons que ce phénomène est responsable des gains observés chez le nématode (**180**). L'implication de ces flux calciques sera plus amplement débattue dans la discussion finale de ce manuscrit.



Cet article présente aussi les résultats obtenus lors de la campagne de validation menée sur le modèle murin *mdx*. Les résultats, obtenus en collaboration avec le laboratoire de Hanns Lochmuller, mettent en évidence un effet bénéfique de cette classe de molécules chez cette souris dystrophique. Il faut tout de même noter que certains des paramètres étudiés n'ont pas montré d'améliorations significatives.

Ces résultats hétérogènes peuvent s'expliquer par le fait que :

- i) la souris *mdx* a beau être un modèle largement utilisé pour étudier l'impact de nouveaux traitements contre la myopathie de Duchenne, le choix des paramètres pertinents et représentatifs de la maladie est encore sujet à débat. De la même manière, le choix de la fenêtre de traitement (début et durée) est sujet à polémique.
- ii) la différence entre les fonctions et la diversité des anhydrases carboniques murines par rapport aux anhydrases carboniques de *C. elegans* participe probablement à diminuer l'efficacité du traitement.
- iii) l'activité de la méthazolamide et de la dichlorphénamide s'exerce, chez la souris, sur la plupart des anhydrases carboniques (**391**). Ce manque de spécificité réduit peut être un effet bénéfique potentiellement dû à l'inhibition d'une ou plusieurs enzymes spécifiques. Malheureusement, il n'a pas été possible de relier *cah-4* avec un homologue murin ou humain. A ce jour, il est donc difficile de dire si l'inhibition spécifique d'une ou plusieurs des anhydrases carboniques murines puisse conduire à améliorer les gains observés chez la souris, et à *fortiori* chez l'homme.

# Evaluation of the therapeutic potential of carbonic anhydrase inhibitors in two animal models of dystrophin deficient muscular dystrophy

Jean Giacomotto<sup>1,†</sup>, Cordula Pertl<sup>2,†</sup>, Caroline Borrel<sup>1</sup>, Maggie C. Walter<sup>2</sup>, Stefanie Bulst<sup>2</sup>, Bob Johnsen<sup>3</sup>, David L. Baillie<sup>3</sup>, Hanns Lochmüller<sup>4</sup>, Christian Thirion<sup>2</sup> and Laurent Ségalat<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, UMR 5534, Université Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex, France, <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Myology, Department of Neurology, Friedrich Baur Institute, Ludwig Maximilians University of Munich, Munich, Germany, <sup>3</sup>Department of Molecular Biology and Biochemistry, Simon Fraser University, Burnaby, BC, Canada, V5A 1S6 and <sup>4</sup>Institute of Human Genetics, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK

Received June 8, 2009; Revised July 6, 2009; Accepted July 27, 2009

Duchenne Muscular Dystrophy is an inherited muscle degeneration disease for which there is still no efficient treatment. However, compounds active on the disease may already exist among approved drugs but are difficult to identify in the absence of cellular models. We used the *Caenorhabditis elegans* animal model to screen a collection of 1000 already approved compounds. Two of the most active hits obtained were methazolamide and dichlorphenamide, carbonic anhydrase inhibitors widely used in human therapy. In *C. elegans*, these drugs were shown to interact with CAH-4, a putative carbonic anhydrase. The therapeutic efficacy of these compounds was further validated in long-term experiments on *mdx* mice, the mouse model of Duchenne Muscular Dystrophy. Mice were treated for 120 days with food containing methazolamide or dichlorphenamide at two doses each. *Musculus tibialis anterior* and diaphragm muscles were histologically analyzed and isometric muscle force was measured in *M. extensor digitorum longus*. Both substances increased the tetanic muscle force in the treated *M. extensor digitorum longus* muscle group, dichlorphenamide increased the force significantly by 30%, but both drugs failed to increase resistance of muscle fibres to eccentric contractions. Histological analysis revealed a reduction of centrally nucleated fibers in *M. tibialis anterior* and diaphragm in the treated groups. These studies further demonstrated that a *C. elegans*-based screen coupled with a mouse model validation strategy can lead to the identification of potential pharmacological agents for rare diseases.

## INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a progressive disorder affecting striated and cardiac muscles. It is caused by mutations in the dystrophin gene (1,2), one of the largest gene in the human genome. This gene encodes a large cytoskeletal protein called dystrophin that links the cytoskeleton to the extracellular matrix (3–5). DMD is the most prevalent X-linked recessive neuromuscular disorder, affecting 1 in 3500 male children.

There is still no curative treatment available against DMD. Current treatments for DMD are symptomatic and significantly improve longevity and quality of life but do little to prevent loss of muscle function (6). The standard care applied to DMD patients is prednisone therapy (7). Several therapeutic strategies have been developed in the past decade for which clinical trials have already been initiated: the reconstitution of dystrophin expression by replacing the mutated gene using adeno associated virus (AAV) vectors (8), repairing the endogenous gene by antisense-mediated

\*To whom correspondence should be addressed at: CNRS-CGMC-UMR5534, Université Lyon-1 Claude Bernard, Batiment Mendel, 43 bld du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne Cedex, France. Tel: +33 472432951; Fax: +33 472432951; Email: segalat@cgmc.univ-lyon1.fr

<sup>†</sup>G.J. and C.P. contributed equally to the study.

exon skipping (9), stop codon readthrough, upregulation of compensating molecules such as utrophin (10), blocking muscle degradation by myostatin inhibition, anti-inflammatory therapy, cell-based therapies (11,12). However, efficacy and safety of those novel therapeutic approaches is still a matter of debate. Consequently, testing small molecules for therapeutic efficacy against DMD is a valuable approach.

Since mice have a high unitary cost, random screens of large numbers of compounds on mouse model may not be feasible. In addition, there is still no *in vitro* model that recapitulates enough properties of the disease. Invertebrate models such as *Caenorhabditis elegans* are complementary models to the mouse because they are cheap, grow rapidly and are amenable to large genetic studies (13–15). So, the main purpose of screens conducted on *C. elegans* is to serve as a first-pass filter, in order to select lead compounds out of chemical libraries, and to eventually test the selected items on the *mdx* mouse.

*Caenorhabditis elegans* possesses a dystrophin-like gene (*dys-1*) encoding a protein displaying the same structural features as the human dystrophin (16). When in a sensitized *hll-1* genetic background, *dys-1* mutations lead to a progressive impairment of locomotion (17). Examination of the musculature of these animals reveals a widespread degeneration of the body-wall muscles which are responsible for the animal locomotion. These muscles have a sarcomeric structure and protein composition closely related to mammalian striated muscles (18). 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.

Carbonic Anhydrases (CA) are a family of metalloenzymes which have various tissue distributions and intracellular locations in mammals (19–21). There are several cytosolic isoforms (CA I–III, CA VII and CA XIII), five membrane-bound isozymes (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV and CA XV), two mitochondrial forms (CA VA and VB), as well as a secreted CA isozyme, CA VI. These enzymes catalyze the interconversion between carbon dioxide and the bicarbonate ion. They are thus involved in crucial physiological processes connected with respiration and transport of CO<sub>2</sub>/bicarbonate between metabolizing tissues and lungs. They are also involved in regulation of pH, CO<sub>2</sub> homeostasis, electrolyte secretion in a variety of tissues/organs, biosynthetic reactions, bone resorption, calcification, tumorigenicity and many other physiologic or pathologic processes (22,23). Since CAs are involved in a large variety of processes, they represent an important therapeutic target. Disorders including oedema, glaucoma, obesity, cancer, epilepsy, osteoporosis, periodic paralysis and ataxia are treated with CA inhibitors (20,21).

A screen of approximately 1000 compounds on the *dys-1(cx18)*, *hll-1(cc561)* model identified several substances that ameliorated the *C. elegans dys*-deficient phenotype. Two of the top-five hits turned out to be methazolamide (MTZ) and dichlorphenamide (DCPM). These molecules belong to the class of sulfonamides, known inhibitors of CA enzymes. In our study, CA inhibitors were assessed for their therapeutic potential of dystrophin-deficient muscular dystrophy in two animal models, *C. elegans* and the *mdx* mouse.

## RESULTS

### Effect of MTZ and DCPM on *C. elegans* dystrophin-deficient muscle

We exploited a *C. elegans* model of dystrophin-dependent muscle degeneration in a screen of bioactive molecules to identify potential blockers of muscle degeneration. The relevance of such a screen has been previously demonstrated (24). During this screen, we observed by visual inspection that 7-day *dys-1(cx18)*; *hll-1(cc561)* adult animals grown on 0.5 mg/ml (2 mM) of MTZ or on 0.1 mg/ml (0.3 mM) of DCPM plates moved better than untreated animals, suggesting that the function of the body wall muscles in these animals was partially conserved. Examination of the musculature by phalloidin staining, which labels actin fibers, revealed a dramatic reduction of muscle degeneration in treated animals (Figs 1 and 2). Whereas the untreated dystrophic animals show 5–6 degenerating or dead muscle cells per pair of quadrants, the animals treated with MTZ or DCPM present only 1–2 such cells.

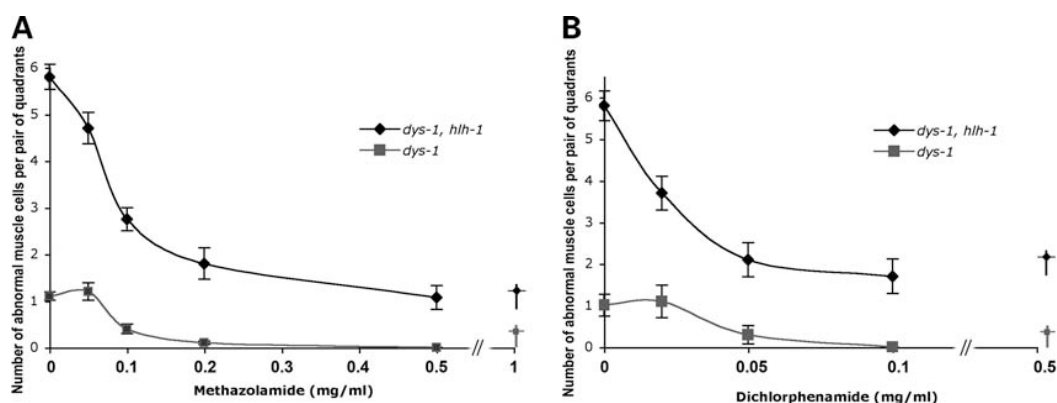
Dose–response experiments (Fig. 1) showed that the effect of MTZ and DCPM on muscle degeneration is optimal at 0.5 mg/ml and at 0.1 mg/ml in the medium, respectively (Fig. 1). The positive effect was qualitatively visible down to 0.1 mg/ml for MTZ and down to 0.01 mg/ml for DCPM. Concentration of drugs in the medium above 1 mg/ml of MTZ or 0.5 mg/ml of DCPM was toxic to the animals. The actual drug concentration in the animal is not known but is thought to be 100–1000× lower.

The muscle degeneration in the DMD worm model is caused by the synergy between *dys-1(cx18)* and *hll-1(cc561)* mutations, in which the mild *hll-1(cc561)* mutation serves as an amplifier of the *dys-1(cx18)* phenotype (17). Therefore, we wanted to verify that MTZ or DCPM were also active on the *dys-1(cx18)* mutation alone. The dose-effect experiments on *dys-1(cx18)* showed a decrease in muscle degeneration similar to that of the double mutant (Fig. 1).

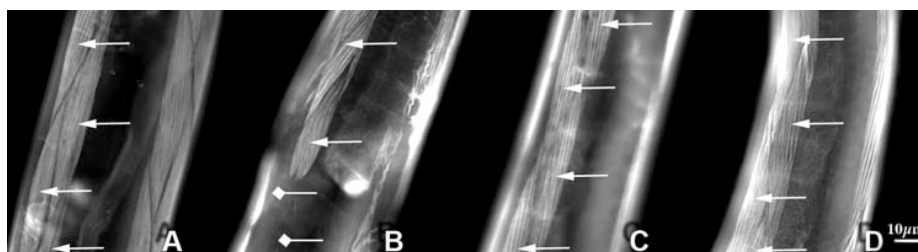
The degeneration observed in the DMD worm model is activity- and time-dependent (17). Consequently, compounds that have a sedative effect or reduce growth rate also reduce muscle degeneration. To verify that MTZ and DCPM did not act this way, but had a real beneficial effect on muscle, we tested their impact on these parameters. Addition of 0.5 mg/ml of MTZ or 0.1 mg/ml of DCPM had no sedative effect on the locomotion and growth rate of *dys-1(cx18)* or wild-type worms compared with untreated animals (Fig. 3A and B). These results demonstrated that the gain obtained with MTZ and DCPM on muscle degeneration is not due to a sedative effect or to a reduced growth rate.

### Effect of CA inhibition on *C. elegans* dystrophin-deficient muscle

Since we found that MTZ and DCPM can reduce muscle degradation in the dystrophic model of *C. elegans*, we further investigated the mode of action of these compounds. Sulfonamides are known to be strong inhibitors of human CAs (20). In *C. elegans*, this class of enzymes is poorly documented. The only documented CA is *cah-4* (25,26). Consequently, we first inventoried CAs in *C. elegans*. A Blast



**Figure 1.** Methazolamide (MTZ) and Dichlorphenamide (DCPM) reduce muscle degeneration in *C. elegans*. Number of missing or degenerating body-wall muscle cells per pair of quadrants of 7-day *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* and *dys-1(cx18)* animals exposed to various concentration of MTZ (A) or DCPM (B). Abscissa value represents the concentration in mg/ml in the medium. The concentration within the animals is unknown. Standard error of the mean (SEM) is indicated by the vertical lines. Cross symbol (†) represents a toxic concentration (lethality or slow growth).



**Figure 2.** Representative images of muscles of treated and non-treated *C. elegans*. Striated body-wall muscles cells (arrow) of wild-type animal (A) and of dystrophic animals *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* treated with DMSO (B), MTZ 0.5 mg/ml (2 mM) (C) or DCPM 0.1 mg/ml (0.3 mM) (D). Body-wall muscles appear as diamond-shaped cells (arrow). Dystrophic animals show a high number of degenerating muscles cells (diamond arrows) rarely seen in animal treated with MTZ or DCPM. These animals were grown 7 days at 15°C in the presence of drugs, and were observed after fixation and phalloidin–rhodamine incubation.

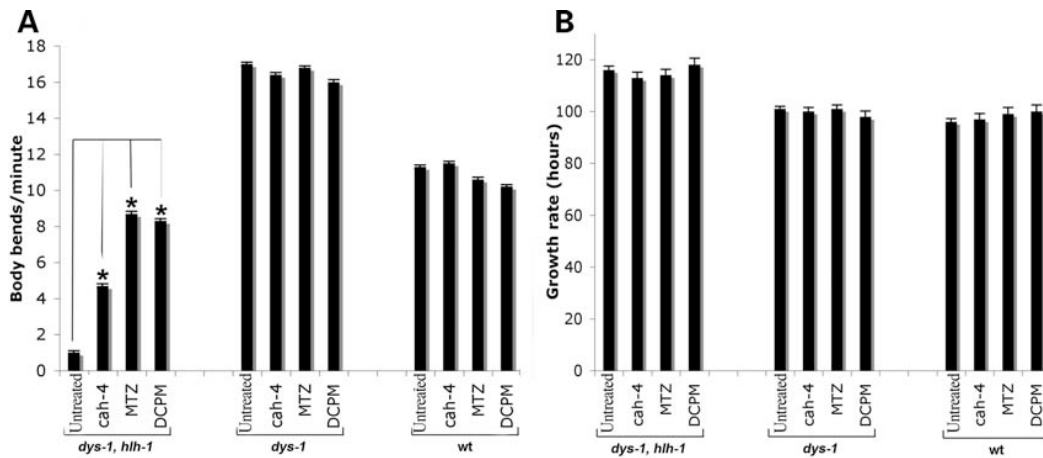
from 14 *Homo sapiens* sequences obtained from the NCBI website revealed six putative CAs in the *C. elegans* genome. These genes are called *cah-1* to 6. A maximum likelihood tree was constructed (Fig. 4). This tree shows that only *cah-1* and *cah-2* present a high homology with human CA-X and XI. The other worm CAs are too divergent to be matched with human CAs.

We hypothesized that the effect of MTZ and DCPM could be mimicked by knocking down one or several *C. elegans* *cah* genes. We tested this hypothesis by double-stranded RNA-mediated interference (RNAi) feeding experiments. RNAi is a useful method for gene inactivation in *C. elegans* (27). Four clones available from Geneservice Bank (III-2NO3, II-5LN09, X-7M16, X-6I20) allowed targeting of four of the six *cah* gene (*cah-1*, *cah-2*, *cah-3* and *cah-4*). The last two clones were constructed for the purpose of this study. RNAi experiments with the six clones showed that only inhibition of the gene *cah-4* significantly reduced muscle degeneration in the *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* strain (Fig. 5). RNAi experiments ran on gene combinations did not bring additional information, suggesting that *cah-4* is solely responsible for the drug response to both MTZ and DCPM (Data not shown). Furthermore, *cah-4* RNAi did not impact the activity or growth rate of worms, indicating that it is the *cah-4* reduction *per se* which is responsible for the

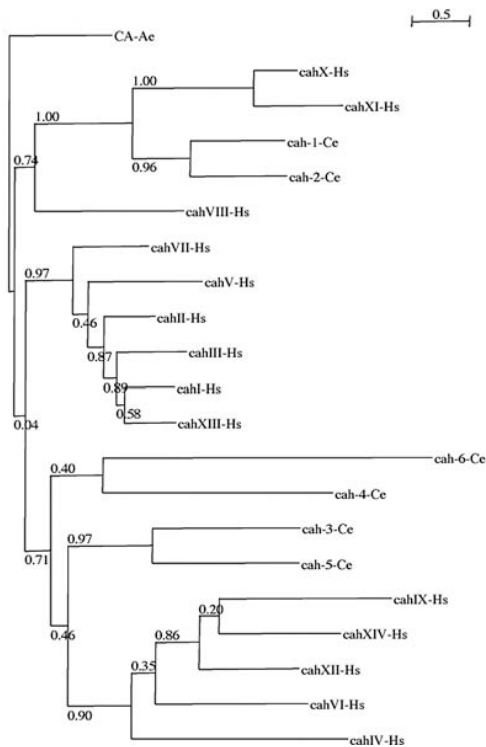
beneficial effect (Fig. 3A and B). Moreover, this experiment showed a partial restoration of *dys-1; hlh-1* locomotion.

#### Synergy between sulfonamides and CA RNAi in *C. elegans*

To further elucidate the role of these genes in the response of sulfonamide, we tested for a cooperative effect between the presence of sulfonamide and the diminution of each *cah* transcripts. A dose–response experiment was conducted in presence or absence of *cah* dsRNA. No statistical difference was observed between the dose–response control and the dose–response coupled with the inhibition of *cah-1*, *cah-2*, *cah-3*, *cah-5* and *cah-6* transcripts (Fig. 6). The optimal concentration remains around 0.5 mg/ml in all conditions, and the sublethal MTZ concentration remains also unchanged (1 mg/ml). On the contrary, the inhibition of *cah-4* transcripts in presence of MTZ or DCPM showed a dramatic shift of the dose–response curve to the left. The MTZ is lethal at 1 mg/ml in the medium for the negative control and this concentration goes down to 0.1 mg/ml when coupled with an inhibition of *cah-4* transcripts. The optimal concentration to reduce degeneration goes down from 0.5 to 0.01 mg/ml when coupled to *cah-4* RNAi. For DCPM, the toxic concentration is shifted from 0.5 to 0.05 mg/ml when coupled with *cah-4* RNAi and the optimal concentration is shifted from 0.1 to 0.005 mg/ml.



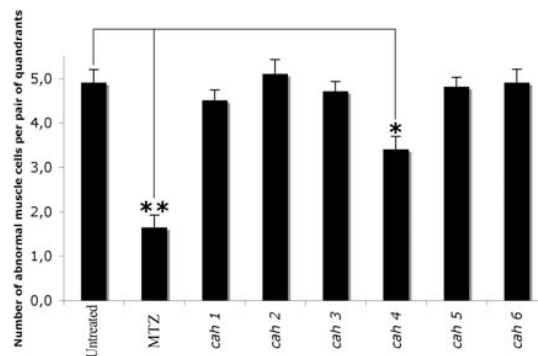
**Figure 3.** Comparison of locomotion rate and growth rate of MTZ and DCPM treated animals. Locomotion rate (A) and growth rate (B) of *dys-1(cx18); hhl-1(cc561)*, *dys-1(cx18)* and wild-type adult animals exposed to DMSO 1% (Untreated), *cah-4* RNAi (*cah-4*), 0.5 mg/ml of MTZ and 0.1 mg/ml of DCPM. Mean of 30 worms  $\pm$  Standard Error of the Mean (SEM), \* different from control at  $P < 0.01$ .



**Figure 4.** Phylogenetic relationships of *Homo sapiens* (Hs) and putative *C. elegans* (Ce) Carbonic Anhydrase. The tree was constructed by the maximum likelihood method. The number at each node represents bootstrap values from 500 replicates. The *Anthopleura elegantissima* (Ae) CA was used as an outgroup. The bar indicates the number of substitutions per site.

These results suggest that the mechanism involved is common to both compounds, and further demonstrate that the protein CAH-4 is their target.

As a negative control the same experiments were performed with Imipramine, Nifedipine and Trimipramine. These drugs have been previously shown to reduce muscle degeneration

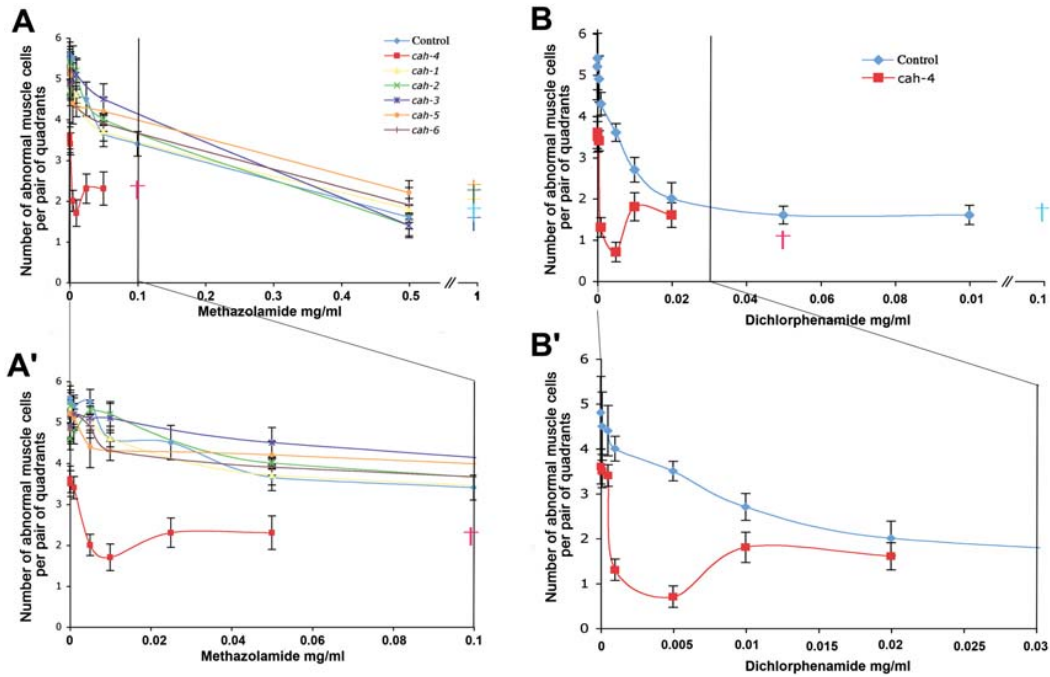


**Figure 5.** Effect of *cah* gene inhibition on *C. elegans* muscle degeneration. Number of missing or degenerating body-wall muscle cells per pair of quadrants of 7-day *dys-1(cx18); hhl-1(cc561)* animals. Each of the six *C. elegans* *cah* genes was specifically inhibited by RNAi. Untreated: Dystrophic animals exposed to DMSO 1% and empty vector L4440. MTZ: Dystrophic animals exposed to 0.5 mg/ml of MTZ and empty vector L4440. Mean of 30 worms  $\pm$  SEM, \* different from negative control at  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ .

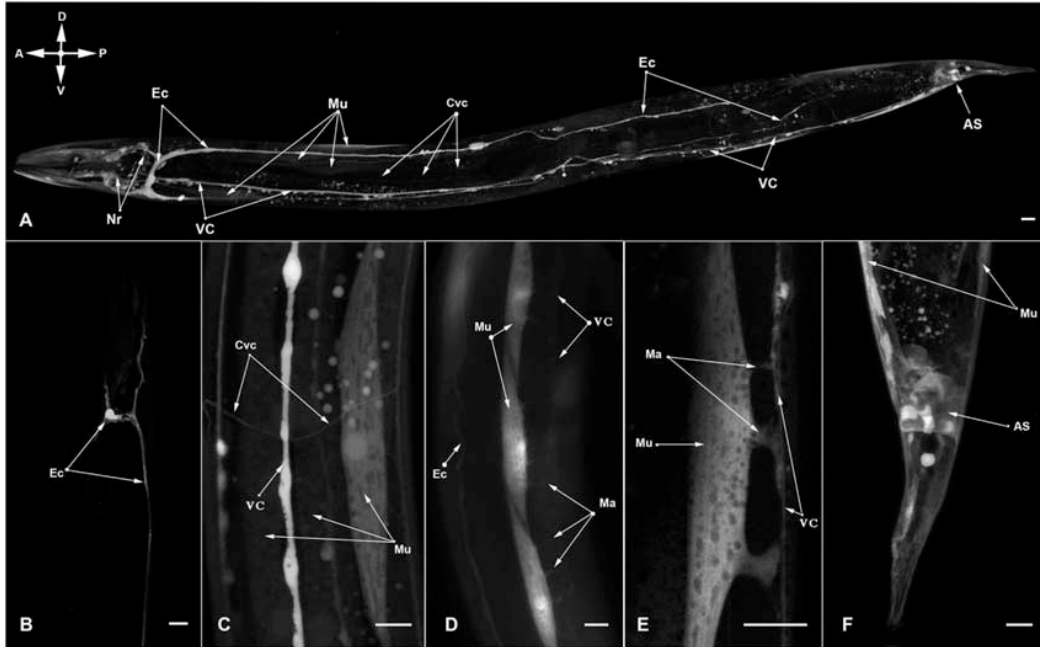
in *C. elegans* but are not CA inhibitors (28). In presence of *cah-4* dsRNA, their respective sublethal concentration remained unchanged (data not shown), thereby demonstrating that MTZ and DCPM interact with CAH-4 in a specific way.

#### CAH-4 tissue distributions

We then investigated the tissue expression of *cah-4*. To localize CAH-4, a plasmid carrying the putative endogenous promoter of *cah-4* in frame with GFP was constructed and injected in worms. Fifty fluorescent worms (all stages) were analyzed under confocal microscopy. The GFP protein was localized at all stages in the excretory cell, in the nervous system (nerve ring, dorsal and ventral cord and motor neuron commissures), in body wall muscles and in the anal muscles (Fig. 7). This expression pattern is consistent with the effect observed.



**Figure 6.** Synergetic effect between sulfonamide treatment and *cah* gene inhibition. Number of missing or degenerating body-wall muscle cells per pair of quadrants of 7-day *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* animals exposed to various concentration of MTZ (A and A') or DCPM (B and B') in presence or absence of *cah* dsRNA. Mean of 30 worms  $\pm$  SEM. Cross symbol (†) represents a toxic concentration.

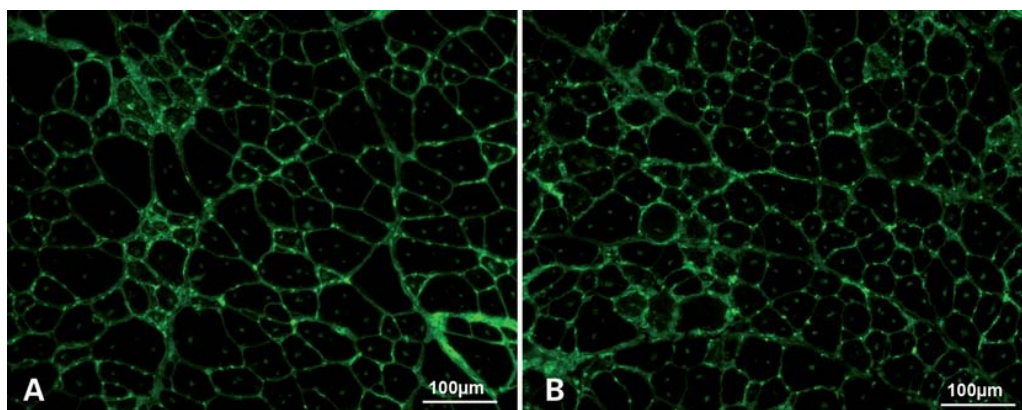


**Figure 7.** CAH-4 tissue expression. Expression of *cah-4* in *C. elegans* detected by reporter gene. Expression was observed in the excretory cell (Ec), nerve ring (Nr), ventral and dorsal cord (VC, DC), commissure from ventral cord (Cvc), body wall muscle (Mu), muscle arms (Ma) and around the anal sphincter (AS). Auto-fluorescent gut granules are also visible. Bars indicate 10  $\mu$ m.

**Effect of MTZ and DCPM on *mdx* mouse muscle**

*Treatment of mdx mice with DCPM and MTZ.* We then analyzed whether MTZ and DCPM would have an effect on the

mouse *mdx* model of DMD. Sex- and age-matched (70-day) *mdx* mice were fed 120 days with drug containing food or control food with identical composition, and animals were then analyzed. For DCPM treatment, a low-dose



**Figure 8.** Representative wheat germ agglutinin (WGA) of *tibialis anterior* (TA) muscle. (A and B) Alexa 488 conjugated WGA-staining of TA muscle of untreated (A) and 5× MTZ-treated (B) *mdx* mice. WGA binds to N-acetylglucosaminyl and sialic acid residues at the border of the muscle fibers.

(15 mg/kg/day) or a high-dose (60 mg/kg/day) was administered, which is, respectively, 5× and 20× human average posology. For MTZ, 20× posology (86 mg/kg/day) was lethal, so we administered a low concentration which was 1× posology (4.3 mg/kg/day) and a high concentration which was 5× posology (21.5 mg/kg/day). Concentrations of drugs in food were calculated on the basis of that *mdx* mice eat ~15% of their body weight per day (L.S., unpublished results). All mice had similar weight at the end of the treatment suggesting that food intake was comparable. Two types of readouts were conducted: histology and force measurement.

**Histology assessment of MTZ treated muscles.** Muscles from drug-treated animals were histologically analyzed. Representative Wheat Germ Agglutinin (WGA-staining), for *tibialis anterior* (TA) muscles of MTZ high dosage group is shown in Figure 8. We performed Haematoxylin Eosin staining (HE-staining) to obtain a general impression of the histological appearance of both groups to be compared. No obvious differences of the histological appearance became visible for 5× MTZ treated muscles compared with the untreated group (data not shown). However, an automated analysis of the fiber type distribution revealed subtle differences (see below). In Figure 8A and B the Alexa 488 conjugated WGA-staining for sections from untreated and 5× MTZ treated *mdx* mice is shown. The WGA-staining allowed clear delineation of fiber boundaries for determination of minimal fiber diameters. Myosin Heavy Chain (MHC) double staining (Fig. 9A) provided information about the fiber type distribution, MHC isoforms I, and type IIa and IIb fibers, which are separately stained by the protocol applied. Both substances showed no effect on the fiber type composition (data not shown).

**Automated histological analysis of muscle sections.** In order to obtain a reliable and secured statistical analysis of pathology-relevant histological parameters of dystrophic muscle in *mdx* mice, a standardized and automated quantitative method was developed with S.CO Lifescience (München, Germany) (Fig. 9). Two adequate parameters for analysis of the histological status were chosen. The minimal Feret's diameter of the fibers, and the percentage of centrally

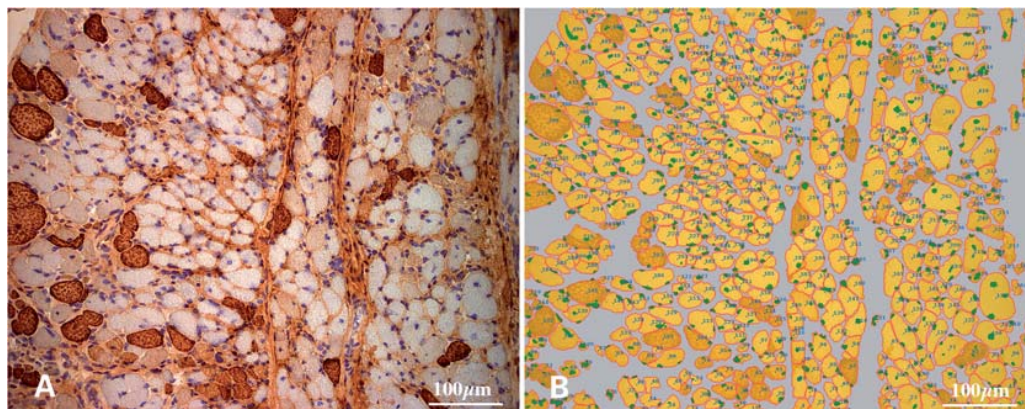
nucleated fibers (indicative of muscle regeneration) were determined (29).

Dystrophic muscle typically displays a higher variability of the muscle fiber diameter compared with wild-type muscle. The variance coefficient (VC) of all muscle fiber minimal Feret's diameters of a given muscle cross-section provides a numerical value of the fiber size variability (29). The minimal Feret's diameter is very robust against experimental errors such as the orientation of the sectioning angle. Regarding the second histological parameter, muscles of wild-type mice rarely contain centralized nuclei, whereas muscles of *mdx* mice show an average percentage of up to 66% of centrally nucleated fibers after the first crisis of degeneration and regeneration at around 7 weeks of age.

In this study, we examined about 3000 fibers of TA and diaphragm (DIA) muscles for each 5× MTZ treatment and untreated group covering both parameters. Automated histological analysis was performed only for the 5× MTZ treated group and its untreated control group, because quality of the muscles belonging to the DCPM group was not sufficient and thus analysis not possible.

The histological analysis of the TA muscle showed a significant decrease of the percentage of centrally nucleated fibers in the 5× MTZ treated group (MTZ:  $57.4 \pm 14.9$ ; control:  $65.1 \pm 11.2$ ;  $P = 0.03$ ) (Fig. 10A), and a non-significant higher VC with  $Z = 487$  in the treatment group compared with  $Z = 448$  in the control group ( $P > 0.05$ ). In accordance with the higher VC in the 5× MTZ-treated group, we were able to distinguish a shift of the minimal Feret's diameter towards smaller fibers with diameters  $< 20 \mu\text{m}$  (Fig. 10C) in the 5× MTZ-treated group ( $P = 0.03$ ), whereas the number of fibers between 30 and 40  $\mu\text{m}$  were higher in the untreated group ( $P = 0.02$ ) (Fig. 10C).

In DIA no significant change in the percentage of centrally nucleated fibers between 5× MTZ treated group ( $72.1 \pm 6.7$ ) and untreated control group ( $75.1 \pm 7.0$ ) was observed ( $P = 0.085$ ) (Fig. 10B) and the VC of the muscle fiber size distribution in diaphragm was slightly lower with  $Z = 425$  in the treatment group compared with  $Z = 439$  in the untreated group ( $P > 0.05$ ). Moreover, a very similar fiber size distribution was observed in both groups (Fig. 10D).



**Figure 9.** Automated quantitative analysis of muscle histology. (A) Original photo of a diaphragm (DIA) section stained with Myosin Heavy Chain (MHC)-double staining of *mdx* mouse. Brown fibers display MHC fiber type I and blue fibers fiber type IIA or IIB. (B) Processed photo of the same DIA section mentioned in (A). The yellow areas describe the fibers the program recognizes (type I: dark yellow, type II: bright yellow). Each identified fiber is labeled with a number defining its ID. Connective tissue is not recognized (grey areas). Nuclei are marked with green dots.

*Muscle force measurements of mdx mice treated with MTZ and DCPM.* The ability of therapeutic drugs to improve force generation was determined by isometric force measurement using different protocols able to distinguish between maximal force generation capability (tetanic force) and resistance to eccentric contraction. Treatment of mice with DCPM ( $20\times$  posology) increased significantly the tetanic specific force of *extensor digitorum longus* (EDL) muscle by 30% in the treated group (DCPM:  $282 \pm 64$ ; untreated:  $198 \pm 53$ ;  $P = 0.034$ ) (Fig. 11B). This improvement in muscle force generation was not seen in the second treatment group at lower concentration (data not shown).

We further examined in *mdx* EDL muscle the maximal force generation using an eccentric contraction protocol with elongation of the muscle for 10% of its resting length ( $L_0$ ). Treatment with DCPM at both concentrations, however, was not able to improve this parameter. On the contrary, results in Figure 11A show a significant ( $P = 0.034$ ) higher percentage of the mean force drop in DCPM treated mice ( $67 \pm 14\%$ ) compared with untreated *mdx* mice ( $46 \pm 15\%$ ). These results show that DCPM treatment improved the effective muscle strength, but was not able to increase muscle fiber resistance to exercise.

The  $5\times$  MTZ treatment group displayed a non-significant higher percentage of the mean force drop ( $55 \pm 17$  versus  $49 \pm 15\%$  in the untreated group) (Fig. 11C), whereas tetanic specific force increased in the  $5\times$  MTZ treated mice by 25% (MTZ:  $264 \pm 57$ ; untreated:  $197 \pm 86$ ;  $P = 0.05$ ), as shown in Figure 11D.

Overall, with the exception of the eccentric contraction test, these substances show a clear improvement of the dystrophic phenotype in *mdx* mice.

## DISCUSSION

### *Caenorhabditis elegans* as a model for drug discovery

Our findings confirm the use of *C. elegans* as a model organism for screening, identifying and characterizing potential lead pharmacological agents. In this study, we show the therapeutic

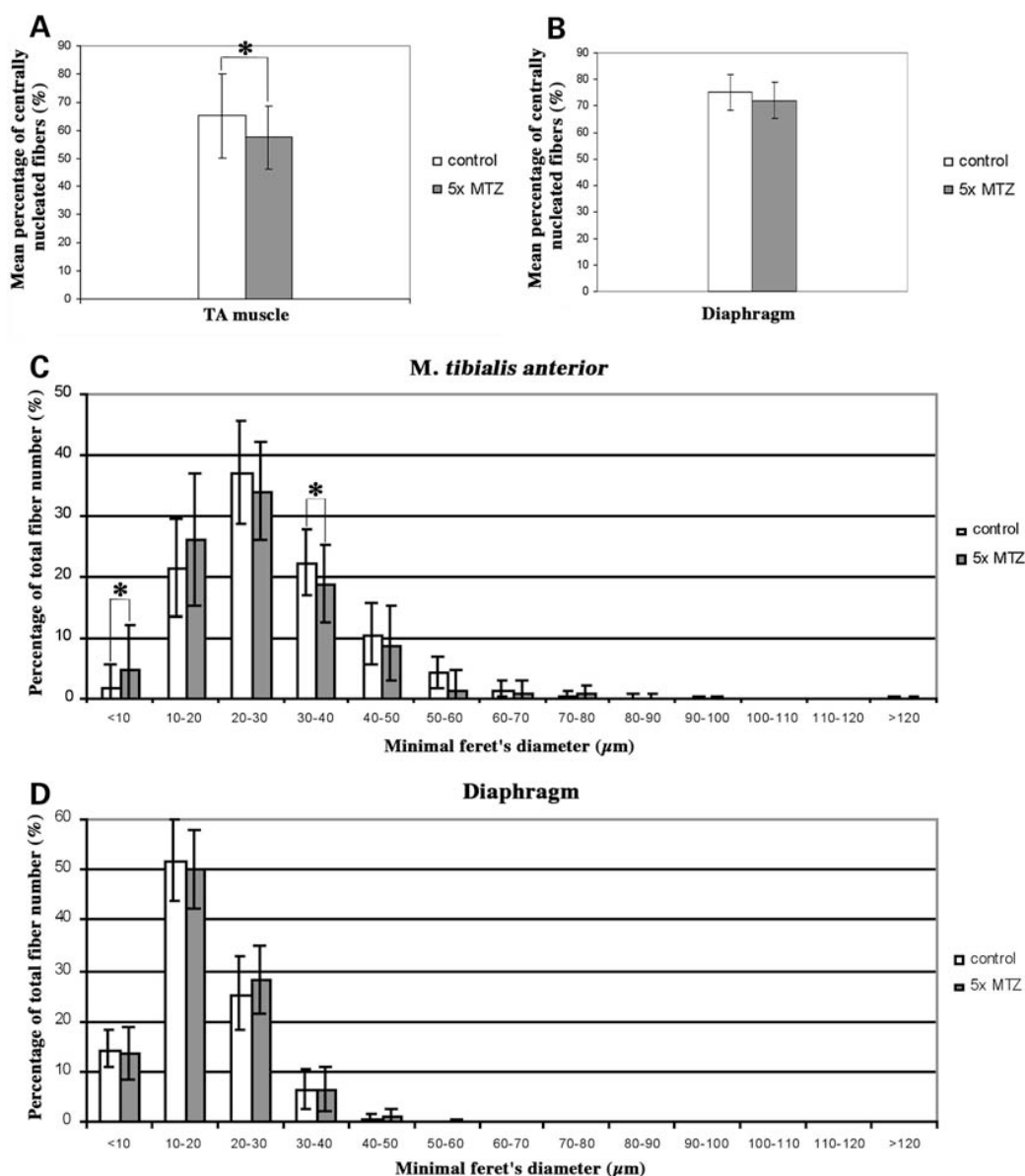
potential of a previously unsuspected class of molecules for the treatment of DMD. One of the concerns of using the *C. elegans* model for drug discovery is the determination of the effective dose for a lead compound. The molecules used in this study were provided to the worms through the media. *C. elegans* has an outer exoskeleton (cuticle) which provides protection from environmental chemicals (30). Thus, the effective concentration absorbed through the cuticle and/or the intestinal lumen is not known and is approximately  $100\text{--}1000\times$  lower than in the medium (28). However, this limitation does not impede the use of *C. elegans*. Data have to be considered mostly in a qualitative manner.

### Sulfonamide and CA in *C. elegans*

Sulfonamide is known to be strong inhibitors of several CA in humans (20). After identifying CAs in the worm, we knocked down their expression by RNAi experiments and we found that RNAi inhibition of *cah-4* reduced muscle degeneration (Fig. 4). Since *cah-4* reduction mimics the effect of sulfonamide treatment, it is likely that it is the target of the compounds (Fig. 5). Moreover, several sulfonamides including MTZ and DCPM have already been found to be active on CAH-4 with  $k_i$  values at 42 and 38 nM, respectively (25), and null mutants *cah-4(tm2805)* are lethal. We postulated that this lethality is due to the absence of CAH-4 activity since we could mimic it with a high concentration of MTZ (1 mg/ml) or DCPM (0.5 mg/ml). Furthermore, worms display an increased sensitivity to MTZ and DCPM when these treatments are coupled with *cah-4* RNAi (Fig. 6). All together, these results suggest that the gain obtained in the *C. elegans* dystrophin-deficient model is due to an inhibition of CAH-4 activity by sulfonamide.

Furthermore, the *cah-4::GFP* reporter gene was localized in body wall muscles and in the nervous system. Although it cannot be formally demonstrated, it is likely that sulfonamides act directly on muscles for the following reasons: (i) Compounds did not reduce locomotion of *dys-1* and wild-type worms, indicating an absence of a major effect on the





**Figure 10.** Quantitative assessment of muscle histology. (A and B) Percentage of centrally nucleated fibers in TA muscle (A) and diaphragm (B) of untreated versus 5 × MTZ-treated *mdx* mice. Data expressed as mean ± SD; mean percentage of centrally nucleated fibers (*n* = 3000). (C and D) Fiber size distribution in TA muscle (C) and DIA (D) of untreated versus 5 × MTZ-treated *mdx* mice. \* Different from control at *P* < 0.05.

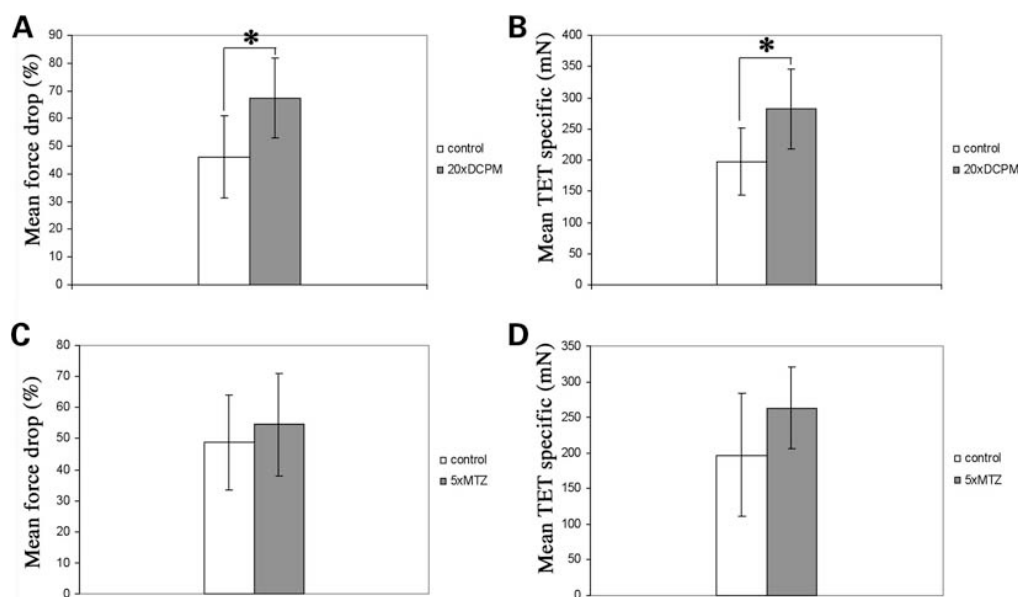
central nervous system (Fig. 3A). (ii) RNAi is poorly active on the nervous system of *C. elegans* (31), yet it is of considerable effect in our experiment.

MTZ and DCPM are known to induce metabolic acidosis and their mechanisms of action most likely involve changes of pH that alter the transmembrane potential and excitability (32). Lower pH values reduce potassium conductance of the cell membrane and have an effect on the activation and inactivation of sodium and calcium channels, respectively (33). On the other hand, acidification of the sarcoplasmic reticulum *trans*-chamber induced a reduction of the unitary conductance of the Ca<sup>2+</sup> release channel (34). Since we found that calcium channel activity is a critical factor in the progression of

dystrophin-dependent muscle degeneration in *C. elegans* (35), we hypothesize that an appropriate concentration of MTZ or DCPM could reduce Ca<sup>2+</sup> transients and thus decrease muscle degeneration in *C. elegans*.

#### Effect of MTZ and DCPM on *mdx* mouse muscle

Despite the fact that muscle pathology for dystrophin-deficiency differs between the *mdx* mouse model and human patients, the *mdx* mouse model is the most important animal model for preclinical studies in DMD research (36,37). In the present study, we have applied recommended methods for pre-clinical analysis in DMD research. Readout parameters



**Figure 11.** Muscle force measurements of EDL from treated and untreated *mdx* mice. (A and B) Muscle force measurements for right EDL after 120 days treatment with 20 × DCPM of 6-month-old male *mdx* mice ( $n_{\text{control}} = 7$ ,  $n_{\text{DCPM}} = 6$ ). (A) Mean force drop after eccentric stimulation (B) Mean tetanic specific force (TET specific) obtained by normalization of tetanic maximal force (TET max) with CSA (cross sectional area). (C and D) Muscle force measurements for EDL after 120 days treatment with 5 × MTZ of 6-month-old female *mdx* mice ( $n_{\text{control}} = 6$ ,  $n_{\text{MTZ}} = 5$ ). (C) Mean force drop after eccentric stimulation of untreated and 5 × MTZ-treated *mdx* mice (D) Mean TET specific obtained by normalization of TET max with CSA ( $P = 0.05$ ). Data expressed as mean ± SD. \*Different from control at  $P < 0.05$ .

included muscle force measurement on isolated muscle, and the histological examination including the percentage of centrally nucleated fibers and the VC of the fiber size which reflects the degeneration and regeneration processes.

Histological analysis of the TA muscle revealed a statistically significant decrease in the percentage of centrally nucleated fibers for 5 × MTZ treated mice, implying less degeneration/regeneration occurring during the treatment period. This result is particularly remarkable, since the treatment was initiated at an age of 70 days, a time point where intense degenerative and regenerative activity had already taken place (38–40).

Moreover, automated histological analysis revealed an increase in fiber size variability in the 5 × MTZ-treatment group, which is not obvious by simple visual inspection of the corresponding HE sections. A detailed analysis of the fiber size distribution revealed the occurrence of more smaller and larger fibers, which typically arise during cycles of regeneration and degeneration, in this group. In addition Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) staining for regenerating fibers clearly showed more NCAM positive fibers, corroborating the higher number of small fibers observed here (data not shown). DIA presents the most severely affected muscle in *mdx* mice. In this study treatment of *mdx* mice with 5 × MTZ did not ameliorate the histological parameters of the diaphragm. Possibly, damage associated with dystrophin-deficiency in the diaphragm is too severe to be alleviated by the treatment applied in this study. Also, the treatment window used here may occur to late to show any improvement for the diaphragm.

We then investigated the functional analysis of muscle force measurements of limb muscles. Significant differences

between *mdx* and wild-type mice are easier observed in older mice (41). In the MTZ- and DCPM-high dosage groups an increase of the tetanic specific force led to an improvement of the maximal force. The increase in muscle force was not due to differences in muscle weight or size, since normalization of isolated muscles regarding to these two parameters occurred. The maximal force generation, but not the overall resistance of the muscle to a stimulated endurance protocol, was increased.

A possible mode of action of MTZ and DCPM could be through a reduction of reactive oxygen species, in particular by blocking the muscle-abundant CAIII (42–44). However, since CAIII is more than 10 000 times less sensitive to MTZ compared with other CA isoforms, this hypothesis is still a matter for conjecture (26).

Wetzel *et al.* analyzed the effects of CA inhibitors on muscle force generation and  $\text{Ca}^{2+}$ -transients. Inhibition of a sarcoplasmic reticulum CA (SR-CA) isoform was suggested. Indeed, MTZ was shown to be a strong inhibitor of the membrane bound CAIX and of the *C. elegans cah-4*, too, and it was stated that inhibition of only one SR-CA isoform does not affect muscle contraction, whereas inhibition of all three CAs IV, IX and XIV does (26,45). Thus inhibition of these CA isoforms could be implicated in the observed phenotypes in this study as well. Treatment of isolated muscle bundles with one particular inhibitor L-645151 or 6-ethoxyzolamide increased the peak force signals of twitches on EDL and Soleus and showed a prolonged  $T_{1/2}$  relaxation time. The authors suggested that CAs generate  $\text{H}^+$  outside the SR and supply the ions for the coupled  $\text{Ca}^{2+}$ – $\text{H}^+$  bidirectional transport across the SR membrane and buffer incoming  $\text{H}^+$  ions

inside the SR by catalysis of the reverse reaction (46). Bruns *et al.* (47) showed an acceleration of the  $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$  reaction of  $\sim 1000$ -fold by the SR-CA. Catalysis by CAII reduced the half time from 7 s to  $\sim 7$  ms. Inhibition of CAs by sulfonamides was shown to slow  $\text{Ca}^{2+}$  release from the SR. Consequently, release and uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  as well as the rise time of twitches (increase in force) were prolonged, providing a plausible explanation for the increase in maximal tetanic force by CA inhibitors.

Despite a decrease in resistance of muscle fibers to eccentric contractions, the analyzed substances DCPM and MTZ showed efficacy in the *mdx* mouse and increased the specific tetanic muscle force, demonstrating that a *C. elegans* screen coupled with a mouse model validation strategy can conduct to the identification and characterization of potential drugs against rare diseases. Differences in CA usage and model physiology likely account for differences of responses observed between the two models.

At this time, sulfonamide like MTZ and DCPM may not be pursued in further preclinical for treatment of DMD, but the development of isozyme-specific or at least organ-selective CA inhibitors may be highly beneficial to improve their efficacy against DMD and applied to other muscular dystrophies, as well as devoid of major side effects.

## MATERIALS AND METHODS

### Strains and culture conditions

*Caenorhabditis elegans* strains were cultured at 15°C on 6 cm Petri dishes containing NGM agar and a lawn of *Escherichia coli* OP50 unless stated otherwise. The *dys-1(cx18)*; *hlh-1(cc561)* strain was grown at 15°C, which is the permissive temperature for the ts mutation *hlh-1(cc561)* (17). The wild-type N2 strain was obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center.

### Pharmacological compounds

All pharmacological compounds were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Concentrated solutions of each drug were prepared by dissolving compounds in DMSO. *C. elegans* tolerates DMSO up to a final concentration of 2% vol/vol. Compounds were added to liquid NGM that had been autoclaved and cooled to 55°C, and the media was immediately mixed and dispensed into Petri dishes. *C. elegans* are permeable to aqueous and organic molecules, although the tough, outer cuticle may necessitate high concentrations. It is admitted that drugs penetrate the animals both by diffusion through the cuticle and ingestion (37). Drugs used in this study were: MTZ, DCPM.

### Muscle observation and analysis on *C. elegans*

The body wall muscles of *C. elegans* are divided into four quadrants (ventral right and left, dorsal right and left) each of which consists of 23 or 24 trapezoidal cells, arranged in two staggered rows. Muscle observation was performed on 7-day animals, after fixation, by rhodamine coupled-phalloidin staining, a marker of filamentous actin. Staining was done

according to Waterston *et al.* (48). Slides were observed on a Zeiss Axioplan microscope. A body wall muscle cell is considered degenerating when its actin fibers are fragmented or destroyed (17) (Fig. 1). Only the two most visible muscle quadrants of each animal were scored. Numbers were compared by a Student's *t*-test.

### Locomotion rate and growth rate

To estimate the locomotion rate of worms, 7-day animals were scored for the number of body bends generated during an interval of 1 min. A body bend was defined as one complete sinusoidal movement from maximum to minimum amplitude and back again. The growth rate refers to the time from P0 egg to the first F1 egg (generation time). At last 30 worms were examined.

### Phylogenetic analyses

To search for CA in *C. elegans*, a Blastp search was performed on *Caenorhabditis elegans* genome (taxid: 6239) with 14 Homo sapiens CAs sequences obtained from the NCBI website as query sequence. CA1 (NP\_001729.1), CA2 (NP\_000058.1), CA3 (AAH04897.1), CA4 (NP\_000708.1), CA5 (NP\_001730.1), CA6 (EAW71606.1), CA 7 (EAW83046.1), CA8 (NP\_004047.3), CA9 (NP\_001207.2), CA10 (NP\_064563.1), CA11 (NP\_001208.2), CA12 (EAW77648.1), CA13 (NP\_940986.1) and CA14 (NP\_036245.1). The *C. elegans* sequences selected are: *cah-1* (NP\_498083.1), *cah-2* (NP\_495567.3), *cah-3* (NP\_510674.1), *cah-4* (NP\_510265.1), *cah-5* (NP\_509186.3) and *cah-6* (NP\_491189.1). A maximum likelihood tree was constructed with SEEVIEW version 4.0 (49), based on alignment using MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (50). The *Anthopleura elegantissima* CA sequence (AF140537\_1) was used as an out-group. The bootstrap was performed with 500 replicates.

### RNAi procedure

RNAi experiments was performed on NGM plates supplemented with 100  $\mu\text{g/ml}$  ampicillin, 12.5  $\mu\text{g/ml}$  tetracycline and 1 mM IPTG as previously described (51). The RNAi clones for *cah-1*, *cah-2*, *cah-3* and *cah-4* were obtained from the Geneservice library. RNAi for *cah-5* and *cah-6* were obtained by amplification of  $\sim 600$  bp of genomic DNA of either gene and cloned into the RNAi feeding vectors L4440 (Courtesy of Dr Andrew Fire). Bacterial suspensions were used to seed RNAi plates. Five adult gravid worms were put on plate for one night and removed, so as the progeny were exposed to drug and RNAi from hatching to fixation. All animals were fixed and observed at day 7. As a control, *pos-1* RNAi knockdown performed in parallel resulted in near 100% embryonic lethality.

### Generation of *cah-4::GFP* construct and localization

The putative endogenous promoter of the *cah-4* gene has been cloned in-frame with GFP in pPD95.67 (provided by A. Fire). To ensure the amplification of *cah-4* promoter region,  $\sim 3$  kb

upstream of the second ATG start codon of *cah-4* have been amplified. Hermaphrodite from *dpy-5(e907)* strain (CB907) injected with 150 ng/ $\mu$ l pCeh361 (*dpy-5* rescuing construct), 10 ng/ $\mu$ l of promoter-*cah-4*::GFP fusion PCR product. Plasmid microinjection was performed as described (52). Individual F1 wild-types were isolated and we retained a line that transmitted F2 transgenics. Transgenic worms with GFP fluorescence were selected, and the animals were viewed by fluorescence microscopy on a Zeiss LSM 510 Meta fluorescence confocal microscope.

### Mice and treatment

*mdx* mice were obtained from Charles River Laboratories, Belgium. All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the institutional animal care committee.

Feeding started at an age of 70 days for mice with both 20  $\times$  (60 mg/kg/day) and 5  $\times$  (15 mg/kg/day) posology DCPM and 5  $\times$  (21.5 mg/kg/day) and 1  $\times$  (4.3 mg/kg/day) posology MTZ containing food. Control food consisted of the same compounds as the experimental food except the effective substances and did not show any effect on the weight, health and behavior of the mice.

### Muscle force measurement

After feeding for 120 days *Musculus extensor digitorum longus* was removed and connected to an isometric force transducer (type GRA FT-03; FMI, Seeheim, Germany) (model MIO-0501 DC-Brückenmeßverstärker; ALFOS AG, Biel-Benken; FMI, Seeheim, Germany) coupled to a signal amplifier (model MIO-0501 DC-Brückenmeßverstärker; FMI, Seeheim, Germany). Electrical field stimulation was generated by means of platinum electrodes on both sides of the muscle. Supramaximal stimuli with monophasic pulse duration of 1 ms were released through a computer-controlled electrical stimulator (model ISG-8834/1-S; FMI, Seeheim, Germany). Maximal isometric twitch force was assessed by three twitch stimulations. The maximal isometric tetanic force was measured stimulating the muscle at 125 Hz for 175 ms. Specific force was obtained by normalizing maximum tetanic force on total muscle cross-sectional area (CSA). CSA was calculated by following formula (53):

$$\frac{\text{muscle mass}[\text{mg}]}{\text{fiber length}[\text{mm}] \cdot 1.06 \text{ mg/mm}}$$

Measurements for eccentric contraction were performed in principle as described (54).

### Histochemistry and immunohistochemistry

Eight-micrometer serial cross sections of *M. tibialis anterior* and diaphragm were stained with Haematoxylin–Eosin and sequentially with antibodies against type I myosin heavy chain and type II (IIa and IIb) myosin heavy chain for MHC-double staining, respectively. HE-staining was carried out according to standard protocols. The antibody against type I myosin heavy chain (NovoCastra, Newcastle upon Tyne, UK) was diluted 1:100 as well as the type II myosin

heavy chain antibody (NovoCastra, Newcastle upon Tyne, UK). Each incubation of the sections with one of the two primary antibodies was followed by staining with the secondary antibody rabbit anti mouse Ig horseradish peroxidase (DAKO, Glostrup, Denmark) diluted 1:100. The different myosin heavy chain fiber types were visualized sequentially by different substrates 3,3' diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) showing a brown color (type I) and the substrate provided by the Vector SG visualization solution (Vector Laboratories, Burlingame, USA) showing a blue color (type IIa and IIb). After the first color reaction the sections were blocked with fetal calf serum before the second primary antibody was applied.

The fiber boundaries were stained by 100 ng/ml WGA conjugated to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Leiden, Netherlands). Nuclei were stained with 10 ng/ml DAPI (Sigma, Steinheim, Germany). Finally, cover slips were mounted in DakoCytomation Fluorescent (DAKO, Glostrup, Denmark).

### Quantitative assessment of muscle histology

Automatic quantitative analysis of muscle histology was performed with a special designed module for the image analysis system S.CORE by S.CO LifeScience, Munich, Germany. Three different images of the observed section were taken in parallel: (i) Green fluorescent WGA staining to display the fiber boundaries, (ii) Blue fluorescent DAPI staining to show the nuclei, (iii) MHC-double staining to visualize all fibers which are positive for type I MHC or type IIa and IIb MHC, respectively. In the first image all membrane structures were subtracted from background, leading to a mask for the individual muscle fibers, and the minimal Feret's diameter calculated.

This mask was superimposed first with the DAPI image to quantify the number of nuclei within each single muscle fiber and subsequently with the MHC-double staining to determine the fibers positive for type I MHC or type IIa and IIb MHC, respectively. The VC was calculated using the following formula:

$$Z = 1000 \cdot \frac{\text{S.D. of muscle of fiber min} \cdot \text{Feret's diameter}}{\text{Mean muscle fiber min} \cdot \text{Feret's diameter}}$$

Automated histological analysis was performed only for the 5  $\times$  MTZ treated group and the corresponding control group, because the quality of the muscles belonging to the DCPM group was not sufficient for analysis.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS Statistics 17.0 software (SPSS GmbH Software, Munich, Germany). All data sets were tested for normal distribution using the Kolmogorov–Smirnov test. Those data subsets that showed a normal distribution were analyzed performing a *t*-test. All others were tested with the Mann–Whitney test.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the *C. elegans* Genetics Center for providing strains. We thank Kathrin Gieseler for expert opinion and Ursula

Klutzný and Anja Pertl for excellent technical support, Dana Matzek for fosterage of our mice. Finally, we want to thank Dr Markus Eblenkamp and his S.CO Lifescience team for developing and performing the automated histological analysis.

*Conflict of Interest statement.* None declared.

## FUNDING

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM) and by the European Muscle Development Network (MYORES). The work integrated into an individual research project within the MD-NET funded by the German ministry of education and research (BMBF, Bonn, Germany).

## REFERENCES

- Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Bertelson, C.J. and Colletti, C.A. (1986) Molecular genetics of Duchenne muscular dystrophy. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51**, 349–351.
- 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**, 509–517.
- Rando, T.A. (2001) The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve*, **24**, 1575–1594.
- Rentschler, S., Linn, H., Deininger, K., Bedford, M.T., Espanel, X. and Sudol, M. (1999) The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol. Chem.*, **380**, 431–442.
- Campbell, K.P. and Kahl, S.D. (1989) Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*, **338**, 259–262.
- Wells, D.J. (2008) Treatments for muscular dystrophy, increased treatment options for Duchenne and related muscular dystrophies. *Gene Ther.*, **15**, 1077–1078.
- Manzur, A.Y., Kuntzer, T., Pike, M. and Swan, A. (2004) Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2**, CD003725.
- Rodino-Klapac, L.R., Chicoine, L.G., Kaspar, B.K. and Mendell, J.R. (2007) Gene therapy for duchenne muscular dystrophy, expectations and challenges. *Arch. Neurol.*, **64**, 1236–1241.
- Wilton, S.D. and Fletcher, S. (2005) Antisense oligonucleotides in the treatment of Duchenne muscular dystrophy, Where are we now? *Neuromuscul. Disord.*, **15**, 399–402.
- Miura, P. and Jasmin, B.J. (2006) Utrrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy, how close are we? *Trends Mol. Med.*, **12**, 122–129.
- Cossu, G. and Sampaolesi, M. (2007) New therapies for Duchenne muscular dystrophy, challenges, prospects and clinical trials. *Trends Mol. Med.*, **13**, 520–526.
- Grounds, M.D., Radley, H.G., Lynch, G.S., Nagaraju, K. and De Luca, A. (2008) Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol. Dis.*, **31**, 1–19.
- Kaletta, T. and Hengartner, M.O. (2006) Finding function in novel targets, *C. elegans* as a model organism. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 387–398.
- Segalat, L. (2007) Invertebrate animal models of diseases as screening tools in drug discovery. *ACS Chem. Biol.*, **2**, 231–236.
- Nass, R., Merchant, K.M. and Ryan, T. (2008) *Caenorhabditis elegans* in Parkinson's disease drug discovery, addressing an unmet medical need. *Mol. Interv.*, **8**, 284–293.
- Bessou, C., Giuglia, 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.
- 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**, 1092–1097.
- Moerman, D.G. and Williams, B.D. (2006) Sarcomere assembly in *C. elegans* muscle. *WormBook*, 1–16.
- Lindskog, S. (1997) Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Ther.*, **74**, 1–20.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A. and Casini, A. (2003) Carbonic anhydrase inhibitors. *Med. Res. Rev.*, **23**, 146–189.
- 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.
- Hewett-Emmett, D. (2000) Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families. *EXS*, **90**, 29–76.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A. (2000) Activation of carbonic anhydrase isozymes. *EXS*, **90**, 197–219.
- Gaud, A., Simon, J.M., Witzel, T., Carre-Pierrat, M., Wermuth, C.G. and Segalat, L. (2004) Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul. Disord.*, **14**, 365–370.
- Hall, R.A., Vullo, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Klappa, P. and Muhlschlegel, F.A. (2008) External pH influences the transcriptional profile of the carbonic anhydrase, CAH-4b in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **161**, 140–149.
- Crocetti, L., Maresca, A., Temperini, C., Hall, R.A., Scozzafava, A., Muhlschlegel, F.A. and Supuran, C.T. (2009) A thiabendazole sulfonamide shows potent inhibitory activity against mammalian and nematode alpha-carbonic anhydrases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 1371–1375.
- 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**, 806–811.
- 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**, 253–258.
- 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**, 675–682.
- Page, A.P. and Johnstone, I.L. (2007) The cuticle. *WormBook*, 1–15.
- Kennedy, S., Wang, D. and Ruvkun, G. (2004) A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature*, **427**, 645–649.
- Spacey, S.D., Hildebrand, M.E., Materek, L.A., Bird, T.D. and Snutch, T.P. (2004) Functional implications of a novel EA2 mutation in the P/Q-type calcium channel. *Ann. Neurol.*, **56**, 213–220.
- Shapiro, M.S., Gomeza, J., Hamilton, S.E., Hille, B., Loose, M.D., Nathanson, N.M., Roche, J.P. and Wess, J. (2001) Identification of subtypes of muscarinic receptors that regulate Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channel activity in sympathetic neurons. *Life Sci.*, **68**, 2481–2487.
- Rousseau, E. and Pinkos, J. (1990) pH modulates conducting and gating behaviour of single calcium release channels. *Pflugers Arch.*, **415**, 645–647.
- Mariol, M.C. and Segalat, L. (2001) Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. *Curr. Biol.*, **11**, 1691–1694.
- Willmann, R., Possekkel, S., Dubach-Powell, J., Meier, T. and Ruegg, M.A. (2009) Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.*, **19**, 241–249.
- Spurney, C.F., Gordish-Dressman, H., Guerron, A.D., Sali, A., Pandey, G.S., Rawat, R., Van Der Meulen, J.H., Cha, H.J., Pistilli, E.E., Partridge, T.A. et al. (2009) Preclinical drug trials in the *mdx* mouse, assessment of reliable and sensitive outcome measures. *Muscle Nerve*, **39**, 591–602.
- 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.
- 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.
- Torres, L.F. and Duchon, L.W. (1987) The mutant *mdx*, inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain*, **110**, 269–299.

41. Dunant, P., Larochelle, N., Thirion, C., Stucka, R., Ursu, D., Petrof, B.J., Wolf, E. and Lochmuller, H. (2003) Expression of dystrophin driven by the 1.35-kb MCK promoter ameliorates muscular dystrophy in fast, but not in slow muscles of transgenic mdx mice. *Mol. Ther.*, **8**, 80–89.
42. McKenna, M.J., Medved, I., Goodman, C.A., Brown, M.J., Bjorksten, A.R., Murphy, K.T., Petersen, A.C., Sostaric, S. and Gong, X. (2006) N-acetylcysteine attenuates the decline in muscle Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-pump activity and delays fatigue during prolonged exercise in humans. *J. Physiol.*, **576**, 279–288.
43. Reid, M.B. (2008) Free radicals and muscle fatigue, Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radic. Biol. Med.*, **44**, 169–179.
44. Räisänen, S.R., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rahkila, P., Härkönen, P.L. and Väänänen, H.K. (1999) Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *FASEB J.*, **13**, 513–522.
45. Scheibe, R.J., Mundhenk, K., Becker, T., Hallerdei, J., Waheed, A., Shah, G.N., Sly, W.S., Gros, G. and Wetzel, P. (2008) Carbonic anhydrase IV and IX, subcellular localization and functional role in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **294**, 402–412.
46. Wetzel, P., Kleinke, T., Papadopoulos, S. and Gros, G. (2002) Inhibition of muscle carbonic anhydrase slows the Ca<sup>2+</sup> transient in rat skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **283**, C1242–C1253.
47. Bruns, W., Dermietzel, R. and Gros, G. (1986) Carbonic anhydrase in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *J. Physiol.*, **371**, 351–364.
48. Waterston, R.H., Hirsh, D. and 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.
49. Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO\_WIN, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.*, **12**, 543–548.
50. Edgar, R.C. (2004) MUSCLE, multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1792–1797.
51. Timmons, L. and Fire, A. (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, **395**, 854.
52. Mello, C. and Fire, A. (1995) DNA transformation. *Methods Cell Biol.*, **48**, 451–482.
53. Gorospe, J.R. and Hoffman, E.P. (1992) Duchenne muscular dystrophy. *Curr. Opin. Rheumatol.*, **4**, 794–800.
54. 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. USA*, **90**, 3710–3714.

## 2. Les tricycliques et les molécules reliées à la sérotonine

### 2.1. Etudes préliminaires

Les cribles DMD ont généré une forte proportion de hits reliés au métabolisme de la sérotonine, dont la sérotonine proprement dite et des composés (les tricycliques) connus pour inhiber sa recapture. La sérotonine est un neuromédiateur, aux multiples effets, conservé dans tout le règne animal. Elle 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 tout en étant recaptée par un mécanisme actif au niveau du compartiment présynaptique. L'**article 2** qui suit montre et valide le potentiel thérapeutique de cette classe de molécule chez le mutant *dys-1(cx18)*, *hll-1(cc561)*. Il faut noter que ce travail a été conduit par Maïté Carre-Pierrat, ma participation lors de ces travaux s'est limitée à contribuer à l'analyse des données et à leur valorisation. Cet article montre aussi que l'absence de sérotonine dans un contexte *hll-1*, chez *C. elegans*, mime l'effet de la mutation *dys-1(cx18)*.

En conclusion, ces résultats montrent qu'il est possible de compenser les effets de la mutation *dys-1(cx18)* en jouant sur la disponibilité de la sérotonine, et que la présence de ce neurotransmetteur est essentiel au maintien des cellules musculaires striés de *C. elegans*.

Les études complémentaires menées sur les tricycliques et la sérotonine sont présentées à la suite de cet article.

## 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);  $\alpha$ -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

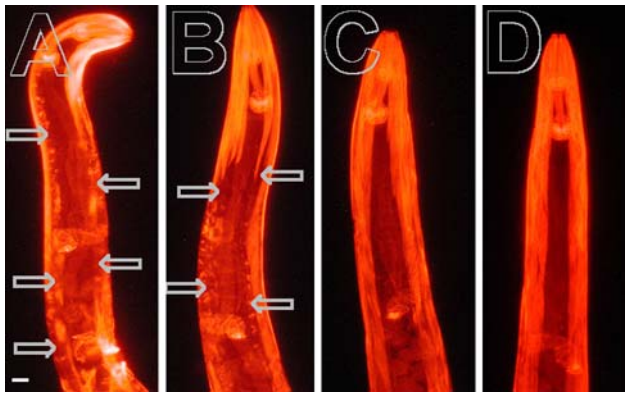
was previously calibrated with serial dilutions of serotonin creatinine sulfate (Sigma H-7752).

### 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  $12.3 \pm 3.8$  per animal to  $2.5 \pm 1.2$  (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 ( $0.7 \pm 0.2$  down to  $0.1 \pm 0.1$ ; 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  $0.8 \pm 0.1$  to  $0.3 \pm 0.1$ , 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

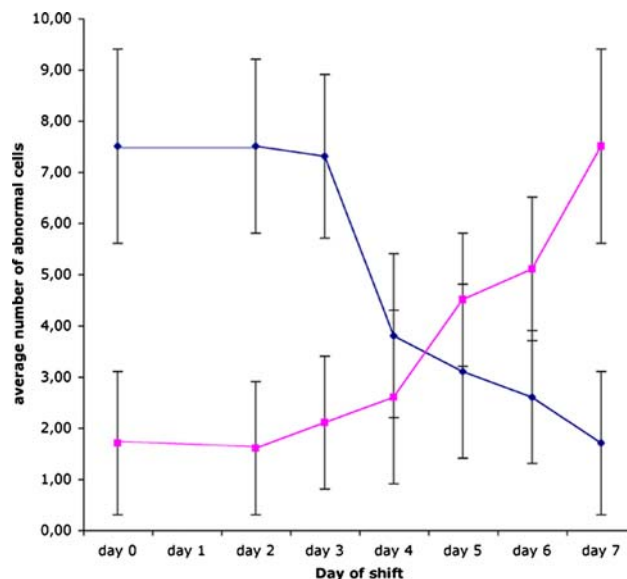
McCombie 1997; Hamdan et al. 1999; Hobson et al. 2003; Ranganathan et al. 2000). These experiments gave only modest results with respect to serotonin response inhibition (data not shown). Thus, our current interpretation is that serotonin blocks muscle degeneration either by acting through several receptors 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 ( $4.5 \pm 1$  vs.  $0.5 \pm 0.4$  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<sub>2A</sub> (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-HT<sub>7</sub>-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<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> 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 locomotor 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

## 2.2. Recherche du mode d'action des composés reliés à la sérotonine

Suite à ces travaux et en raison de la prépondérance de cette classe de molécules dans l'ensemble des composés identifiés lors des cribles, l'équipe du docteur Laurent Ségalat a redoublé d'effort pour tenter de comprendre les mécanismes mis en jeu. Carre-Pierrat *et al.* ont alors 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 (392). Ce travail a permis de décrire de nouveaux récepteurs sérotoninergiques, mais n'a malheureusement pas abouti à l'identification des mécanismes reliés à l'action de la sérotonine sur la dégénérescence. Cette recherche s'est poursuivie par des approches génomiques conduites par Stefan Junemann, un post-doctorant de notre laboratoire. Sa stratégie se basait sur des techniques de mutagenèses aléatoires (recherche de mutants suppresseurs), conduites sur le mutant *dys-1(cx18)*, *hlh-1(cc561)*. Les animaux mutagenisés présentant une paralysie malgré le traitement à la sérotonine étaient isolés, puis les gènes reliés à cette résistance devaient être identifiés par mapping. Stefan a réussi à isoler une lignée résistante à la sérotonine. Malheureusement la technique de mapping utilisée n'a pas permis d'isoler un gène précis mais seulement un locus sur le chromosome IV portant le ou les gènes responsables de la résistance observée. J'ai alors participé à l'évaluation des différents gènes candidats présents sur ce locus par des techniques d'ARN interférence. Peu avant le départ de Stefan, cette approche a permis d'identifier le gène *itr-1* parmi les différents gènes testés. Ce gène code pour un récepteur à l'inositol triphosphate (IP3), et présente une forte homologie avec les canaux calciques humains IP3R présentés en introduction (27). Chez *C. elegans*, *itr-1* est le seul représentant des canaux calciques IP3R ; il est exprimé dans la plupart des cellules (27, 125, 393). A ce jour, le récepteur canal ITR-1 est décrit comme impliqué dans des phénomènes de contractions périodiques des muscles lisses du pharynx, de la vulve et de l'appareil excréteur du nématode, dans le système reproducteur des mâles, dans le développement, et dans la réponse nerveuse conduisant à la fuite de l'animal suite à un contact physique (125-130). Il n'a, par contre, jamais été décrit comme étant relié aux phénomènes de contraction des muscles striés de *C. elegans*.

A ce stade, nos travaux montrent que l'inactivation du gène *itr-1* abolit l'effet bénéfique de la sérotonine sur la paralysie des animaux *dys-1(cx18)*, *hlh-1(cc561)*. Nous pouvons donc supposer que les gains musculaires observés dus à l'ajout de sérotonine sont reliés au gène *itr-1*, et que l'inactivation de ce gène entraîne une résistance à la sérotonine.

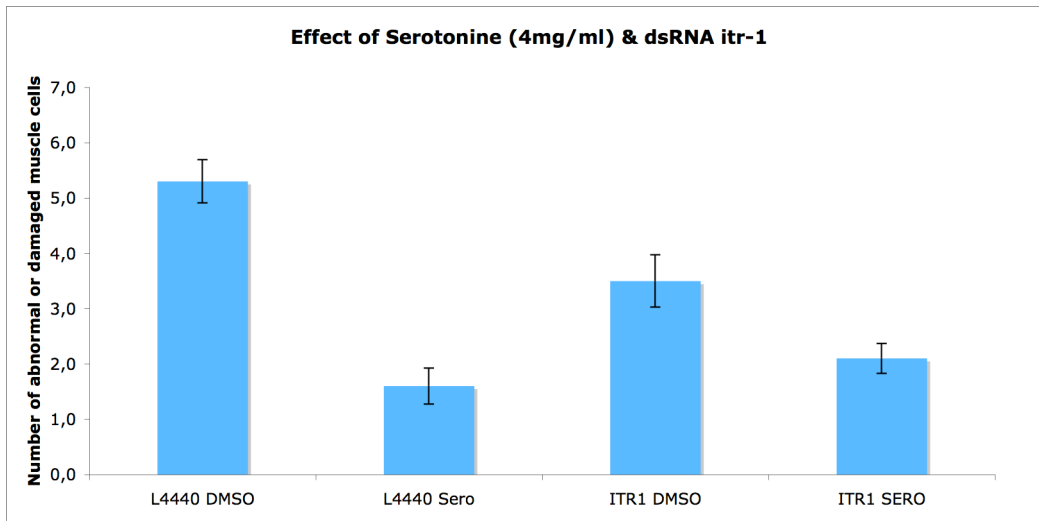
Nous avons, depuis peu, poursuivi l'étude de l'impact de ce gène, et les résultats préliminaires obtenus mettent en évidence un phénomène plus complexe.

Tout d'abord, nous avons cherché à savoir si cette résistance était spécifique, ou si elle abolissait aussi la réponse de composés non reliés au métabolisme de la sérotonine. Comme l'indique le **tableau 12**, contrairement à l'ajout de sérotonine, d'imipramine ou de trimipramine, l'inactivation du gène *itr-1* par RNAi dans un contexte *dys-1(cx18)*, *hlh-1(cc561)* n'a pas d'impact sur les gains moteurs observés en présence d'inhibiteurs d'anhydrases carboniques, de nifédipine (antagoniste des récepteurs dihydropyridine) ou de tétrazepam (benzodiazépine). Ce phénomène semble donc se limiter aux composés reliés à la disponibilité de la sérotonine.

<i>dys-1(cx18), hlh-1(cc561)</i>	<b>L4440</b>	<b><i>itr-1</i></b>
<b>DMSO</b>	-	+
<b>Sérotonine 4 mM</b>	++	-
<b>Imipramine 300 µM</b>	++	-
<b>Trimipramine 250 µM</b>	++	+
<b>Methazolamide 2 mM</b>	+++	+++
<b>Dichlorphénamide 320 µM</b>	+++	+++
<b>Nifédipine 250 µM</b>	++	++
<b>Tétrazepam 250 µM</b>	++	++

**Tableau 12 : Evaluation qualitative de la motricité des animaux *dys-1(cx18)*, *hlh-1(cc561)* en présence ou en absence d'ARNdb *itr-1* (RNAi).** Parmi les composés testés, seuls la sérotonine, l'imipramine et la trimipramine sont reliés au métabolisme de la sérotonine. Pour rappel, voir le **tableau 4**. - : animaux inertes, + : forte paralysie, ++ : paralysie modérée, +++ : locomotion proche d'un animal sauvage.

Comme expliqué en introduction, la paralysie observée dans notre modèle DMD est due à une perte progressive de cellules musculaires. Nous supposons donc que l'inactivation de *itr-1* abolit l'effet protecteur de la sérotonine sur cette dégénérescence, ce qui expliquerait l'apparition de la paralysie malgré le traitement. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'impact de l'inactivation de *itr-1* sur la dégénérescence musculaire, en présence ou en absence de sérotonine (**fig. 53**).



**Figure 53 : Evaluation quantitative de la dégénérescence musculaire des mutants *dys-1(cx18)*, *hll-1(cc561)* en présence ou en absence de sérotonine et d'ARNdb *itr-1*. L4440 DMSO : contrôle négatif (Vecteur vide + solvant), L4440 Sero : animaux traités à la sérotonine 10 mM et sans RNAi, ITR1 DMSO : animaux traités au solvant en présence d'ARNdb *itr-1*, ITR1 SERO : animaux traités à la sérotonine 10 mM en présence d'ARNdb *itr-1*.**

De façon surprenante, l'inactivation du gène *itr-1* chez les mutants *dys-1(cx18)*, *hll-1(cc561)* n'a pas d'impact sur la dégénérescence musculaire lors d'un traitement à la sérotonine (**fig. 53**). En clair, la paralysie observée dans un contexte "sérotonine + RNAi *itr-1*" n'est pas reliée à une perte de cellules musculaires. De plus, les résultats présentés dans la **figure 53**, mettent en évidence un effet bénéfique de l'inactivation de *itr-1* sur la dégénérescence des mutants *dys-1(cx18)*, *hll-1(cc561)* non traités.

Finalement, l'inactivation de *itr-1* ne supprime pas l'effet bénéfique de la sérotonine sur la dégénérescence musculaire.

Une question se pose alors, pourquoi ces animaux "Sero + RNAi *itr-1*" sont-ils paralysés alors que leur musculature semble plus ou moins intacte ? Pour apporter des éléments de réponse à cette question, nous avons entrepris d'analyser le comportement moteur des animaux traités ou non à la sérotonine, et/ou en présence ou en absence d'ARN *itr-1* (**tableau 13**).



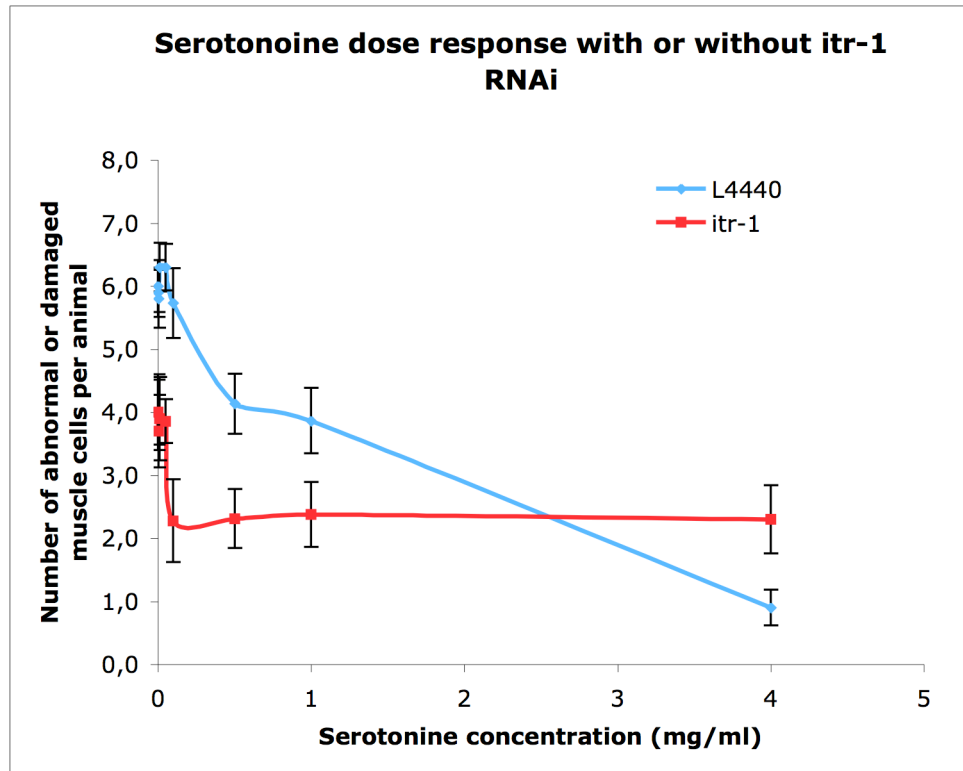
	DMSO	Sérotonine	<i>itr-1</i>	Sérotonine / <i>itr-1</i>
<i>dys-1(cx18) ; hhh-1(cc561)</i>	0,7	4,4	2,4	1,1
<i>dys-1(cx18)</i>	15,1	8,2	8	2,3
wt	11,5	7,1	7,1	3,2

**Tableau 13 : Evaluation de l'activité motrice des animaux en présence ou en absence de sérotonine (4 mg/ml) et d'ARNdb *itr-1*.** Les valeurs représentées dans ce tableau correspondent aux nombres d'oscillations effectuées par les animaux sur une période de 60 secondes (Chaque case correspond à la moyenne de résultats obtenus avec 10 individus).

Le **tableau 13** montre que, à l'exception du contexte génétique *dys-1(cx18)*, *hhh-1(cc561)*, l'exposition à la sérotonine et/ou à des ARNdb *itr-1* réduit la motricité des animaux. De plus, leur(s) effet(s) s'additionne(nt), laissant envisager un phénomène synergique. Dans tous les cas, la paralysie observée est due à une action combinée, de la sérotonine et de l'inactivation de *itr-1*, sur la locomotion.

Malgré les conclusions de l'**article 2**, ces résultats laissent donc supposer que l'action bénéfique de la sérotonine et/ou de l'inactivation de *itr-1* sur la dégénérescence musculaire passent par une inhibition de l'activité musculaire. Néanmoins, aucun gène ou molécule connu pour réduire l'activité des animaux n'a permis de reproduire les gains observés avec les traitements modulant la disponibilité de la sérotonine (résultats non présentés), laissant suggérer l'implication d'un autre phénomène. Ces hypothèses seront plus amplement débattues en discussion générale.

Afin de savoir si les effets de la sérotonine et de l'inactivation de *itr-1*, sur la dégénérescence musculaire, passent par un mécanisme commun, nous avons ensuite réalisé une étude effet-doses avec la sérotonine, en présence ou en absence de RNAi *itr-1* (**fig. 54**).



**Figure 54 :** Dégénérescence musculaire observée chez le mutant *dys-1(cx18)*, *hlh-1(cc561)* en fonction de la concentration en sérotonine, et en présence ou en absence de RNAi *itr-1*. Moyenne de 15 animaux +/- sem (standard deviation of the mean).

La **figure 54** montre que la sérotonine, en présence de RNAi *itr-1*, commence à perdre son effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire dans des concentrations plus faibles, suggérant un effet synergique sur une même voie d'action. A ce stade, le traitement à la sérotonine semble donc relié à l'activité du canal ITR-1.

Au vue de ces différents résultats, plusieurs questions restent en suspens :

- Quelle est la relation entre l'action de la sérotonine et l'activité du canal calcique ITR-1 dans les phénomènes de mise en place de la paralysie ?
- Est-ce la réduction de la locomotion qui diminue la dégénérescence musculaire dans ce contexte ?

En raison du caractère préliminaire de nos résultats, il est difficile de répondre à ces questions.

En ce qui concerne la paralysie, les résultats suggèrent tout de même que l'ajout de composés augmentant la disponibilité de la sérotonine, inhibe, directement ou indirectement, l'activité du canal calcique ITR-1. Les flux de calcium régis par ce canal sont alors probablement réduits, se traduisant par une réduction de la motricité des animaux.

Si tel est le cas, où réside l'activité de ce canal ITR-1 (relié à la paralysie) ? Dans le muscle, se traduisant par une diminution de la libération de calcium en réponse aux décharges d'acétylcholine, et ayant pour conséquence une diminution de l'activité contractile ? Dans le système nerveux, par une inhibition, directe ou indirecte, de l'influx nerveux ? Nous penchons à ce jour pour un effet musculaire car les processus RNAi sont peu efficaces au niveau du système nerveux du nématode *C. elegans* (394). Il faut tout de même noter que cette hypothèse est en contradiction avec la littérature, qui décrit les flux de calcium régis par ce canal comme non impliqués dans les phénomènes d'excitation/contraction du muscle strié (**voir introduction**). De plus, ce canal ITR-1 n'a jamais été décrit comme exprimé dans les cellules musculaires striés de *C. elegans*. Pour localiser ce phénomène, nous prévoyons d'inhiber et de surexprimer *itr-1* spécifiquement dans les neurones et dans les muscles des nématodes, via des promoteurs tissu-spécifiques couplés à la séquence endogène ou à une séquence complémentaire de l'ARN du gène *itr-1* (RNAi).

Enfin, où et comment agit la sérotonine pour entraîner une diminution de la locomotion et éventuellement une diminution de l'activité de ce canal ? Chez *C. elegans*, la sérotonine est connue pour inhiber la libération d'acétylcholine dans le système nerveux, et par la même réduire l'activité des animaux (395). Il est donc probable que l'inhibition motrice observée provienne d'un effet sur le système nerveux.

En ce qui concerne la relation entre la sérotonine, *itr-1* et la dégénérescence, les mécanismes sont plus difficiles à expliquer. Nous tenterons d'apporter une explication lors de la discussion générale.

### 3. Approche métabolomique

Ce chapitre présente la technologie développée, en partenariat avec le laboratoire de Lyndon Emsley, pour analyser le métabolome de *C. elegans*. Le terme métabolomique est récent, il désigne l'analyse qualitative et quantitative de l'ensemble, ou d'un ensemble, de métabolites contenus dans un milieu ou un tissu biologique à un moment donné. Le métabolome correspond à l'étape finale, la résultante de l'expression des gènes, des interactions protéiques et de l'environnement auquel on peut rattacher le médicament. Par métabolites, on entend ici des molécules de faible poids moléculaire, en général inférieur à 1000 g/mol. La particularité et le grand avantage de la métabolomique réside dans l'analyse simultanée d'un très grand nombre de substances. Les méthodes utilisées pour obtenir ces résultats sont la résonance magnétique nucléaire, ou RMN, et la spectrométrie de masse. A ce jour, la métabolomique est essentiellement utilisée pour des études toxicologiques, pour l'analyse du métabolisme des OGM et des effets du dopage.

Quel que soit le type de maladie ou le mode d'action d'un médicament, il y a de fortes chances que leurs actions entraînent des modifications qualitatives et/ou quantitatives des métabolites présents dans l'organisme. Ces bouleversements peuvent souvent être décelés par les techniques actuelles à condition de savoir où, et quoi regarder. Malheureusement, cette exploration est dépendante des efforts menés en biologie médicale pour identifier des biomarqueurs des maladies et des grandes voies métaboliques. Par exemple, le taux de créatine kinase présent dans le sang des patients DMD est connu pour être anormalement élevé, témoignant d'une fuite du milieu intracellulaire des cellules musculaires dans le sang (137). A l'inverse, en explorant l'ensemble des métabolites présents dans un fluide ou une biopsie, les approches métabolomique ne se limitent pas aux biomarqueurs connus, et permettent de révéler l'ensemble des bouleversements métaboliques induits par l'apparition d'une maladie ou l'ajout d'un composé (396-398).

Une étude métabolomique se déroule en trois étapes :

- l'obtention du matériel biologique, tel que des biofluides ou des biopsies. Dans notre cas nous utilisons un organisme entier,
- l'extraction des données métaboliques. Pour cette étape nous utilisons la RMN.
- l'analyse des jeux de données.

La dernière de ces trois étapes utilise des outils d'analyses des données tels que les PCA (Analyse en Composantes Principales) et les PLS, O-PLS (Orthogonal-Partial Least Squares projections to latent structures). Ces outils visent principalement à i) évaluer l'homogénéité des préparations / enregistrements et observer la distribution des jeux de données, ii) isoler un nombre restreint de variables - issues des différents spectres - correspondant aux variations métaboliques propres aux différents échantillons. Ils permettent également d'établir des modèles prédictifs permettant de relier un échantillon à telle ou telle classe préalablement définie par l'opérateur.

Ce travail peut paraître éloigné du but initial visant à soigner et comprendre les troubles observés dans les maladies citées, pourtant, nous avons développé cette technique afin de :

- visualiser les bouleversements métaboliques prenant place dans les différents modèles, traités et/ou non traités,
- identifier des biomarqueurs spécifiques des maladies présentées,
- identifier les voies métaboliques reliées à l'activité des molécules obtenues lors des cribles.

### **3.1. Preuve de concept de la métabolomique sur animal entier :**

Même si, à ce jour, nous travaillons encore à dégager les informations pertinentes relatives aux différents modèles utilisés et à l'impact des composés identifiés comme actifs contre ces derniers, je présente cette approche car elle se révèle très prometteuse (**article 3 et 4**). Comme toute nouvelle approche, pour obtenir des résultats pertinents et fiables, ces analyses métabolomiques conduites sur animal entier ont demandé de nombreuses mises au point, et plusieurs étapes de validation. Tout d'abord, pour établir la preuve de concept de cette nouvelle méthode, nous sommes sortis de notre objectif principal et nous avons montré qu'il est possible de caractériser une souche selon son profil métabolique (**article 3 et 4**). De plus, comme le décrit l'**article 3**, la puissance de cette technologie nous permet de mettre en

évidence des perturbations métaboliques pour des gènes n'induisant pas de phénotype visible à ce jour. Ainsi, en généralisant cette approche à l'ensemble des mutants *C. elegans* disponibles, nous pourrions à l'avenir disposer d'informations très utiles sur la relation qu'entretiennent les gènes avec le métabolisme, et identifier des biomarqueurs du dérèglement des grandes fonctions biologiques. À terme, ces analyses permettront ainsi de mieux comprendre l'ensemble du métabolome, et la relation qu'il entretient avec le génome et le protéome. Enfin, l'**article 4** décrit les efforts que nous avons menés pour rendre ces analyses robustes, comparables et applicables à grande échelle.

Il faut tout de même noter que nous travaillons avec des maladies mal comprises à ce jour. Par conséquent, nous pouvons nous demander si cette technologie, naissante, va permettre de répondre à certaines de nos questions, ou, au contraire, risque-t-elle d'en soulever de nouvelles qui demanderont encore plus de réponses ? Le verdict ne tardera pas à se faire entendre.

# Metabotyping of *Caenorhabditis elegans* reveals latent phenotypes

Benjamin J. Blaise\*, Jean Giacomotto†, Bénédicte Elena\*, Marc-Emmanuel Dumas\*, Pierre Toulhoat\*\*‡, Laurent Ségalat†, and Lyndon Emsley\*§

\*Centre de Résonance Magnétique Nucléaire à Très Hauts Champs and Laboratoire de Chimie, Ecole Normale Supérieure de Lyon/Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Lyon, 69364 Lyon, France; †Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 5534, Centre National de la Recherche Scientifique/Université Lyon 1, Bâtiment Mendel, 43, Boulevard du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne Cedex, France; and ‡Institut National de L'Environnement Industriel et des Risques, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil en Halatte, France

Edited by Ann E. McDermott, Columbia University, New York, NY, and approved October 24, 2007 (received for review August 6, 2007)

Assigning functions to every gene in a living organism is the next challenge for functional genomics. In fact, 85–90% of the 19,000 genes of the nematode *Caenorhabditis elegans* genome do not produce any visible phenotype when inactivated, which hampers determining their function, especially when they do not belong to previously characterized gene families. We used <sup>1</sup>H high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy (<sup>1</sup>H HRMAS-NMR) to reveal the latent phenotype associated to superoxide dismutase (*sod-1*) and catalase (*ctl-1*) *C. elegans* mutations, both involved in the elimination of radical oxidative species. These two silent mutations are significantly discriminated from the wild-type strain and from each other. We identify a metabotype significantly associated with these mutations involving a general reduction of fatty acyl resonances from triglycerides, unsaturated lipids being known targets of free radicals. This work opens up perspectives for the use of <sup>1</sup>H HRMAS-NMR as a molecular phenotyping device for model organisms. Because it is amenable to high throughput and is shown to be highly informative, this approach may rapidly lead to a functional and integrated metabonomic mapping of the *C. elegans* genome at the systems biology level.

functional genomics | metabolic profiling | metabonomics | nuclear magnetic resonance

Assigning functions to every gene in a living organism is the next challenge for functional genomics. However, only a small proportion of genes produce visible phenotypes when inactivated; for example, only 10–15% of the 19,000 genes of the nematode *Caenorhabditis elegans* produce a visible phenotype (1, 2). For the remaining ones, determining their function is more difficult, especially when they do not belong to previously characterized gene families.

For example, oxidative stress is a key, yet subtle, biological process involved in aging, with long-term integration of many slow processes leading to irreversible cellular and molecular damage.

Phenotyping plays a critical role in postgenomic sciences. Today, a range of molecular phenotyping tools is available to characterize mutations. Although gene expression and protein profiling are predominantly used (3–5), metabonomic and metabolomic strategies (6, 7) advantageously produce metabolic fingerprints that allow identification of variations in low-molecular-weight compounds in biofluids or organs in response to pathophysiological events (8), drug treatments (9), or genetic polymorphisms (10). It is therefore an attractive hypothesis-free approach for large-scale functional genomics in model organisms (11).

Here we capitalize on recent developments in solid-state NMR that allow the acquisition of highly resolved <sup>1</sup>H spectra of metabolites from inhomogeneous materials such as biopsies (12) or food (13). As shown below, when applying <sup>1</sup>H high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy (<sup>1</sup>H HRMAS-NMR), we provide complex metabolic phenotypes (6) or metabotypes (8) suitable for discriminating between *C. elegans* oxidative stress mutants, which cannot otherwise be distinguished phenotypically (14). In this

study, we develop, validate, and apply a strategy using <sup>1</sup>H HRMAS-NMR spectroscopy of whole-model organisms, in this case *C. elegans*, to reveal the latent phenotypes associated with silent mutations (11) in Metazoans, an approach already developed in yeast and plants using mass spectrometry and liquid-state NMR (15, 16). In particular, we investigate subtle metabolic disruptions induced by mutations of oxidative stress enzymes. We show, as a proof of concept of this strategy, a metabotype significantly associated to oxidative stress mutants with otherwise no overt phenotypes, i.e., silent mutations in the terminology of Oliver and coworkers (11).

## Results

**<sup>1</sup>H HRMAS-NMR Reveals Metabolic Phenotypes for Both Morphological and Invisible Mutations.** To investigate the potential of metabonomics to produce reliable metabolic phenotypes for *C. elegans*, we first recorded <sup>1</sup>H HRMAS-NMR spectra of three *C. elegans* strains: a wild-type strain (N2), the collagen *dpy-10(e128)* mutant, which displays a visible (morphological) phenotype, and the *sod-1(tm776)* mutant, which has no overt phenotype.

Approximately 1,000 worms (Fig. 1a) were filled in a HRMAS-NMR rotor and spun at 3.5 kHz for 1D <sup>1</sup>H HRMAS-NMR acquisition (Fig. 1b). Spectra were recorded for each sample [Fig. 1c; see supporting information (SI) Table 1 for assignment] and bucketed with a 10<sup>-3</sup>-ppm resolution. We note that there is no particular indication in these spectra (broadening or splitting) of distributions of molecular environments within the sample. Supervised multivariate statistical modeling using partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) shows a significant discrimination of the three strains (Fig. 1d) and reveals strain-specific metabolic features for *dpy-10(e128)* and more remarkably for *sod-1(tm776)* (Fig. 1e). To validate discrimination of mutations, we resampled the model under the null hypothesis by generating 999 random permutations of the class vector. This shows that none of the random models outperforms the initial model in terms of prediction (Fig. 1f).

In this case the extent of metabolic variations in the spectra illustrated in Fig. 1e are just as large for the invisible *sod-1* mutant as for the visible *dpy-10* mutant. *dpy-10* mutants are characterized by higher glycerol levels; such elevation was previously shown to be involved in the osmotic stress response of *C. elegans* (17) and is compliant with similar observations in other model organisms. These data clearly demonstrate the potential of <sup>1</sup>H HRMAS-NMR

Author contributions: B.J.B., J.G., B.E., M.-E.D., P.T., L.S., and L.E. designed research; B.J.B., J.G., B.E., and M.-E.D. performed research; B.J.B. and M.-E.D. analyzed data; and B.J.B., B.E., M.-E.D., P.T., L.S., and L.E. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

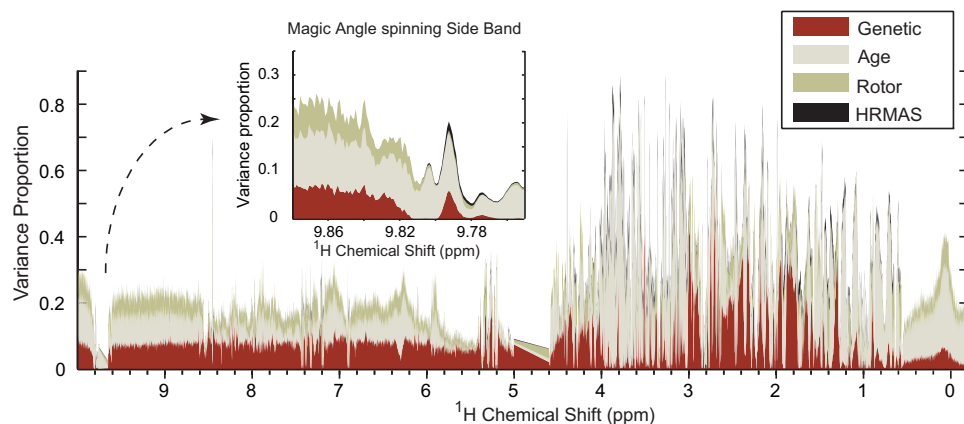
§To whom correspondence should be addressed. E-mail: lyndon.emsley@ens-lyon.fr.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0707393104/DC1](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0707393104/DC1).

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA







**Fig. 2.** Characterization of biological and technological factors. The effects of biological factors (i.e., genetics and age) and technological factors (i.e., rotor filling and instrumental reproducibility) were assessed by an O2PLS (29) variance component model by using a  $2^4$  full factorial design as Y matrix and NMR as X matrix. For each NMR variable, the model computes the proportion of variance (scaled to 1.0) attributed to each one of the four factors (genetics, age, rotor, and HRMAS) across the entire  $^1\text{H}$  HRMAS-NMR spectrum; the remaining white area corresponds to the residual of the model with a total of 100%. The maximum of the variance proportion for each factor is 54%, 82%, 21%, and 8% for genetics, age, rotor filling, and instrumental reproducibility, respectively. Biological factors show the strongest variance proportions in the aliphatic part of the spectrum ( $\delta$ [0;4.6]), whereas technological parameters such as instrumental reproducibility show a stronger variance proportion in the magic angle spinning side bands of the residual water signal ( $\delta$  9.79), for instance. Further scores, loadings, and internal validation are presented in SI Fig. 5.

efficiency of the model to discriminate nematode groups. There is no overlap between the different groups, which confirms that the oxidative stress and the age-related metabolic patterns are distinct (SI Fig. 6).

These results confirm that age and genetic factors generate two different patterns (SI Fig. 5 *c* and *d*), allowing NMR-based metabolotyping to distinguish the subtle metabolic changes induced by mutation of a key oxidative stress enzyme from that due to age. They also validate the robustness of the latent metabolic phenotype associated with *sod-1* (homology between the loadings in Fig. 1*c* and SI Fig. 5*c*).

**Metabonomic Mapping of Oxidative Stress Genes Reveals Similar Metabotypes.** To assess whether this strategy generates biologically relevant metabotypes that might qualify as candidate biomarkers, we then compared the profiles of strains lacking consecutive enzymes involved in oxygen dismutation (Fig. 3): *sod-1(tm776)* and *ctl-1(ok1242)*. *ctl-1* encodes a catalase downstream of superoxide dismutase in the detoxification pathway of reactive oxygen species (ROS). PLS-DA shows a discrimination of N2, *sod-1(tm776)*, and *ctl-1(ok1242)* (Fig. 3*a*). *sod-1(tm776)* and *ctl-1(ok1242)* mutants are both metabolically characterized by a reduction of lipids signals ( $\delta$  0.90  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$ ; 1.30  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ; 1.41  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ; 1.59  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$ ; 5.33 unsaturated lipids =  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2$ ), as confirmed by 2D NMR (Fig. 3*b*). In addition, *ctl-1(ok1242)* presents an accumulation of glucose ( $\delta$  3.92  $\text{CH}_2\text{-C6}$ ; 4.63  $\beta$ -anomeric  $\text{H}_1$ ; 5.23  $\alpha$ -anomeric  $\text{H}_1$ ), glycerate ( $\delta$  3.84  $\text{CH}_2$ ), and glycerol ( $\delta$  3.56  $\text{CH}_2$ ; 3.65  $\text{CH}_2$ ) as presented in SI Table 3.

As a result, these observations show that our metabolotyping approach identifies close but distinct metabolic markers associated with oxidative stress silent mutations. Our analysis strongly suggests that oxidative stress caused by silent mutations is a distributed process across the whole metabolic system, because we identified a combination of several metabolites (a metabotype) predictive of oxidative stress.

## Discussion

**Biological Relevance of Oxidative Stress Metabotypes.** Different hypotheses can be proposed to explain these metabolic patterns (Fig. 3*d*): the reduction of lipid signals observed in both *sod-1(tm776)* and *ctl-1(ok1242)* suggests that the lack of ROS

detoxification enzymes in these two strains leads to an elevation of ROS. This is consistent with the fact that lipids are primary targets of free radicals (19, 20). In this metabolic pattern established for both the *sod-1(tm776)* and *ctl-1(ok1242)* mutants, the reduction in lipids shows a new homeostatic equilibrium, in which increased lipoperoxidation (denoted by  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$  aldehyde resonances at  $\delta$  1.40 characteristic of some lipoperoxidation products) is balanced by reduced availability of substrate for free radical reactions. The increased amount of trimethylamine-*N*-oxide, an osmolyte-stabilizing protein conformation (21), could derive from the interplay between cellular oxidative stress and osmotic stress (22). Interestingly, TMAO is a xenobiotic metabolite (23) (coprocessed by enterobacteria) that was shown to be involved in insulin resistance in mammals (8).

Thus, in both mutants we observe a similar reduction of lipid levels, consistent with a pathway-level signature. However, whereas SOD is the only pathway transforming superoxide radicals to hydrogen peroxide, in the absence of catalase, pathway redundancy leaves the GSH peroxidase pathway for the elimination of hydrogen peroxide (Fig. 3*d*). Because recycling of GSH is coupled to glucose metabolism by NADPH/NADP<sup>+</sup> redox cycles, lack of catalase may indirectly lead to an increase in glucose and its degradation products (mainly glycerol and glycerate) (24) used to replenish NADP<sup>+</sup>. As for the *sod-1(tm776)* case above, this rationale is fully supported by the metabotypes we identify here for *ctl-1(ok1242)*.

Mutations affecting consecutive enzymes in the same pathway lead to similar (SI Fig. 7 *a* and *c*), albeit distinct (SI Fig. 7*e*), metabotypes. Thus, not only does NMR analysis of the mutants distinguish these latent phenotypes from others, it also provides a clear picture of the subtle metabolic changes induced by silent mutations, with both pathway-specific and mutation-specific metabotypes.

## Conclusions

Our results show that  $^1\text{H}$  HRMAS-NMR-based metabolic profiling is a powerful and reliable approach providing both metabolic fingerprints and metabolic phenotypes (metabotypes) for both morphological and invisible mutations in preparations of 1,000 worms, as well as fine mapping of metabolic consequences of oxidative stress mutations of *C. elegans*. A major advantage of the high-field  $^1\text{H}$  HRMAS



of the water resonance during the recycle delay of 1.7 s. The mixing time,  $t_m$ , was set to 100 ms. The 90° pulse length was adjusted to 5.3  $\mu$ s, and  $\tau$  was adjusted to 4  $\mu$ s. A total of 16,000 data points with 512 scans were acquired by using a spectral width of 8,503 Hz, for a total acquisition time of  $\approx$ 25 min. The magic angle spinning frequency was set to 3.5 kHz, and the sample temperature was regulated at 293 K.  $^1\text{H}$  chemical shifts were internally referenced to the alanine  $\text{CH}_3$  doublet at  $\delta$  1.48. All free induction decays were multiplied by an exponential function equivalent to a 1-Hz line-broadening factor before Fourier transformation.

For the purpose of assignment of the observed NMR spectral resonances to various metabolites, a set of 2D  $^1\text{H}$  HRMAS correlation experiments was carried out, as previously reported in the literature (26), including  $^1\text{H}$  COSY, total correlation spectroscopy (TOCSY), and J-resolved experiments. Heteronuclear single quantum spectroscopy was used to reveal direct proton carbon connectivities. TOCSY was run by using the DIPSI2 spin-lock scheme for  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  transfers with a 90° pulse of 80  $\mu$ s and a mixing time of 0.1 s. For COSY, 2,048  $t_2$  data points with 128 scans per increment and 300  $t_1$  data points were acquired. For TOCSY, 2,048  $t_2$  data points with 128 scans per increment and 470  $t_1$  data points were acquired. The spectral width in both dimensions was 7,500 Hz for both COSY and TOCSY experiments. For the J-resolved experiment, 4,096  $t_2$  data points with 128  $t_1$  data points were acquired. Spectral widths were set to 7,500 Hz in F2 and 40 Hz in F1. Finally, HSQC was run with 2,048  $t_2$  data points with 432 scans for each of the 256  $t_1$  data points. Spectral widths were set to 7,500 Hz in F2 and 35,200 Hz in F1. Total acquisition time was  $\approx$ 36 h for COSY, 13 h for TOCSY, 24 h for the J-resolved experiment, and 67 h for HSQC. Assignment was established from a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (27) spin-echo spectrum. The acquisition time was 8 min (256 scans). The spin-spin relaxation delay ( $\tau-\pi-\tau$ ) was set to 810  $\mu$ s, and 200 loops were performed before acquisition.

**Data Import and Pattern Recognition.**  $^1\text{H}$  HRMAS-NMR spectra were phased by using the Topspin 1.3 interface. They were reduced over the chemical shift range of  $-0.49$  to  $9.59$  ppm with exclusion areas around residual water signal ( $4.61$ – $4.99$  ppm) and its magic angle spinning side band ( $-0.40$  to  $-0.19$  ppm), except for statistical support analysis, using AMIX (Bruker) to 10,000  $10^{-3}$ -ppm wide regions (buckets), and the signal intensity in each region was integrated. Spectra were scaled to total intensity, and integration

was performed with the sum-of-intensities mode. The corresponding buckets table was then exported to the software Simca-P 11 (Umetrics) for statistical analysis.

**Multivariate Statistics.** Principal component analyses (PCA) were run to check the homogeneity of each subpopulation and eventually exclude outliers. Data were then visualized by scores and loadings plots. In scores plots, each point represents a NMR spectrum and thus a sample. Loadings points stand for NMR spectral regions and show intensity variations sustaining the distinction between subpopulations.

OPLS analysis and PLS-DA were run to discriminate two respectively three populations of nematodes by adding a supplementary data matrix  $Y$ , containing information about genetic, age, or technological factors. These methods allow a clearer distinction between populations by canceling orthogonal information to the  $Y$  matrix, which are of no use for this particular discrimination. As for PCA, results were visualized by scores and loadings plots. Model validations were performed by resampling the model 999 times under the null hypothesis, meaning generating models with a randomly permuted  $Y$  matrix not related to the factors of interest. The decrease in model goodness-of-fit statistics  $R^2$  and  $Q^2$  as a function of the correlation between the permuted and the original  $Y$  matrix indicates the quality of the model.

The SIMCA algorithm was used to probe the prediction capacity of the established models. The data set was divided in three. Two of them are used as training sets to create a map. PCA of each group was run to establish the limit of membership to each class. These results are then organized on a 2D plan defining four areas. Upper left and lower right are the area of membership to one of the training set populations. Lower left is the region of membership to the two populations. Finally, upper right may be understood as an exclusion area, where no membership to the training set populations may be found. The last part of the data set is then used as a test set. Every point (representing a spectrum) is projected on this plan, and its membership to one of the training set populations is validated by the position of this projection with respect to the models' limits.

We thank Dr. Armand M. Leroi and Dr. Jake Bundy for helpful discussions and Bruker Biospin (Drs. Martial Piotto, Alain Belguise, and Manfred Spraul) for its financial and scientific support.

- Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Le Bot N, Moreno S, Sohrmann M, et al. (2003) *Nature* 421:231–237.
- Simmer F, Moorman C, van der Linden AM, Kuijk E, van den Berghe PVE, Kamath RS, Fraser AG, Ahringer J, Plasterk RHA (2003) *PLoS Biol* 1:77–84.
- Hill AA, Hunter CP, Tsung BT, Tucker-Kellogg G, Brown EL (2000) *Science* 290:809–812.
- Kaletta T, Hengartner MO (2006) *Nat Rev Drug Discovery* 5:387–398.
- Kwok TCY, Ricker N, Fraser R, Chan AW, Burns A, Stanley EF, McCourt P, Cutler SR, Roy PJ (2006) *Nature* 441:91–95.
- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E (1999) *Xenobiotica* 29:1181–1189.
- Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E (2002) *Nat Rev Drug Discovery* 1:153–161.
- Dumas ME, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A, Fearnside J, Tatoud R, Blanc V, Lindon JC, et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12511–12516.
- Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G, Provost JP, Le Net JL, Baker D, Walley RJ, et al. (2006) *Nature* 440:1073–1077.
- Dumas ME, Wilder SP, Bihoreau MT, Barton RH, Fearnside JF, Argoud K, D'Amato L, Wallis RH, Blancher C, Keun HC, et al. (2007) *Nat Genet* 39:666–672.
- Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang NS, Hayes A, Walsh MC, Berden JA, Brindle KM, Kell DB, Rowland JJ, et al. (2001) *Nat Biotechnol* 19:45–50.
- Cheng LL, Ma MJ, Becerra L, Ptak T, Tracey I, Lackner A, Gonzalez RG (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6408–6413.
- Shintu L, Caldarelli S (2005) *J Agric Food Chem* 53:4026–4031.
- Antoshechkin I, Sternberg PW (2007) *Nat Genet* 8:518–532.
- Ward JL, Harris C, Lewis J, Beale MH (2003) *Phytochemistry* 62:949–957.
- Fiehn O, Kopka J, Dormann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L (2000) *Nat Biotechnol* 18:1157–1161.
- Wheeler JM, Thomas JH (2006) *Genetics* 174:1327–1336.
- Wold S (1976) *Pattern Recognit* 8:127–139.
- Sohal RS (2002) *Free Radical Biol Med* 33:573–574.
- Larsen PL (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8905–8909.
- Yancey PH (2005) *J Exp Biol* 208:2819–2830.
- Schliess F, Gorg B, Haussinger D (2006) *Biol Chem* 387:1363–1370.
- Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID (2005) *Nat Rev Microbiol* 3:431–438.
- Brownlee M (2001) *Nature* 414:813–820.
- Jeener J, Meier BH, Bachmann P, Ernst RR (1979) *J Chem Phys* 71:4546–4553.
- Nicholson JK, Foxall PJD, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC (1995) *Anal Chem* 67:793–811.
- Meiboom S, Gill D (1958) *Rev Sci Instrum* 29:688–691.
- Piotto M, Elbayed K, Wieruszkeski JM, Lippens G (2005) *J Magn Reson* 173:84–89.
- Trygg J, Wold S (2002) *J Chemom* 16:119–128.

## Supplementary Material / Supporting Information

Table 1. Assignment of resonances in the 700 MHz  $^1\text{H}$  HRMAS-NMR spectrum of *C. elegans* based on the literature (1)

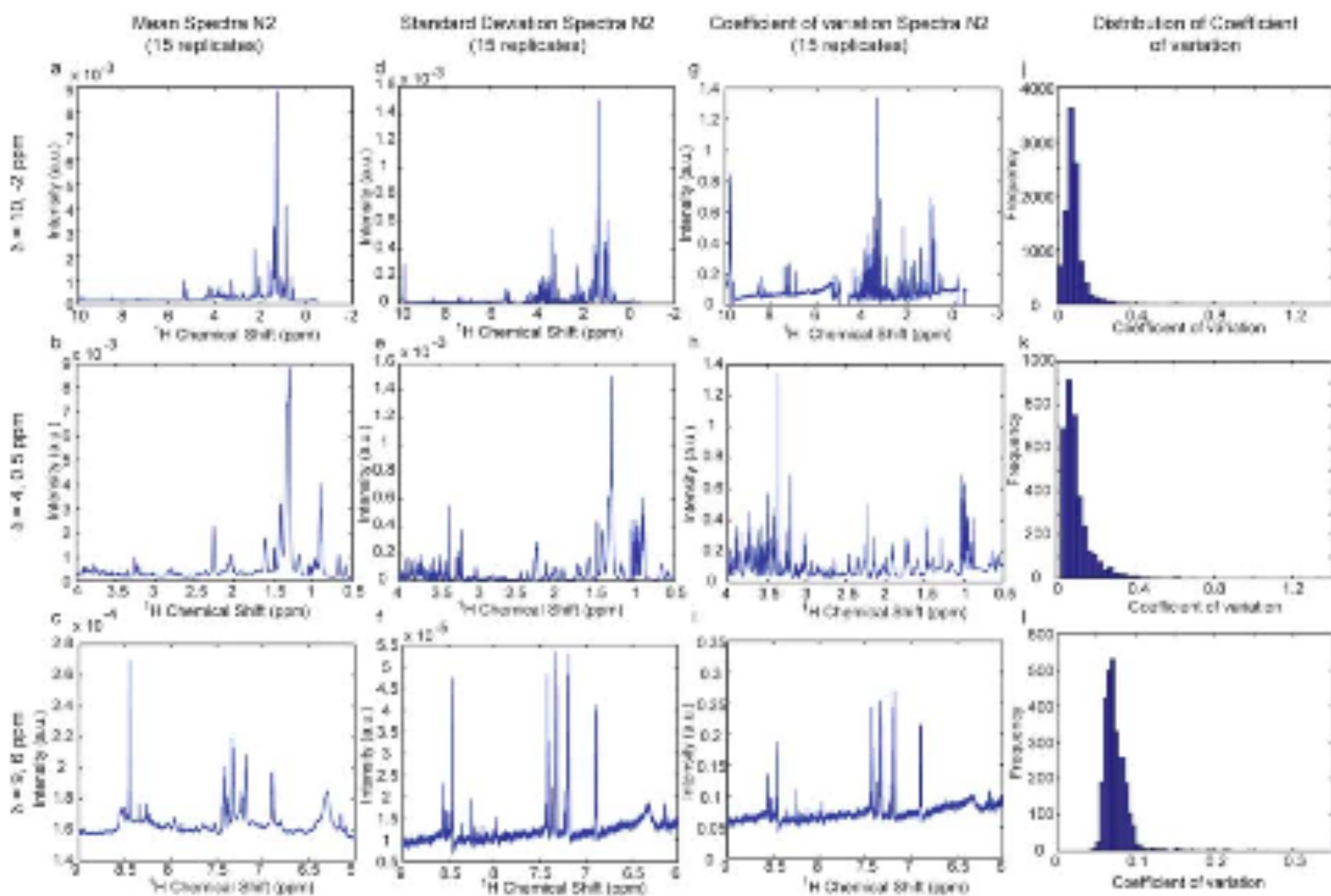
Metabolite	Moieties (key)	Chemical shift (multiplicity)
Cholesterol	C18 (1) and (2)	0.59 (m), 0.67 (m)
Fatty acids	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n(3)$ , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}(4)$ , $\text{CH}_3\text{CH}_2(5)$ , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2(16)$ , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}(17)$ , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}(19)$ , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}(20)$ , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}(24)$	0.89(m), 0.91(m) 0.93(m), 1.17(m) 1.29(m), 1.34(m) 1.41(m), 1.60(m)
Isoleucine	$\delta\text{CH}_3(6)$ , $\beta\text{CH}_3(12)$ , $\beta\text{CH}(31)$ , $\alpha\text{CH}(83)$	0.94(t), 1.01(d), 1.99(m), 3.71(d)
Leucine	$\delta\text{CH}_3(7)$ , $\delta'\text{CH}_3(8)$ , $\beta\text{CH}_2\text{-}\gamma\text{CH}(28)$ , $\alpha\text{CH}(84)$	0.95(d), 0.96(d), 1.73(m), 3.74(m)
$\alpha$ -hydroxy- <i>N</i> -valerate	$\text{CH}_3(9)$	0.97(m)
Valine	$\text{CH}_3(10)$ , $\text{CH}_3(14)$ , $\beta\text{CH}(39)$ , $\alpha\text{CH}(79)$	0.99(d), 1.05(d), 2.26(m), 3.62(d)
Lactate	$\text{CH}_3(18)$	1.33(m)
Penicillamine	$\text{CH}_3(21)$	1.46(s)
Alanine	$\text{CH}_3(22)$ , $\alpha\text{CH}(87)$	1.48(d), 3.79(q)
Saccharopine	$\text{H}\delta$ and $\text{H}\beta\text{ii}(23)$ , $\text{CH}_2\text{COOH}(37)$	1.53(m), 2.19(m)
$\alpha$ -keto- $\beta$ -methyl- <i>N</i> -valerate	$\text{CH}_2(25)$ , $\text{CH}_2(27)$	1.64(m), 1.70(m)
Arginine	$\gamma\text{CH}_2(26)$ , $\beta\text{CH}_2(30)$ , $\alpha\text{CH}(86)$	1.68(m), 1.92(m), 3.78(m)
Lysine	$\beta\text{CH}_2(29)$ , $\epsilon\text{CH}_2(57)$ , $\alpha\text{CH}(85)$	1.84(m), 3.03(t), 3.77(m)
Proline	$\beta\text{CH}_2(32)$ , $\delta\text{CH}_2(72)$ , $\alpha\text{CH}(96)$	2.03(m), 3.38(m), 4.13(m)
<i>N</i> -acetyl-glutamate	$\text{CH}_3(33)$	2.05(s)
Isovalerate	$\text{CH}_2(34)$	2.06(d)

Glutamate/Glutamine	$\beta\text{CH}_2(35)$	2.08(m)
Methionine	S- $\text{CH}_3(36)$ , S- $\text{CH}_2(47)$ , $\alpha\text{CH}(89)$	2.14(m), 2.64(m), 3.85(m)
Homocysteine	$\beta\text{CH}_2(38)$	2.22(m)
Glutamate	$\gamma\text{CH}_2(40)$	2.35(m)
Pyroglutamate	$\text{CH}_2(41)$ , $\text{CH}_2(45)$	2.41(m), 2.49(m)
Glutamine	$\gamma\text{CH}_2(42)$	2.46(d)
Succinate	$\text{CH}_2(43)$	2.46(s)
$\beta$ -alanine	$\text{CH}_2\text{COOH}(46)$ , $\text{NCH}_2(66)$	2.55(m), 3.18(m)
Aspartate	$\beta\text{CH}_2(48)$ and (53)	2.68(d), 2.82(dd)
N-acetyl-L-aspartate	$\text{CH}_2(49)$	2.70(d)
$\alpha$ -ketobutyrate	$\text{CH}_2(50)$	2.73(m)
Dimethylamine	$\text{CH}_3(51)$	2.74(s)
Sarcosine	$\text{CH}_3(52)$	2.76(s)
Asparagine	$\beta\text{CH}_2(54)$ and (56)	2.87(d), 2.97(d)
Melatonin	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(55)$	2.94(m)
Tyrosine	$\beta\text{CH}_2(58)$ , $\beta\text{CH}_2(67)$ aromatic(111)	3.05(d), 3.20(d), 6.9 (m) and 7.19(m)
Ornithine	$\delta\text{CH}_2(59)$	3.08(m)
Indole-3-lactate	$\text{CH}_2(60)$	3.10(m)
Cysteine	$\text{CH}_2(61)$	3.11(m)
Phenylalanine	$\beta\text{CH}_2(62)$ , $\beta\text{CH}_2(70)$ , aromatic(115)	3.13(m), 3.29(m), 7.42(m)
Histidine	$\beta\text{CH}_2(63)$ , $\alpha\text{CH}(93)$	3.14(m), 3.97(dd)
Homocarnosine	$\alpha\text{CH}_2(55)$	3.16(m)

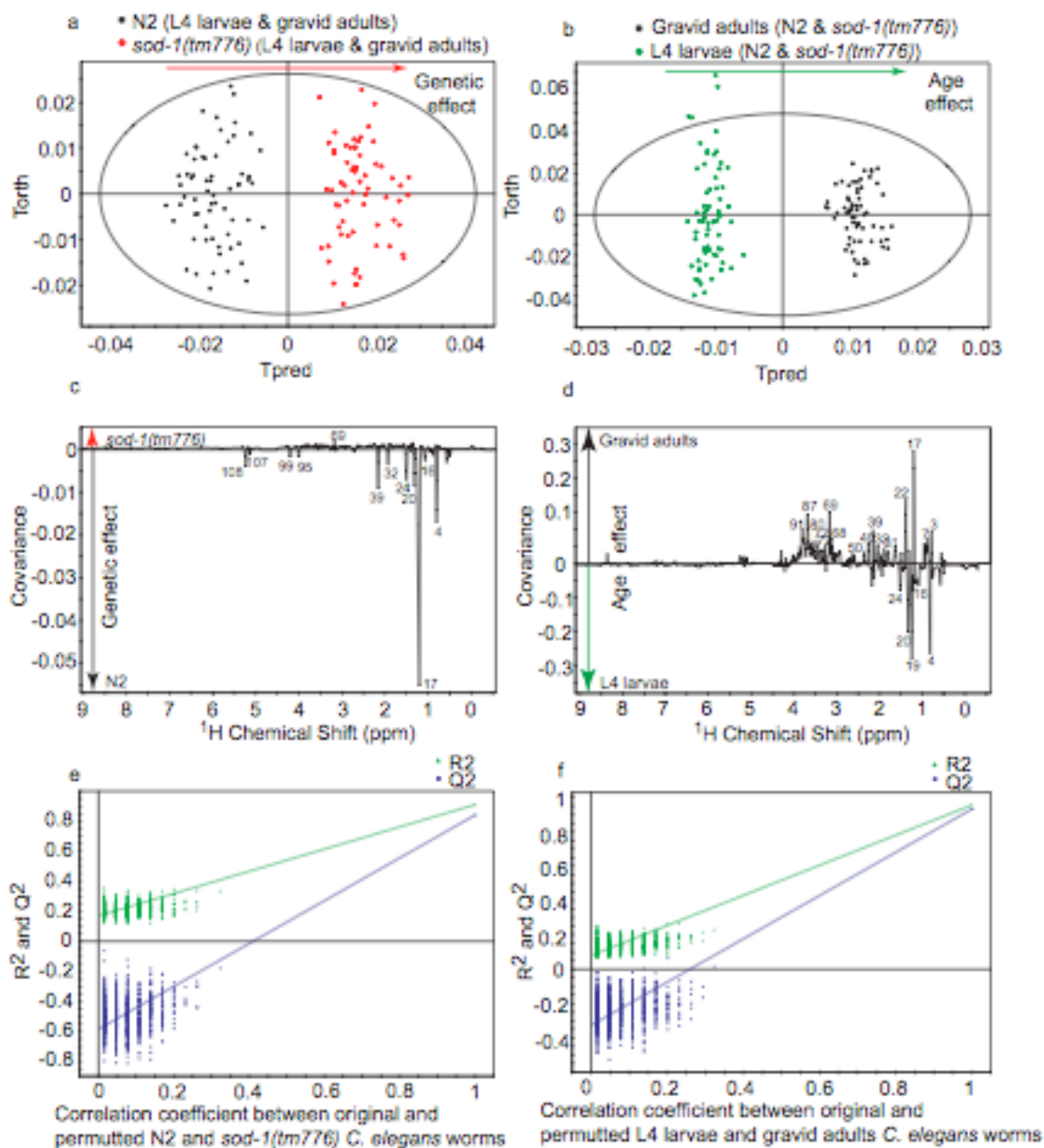
*Identification des voies d'action*

β-glucose	H <sub>2</sub> (68), H <sub>4</sub> (73), H <sub>3</sub> (75), CH <sub>2</sub> -C6(91), H <sub>1</sub> (105)	3.25(m), 3.41(t), 3.48(t), 3.92(dd), 4.64(d)
Trimethylamine-N- oxyde (TMAO)	CH <sub>3</sub> (69)	3.27(s)
5-methoxytryptamine	CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> (70)	3.33(m)
α-glucose	H <sub>4</sub> (74), H <sub>2</sub> (76), CH <sub>2</sub> -C6(82), H <sub>1</sub> (107)	3.42(t), 3.52(dd), 3.70(dd), 5.23(d)
Glycerol	CH <sub>2</sub> (77), CH <sub>2</sub> (80), C2-H(90)	3.56(dd), 3.65(dd), 3.87(m)
Threonine	αCH(78), βCH(98)	3.60(d), 4.26(m)
Choline in lipids	NCH <sub>2</sub> (81)	3.67(m)
Glycerate	CH <sub>2</sub> (88)	3.84(d)
Serine	βCH <sub>2</sub> (92), βCH <sub>2</sub> (94),	3.96(dd), 4.00(dd)
Glyceryl of lipids	CH <sub>2</sub> OCOR(95), CHOCOR(106)	4.09(m), 5.20(m)
Inosine	H <sub>5</sub> '(97), H <sub>4</sub> '(102), H <sub>2</sub> '(110), H <sub>6</sub> (119), H <sub>2</sub> (120)	4.23(m), 4.44(m), 6.10(d), 8.23(s), 8.35(s)
Unknown	(99)	4.34(m)
Unknown	(100)	4.39(m)
Dihydroxyacetone	CH <sub>2</sub> (101)	4.42(s)
Folate	CH <sub>2</sub> (103)	4.53(s)
β-galactose	H <sub>1</sub> (104)	4.57(d)
Unsaturated lipids	=CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (108)	5.33(m)
Uracil	H <sub>5</sub> (109)	5.80(d)
Indole	H <sub>6</sub> (112), H <sub>7</sub> (116)	7.22(t), 7.53(d)
Phenylacetate	H <sub>2</sub> , H <sub>4</sub> and H <sub>6</sub> (113)	7.33(t)
β-phenylpyruvate	H <sub>4</sub> (114)	7.38(t)
Anserine	H <sub>2</sub> (117)	7.97(s)
Adenine	H <sub>8</sub> (118)	8.19(s)
Formate	CH(121)	8.46(s)
Picolinate	H <sub>6</sub> (122)	8.52(s)

1. Nicholson JK, Foxall PJD, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC (1995) *Anal Chem* 67:793-811.



**Fig. 4. Calculation of coefficients of variation.** To assess intrinsic reproducibility, 15 spectra were acquired from different N2 samples. From the left to the right and from top to bottom, mean spectra (a-c), standard deviation spectra (d-f), coefficients of variation (g-i), and their distribution (j-l) are given for the whole spectrum  $\delta[-0.5; 10]$  (a, d, g, and j), the aliphatic region  $\delta[0.5; 4]$  (b, e, h, and k), and the aromatic region  $\delta[6; 9]$  (c, f, i, and l). The coefficients of variation show a mode around 15%, which validates the robustness and reproducibility of the overall protocol to collect  $^1\text{H}$  HRMAS-NMR spectra of different control preparations.



**Fig. 5. Statistical support for the discrimination between *sod1(tm776)* and N2.** Further study of the biological factors (genetics and age) is given with the scores (a and b), loadings (c and d), and model validation plots (e and f) related to genetics (a, c, and e) and age (b, d, and f). Spectral assignment was achieved based on literature values (1) and 2D homo- and heteronuclear HRMAS-NMR spectroscopy. Model validation for the biological factors (genetics in e and age in f) was performed by resampling the model 999 times under the null hypothesis  $H_0$ .

1. Nicholson JK, Foxall PJD, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC (1995) Anal Chem 67:793-811.

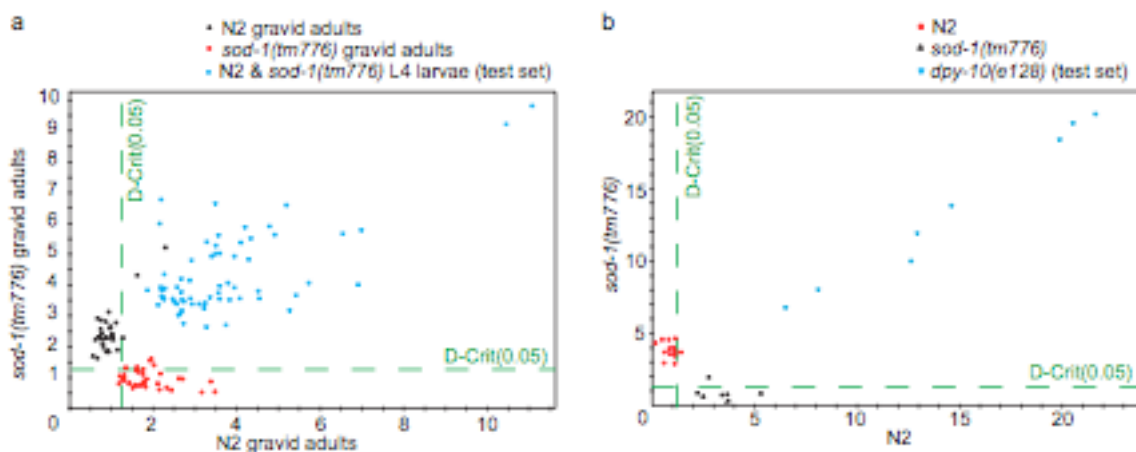


Table 2. Significant metabolic variations observed in *sod-1(tm776)* vs. N2 *C. elegans* nematodes in SI Fig. 5c

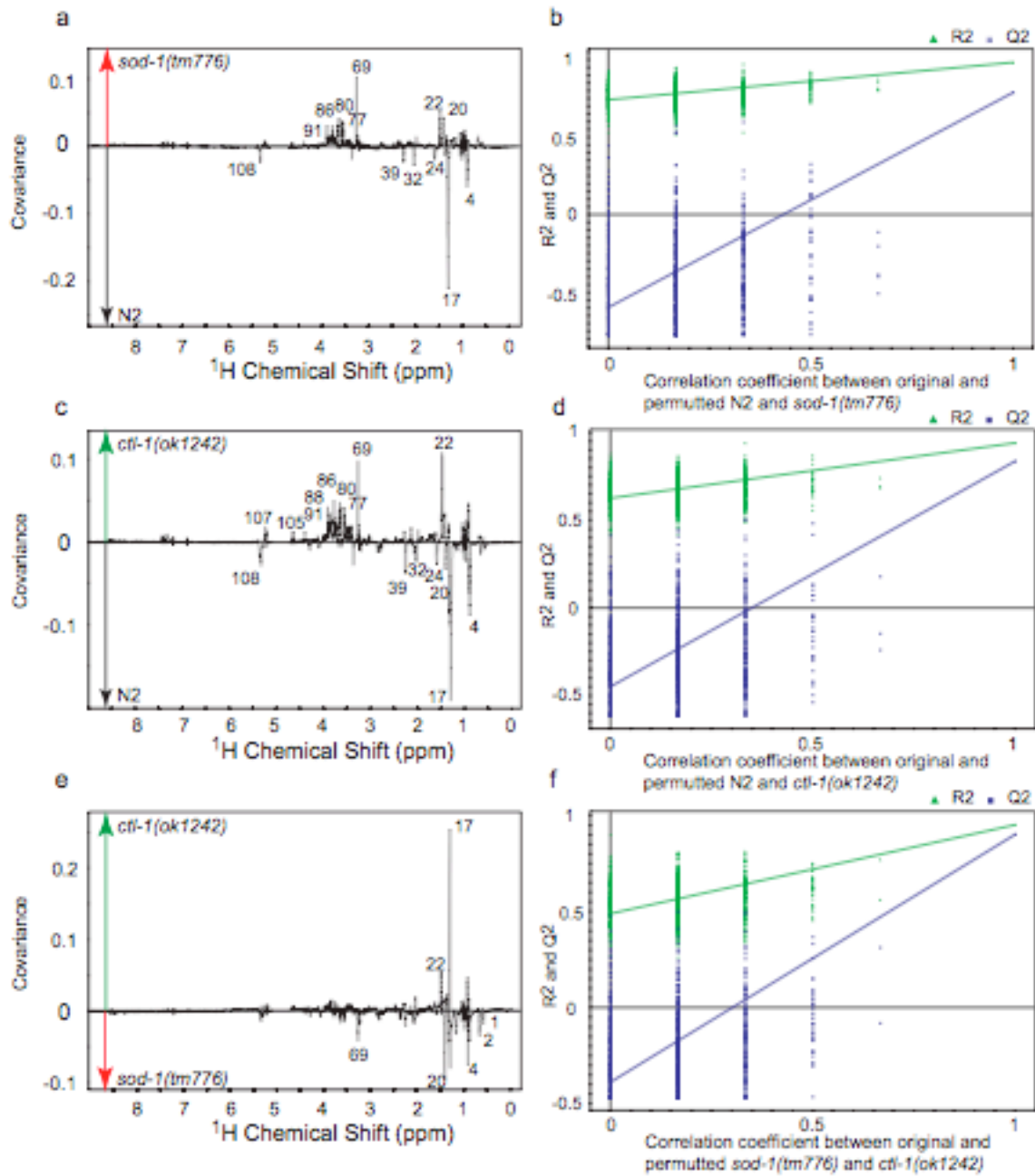
Metabolite (key)	Chemical shift $\delta$ , ppm	Changes of direction
Lipids CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C=C (4)	0.90	↓
Lipids CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (16)	1.16	↓
Lipids CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO (17)	1.30	↓
Lipids CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO (20)	1.41	↓
Lipids CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C=C (24)	1.59	↓
Proline (32)	2.03	↓
Valine (39)	2.26	↓
TMAO (69)	3.27	↑
Glycerol of lipids (95)	4.09	↓
Glycerolphosphoryl choline (99)	4.30	↓
$\alpha$ -glucose (107)	5.23	↓
Unsaturated lipids (108)	5.33	↓

The arrows indicate the direction changes (↑ increase; ↓ decrease) in the concentration among *sod-1(tm776)* relative to N2. The numbers in parentheses correspond to the metabolite resonance ID on the 700MHz spectra in Fig. 1. Assignment is based on the literature(1).

1. Nicholson JK, Foxall PJD, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC (1995) *Anal Chem* 67:793-811.



**Fig. 6. Cooman's plots for age (a) and genetic effects (b).** Principal component analysis (PCA) on the training set creates reference models that are displaced in the upper left and lower right of the plot. The test set is then projected on this plot, and the membership of each spectrum of the test set is then evaluated with respect to the PCA models' limits. In both cases, training sets that do not belong to the classes used in PCA to create the map are projected in the exclusion area (upper right). These SIMCA plots show the capacity of the developed protocol to identify a sample, on age (a) or genetic (b) specificity, by its comparison with previously recorded data points.



**Fig. 7. Statistical support for oxidative stress pathway dissection.** OPLS loadings between *sod-1(tm776)* and N2, *ctl-1(ok1242)* and N2, and *sod-1(tm776)* and *ctl-1(ok1242)*, respectively (a, c, and e), show variations in concentration that can be linked to metabolites. Internal validations of the above models are displayed showing a substantial decrease of performances ( $R^2$  and  $Q^2$ ) as genetic data are permuted (b, d, and f).

Table 3. Significant metabolic variations observed in *ctl-1(ok1242)* vs. N2 *C. elegans* nematodes in SI Fig.7c

Metabolite (key)	Chemical shift $\delta$ , ppm	Changes of direction
Lipids CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C=C (4)	0.90	↓
Lipids CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (17)	1.29	↓
Lipids CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO (20)	1.41	↓
Alanine (22)	1.48	↑
Lipids CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C=C (24)	1.59	↓
Proline (32)	2.03	↓
Valine (39)	2.26	↓
TMAO (69)	3.24	↑
Glycerol (77)	3.56	↑
Glycerol (80)	3.65	↑
Arginine (86)	3.78	↑
Glycerate (88)	3.84	↑
$\beta$ -glucose (91)	3.92	↑
$\beta$ -glucose (105)	4.63	↑
$\alpha$ -glucose (107)	5.23	↑
Unsaturated lipids (108)	5.33	↓

The arrows indicate the direction changes (↑ increase; ↓ decrease) in the concentration among *ctl-1(ok1242)* relative to N2. The numbers in parentheses correspond to the metabolite resonance on the 700MHz spectra in Fig. 1. Assignment is based on the literature(1).

1. Nicholson JK, Foxall PJD, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC (1995) *Anal Chem* 67:793-811.

## Metabolic Profiling Strategy of *Caenorhabditis elegans* by Whole-Organism Nuclear Magnetic Resonance

Benjamin J. Blaise,<sup>†,‡</sup> Jean Giacomotto,<sup>†,§</sup> Mohamed N. Triba,<sup>†,‡,§</sup> Pierre Toulhoat,<sup>†,||</sup> Martial Piotto,<sup>⊥,¶</sup> Lyndon Emsley,<sup>‡</sup> Laurent Ségalat,<sup>§</sup> Marc-Emmanuel Dumas,<sup>‡</sup> and Bénédicte Elena<sup>\*,‡</sup>

Université de Lyon, CNRS/ENS Lyon/UCB-Lyon1, Centre de RMN à Très Hauts Champs, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France, Université de Lyon, CNRS/UCB-Lyon1, CGMC (UMR 5534), Bâtiment Mendel, 43 boulevard du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne Cedex, France, INERIS, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil en Halatte, France, Institut de Chimie, 4 rue Blaise Pascal, Université Louis Pasteur, 67084 Strasbourg, France, and Bruker Biospin, 34 rue de l'industrie, 67166 Wissembourg, France

Received January 7, 2009

In this study, we present a methodology for metabotyping of *C. elegans* using <sup>1</sup>H high resolution magic angle spinning (HRMAS) whole-organism nuclear magnetic resonance (NMR). We demonstrate and characterize the robustness of our metabolic phenotyping method, discriminating wild-type N2 from mutant *sod-1(tm776)* animals, with the latter being an otherwise silent mutation, and we identify and quantify several confounding effects to establish guidelines to ensure optimal quality of the raw data across time and space. We monitor the sample stability under experimental conditions and examine variations arising from effects that can potentially confuse the biological interpretation or prevent the automation of the protocol, including sample culture (breeding of the worms by two biologists), sample preparation (freezing), NMR acquisition (acquisition by different spectroscopists, acquisition in different facilities), and the effect of the age of the animals. When working with intact model organisms, some of these exogenous effects are shown to be significant and therefore require control through experimental design and sample randomization.

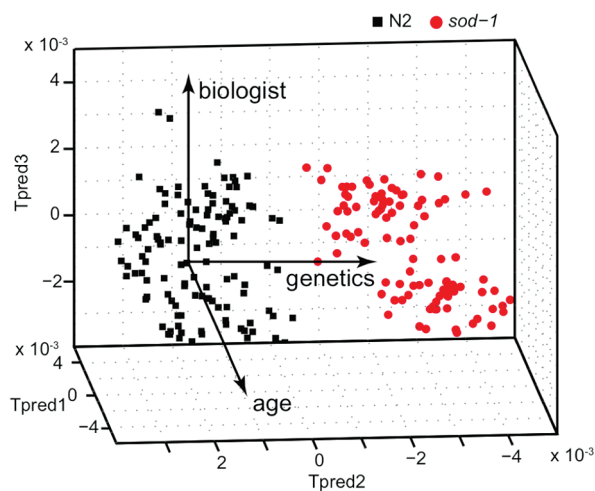
**Keywords:** metabotyping • <sup>1</sup>H HRMAS NMR • *Caenorhabditis elegans* • standardization • metabonomics • metabolomics

### Introduction

Metabonomics/metabolomics is an emerging field of post-genomic sciences, which focuses on identifying and quantifying low molecular weight compounds (metabolites) to obtain information at a molecular level and to understand the response of a living organism to pathophysiological stimuli.<sup>1</sup> This can be achieved by simultaneous quantification of metabolites using spectroscopic methods such as nuclear magnetic resonance (NMR) or mass spectrometry (MS).<sup>2,3</sup> It has been applied to a variety of biological samples to characterize features such as genetics, toxicology, metabolic regulation, and infectious disease.<sup>4–9</sup>

We have recently shown that a whole-organism NMR-based metabonomics strategy can be used to assign distinct metabolotypes to different genetically modified strains of the model organism *C. elegans*<sup>10</sup> but could be extendable to other small model organisms.<sup>11</sup> This provides the rationale for a large-scale functional genomics screening of this animal, or targeted metabolic studies in areas where *C. elegans* has been shown

to be a good platform, for example, in understanding physiological aspects of lifespan and aging, genetic diseases, drug toxicity, and pharmacology studies.<sup>12–16</sup>



**Figure 1.** O2-PLS discrimination model on genetics, age, and biologist. O2-PLS score plot discriminating 228 *C. elegans* (129 N2 and 99 *sod-1(tm776)*) spectra. Major discriminating effects are represented by age ( $Q^2 = 0.73$ ), genetics ( $Q^2 = 0.61$ ), and biologist breeding effect ( $Q^2 = 0.41$ ) axis. Other studied effects, sorted by decreasing significance, are: NMR facilities ( $Q^2 = 0.20$ ), freezing ( $Q^2 = 0.19$ ), and NMR spectroscopists ( $Q^2 = -0.44$ ).

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: benedicte.elena@ens-lyon.fr.

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

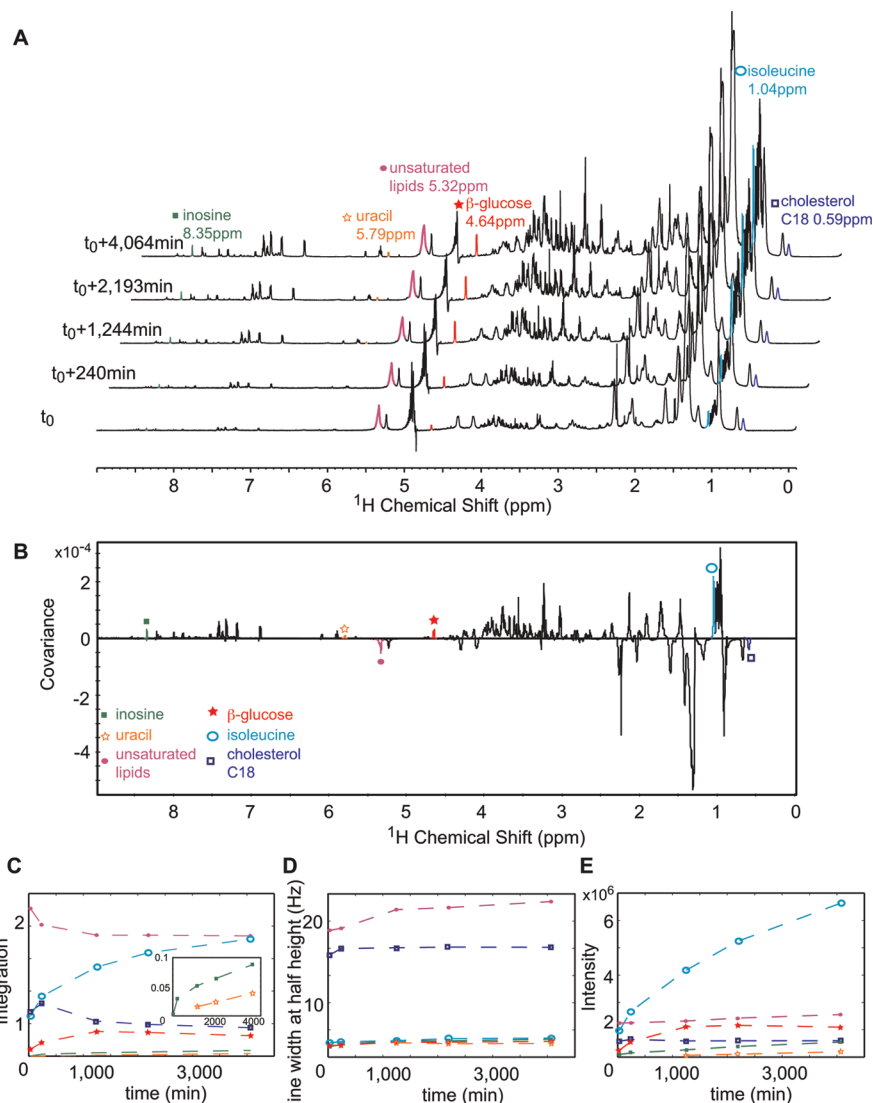
<sup>‡</sup> CNRS/ENS Lyon/UCB-Lyon1.

<sup>§</sup> CNRS/UCB-Lyon1.

<sup>||</sup> INERIS.

<sup>⊥</sup> Université Louis Pasteur.

<sup>¶</sup> Bruker Biospin.



**Figure 2.** Sample degradation. (a) 1D NOESY experiments of *C. elegans* nematodes acquired at different time intervals, 293 K, and 3.5 kHz MAS frequency. (b) O-PLS regression was done with respect to time showing that almost all signals are affected by the spinning. The evolution of six resolved signals belonging to different classes of metabolites (inosine, ■; uracil, ☆; unsaturated lipids, ●;  $\beta$ -glucose, ★; isoleucine, ○; and cholesterol, □) was monitored by measuring (c) peaks integral, (d) line-width at half-height, (e) and maximal intensity.

Whole-organism spectral data used in this type of analysis encapsulates the metabolic information available in a single data set. To interpret this high information density, the use of multivariate statistical analyses (the most popular being PCA, PLS-DA, O-PLS)<sup>17,18</sup> is a necessity to compress the latent information and extract a metabolic signature relevant to a particular question. Our ability to recover latent information is dependent on various exogenous technological factors that can influence the analyses and lead to an overestimation of discriminative capacities.<sup>19</sup> However, for such an approach to become transferable and widespread, long-term, multiuser, multicenter studies require the identification of confounding effects that could interfere with the measurements of biological effects of interest.

This work notably is in line with recent initiatives (Metabolomic Standard Initiative, Standard Metabolic Reporting Structure)<sup>20–22</sup> that have established good laboratory practices for MS and solution NMR-based metabolomics<sup>20–24</sup> and is of current particular relevance as *C. elegans* genetics has recently been the subject of several metabolomic/metabolomic studies.<sup>13,25,26</sup>

## Experimental Section

**Nematode Strains.** *C. elegans* strains used in this study are wild type (N2) and FX776 (*sod-1(tm776)*). They were obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center. These strains were maintained at 23 °C on NGM agar medium with OP50 bacterial lawns as food source, to keep worms well fed at all time.

***C. elegans* Preparation and Conservation.** At the appropriate stage, nematodes were fixed with formaldehyde (3.7% final) in M9 saline buffer during 45 min at room temperature under agitation and then washed four times with ultrapure water. A last wash was performed using D<sub>2</sub>O to provide a field-frequency lock signal for NMR experiments. A population of approximately 1000 worms was then filled into a 4 mm HRMAS rotor with Kel-f inserts restricting the effective sample volume to a 12  $\mu$ L sphere. A speed vacuum engine was used to remove D<sub>2</sub>O surplus. NMR acquisition was performed on the day of sample preparation except for the freezing study. In this last case, worms were prepared between one and two weeks before NMR experiments. After preparation, they were smoothly frozen at

## research articles

–80 °C for storage and then were thawed at room temperature before transfer into the rotor on the day of NMR acquisition.

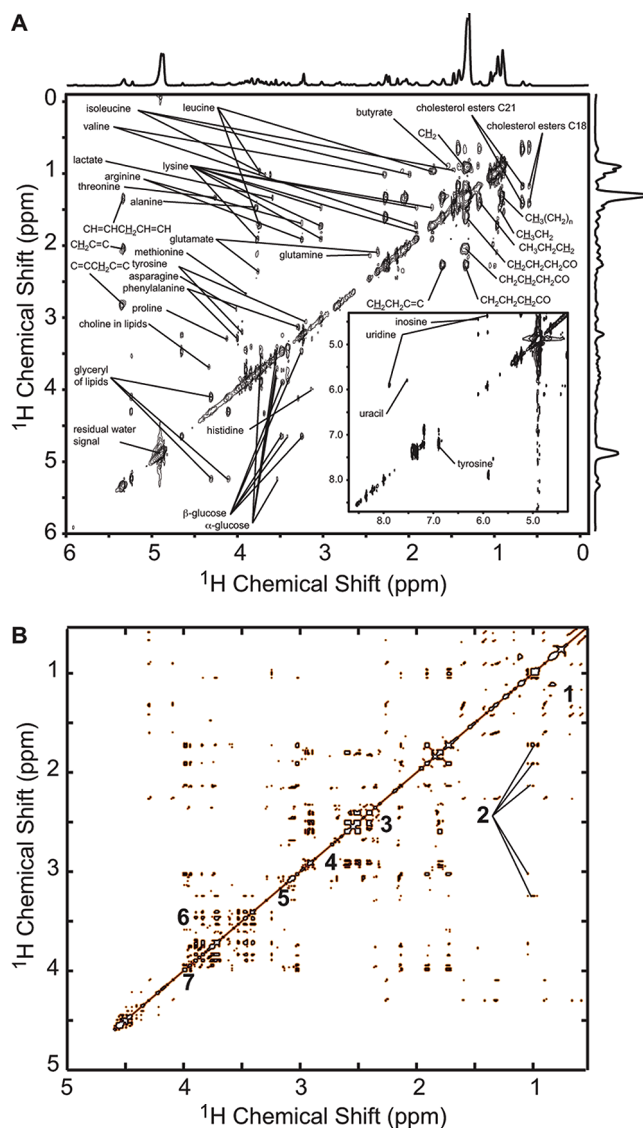
**<sup>1</sup>H HRMAS-NMR Spectroscopy.** All NMR experiments were carried out on Bruker Avance spectrometers operating at 700 MHz, using a standard double resonance (<sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C) 4 mm HRMAS probe. Standard HRMAS one-dimensional nOe spectroscopy experiments<sup>27</sup> (recycle delay–90°–*t*–90°–*t<sub>m</sub>*–90°–acquisition) were carried out on each sample for statistical analysis. Water suppression was achieved using low power irradiation of the water resonance during the recycle delay of 1.7 s. The mixing time *t<sub>m</sub>* was set to 100 ms. The 90° pulse length was adjusted to 5.3 μs, and *t* to 4 μs. Sixteen thousand data points with 512 scans were acquired using a spectral width of 8503 Hz, for a total acquisition time of approximately 25 min. The magic angle spinning frequency was set to 3.5 kHz, and the sample temperature was regulated at 293 K. All free induction decays were multiplied by an exponential function equivalent to a 0.3 Hz line-broadening factor before Fourier transformation for a size of real spectrum of 32k data points.

Structural assignment of the metabolic signals observed in the spectra can be achieved by 2D correlation experiments, such as TOCSY, as illustrated in Figure 3a, yielding to correlations within a metabolite (spin systems), or by the measurement of the statistical correlations between NMR variables yielding to correlations between both spin systems and metabolic systems, corresponding to different resonances of the same compound or metabolites present in the same physiological pathway, in a STOCSY spectrum,<sup>28,29</sup> as shown in Figure 3b. The STOCSY can be interpreted as a pseudo 2D NMR spectrum representing the correlation matrix of a data matrix of 1D NMR spectra. The assignment is thus based on the chemical shifts reported for metabolites in the literature.<sup>30</sup>

**Data Import and Pattern Recognition.** <sup>1</sup>H HRMAS-NMR spectra were processed using the Topspin 1.3 interface (Bruker GmbH, Rheinstetten, Germany). They were reduced over the chemical shift range of –0.1 to 9 ppm with exclusion areas around residual water signal (4.6 to 5.10 ppm) using the AMIX software (Bruker GmbH) to 10 000 10<sup>–3</sup> ppm wide regions (buckets), and the signal intensity in each region was integrated. Spectra were scaled to total intensity, and integration was performed with the sum of intensities mode. The corresponding buckets table was then exported to the software Simca-P 11 (Umetrics, Umeå, Sweden) for statistical analysis.

**Multivariate Statistics.** Principal component analyses (PCA)<sup>17</sup> were carried out to check the homogeneity of each subpopulation and eventually exclude outliers. Data were then visualized by score and loading plots. In score plots, each point represents a NMR spectrum and thus a sample. Loadings points stand for NMR spectral regions and show intensity variations sustaining the distinction between subpopulations.

Orthogonal partial least-squares (OPLS)<sup>18</sup> analysis and bi-directional O2-PLS<sup>31</sup> were run to discriminate populations of nematodes by adding a supplementary data matrix *Y*, containing information about genetic, age or technological factors. These methods allow a clearer distinction between populations by canceling orthogonal information to the *Y* matrix, that are of no use for this particular discrimination. As for PCA, the results were visualized by score and loading plots. Model validations were performed by resampling the model 999 times under the null hypothesis, meaning generating models with a randomly permuted *Y* matrix not related to the factors of interest. The decrease in model goodness-of-fit statistics *R*<sup>2</sup> and

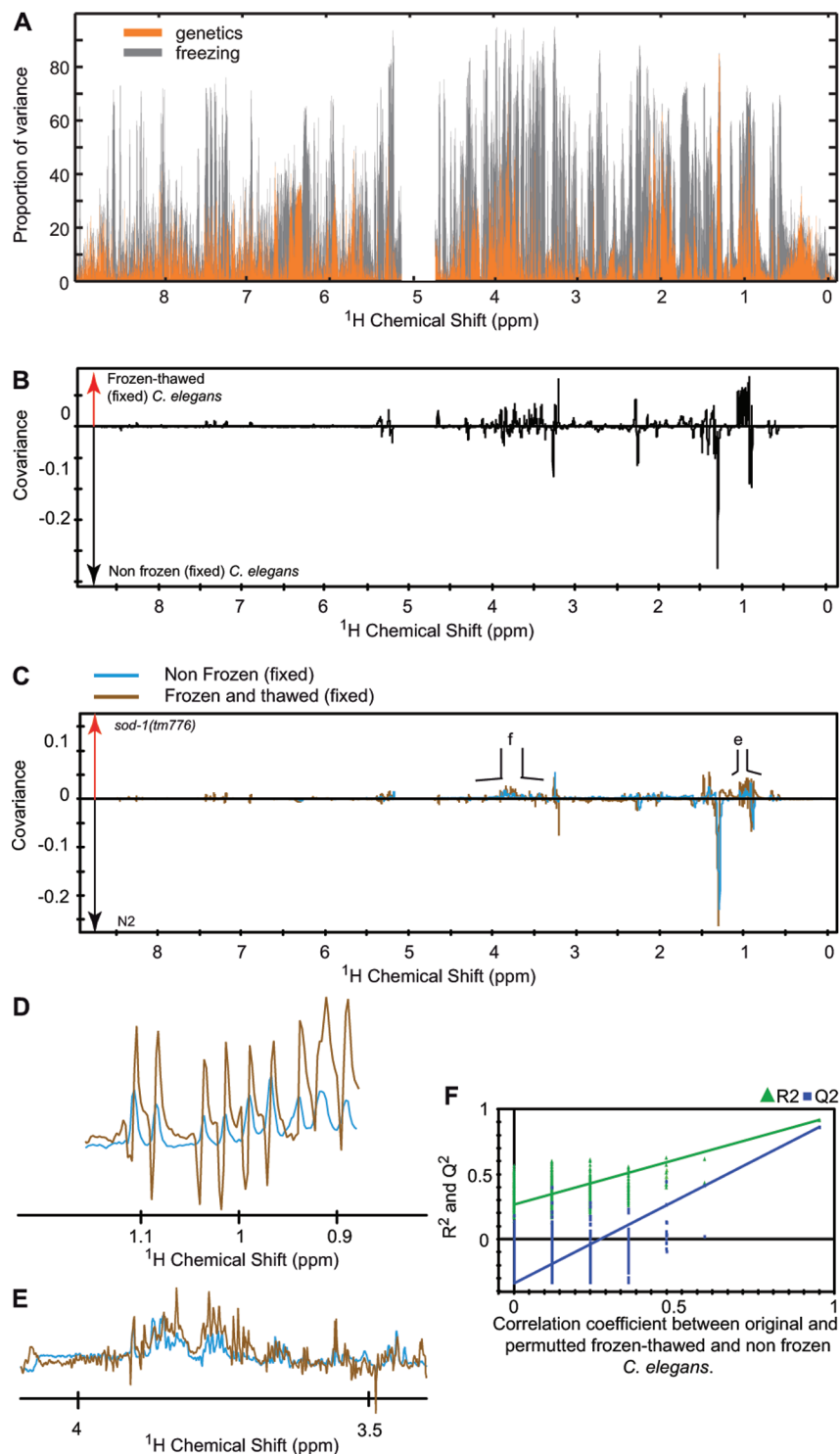


**Figure 3.** Structural assignment. (a) 2D <sup>1</sup>H TOCSY spectrum of *sod-1(tm776)* *C. elegans* mutants acquired at 700 MHz, and assigned according to the literature.<sup>30</sup> 2048 *t*<sub>2</sub> data points with 256 scans per increment and 128 *t*<sub>1</sub> data points were acquired. The spectral width in both dimensions was 12 ppm, for a total acquisition time of about 16 h. 2D NMR data is processed with a squared sine apodization of the signal corresponding to a line broadening of 2 Hz in *F*<sub>2</sub> and 1 Hz in *F*<sub>1</sub>. (b) STOCSY pseudo 2D spectrum constructed with a correlation cutoff of 0.92 from a data set of 147 1D NOESY spectra from N2 and *sod-1(tm776)* mutants. The intensity of the correlation of the NMR variables is reinforced by a color code from yellow to dark. Some correlation systems are identified: (1) lipids, (2) lysine, (3) glutamine/glutamate, (4) asparagine, (5) tyrosine/phenylalanine, (6) glucose, (7) serine/histidine.

*Q*<sup>2</sup> as a function of the correlation between the permuted and the original *Y* matrix indicates the quality of the model.

## Results and Discussion

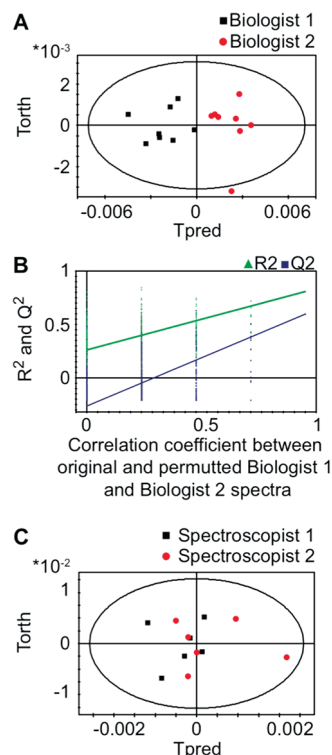
The present analysis focuses on identifying the different key steps that are necessary to extend the metabolic profiling (metabotyping) of selected mutations to a broader strategy for functional genomics of *C. elegans*, targeting the study of a large collection of mutants. To this end, the goal is to ensure that



**Figure 4.** Sample preparation: effect of genetics and sample freezing are presented on a component variance model. (b) Loading plot quantifies the effect of sample freezing for a mixture of fixed N2 and *sod-1(tm776)* *C. elegans* samples. (c) Metabotypes discriminating *sod-1(tm776)* from N2 with frozen–thawed (brown) or non frozen (blue) nematodes are reasonably similar with (d) area of important or (e) small variations. (f) Model describing the effect of freezing was validated by resampling under the null hypothesis.

the variability in the NMR data linked to genetic differences is larger than any variability connected with any other possible confounding effects leading to intersample or interindividual variability. In the current approach, interindividual effects are essentially removed by using NMR samples for analysis consisting of several hundred individuals.

Figure 1 demonstrates that, indeed, using the standardized method developed here, the discrimination induced by genetic factors is not confounded by any dispersion induced by potentially disrupting factors. Two-hundred twenty-eight  $^1\text{H}$  HRMAS NMR spectra of *C. elegans* from wild-type N2 and *sod-1(tm776)* mutants are represented in an orthogonal bidirec-



**Figure 5.** Operator effects. (a) O-PLS analysis score plot constructed from analysis of 2 sets of 8 wild-type (N2) *C. elegans* samples prepared by two different biologists with  $R^2 = 0.807$  and a  $Q^2 = 0.566$ . (b) Model resampling was performed under the null hypothesis showing a clear decrease of  $R^2$  and  $Q^2$  in random models. (c) O-PLS score plots for equivalent analysis in the case of two different NMR spectroscopists performing acquisition after shimming with two matrices of NMR shims using a rotor filled with 10% chloroform in acetone- $D_6$ . The shim quality target was set to a  $^1H$  line-width of 7.5 Hz at the  $^{13}C$ -satellites height. Resolution of 6.48 and 7.30 Hz was obtained respectively by the two spectroscopists. The poor quality ( $R^2 = 0.195$ ) and prediction ( $Q^2 = -1.32$ ) factors for this model confirm the impossibility of rejecting the null hypothesis, that is, the inability to distinguish the two NMR users.

tional partial least-squares regression (O2-PLS)<sup>31</sup> score plot. In the following, we explore the dispersion related to several different factors such as age and biological breeding (represented by arrows together with genetics in Figure 1). Notably, we show that many factors such as batch, sample preparation, NMR settings, HRMAS analysis, or NMR facilities do not have a predictive value in the model. We conclude that despite the variability induced by exogenous technological factors (some of them being here amplified on purpose as concerns intrinsic effects such as age), functional genomics of *C. elegans* by  $^1H$  HRMAS NMR-based metabotyping is robust enough to monitor or cancel out these effects in large-scale studies as long as standards, which we establish in this robust metabotyping method, are respected.

**Monitoring Sample Stability.**  $^1H$  HRMAS NMR allows the acquisition of resolved spectra from a semisolid sample<sup>32</sup> such as an ensemble of nematodes. This NMR technique involves rotating the sample at relatively high spinning frequencies of a few kilohertz.

The sample, under magic angle spinning (MAS), may be subject to physical degradation over time leading to bias in the analysis. We acquired 1D spectra of a pellet of fixed *sod-*

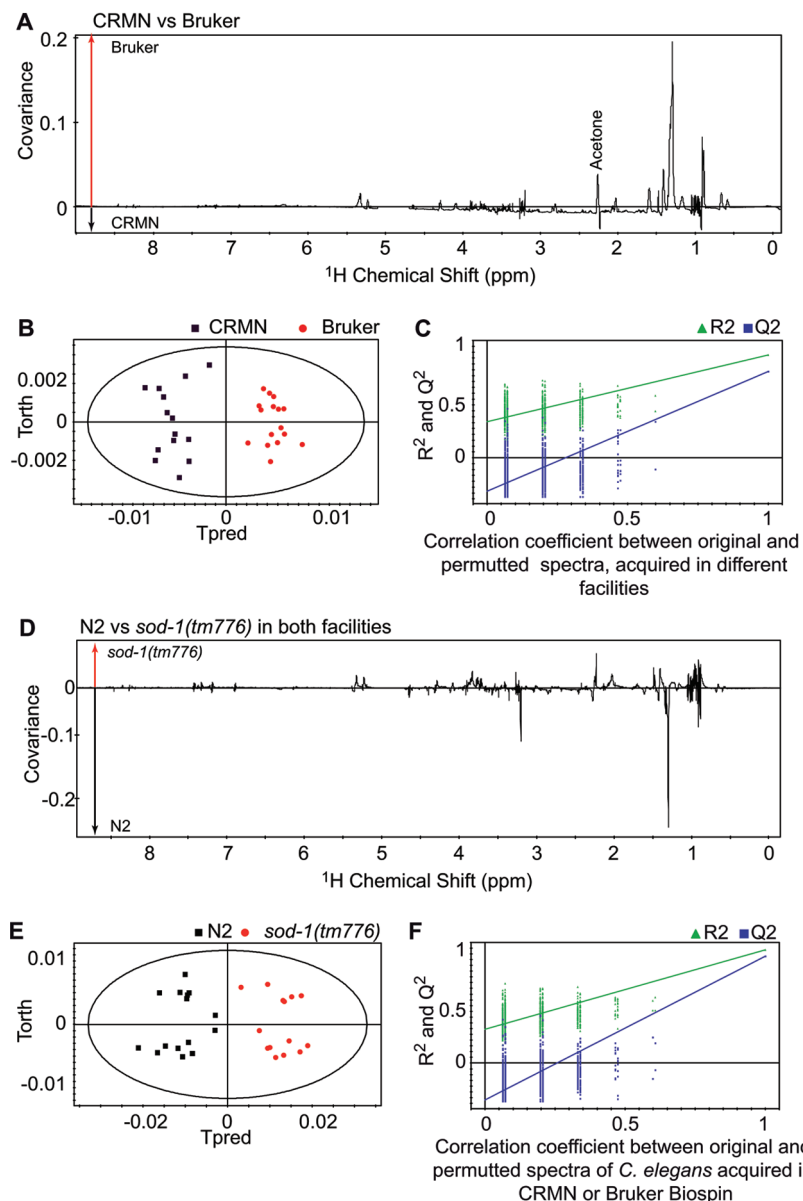
*1(tm776)* mutants, filled into a rotor (NMR sample container), at different time intervals to monitor the evolution of the sample under rotation (Figure 2a). We have already shown that an experiment carried out at 293 K over 25 min does not noticeably alter the spectrum, as it is not possible to distinguish by O-PLS two NMR spectra acquired on the same sample.<sup>10</sup> However, large changes are detected after 240 min of sample spinning at 3500 Hz. A regression of the spectral data with respect to time (Figure 2b) results in a variation of almost all NMR signals; moreover, lipids seem to be highly affected. We plotted peak integrals, intensity, and line-width at half-height for six resolved compounds belonging to different metabolite classes (cholesterol, isoleucine,  $\beta$ -glucose, unsaturated lipids, uracil, and inosine) as a function of time in Figure 2c, d, and e. NMR signals were assigned using  $^1H$  TOCSY and STOCSY spectra (Figure 3a and b). An overall increase (with the exception of lipids in the integral) was observed. The absence of significant change in the line-width indicates a higher concentration of metabolites in the unrestricted liquid phase. This probably results from the destruction of the cellular environment under the effect of MAS and temperature.

In summary, *C. elegans* spectra for a quantitative metabolism analysis should be recorded within one hour of inserting the sample in the NMR instrument, in order to be relevantly used in further statistical analysis. Note that 2D spectra for assignment and identification, where the absolute concentration is not so critical, can be recorded over longer time (16 h for  $^1H$ - $^1H$  TOCSY shown in Figure 3a and 40 h for  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC).

**Sample Preparation.** *C. elegans* metabolic phenotypes reflect the interaction of the genome and the environment.<sup>33</sup> Therefore we investigated the impact of freezing *C. elegans* samples at  $-80$  °C, as compared to worms pellets prepared on the day of the NMR experiments, in order to decouple the breeding stage from the NMR analysis, thereby improving considerably the flexibility of the protocol.

We compared the metabolic signature between N2 and *sod-1(tm776)* postfixation in two different experimental settings: NMR analysis of non frozen (Protocol A) and frozen nematodes (Protocol B). Half of the *C. elegans* samples were placed in a freezer at  $-80$  °C, directly after breeding and fixation, and frozen within one hour. They were left approximately two hours at  $-80$  °C then thawed at room temperature over ten minutes before NMR analysis. NMR acquisition was performed directly after fixation for the other half of the samples. The results of a variance component model presented in Figure 4a show that overall genetics has a slightly greater effect on the spectra than freezing. More importantly, an O-PLS model (Figure 4b and f) shows explicitly the effect of freezing on the complete spectrum. Sample freezing has a strong effect on the spectra, showing an increase in concentration of water-soluble metabolites and a decrease in lipids and fatty acids, which has previously been observed by Middleton and co-workers who characterized the effect of sample freezing in HRMAS NMR spectra of biological tissues.<sup>34</sup> We also observed an additional variation of the chemical shift in the 0.9–1.1 ppm area (Figure 4d). Thus, sample freezing seems to be responsible for a concerted chemical shift variation affecting the amino acid methyl resonances (Figure 4d) and an increase of the intensity of the loadings, as shown in the 3–4 ppm region (Figure 4e). Although the metabolites associated to the discrimination between N2 and *sod-1(tm776)* are not fully identical (Figure 4c), we found a correlation of 0.67 between the two loading plots and the signals in the loadings remain generally the same





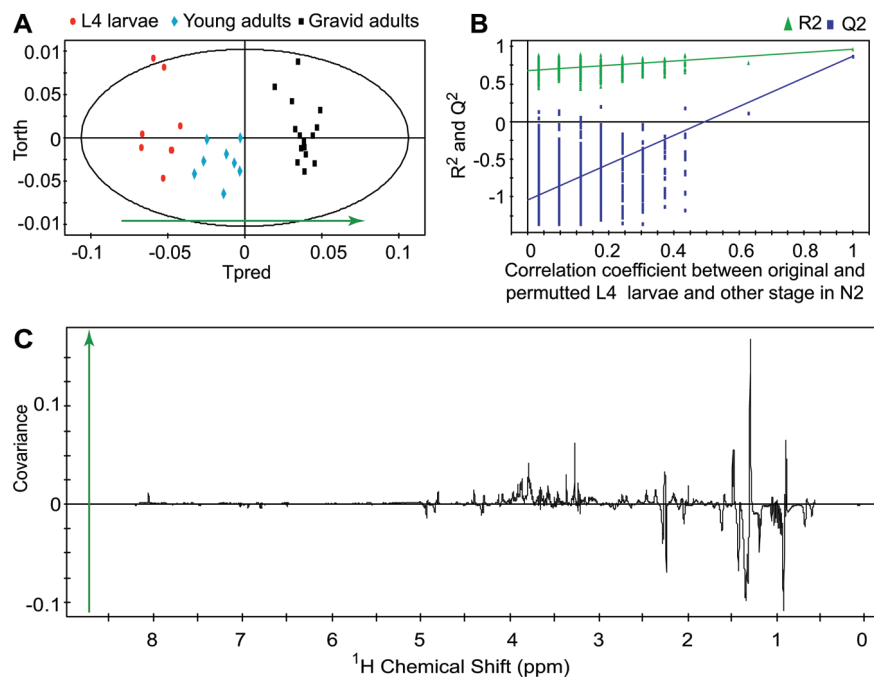
**Figure 6.** NMR center effect. The same experimental design was used to compare N2 and *sod-1* nematodes in different facilities. The (a) O-PLS model loadings, (b) score plots, and (c) quality factors discriminate the set of N2 and *sod-1* spectra on the basis of the NMR facilities (CRMN or Bruker), with a loading plot showing a baseline variation. Model quality coefficients are  $R^2 = 0.926$  and  $Q^2 = 0.874$ . (d–f) O-PLS model discriminating these spectra on the basis of the genetic strain. Model quality coefficients are  $R^2 = 0.876$  and  $Q^2 = 0.748$ . The correlation coefficient between the *sod-1* vs N2 metabolic phenotype shown in (d) and the one established at a single facility (Supplementary Figure 2e, Supporting Information) is 0.93.

(except for the changes in the methyl region discussed above), indicating that the change of the experimental protocol does not affect the results of the biological metabolic analysis. We consider two metabolites to be reasonably similar when the same peaks are identified with a significant covariance (i.e.,  $> 0.02$ ) on both loadings. The complete analysis on the effect of freezing is detailed in Supplementary Figure 1, Supporting Information. Freezing is hence validated as part of an experimental protocol that allows the separation of the two main experimental steps of the method, that is, worm breeding and NMR acquisition, which is a practical necessity for large-scale metabolomics studies for functional genomics of *C. elegans*.

**Operator-Related Effects.** Another type of confounding factor arises from the use of one protocol (even though standardized) for nematode breeding, sample preparation or

NMR acquisition, by different operators sharing their results. We studied nematode paired-breeding and NMR paired-acquisition to assess and quantify these operator-related effects.

Worm breeding variation was thus investigated by the comparison of N2 nematodes bred by two different investigators that filled a total of 16 (8 per investigator) HRMAS rotors. O-PLS analysis reveals a discrimination of the samples based on culture variation (Figure 5a). Metabolic differences between the two cultures affect a large range in the spectrum (data not shown). Validation of the statistical model was performed by resampling the model under the null hypothesis (Figure 5b), showing no random models outperforming the initial one in terms of explanation ( $R^2 = 0.807$ ) or prediction ( $Q^2 = 0.566$ ). Several factors could be at work here. Since the biologist carries out several steps to breed and prepare the sample, the



**Figure 7.** Developmental metabonomics in N2 *C. elegans*. (a) O-PLS model score plot discerning the effect of developmental stage in a population of wild-type N2 worms. (b) Model validation was performed by resampling the model under the null hypothesis ( $R^2 = 0.949$ ;  $Q^2 = 0.849$ ). (c) Corresponding loading plot, that is, metabotype.

experiment can be affected by the time needed to wash the Petri dishes (10 dishes per rotor) and to transfer worms to the tube where they will be fixed (technological effect). Depending on the experimentalist, though following the same standard protocol, this step can be more or less time-consuming, exposing worms to variable levels of stress. This points out that biological preparation is a significant confounding factor that must be taken with great care to allow the extraction of useful information. Randomization in sample preparation is thus essential to minimize this effect.

Similarly, the spectroscopist carries out a succession of steps to obtain an NMR spectrum. The quality of an NMR spectrum depends on many parameters. Among them, the NMR shims set by the operator to achieve high resolution of the proton resonance lines will play an important role, as well as tuning and matching of the probe, or the setup of an efficient water presaturation. A set of 6 wild-type nematode samples was prepared, and NMR spectra were recorded for each sample, in a random order, by two different spectroscopists, setting up independently their NMR acquisition conditions. A standard protocol was followed by both spectroscopists: shims were set on a 10% chloroform sample in acetone-D6 and adjusted to reach a proton line width at the height of the  $^{13}\text{C}$ -satellites inferior to 7.5 Hz. Respectively, a resolution of 6.48 and 7.30 Hz was obtained by our two operators. Each NMR spectroscopist used his or her own shim matrix and performed final calibrations on each rotor (tuning and matching, calibration of the water presaturation, and additional shims adjustment). An O-PLS model was unable to discriminate populations according to the NMR operator (Figure 5c). Quality of the model in terms of quality  $R^2 = 0.195$  or prediction  $Q^2 = -1.32$  is low, and resampling under the null-hypothesis shows that random models can outperform the capacity of the initial model in terms of quality or prediction. This indicates the impossibility to distinguish two spectroscopists by rejecting the

null hypothesis. An NMR operator, carefully following the standardized acquisition protocol, is thus not a confounding factor.

We also investigated the effect of multiple acquisition platforms in geographically distinct locations. Two sets of N2 and *sod-1(tm776)* samples were prepared and frozen, with one data set acquired at CRMN (Lyon), and the other shipped to the application laboratory of Bruker Biospin in Wissembourg. Experiments were performed on Bruker spectrometers operating at 700 MHz but with different electronic console configurations (respectively Avance I and Avance III models with differences in the electronics and digital filters). We thus compare 2 batches of samples acquired on spectrometers with different electronics in two locations. It is therefore clearly possible here to discriminate samples, under supervised analysis, with respect to the facility where the corresponding NMR spectra were acquired (Figure 6a–c) in a high quality model ( $R^2 = 0.926$  and  $Q^2 = 0.874$ ). However, when orienting the supervised analysis to the parameter of interest in our metabotyping study, that is, the discrimination between mutants and wild type nematodes, Figure 6e shows that, when gathering the two groups of data sets, we can still discriminate the two strains, with a metabotype reasonably similar to the one determined during the previous study carried out at the CRMN (Figure 6d–f,  $R^2 = 0.876$  and  $Q^2 = 0.748$ ). Note that the data acquired at Bruker Biospin (Wissembourg) had a supplementary exclusion area around a singlet at 2.23 ppm corresponding to residual acetone after drying in our washing procedure. This result allows defining an instrument independent metabolic signature (correlation of 0.93 between the metabotypes obtained at CRMN and the one obtained by assembling data acquired at CRMN and Bruker Biospin). We show that it is also possible to detect at both facilities a discrimination between N2 and *sod-1(tm776)* with close observed metabotypes and thus to define the metabolic signature of the mutation (Supplemen-

**Metabolic Profiling Strategy of *Caenorhabditis elegans***

tary Figure 2, Supporting Information). A correlation of 0.62 between the two loadings was determined. The results described above therefore clearly indicates that, though there is a need for the harmonization of spectrometer facilities involved in a multicenter study, a relevant discrimination between given *C. elegans* strains metabolotypes can be achieved when data acquisition is randomly distributed between different NMR centers.

**Developmental Metabonomics in N2 *C. elegans*.** Other metabolic variations of *C. elegans* populations obviously arise from physiological processes. Metabolic changes doubtlessly occur during the growth of the nematodes. In order to probe this factor and investigate the impact of developmental stages on the metabolome, we compare N2 nematodes at three stages: L4 larvae, young adults (adults which do not yet have eggs) and gravid adults. An O-PLS model shows a clear discrimination between these three sample categories and the definition of a metabolic phenotype with respect to developmental stages (Figure 7), with quality and prediction parameters  $R^2 = 0.949$  and  $Q^2 = 0.849$ . We observed no overlap between subpopulations based on the predicted age with respect to the observed one, fully validating the model. Furthermore, the model was resampled under the null hypothesis and validated. We thus clearly isolate an effect linked to the developmental stage in N2, which must be controlled by standardization of the developmental stage for genetic analysis in order to identify relevant metabolic variations induced by mutations.

In summary, the effects studied here can be classed into three groups: (i) insignificant (NMR spectroscopist), (ii) significant but manageable (NMR facility, hardware), and (iii) significant requiring control through experimental design (age, fixation, freezing, biologist) and sample randomization (age, biologist, etc.). The particular effects cited here in each category correspond to our experience with the protocol, through implementation of thorough quality control criteria. In studies with smaller numbers of samples, exogenous biological effects must be carefully controlled by a homogenization of the population in terms of both the developmental stage and by randomization of the sample breeding if different biologists are involved, whereas it appears that in a larger scale study (i.e., with a large number of samples per genetic strain), even the age and biologist can be meaningfully isolated from the genetic effect, but do not hamper the genetic analysis.

**Conclusion**

This study is part of the effort observed in metabonomics for the standardization of procedures (sample culture and preparation, spectral acquisition, data treatment and interpretation, report) to prevent analysis being misled by exogenous factors. This work shows that genetic metabolotypes can be reliably established using the method introduced here without being perturbed by confounding factors. Here we identified and assessed potential confounding factors for  $^1\text{H}$  HRMAS whole-organism NMR and established guidelines to control them. In a large-scale metabolotyping context, respecting these guidelines will certainly improve robustness of the NMR analysis and paves the way for large-scale metabolotyping in functional genomics,<sup>35</sup> chemical genomic, or pharmacometabonomics<sup>6</sup> screening efforts for *C. elegans*. The method is by no means limited to *C. elegans* but could obviously be adapted to other small animal models suitable for whole-organism NMR.

**Acknowledgment.** We thank Bruker Biospin for its financial support and helpful discussions (Drs Hartmut

Schaffer, Manfred Spraul, and Alain Belguise). We declare no competing financial interests. We acknowledge financial support from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-JCJC-0042-01).

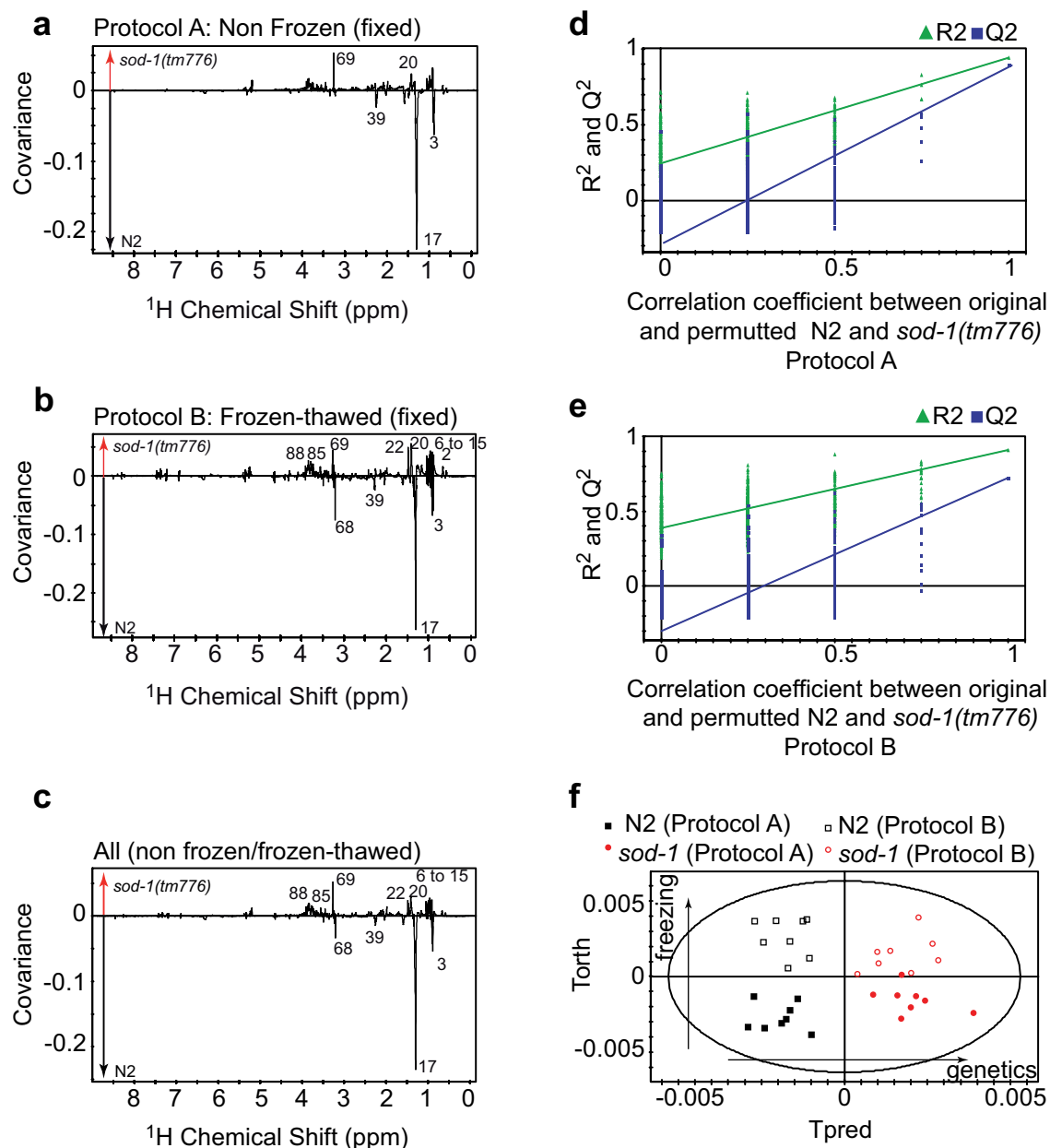
**Supporting Information Available:** Supplementary Figures 1 and 2. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

**References**

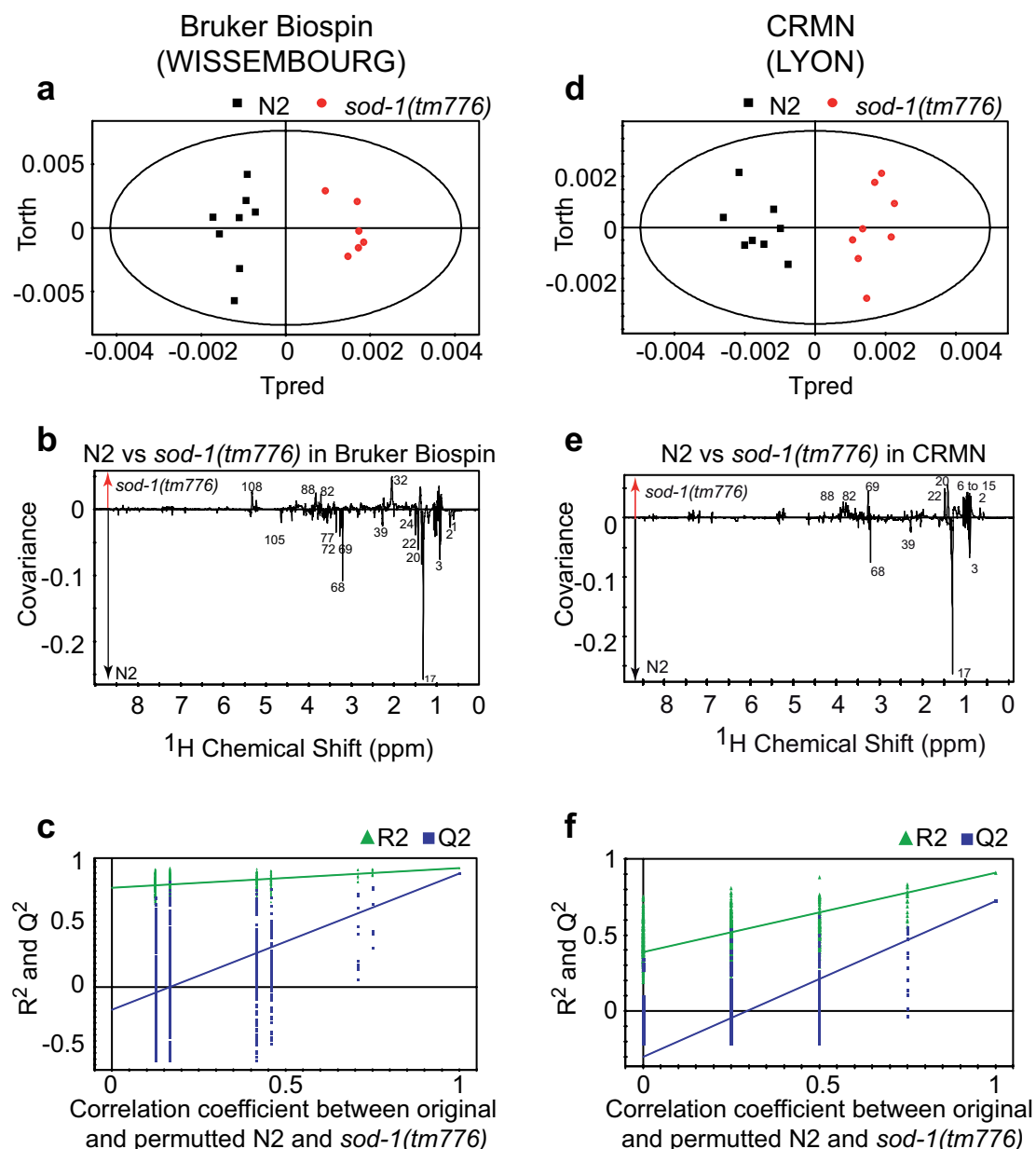
- (1) Nicholson, J. K.; Lindon, J. C.; Holmes, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* **1999**, *29* (11), 1181–1189.
- (2) Nicholson, J. K.; Connelly, J.; Lindon, J. C.; Holmes, E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (2), 153–161.
- (3) Oldiges, M.; Lutz, S.; Pflug, S.; Schroer, K.; Stein, N.; Wiendahl, C. Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76* (3), 495–511.
- (4) Fiehn, O.; Kopka, J.; Dormann, P.; Altmann, T.; Trethewey, R. N.; Willmitzer, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18* (11), 1157–1161.
- (5) Dumas, M. E.; Wilder, S. P.; Bihoreau, M. T.; Barton, R. H.; Fearnside, J. F.; Argoud, K.; D'Amato, L.; Wallis, R. H.; Blancher, C.; Keun, H. C.; Baunsgaard, D.; Scott, J.; Sidemann, U. G.; Nicholson, J. K.; Gauguier, D. Direct quantitative trait locus mapping of mammalian metabolic phenotypes in diabetic and normoglycemic rat models. *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 666–672.
- (6) Clayton, T. A.; Lindon, J. C.; Cloarec, O.; Antti, H.; Charuel, C.; Hanton, G.; Provost, J. P.; Le Net, J. L.; Baker, D.; Walley, R. J.; Everett, J. R.; Nicholson, J. K. Pharmacometabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature* **2006**, *440* (7087), 1073–1077.
- (7) Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Wilson, I. D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (5), 431–438.
- (8) Harrison, R.; Papp, B.; Pal, C.; Oliver, S. G.; Delneri, D. Plasticity of genetic interactions in metabolic networks of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104* (7), 2307–2312.
- (9) Villas-Boas, S. G.; Moon, C. D.; Noel, S.; Hussein, H.; Kelly, W. J.; Cao, M.; Lane, G. A.; Cookson, A. L.; Attwood, G. T. Phenotypic characterization of transposon-inserted mutants of *Clostridium proteoclasticum* B316(T) using extracellular metabolomics. *J. Biotechnol.* **2008**, *134* (1–2), 55–63.
- (10) Blaise, B. J.; Giacomotto, J.; Elena, B.; Dumas, M. E.; Toullhoat, P.; Segalat, L.; Emsley, L. Metabotyping of *Caenorhabditis elegans* reveals latent phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 19808–19812.
- (11) Kameh, M. A.; Hobani, Y.; Dow, J. A. T.; Watson, D. G. Metabonomic profiling of *Drosophila* using liquid chromatography Fourier transform mass spectrometry. *FEBS Lett.* **2008**, *582* (19), 2916–2922.
- (12) Johnson, T. E. *Caenorhabditis elegans* 2007: The premier model for the study of aging. *Exp. Gerontol.* **2008**, *43* (1), 1–4.
- (13) Atherton, H. J.; Jones, O. A. H.; Malik, S.; Miska, E. A.; Griffin, J. L. A comparative metabolomic study of NHR-49 in *Caenorhabditis elegans* and PPAR- $\alpha$  in the mouse. *FEBS Lett.* **2008**, *582* (12), 1661–6.
- (14) Tampakakis, E.; Okoli, I.; Mylonakis, E. A. *C. elegans*-based, whole animal, in vivo screen for the identification of antifungal compounds. *Nat. Protoc.* **2008**, *3* (12), 1925–31.
- (15) Leung, M. C. K.; Williams, P. L.; Benedetto, A.; Au, C.; Helmcke, K. J.; Aschner, M.; Meyer, J. N. *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol. Sci.* **2008**, *106* (1), 5–28.
- (16) Silverman, G. A.; Luke, C. J.; Bhatia, S. R.; Long, O. S.; Vetica, A. C.; Perlmutter, D. H.; Pak, S. C. Modeling Molecular and Cellular Aspects of Human Disease Using the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Pediatr. Res.* **2009**, *65* (1), 10–18.
- (17) Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P. Principal Component Analysis. *Chemometrics Intellig. Lab. Syst.* **1987**, *2* (1–3), 37–52.
- (18) Trygg, J.; Wold, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J. Chemometrics* **2002**, *16* (3), 119–128.
- (19) Teahan, O.; Gamble, S.; Holmes, E.; Waxman, J.; Nicholson, J. K.; Bevan, C.; Keun, H. C. Impact of analytical bias in metabonomic studies of human blood serum and plasma. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (13), 4307–4318.

- (20) Fiehn, O.; Robertson, D.; Griffin, J.; van der Werf, M.; Nikolau, B.; Morrison, N.; Sumner, L. W.; Goodacre, R.; Hardy, N. W.; Taylor, C.; Fostel, J.; Kristal, B.; Kaddurah-Daouk, R.; Mendes, P.; van Ommen, B.; Lindon, J. C.; Sansone, S. A. The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics* **2007**, *3*, 175–178.
- (21) Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Keun, H. C.; Craig, A.; Pearce, J. T. M.; Bruce, S. J.; Hardy, N.; Sansone, S. A.; Antti, H.; Jonsson, P.; Daykin, C.; Navarange, M.; Beger, R. D.; Verheij, E. R.; Amberg, A.; Baunsgaard, D.; Cantor, G. H.; Lehman-McKeeman, L.; Earll, M.; Wold, S.; Johansson, E.; Haselden, J. N.; Kramer, K.; Thomas, C.; Lindberg, J.; Schuppe-Koistinen, I.; Wilson, I. D.; Reilly, M. D.; Robertson, D. G.; Senn, H.; Krotzky, A.; Kochhar, S.; Powell, J.; van der Ouderaa, F.; Plumb, R.; Schaefer, H.; Spraul, M. Standard Metab Reporting Struct, w., Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (7), 833–838.
- (22) Griffin, J. L.; Nicholls, A. W.; Daykin, C. A.; Heald, S.; Keun, H. C.; Schuppe-Koistinen, I.; Griffiths, J. R.; Cheng, L. L.; Rocca-Serra, P.; Rubtsov, D. V.; Robertson, D. Standard reporting requirements for biological samples in metabolomics experiments: mammalian/ in vivo experiments. *Metabolomics* **2007**, *3*, 179–188.
- (23) Beckonert, O.; Keun, H. C.; Ebbels, T. M. D.; Bundy, J.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat. Protocols* **2007**, *2*, 2692–2703.
- (24) Broadhurst, D. I.; Kell, D. B. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics* **2006**, *2* (4), 171–196.
- (25) Falk, M. J.; Zhang, Z.; Rosenjack, J. R.; Nissim, I.; Daikhin, E.; Sedensky, M. M.; Yudkoff, M.; Morgan, P. G., Jr. Metabolic pathway profiling of mitochondrial respiratory chain mutants in *C. elegans*. *Mol. Genet. Metab.* **2008**, *93* (4), 388–397.
- (26) Kell, D. B.; Brown, M.; Davey, H. M.; Dunn, W. B.; Spasic, I.; Oliver, S. G. Metabolic footprinting and systems biology: The medium is the message. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (7), 557–565.
- (27) Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. Investigation of Exchange Processes by 2-Dimensional NMR-Spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71* (11), 4546–4553.
- (28) Zhang, F. L.; Bruschweiler, R. Indirect covariance NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (41), 13180–13181.
- (29) Cloarec, O.; Dumas, M. E.; Craig, A.; Barton, R. H.; Trygg, J.; Hudson, J.; Blancher, C.; Gauguier, D.; Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. Statistical total correlation spectroscopy: An exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic H-1 NMR data sets. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (5), 1282–1289.
- (30) Nicholson, J. K.; Foxall, P. J. D.; Spraul, M.; Farrant, R. D.; Lindon, J. C. 750-Mhz H-1 and H-1-C-13 NMR-Spectroscopy of Human Blood-Plasma. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (5), 793–811.
- (31) Trygg, J. O2-PLS for qualitative and quantitative analysis in multivariate calibration. *J. Chemometrics* **2002**, *16* (6), 283–293.
- (32) Fitch, W. L.; Detre, G.; Holmes, C. P.; Shoolery, J. N.; Keifer, P. A. High-Resolution H-1-NMR in Solid-Phase Organic-Synthesis. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (26), 7955–7956.
- (33) Bollard, M. E.; Stanley, E. G.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed.* **2005**, *18* (3), 143–162.
- (34) Middleton, D. A.; Bradley, D. P.; Connor, S. C.; Mullins, P. G.; Reid, D. G. The effect of sample freezing on proton magic-angle spinning NMR spectra of biological tissue. *Magn. Reson. Med.* **1998**, *40* (1), 166–169.
- (35) Granger, L.; Martin, E.; Segalat, L. Mos as a tool for genome-wide insertional mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*: results of a pilot study. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (14), e117.

PR900012D



**Supplementary figure 1. Effect of freezing on the discrimination between N2 and *sod-1(tm776)*.** Loadings sustaining the discrimination between N2 and *sod-1(tm776)* are very similar (a-b) whether the nematodes are analyzed non frozen (Protocol A in (a)) or after a freezing-thawing cycle (Protocol B in (b)), in both cases following fixation. The correlation coefficient between the two loadings is 0.67. Models were validated by re-sampling under the null hypothesis (d-e). O-PLS model discriminates non frozen and frozen-thawed samples, analyzed together on the basis of genetic strains is presented in (c) and (f). Loading plot (c) is similar the ones determined in (a-b) and the effect of sample freezing is characterized by the first orthogonal component of the corresponding score plot (f). Numbers in the loading plots correspond to assignments provided earlier (Blaise et al., ref. 10).



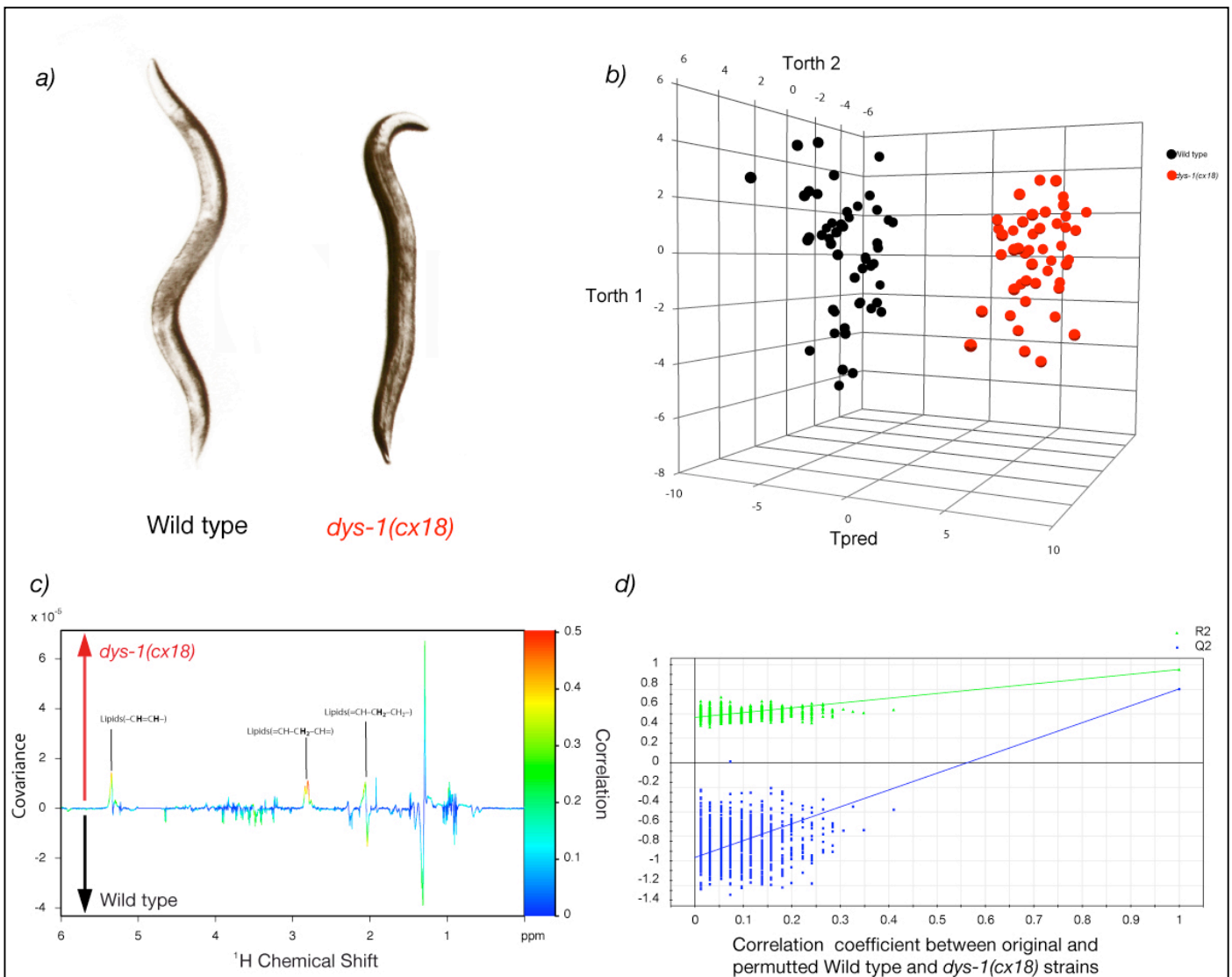
**Supplementary Figure 2. Discrimination between N2 and *sod-1(tm776)* at different NMR facilities.** O-PLS models show discriminations between the N2 and *sod-1(tm776)* strains, with NMR acquisition independently carried out at the CRMN in Lyon (a-c), or at the Bruker Biospin facility in Wissembourg (d-f) with respective quality coefficients of ( $R^2 = 0.945$ ,  $Q^2 = 0.855$ ) and ( $R^2 = 0.911$ ,  $Q^2 = 0.763$ ). Corresponding score plots are shown in (a) and (d). The loading plots (b) and (e) sustaining these discriminations highlight variations of the same metabolites in the same directions, with a correlation coefficient of 0.62. This is probably due to the fact that the two 700MHz spectrometers are piloted by different electronics (Avance and Avance III consoles), especially digital filters. This highlights that a control must be

provided for this confounding effect through harmonization of spectrometers in the facilities included in the multi-centre study. Both models were validated by re-sampling under the null hypothesis, as illustrated in (c) and (f).

### 3.2. Résultats préliminaires DMD

Comme dit précédemment, nous travaillons encore à dégager les informations métaboliques pertinentes relatives i) aux différents modèles présentés dans ce manuscrit, ii) au mode d'action des molécules identifiées lors des cribles. Néanmoins, les travaux menés sur le modèle DMD montrent qu'il est possible de discriminer une souche sauvage d'une souche mutante *dys-1(cx18)* sur la base de leur spectre métabolique acquis par HRMAS-NMR (**fig. 55**). En effet, les analyses statistiques multivariées (OPLS-DA, Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis) ont permis de définir un modèle de prédiction permettant de séparer un spectre RMN issu d'un animal sauvage, d'un spectre issu d'un animal *dys-1(cx18)* (**fig. 55.b**). Ce modèle utilise un sous-ensemble de valeurs du spectre RMN correspondant aux variations spectrales (métaboliques) entre la souche sauvage et la souche *dys-1(cx18)*. Les premières analyses de ces variations spécifiques ont mis en évidence d'importantes différences au niveau de la composition lipidique des animaux (**fig. 55.c**). Des études supplémentaires sont en cours pour identifier l'ensemble des métabolites permettant cette discrimination.

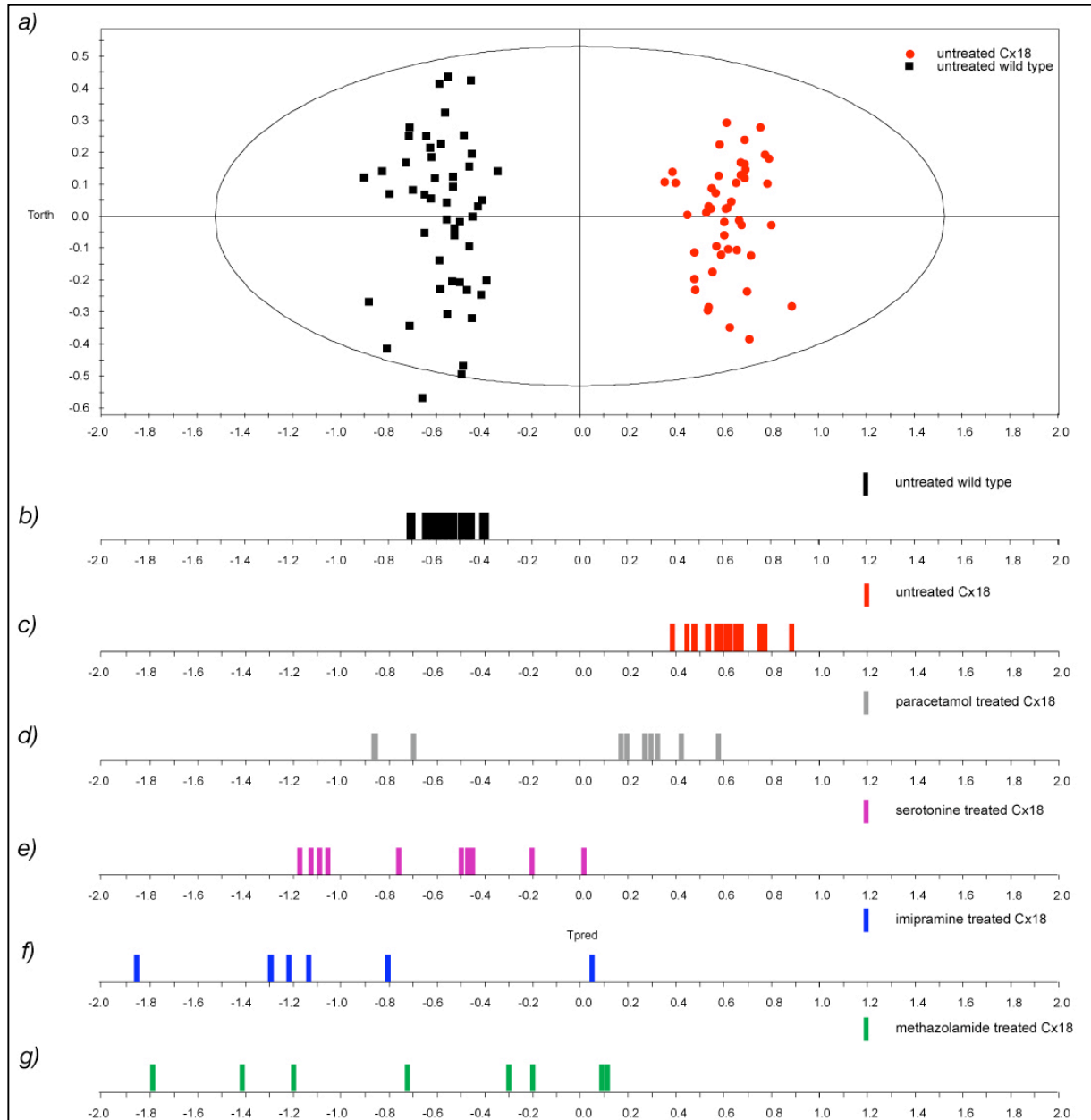




**Figure 55 : Comparaison entre des animaux sauvages (Wild type) et mutants *dys-1(cx18)*.** a) Aspect morphologique des animaux analysés (Adultes, ~ 800 à 1000 $\mu$ m), b) Modèle statistique (OPLS-DA) permettant la discrimination entre les profils métaboliques sauvages et mutants *dys-1(cx18)* ; chaque point correspond à la projection d'un spectre HRMAS-RMN d'un animal sauvage (spot noir) ou d'un animal mutant *dys-1(cx18)* (spot rouge) dans l'espace (3D) défini par le modèle (OPLS-DA) c) Variations spectrales (métabolique) utilisées par le modèle pour discriminer les animaux sauvages des animaux mutants *dys-1(cx18)* (Loadings), d) Validation du modèle utilisé pour la discrimination.

De façon intéressante, en utilisant ce modèle de prédiction (**fig. 55**), l'analyse de l'effet des drogues validées lors du crible DMD, sur l'empreinte métabolique des animaux *dys-1(cx18)*, montre que leur action permet un retour vers des valeurs considérées comme "sauvages" (**fig. 56**) ; par exemple, le spectre RMN d'un animal *dys-1(cx18)* traité à la sérotonine sera attribué à un animal sauvage par le modèle de prédiction - les sous-ensembles de métabolites, les variables, présentent une expression proche de celles retrouvées chez un animal sauvage -.

Ces résultats confirment le potentiel thérapeutique des composés sélectionnés. Il faut noter que l'analyse de l'effet du paracétamol, un composé inactif sur la dégénérescence des animaux mutants, n'entraîne pas de modifications significatives de ces métabolites, ce qui renforce encore plus le modèle de prédiction et la spécificité des métabolites en question. Ces résultats laissent donc supposer que les métabolites (les variables) sélectionnés pour réaliser la discrimination sont pertinents, et que leur identification est potentiellement intéressante pour décrire les conséquences métaboliques liées à une absence de dystrophine. Nous cherchons également à identifier les métabolites (autres que ceux utilisés pour la discrimination) spécifiquement touchés par l'ajout des drogues.



**Figure 56 : Modèle de prédiction DMD et effet des traitements sur le profil métabolique des mutants *dys-1(cx18)*.** a) Modèle de prédiction DMD (OPLS-DA 2D) permettant la discrimination entre un spectre issu d'un animal sauvage (carré noir) et un spectre issu d'un animal mutant *dys-1(cx18)* (spot rouge), ce modèle est identique au modèle présenté dans la figure 56 mais représenté en deux dimensions. b) Projection sur l'axe discriminant de spectres RMN issus d'animaux traités ou non traités. Chaque rectangle correspond à la projection, sur l'axe discriminant du modèle préalablement défini en figure 56, d'un spectre RMN issu d'un animal sauvage (noir), d'un animal mutant *dys-1(cx18)* non traité (rouge) ou traité à la sérotonine (mauve), à l'imipramine (bleu), à la méthazolamide (vert) ou au paracétamol (gris).

**DISCUSSION / CONCLUSION**  
**GENERALE**

## DISCUSSION / CONCLUSION GENERALE

Mes travaux de thèse avaient pour but de :

- développer et optimiser des modèles *C. elegans* permettant d'étudier l'impact de la perte de fonction de gènes impliqués dans des maladies génétiques humaines, dont la myopathie de Duchenne (modèle déjà validé au laboratoire), l'amyotrophie spinale et le syndrome de Schwartz-Jampel ;
- mettre en place des méthodes de criblage robustes, reproductibles et transversales à d'autres maladies, permettant de tester un grand nombre de molécules chimiques ;
- identifier et valider des molécules actives d'un point de vue thérapeutique sur les modèles développés ;
- apporter des éléments de réponses quant aux mécanismes d'action des molécules les plus prometteuses.

A ce jour, nous n'avons pas terminé les campagnes de criblage sur les modèles SMA et Schwartz-Jampel. Nous ne pouvons donc pas discuter de leur utilité pour les patients, et encore moins dire si elles permettront d'apporter des informations pertinentes quant à la physiopathologie de ces maladies. De plus, la stratégie développée avec le crible SMA devait servir de preuve de concept pour d'autres maladies dites "perte de fonction". C'est à dire, montrer qu'il est possible d'identifier des molécules thérapeutiques avec un modèle présentant des troubles considérés comme éloignés des troubles observés chez l'homme, mais restants reliés à des fonctions cellulaires communes. Avant de tirer des conclusions, nous devons donc attendre la fin de nos campagnes. Si, à terme, ces cribles ne permettent pas de dégager des molécules à intérêt thérapeutique, l'étude des composés montrant une toxicité dépendante du modèle utilisé, permettra, peut être, de mettre en évidence certains dérèglements propres à ces maladies. Ces études seront facilitées par les approches métabolomiques que nous avons développées.

Par contre, grâce aux résultats obtenus avec la myopathie de Duchenne, nous avons montré que cette approche peut se révéler utile et pertinente pour l'homme. Ainsi, même si la plupart des composés identifiés sont encore en cours de validation sur le modèle murin *mdx*, nous avons montré grâce aux sulfonamides (**article 1**), que cette stratégie permettait de générer des composés transposables aux organismes supérieurs. De plus, l'étude de leur mode d'action nous renseigne sur les mécanismes de dégénérescence reliés à l'absence de dystrophine. Ces hypothèses sont décrites dans le premier chapitre de cette discussion générale.

Finalemnt, nos travaux ont permis :

- d'identifier des pistes thérapeutiques et des molécules candidates pour traiter les patients DMD (chapitre 1),
- de générer des informations participant à la compréhension des mécanismes de dégénérescence liés à l'absence de dystrophine (chapitre 1).
- de mieux définir les avantages et les contraintes inhérents aux cribles pharmacologiques basés sur des organismes entiers (chapitre 2).

## I. Du nouveau pour la myopathie de Duchenne ?

### 1. Récapitulatif des résultats du crible DMD

Le crible de molécules conduit sur le modèle *dys-1(cx18)* ; *h1h-1(cc561)* a révélé plusieurs molécules capables de freiner la dégénérescence musculaire chez le nématode *C. elegans*. Parmi ces molécules on retrouve une forte proportion de composés pouvant être regroupés dans 3 familles chimiques, les sulfonamides, les benzodiazépines et les tricycliques.

- Les sulfonamides sont connus pour leurs propriétés inhibitrices des anhydrases carboniques. Nos travaux ont montré que cette activité pouvait être bénéfique pour des nématodes dépourvus de dystrophine, et également pour les souris *mdx* (**article 1**). L'effet bénéfique de cette classe de molécules passe, vraisemblablement, par une perturbation des flux calciques au niveau des muscles des animaux, et notamment au niveau du réticulum sarcoplasmique (**390**). Malheureusement cette perturbation n'a pas pu être mesurée. Néanmoins, ce mécanisme est soutenu par les résultats antérieurs de notre équipe ; résultats montrant que les flux calciques, prenant place dans les cellules musculaires des animaux *dys-1(cx18)*, *h1h-1(cc561)*, étaient reliés au phénotype de dégénérescence (**180**). En ce qui concerne l'apport de ces résultats pour les patients DMD, les gains observés chez les souris sont loin d'être suffisants pour envisager des tests cliniques. Les deux composés testés, la méthazolamide et la dichlorphénamide, n'étant que peu spécifiques vis à vis des différentes anhydrases carboniques retrouvées chez la souris et chez l'homme, le développement d'inhibiteurs spécifiques des différentes isoformes pourra peut être donner de meilleurs résultats (**388, 389, 391**). Néanmoins nous ne pouvons dire à ce jour quelle(s) isoforme(s) doit être ciblée(s).
- Les médicaments présentant un squelette tricyclique sont connus dans le domaine médical pour leur action sur le système nerveux central. Ceux identifiés dans nos cribles sont reliés au métabolisme de la sérotonine (**399**). Par exemple, l'imipramine et la trimipramine inhibent la recapture de la sérotonine libérée dans les fentes synaptiques. L'action de ce neurotransmetteur est alors prolongée, il en résulte une stimulation plus importante des éléments du compartiment post-synaptique. Même si nous ne pouvons dire par quelle voie la sérotonine agit sur la dégénérescence musculaire, nos résultats tendent à montrer que son action bénéfique passe, entre autres, par la modulation des flux calciques régis par le canal ITR-1 (homologue des IP3R humains). Ces composés sont encore en cours de validation sur le modèle murin *mdx* (projet supervisé par Maïté Carre-Pierrat), il est donc difficile de dire

s'ils seront transposables aux patients DMD. Les conclusions seront disponibles courant 2010, nous pourrons alors y voir un peu plus clair quant à leur potentiel thérapeutique.

- Les benzodiazépines regroupent des médicaments connus pour leurs propriétés anxiolytiques et myorelaxantes. Leurs actions connues passent par les récepteurs GABA ; récepteurs reliés à l'inhibition de nombreuses voies neuronales (400-402). Ne disposant pas d'informations pertinentes sur leurs modes d'action vis à vis de la dégénérescence chez le ver, nous ne pouvons que supposer que leurs effets bénéfiques passe par une inhibition de la stimulation des muscles. Les validations mammifères de cette classe de molécules sont, comme les tricycliques, encore en cours à ce jour. Ces résultats seront disponibles courant 2010.

## 2. Des molécules, des mécanismes et des pistes thérapeutiques ?

Comme synthétisé ci-dessus, les gains phénotypiques observés avec les molécules identifiées lors du crible DMD semblent être reliés à une modulation des flux calciques d'origine musculaire et/ou à une inhibition de la stimulation nerveuse.

Comment ces mécanismes participent-ils à la réduction de la dégénérescence musculaire chez le nématode ? Pour essayer de comprendre ce qu'il se passe, reprenons le modèle nématode DMD.

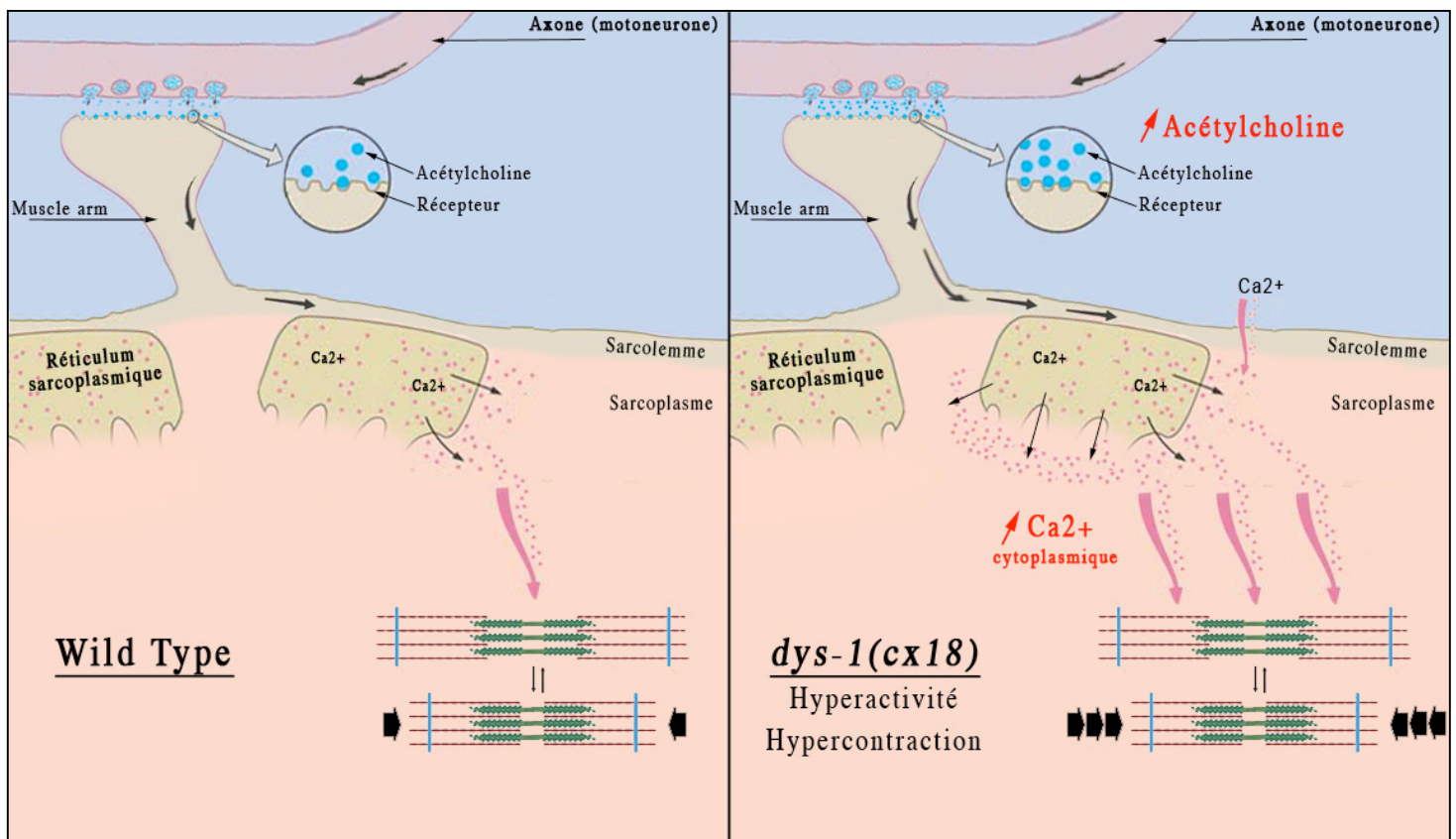
Les animaux portant la mutation *dys-1(cx18)* sont hyperactifs, hypercontractés et présentent une faible dégénérescence musculaire (26). Les phénotypes d'hyperactivité et d'hypercontraction sont attribués à un excès de signal cholinergique au niveau des jonctions neuromusculaires (voir introduction) (26, 244). On peut supposer que cet excès de signal cholinergique entraîne une augmentation de la libération de calcium séquestré dans le réticulum sarcoplasmique. Il a également été montré que l'absence de dystrophine perturbe l'activité de certains canaux ioniques agencés au niveau du sarcolemme, dont les canaux calciques *egl-19* et potassique *slo-1* (179, 382). Ces phénomènes participent probablement à maintenir une concentration calcique anormalement élevée dans le sarcoplasme. Les muscles sont alors plus facilement excitables et plus contractés (fig. 57).

A ce jour, nous n'avons pas pu démontrer cette hypothèse. Nous avons essayé de mesurer le calcium sarcoplasmique par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) via l'injection d'un plasmide capable d'exprimer le cameleon dans les cellules musculaires des nématodes - le cameleon est une protéine dont le spectre de fluorescence dépend de la concentration calcique (403)-, mais aucune lignée fluorescente n'a pu être obtenue à ce jour.



Cette hypothèse reliant une augmentation de la concentration calcique sarcoplasmique à l'absence de dystrophine est tout de même soutenue par le fait que l'on retrouve une surcharge calcique dans les fibres musculaires des souris *mdx* (178, 404, 405), et des patients DMD (176, 177, 406) (pour revue, voir (182)).

A ce stade, nous pouvons donc attribuer le phénotype d'hyperactivité et d'hypercontraction des animaux *dys-1(cx18)* à un excès de signal cholinergique couplé à une surcharge calcique sarcoplasmique (figure 57).



**Figure 57 : Perturbations supposées au niveau des muscles des animaux *dys-1(cx18)*.** La présence de la mutation *dys-1(cx18)* est liée à i) une augmentation du signal cholinergique à la synapse, ii) un dérèglement des flux ioniques à la membrane, qui se traduit probablement par une surcharge calcique dans le cytoplasme des cellules musculaires (26, 244). Pour rappel, contrairement aux mammifères, chez le nématode ce sont les cellules musculaires qui projettent des structures (muscle arms) vers les axones des motoneurones pour former les jonctions neuromusculaires, et non l'inverse ; de plus la membrane sarcoplasmique ne présente pas d'invaginations (tubules T), la membrane est directement couplée avec le réticulum sarcoplasmique (voir fig. 19). Malgré ces différences la cascade d'évènements conduisant à la contraction des cellules musculaires est conservée.

Même si ces phénomènes semblent cohérents vis à vis des phénotypes observés, plusieurs questions subsistent :

- Pourquoi l'absence de dystrophine conduit à une augmentation de la transmission cholinergique chez *C. elegans* et à un dérèglement des canaux ioniques agencés à la membrane plasmique ?

Une hypothèse largement débattue au laboratoire et dans la littérature consiste à dire que l'absence de dystrophine perturbe l'organisation des jonctions neuromusculaires et des constituants du sarcolemme via la désorganisation du DGC présenté en introduction ; les différentes structures post-synaptiques impliquées dans la réponse à l'acétylcholine et les canaux situés sur le sarcolemme sont probablement mal agencés, se traduisant par une perturbation de la transmission du signal cholinergique et une dérégulation des échanges ioniques (26, 244, 407-409). Cette hypothèse est soutenue par le fait que surexprimer l'utrophine ou introduire une mini-dystrophine dans les cellules musculaires des souris *mdx* permet de retrouver un complexe DGC agencé au niveau des jonctions neuromusculaires et au niveau du sarcolemme, et conduit à améliorer le phénotype murin (202, 407, 408, 410). De plus le DGC est impliqué dans la disponibilité des acétylcholinestérases (via le perlecan, fig. 12) (350), on peut donc supposer que la désorganisation de ce complexe entraîne une diminution de la dégradation des molécules d'acétylcholine libérées dans les fentes synaptiques en délocalisant les acétylcholinestérases. Cette hypothèse est soutenue par les mesures de Giuglia *et al.*, réalisées *in vitro* à partir d'extraits de nématodes, montrant que la présence de la mutation *dys-1(cx18)* entraîne une diminution de l'activité de ces enzymes (244). Enfin certains auteurs ont noté que les myotubes en cultures issus de patients DMD sont hypersensibles à l'acétylcholine, sensibilité qu'ils attribuent à un défaut d'acétylcholinestérase (411, 412).

- Pourquoi les muscles dégénèrent dans ce contexte ?

- A ce stade, il faut rappeler que les animaux *dys-1(cx18)*, à la différence des patients DMD, ne présentent qu'une faible dégénérescence musculaire. Comme présenté précédemment, nous couplons cette mutation à la mutation *hll-1(cc561)* pour amplifier ce phénotype de dégénérescence. Le rôle de la mutation faible *hll-1(cc561)* consiste à fragiliser les cellules musculaires, qui deviennent beaucoup plus sensible à l'absence de dystrophine.

Malheureusement, nous sommes dans l'incapacité de dire en quoi consiste cette fragilisation. Structurale ? Métabolique ? Le gène *hll-1* étant impliqué dans la mise en place du système musculaire, il est probable que sa mutation entraîne des défauts structuraux, et cela même à une température permissive (**249, 413**); en ce qui concerne son impact sur le métabolisme, l'analyse du profil métabolique acquis par RMN des mutants *hll-1(cc561)* permettra peut être d'apporter des réponses. -

Au regard des évènements présentés ci-dessus, on peut supposer que la dégénérescence est due à une activité excessive des unités contractiles consécutive à un excès de signal cholinergique et calcique. Néanmoins, l'**article 2** montre que cette hypothèse ne suffit pas. En effet, la mutation *goa-1(n1134)*, connue pour entraîner une forte hyperactivité (par augmentation de la libération d'acétylcholine) (**414**), couplée à la mutation *hll-1(cc561)*, n'entraîne qu'une très faible dégénérescence musculaire. On peut donc en conclure que l'hyperactivité induite par la présence de la mutation *dys-1(cx18)* n'est pas la seule cause de la dégénérescence observée chez les mutants *dys-1(cx18) ; hll-1(cc561)*. Pour conduire à la dégénérescence, l'absence de dystrophine entraîne donc d'autres évènements, s'ajoutant à l'hyperactivité des animaux.

En se basant sur la littérature, plusieurs hypothèses sont alors envisageables pour expliquer la dégénérescence musculaire des animaux *dys-1(cx18) ; hll-1(cc561)* :

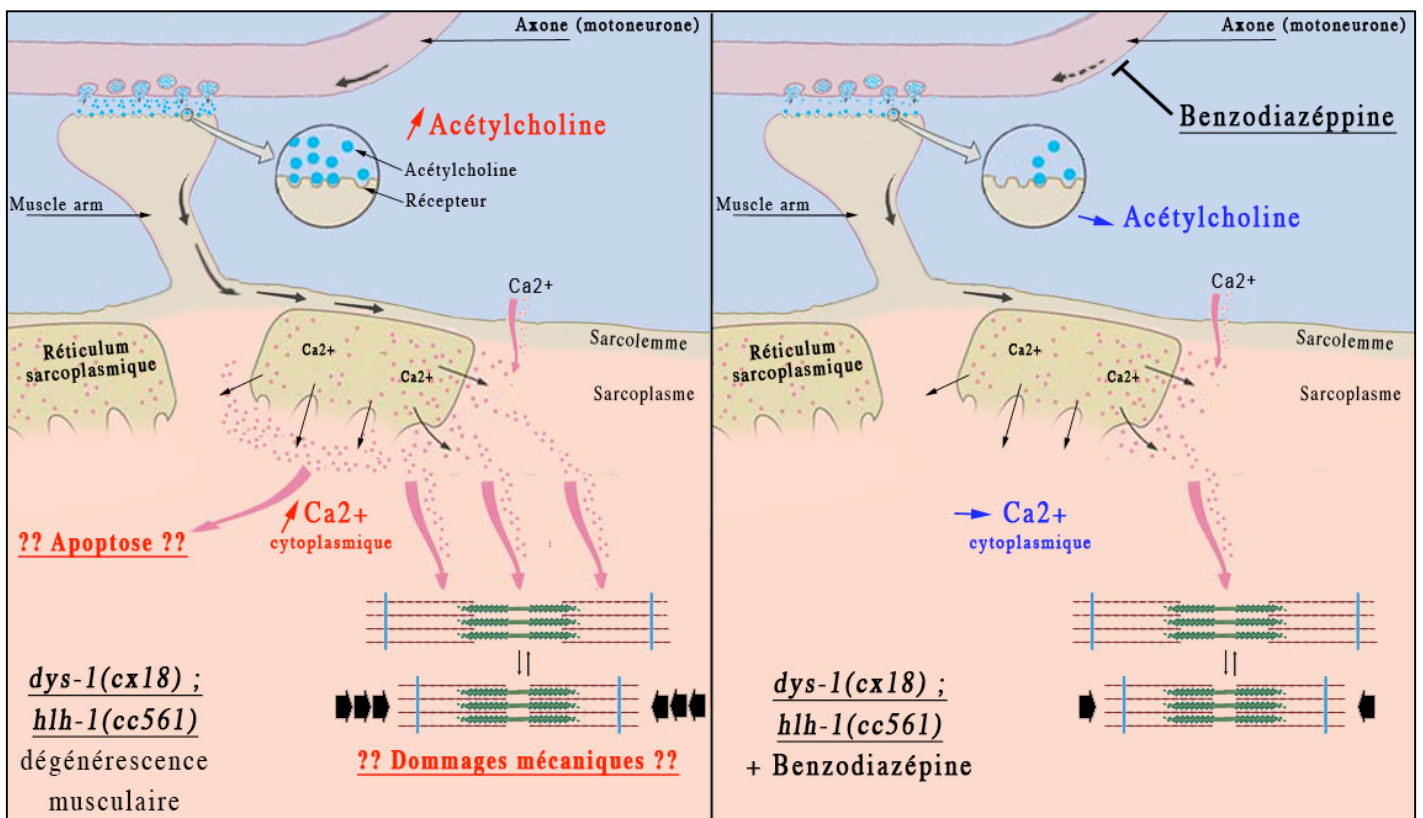
- En plus de son implication dans l'intégrité des jonctions neuromusculaires et dans la distribution des canaux ioniques, le DGC participe à l'interaction qu'entretient la membrane plasmique avec i) les composants de la matrice extracellulaire, ii) les protéines cytosquelettiques, dont, chez les mammifères, les protéines formant les costamères (vinculine, desmine, spectrine, actine cytosquelettique) (**figure 12 et 13**) (**415-418**). Plusieurs études ont montré que ce lien participait au maintien de l'intégrité membranaire lors des phénomènes de contractions (**174**). Chez les mammifères, la dystrophine, son complexe associé, et les costamères agissent comme des coupleurs mécaniques afin de transmettre la contraction générée par les sarcomères au travers du sarcolemme à la lame basale ; ils permettent ainsi de maintenir les sarcomères repartis uniformément le long de la fibre musculaire (**416, 419**). Ainsi, la perte des interactions entre la dystrophine, le DGC, et les costamères participerait à fragiliser la membrane plasmique vis à vis des différents stress mécaniques subis lors des phénomènes de contractions (**418, 420**). On parle d'hypothèse structurale. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'on retrouve des lésions au niveau de la membrane des fibres

musculaires des souris *mdx* et des patients DMD (175). Hypothèse également soutenue par le taux anormalement élevé de créatine kinase retrouvée dans le sang des patients DMD, signalant une fuite importante du milieu intracellulaire de la cellule (139, 175). Chez *C. elegans* l'organisation et le rôle de ces différentes structures semblent conservés, néanmoins il faut noter que les sarcomères sont directement ancrés dans le sarcolemme et dans la membrane basale par l'intermédiaire des dense bodies, et non via un réseau de filaments cytosquelettiques -les sarcomères- (fig. 20) (421). Ainsi, il est probable que cet ancrage de la membrane plasmique des cellules musculaires de *C. elegans* moins sensible à la perte du DGC vis à vis des différents stress mécaniques, ce qui expliquerait la faible dégénérescence des mutants *dys-1(cx18)*. On peut également supposer que la présence de la mutation *hll-1(cc561)* -facteur myogénique- perturbe la mise en place de ces dense bodies, et sensibilise la membrane à l'absence de dystrophine, comme on peut l'observer chez les mammifères. Ainsi, il est probable que dans un contexte *hll-1(cc561)* l'hyperactivité, l'hypercontraction, et les défauts structuraux induits par la perte de la dystrophine suffisent à créer des microlésions au niveau de la membrane plasmique des cellules musculaires, la cellule serait alors incapable de faire face à ces dommages et des phénomènes nécrotiques s'en suivraient. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'inactivation des gènes impliqués dans le couplage excitation/contraction réduit la dégénérescence chez le ver *dys-1(cx18) ; hll-1(cc561)* (382).

- S'additionnant à ces troubles structuraux, le surplus de calcium libéré dans le sarcoplasme a de fortes chances de dépasser les capacités des pompes SERCA, pompes censées reconcentrer ces ions dans le réticulum sarcoplasmique (voir introduction). Il en résulte, probablement, une concentration calcique cytoplasmique anormalement élevée sur une longue période de temps. Plusieurs équipes s'accordent à dire que cette élévation constitutive de la concentration calcique cytoplasmique induit des phénomènes apoptotiques via l'activation de protéases calcium-dépendantes (dont les calpaïnes) (fig. 58) (181-183). Cette élévation calcique pourrait donc également expliquer la dégénérescence. On parle d'hypothèse métabolique. Cette hypothèse est appuyée par le fait que surexprimer le canal calcique *egl-19* dans un contexte *dys-1(cx18)* mime la dégénérescence musculaire observée dans le contexte *dys-1(cx18) ; hll-1(cc561)* (180).

En tenant compte de ces hypothèses, comment le mode d'action des molécules identifiées lors des cribles peut agir sur le phénotype de dégénérescence du mutant *dys-1(cx18) ; hlh-1(cc561)* ?

Avec les **benzodiazépines**, il est difficile de conclure en raison de l'absence de résultats probants. Néanmoins, comme dit plus haut, cette classe de molécules est connue pour interagir avec les voies GABAergiques (400-402). Or, les motoneurones GABAergiques, chez *C. elegans*, ont un rôle d'inhibition des chaînes motrices (voir **tableau 1**) (422). Par conséquent, on peut supposer que leur action se traduit par une inhibition de la libération d'acétylcholine à la synapse neuromusculaire (**fig. 58**). Finalement, cette baisse de signal cholinergique a de forte chance de se traduire par une baisse du signal calcique, aboutissant à i) diminuer les stress mécaniques subis par la cellule, ii) restaurer une concentration calcique cytoplasmique ne dépassant pas les capacités de recapture de la cellule.



**Figure 58 : Rôle putatif des benzodiazépines dans les mécanismes de dégénérescence musculaire.** La souche *dys-1(cx18) ; hlh-1(cc561)* est préférée à la souche *dys-1(cx18)* car elle présente un phénotype de dégénérescence musculaire accru.

Dans le cas des composés **tricycliques** reliés au métabolisme de la sérotonine, l'interprétation des résultats n'est pas simple. Malgré de nombreux efforts, la relation entre la sérotonine et la dégénérescence chez le nématode reste encore un mystère. Néanmoins nous avons réussi à obtenir quelques éléments de réponse quant à son mode d'action.

L'augmentation du taux de sérotonine chez les nématodes a été reliée à une inhibition de leur activité motrice, vraisemblablement par la modulation des canaux calciques *itr-1* (**résultats tricycliques**). Chez *C. elegans*, la sérotonine est connue pour son action inhibitrice des chaînes cholinergiques au niveau du système nerveux (**395**). En tenant compte des hypothèses de départ, on peut alors supposer que l'ajout de sérotonine participe à réduire l'excès d'acétylcholine à la synapse, et ainsi permet de réduire les décharges calciques. Dans tous les cas, si l'on accepte le rôle protecteur d'une inhibition du signal nerveux, la diminution des contraintes subies par les cellules musculaires pourrait alors participer à limiter la dégénérescence (**fig. 59**).

Néanmoins plusieurs résultats viennent compliquer cette hypothèse impliquant une diminution de libération d'acétylcholine et de contraintes physiques dans les gains phénotypiques observés après un traitement à la sérotonine.

Premièrement, aucun composé ou gène connu pour diminuer le comportement moteur de *C. elegans* ne permet d'égaliser les effets bénéfiques de la sérotonine sur la dégénérescence sans paralyser complètement les animaux (Ségalat L., résultats non publiés).

Deuxièmement, dans ce mécanisme, le rôle des flux calciques régis par *itr-1* n'est pas clair. L'interprétation de nos résultats tend à montrer que la modulation de ces flux i) prend place dans les muscles, ii) est relié à l'activité motrice des individus (**résultats tricycliques**). Or, le canal récepteur ITR-1 est décrit dans la littérature comme i) un canal entraînant une sortie de calcium trop lente pour participer aux phénomènes d'excitation/contraction du muscle strié (**voir introduction**) (**41-43, 51**), ii) un canal non impliqué dans la locomotion des nématodes (Baylis, H.A., communication personnelle). Ces résultats contradictoires sont difficiles à expliquer, néanmoins pour décrire le rôle physiologique du canal *itr-1* chez le nématode, l'équipe du Professeur Baylis utilise, entre autres, un allèle (perte de fonction) présentant une mutation ponctuelle (*itr-1(sa73)*) (**125**), alors que notre équipe utilise une technique d'ARN interférence. Nous avons récupéré une souche homozygote pour l'allèle *itr-1(sa73)*, et de façon surprenante, contrairement à un traitement RNAi contre *itr-1*, la présence de l'allèle *itr-1(sa73)* ne sensibilise pas les animaux vis à vis de l'effet "paralysant" de la sérotonine. On

peut alors supposer que la mutation présente sur cet allèle *sa73* ne perturbe pas les fonctions de *itr-1* reliées à la locomotion, ce qui expliquerait la contradiction de nos résultats. Cependant il n'en reste pas moins que la dynamique de ce canal est vraisemblablement trop lente pour être impliquée dans le couplage excitation/contraction. Malheureusement nous avons trop peu d'arguments à l'heure actuelle pour discuter plus longuement du rôle réel du canal *itr-1*, que ce soit dans la mise en place de la paralysie ou dans le phénotype de dégénérescence musculaire. La mesure des flux calciques dans les différents contextes génétiques permettra peut être d'apporter des réponses. L'inactivation tissu-spécifique de *itr-1* nous permettra également de savoir si son implication dans la réponse à la sérotonine siège bien dans le muscle.

Troisièmement, via l'**article 2**, nous avons montré que, malgré la présence de la dystrophine, la combinaison de la mutation *tph-1(mg280)* (biosynthèse de la sérotonine) à la mutation *hll-1(cc561)* entraîne une dégénérescence musculaire, plus faible certes, mais ressemblant à celle observée chez les mutants *dys-1(cx18)* ; *hll-1(cc561)*. La sérotonine a donc un effet protecteur sur le muscle, et délétère lorsqu'elle est absente. La sérotonine étant impliquée dans l'inhibition de l'influx nerveux cholinergique, ces résultats sont en accord avec l'idée qu'un excès d'acétylcholine peut conduire à la dégénérescence des muscles ; et cela, avec ou sans les défauts structuraux induits par l'absence de dystrophine. Cependant, il faut rappeler que les mutants *goa-1(n1134)*, hyperactifs, dus à un excès de libération d'acétylcholine, ne présentent qu'une très faible dégénérescence dans un contexte *hll-1(cc561)* (**article 2**). De plus, l'inactivation des différents récepteurs sérotoninergiques connus dans le système nerveux de *C. elegans* ne permet pas de supprimer, de manière significative, l'effet bénéfique de la sérotonine sur la dégénérescence des mutants *dys-1(cx18)* ; *hll-1(cc561)* (**résultats tricycliques**). Ces résultats suggèrent donc que la sérotonine agit sur la dégénérescence presque indépendamment de la libération d'acétylcholine, et sur un récepteur encore inconnu à ce jour.

Enfin, il faut noter que l'imipramine et la sérotonine ont été utilisées autrefois à haute dose chez le rat sauvage pour induire une dégénérescence musculaire, dégénérescence qui n'est que partiellement abolie par la dénervation des muscles (**423-425**). Ceci suggère qu'une partie de l'effet de ce agit directement sur les muscles et pas seulement par la recapture de la sérotonine au niveau neuronal. De plus, il a été reporté dans la littérature l'existence de récepteurs sérotoninergiques localisés au niveau des cellules musculaires des rats et des souris, ces récepteurs ont un rôle inconnu à ce jour mais sont par contre décrits comme non reliés au couplage excitation/contraction (**426, 427**).

En conclusion, en raison de la complexité et de la contradiction de ces résultats, nous pensons que les gains observés en présence de sérotonine sont dus à une action combinée i) sur la locomotion, via une diminution de libération d'acétylcholine (395), ii) sur un mécanisme encore inconnu à ce jour et indépendant du signal cholinergique à la synapse. Peut être via un récepteur sérotoninergique situé sur le sarcolemme des cellules musculaires, et dont le fonctionnement serait lié à l'organisation du DGC ? En absence de sérotonine ou lorsque le DGC est désorganisé, ce récepteur ne pourrait plus exercer son rôle protecteur, et participerait à la mécanique de dégénérescence.

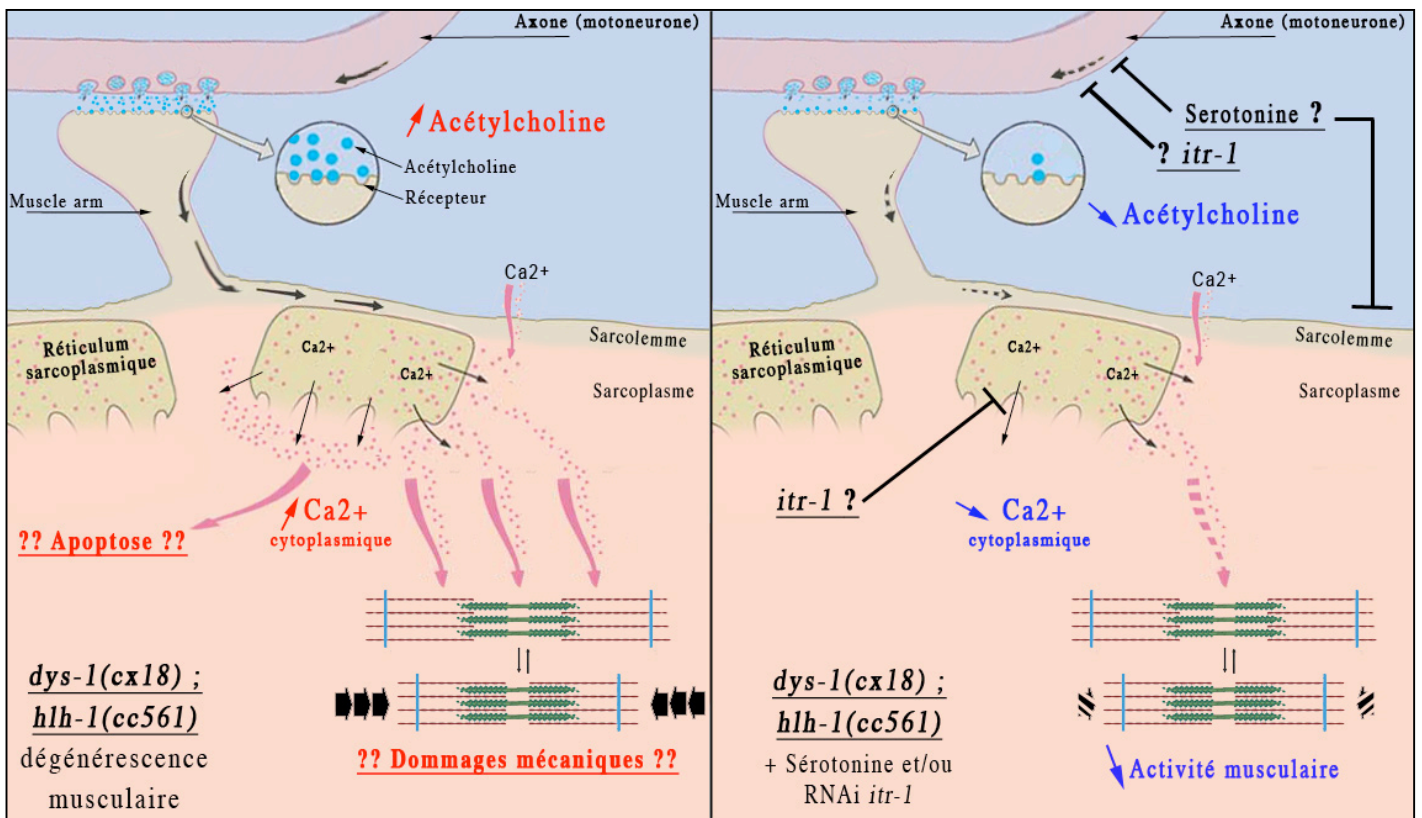
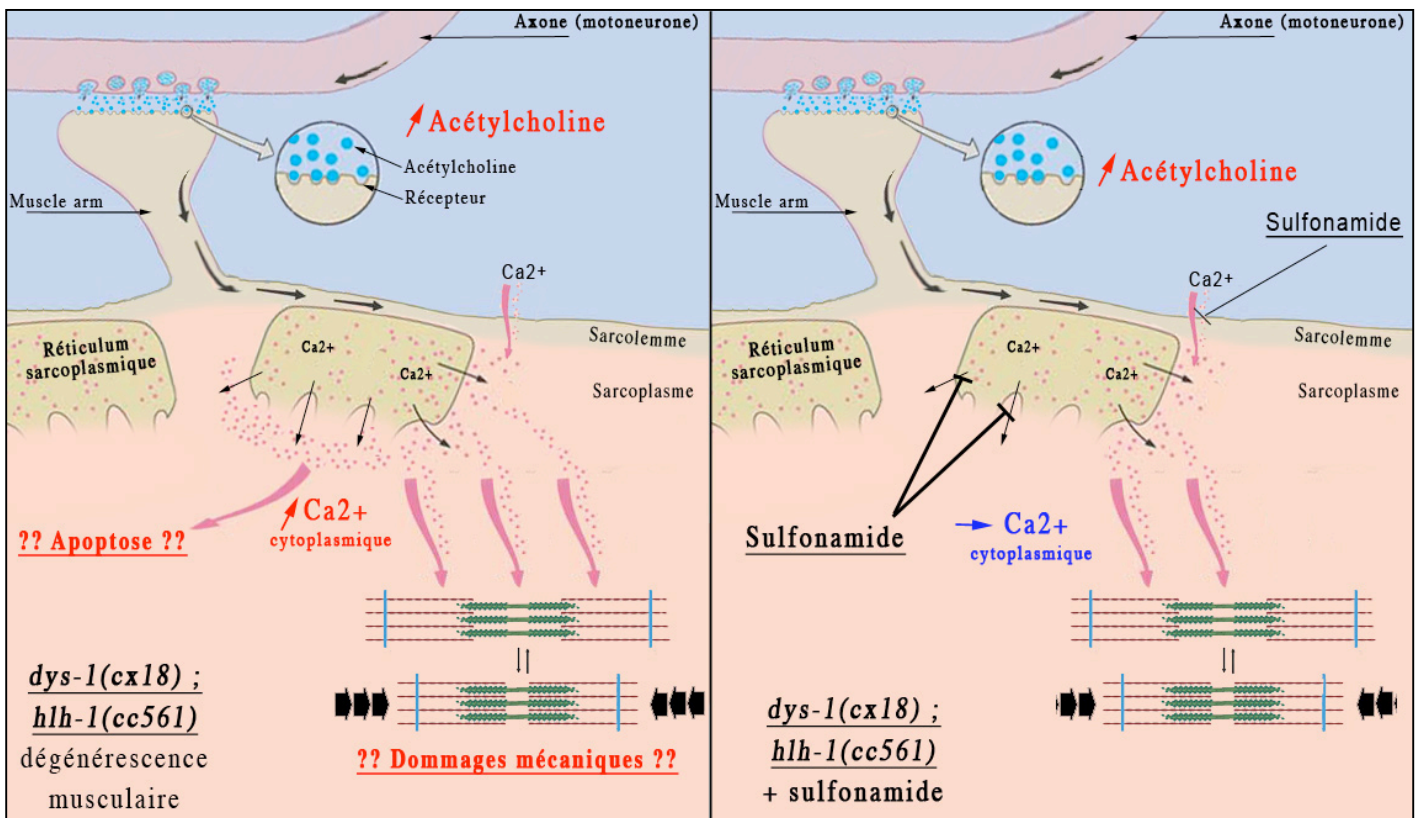


Figure 59 : Mode d'action putatif des composés reliés au métabolisme de la sérotonine.



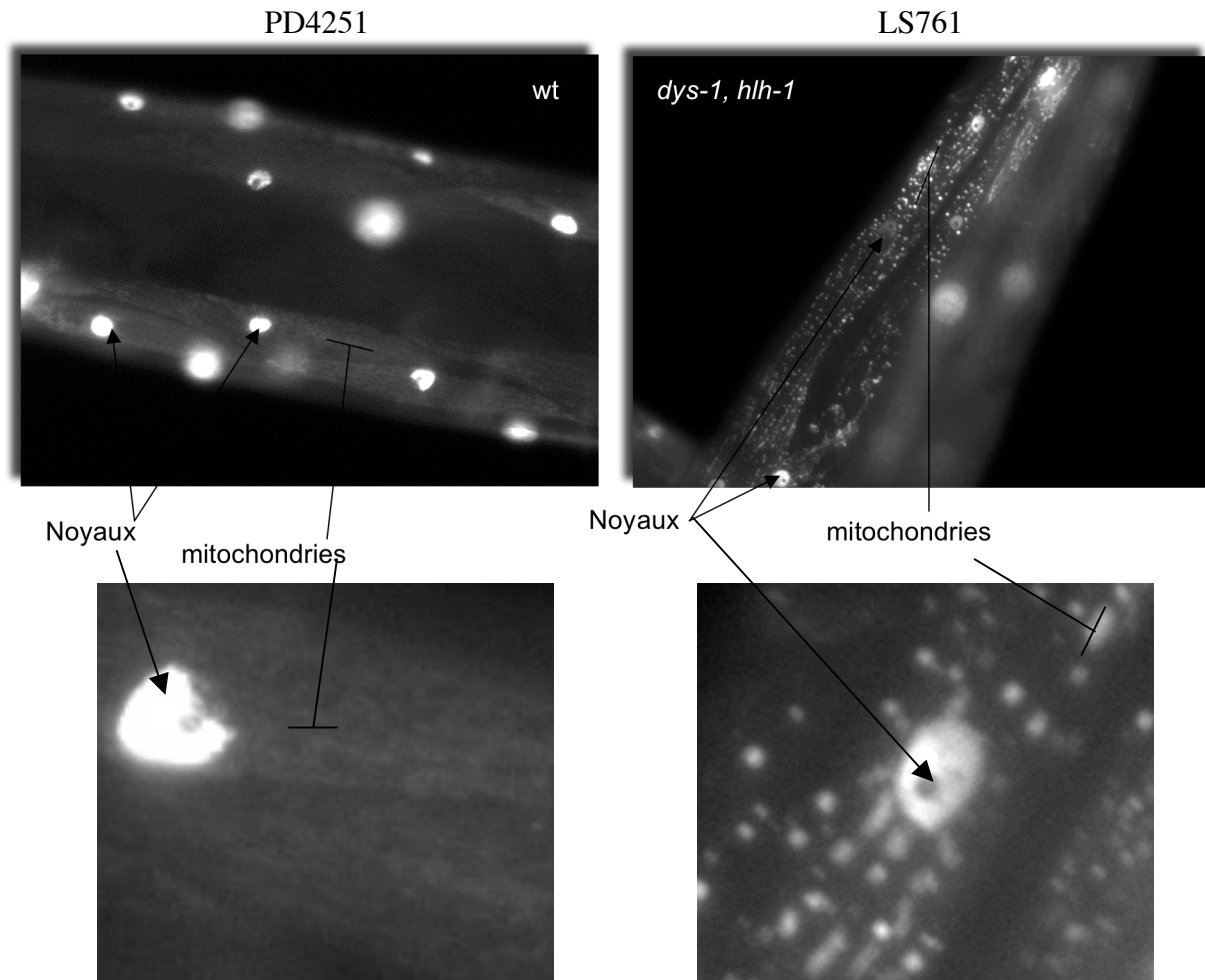
Enfin l'effet des **sulfonamides** identifiés dans nos cribles se traduit, vraisemblablement, par une modulation des flux calciques prenant places dans les cellules musculaires des animaux (**article 1**). Modulation qui n'a pas été mesurée à ce jour. Néanmoins, si tel est le cas, nous pouvons supposer que cette modulation permet de diminuer les décharges calciques suite à une stimulation. Ainsi les cellules musculaires retrouvent une sortie de calcium dite "normale", malgré une stimulation importante (**fig. 60**). Ces composés n'ayant pas d'impact, ni sur l'hyperactivité des mutants *dys-1(cx18)*, ni sur la motricité des animaux sauvages, leur action soutient l'hypothèse d'un "empoisonnement calcique", plutôt qu'un défaut de structure du muscle. Il faut tout de même rester prudent, car la diminution du signal calcique a beau ne pas avoir d'effet visible sur l'activité des animaux, il est probable qu'elle permette de relâcher un peu les unités motrices.



**Figure 60 : Rôle putatif des inhibiteurs d'anhydrases carboniques (sulfonamides) dans les mécanismes de dégénérescence musculaire.**

Venant appuyer cette hypothèse métabolique, l'observation des animaux LS761 (*dys-1* ; *hlh-1*) (traités, ou non, aux sulfonamides) a mis en évidence un phénomène inattendu. Pour rappel, ces animaux présentent des mitochondries et des noyaux fluorescents (GFP). Comparé au profil fluorescent d'un animal sauvage PD4251 et d'un animal mutant traité, le profil

fluorescent d'origine mitochondrial des mutants LS761 semble perturbé, et cela même avant l'apparition de la dégénérescence musculaire (**fig. 61**). Les mitochondries d'un animal sauvage sont organisées de telle sorte qu'il n'est pas possible de les individualiser sur le cliché présenté en **figure 61**. Par contre chez le mutant *dys-1(cx18) ; hlh-1(cc561)*, il est très facile de les distinguer une à une avec le même grossissement ; elles semblent mal organisées et hypertrophiées.

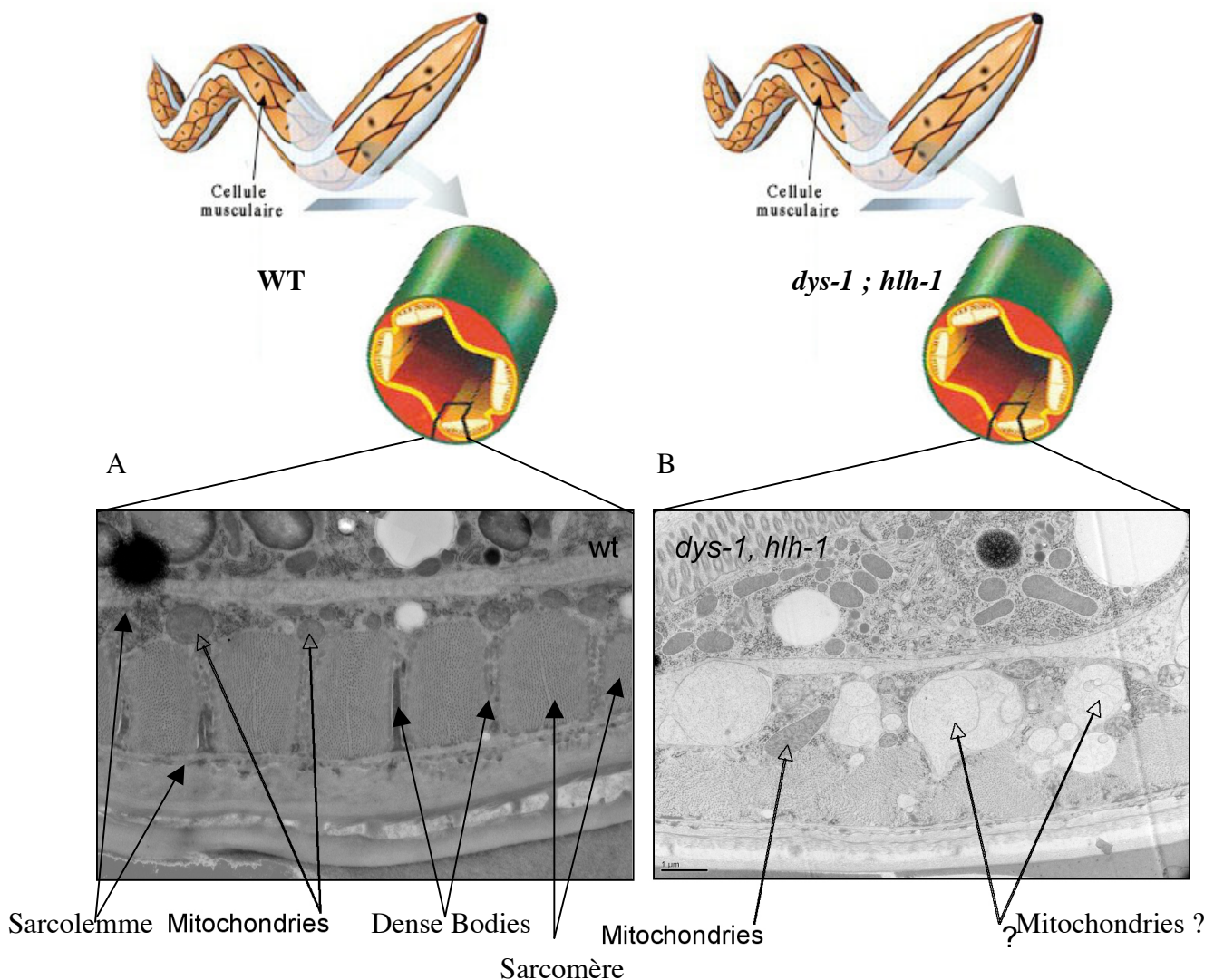


**Figure 61 : Observation d'animaux PD4251 et LS761 non traités sous un microscope à fluorescence (Animaux cultivés 7 jours à 15°C).**

De façon intéressante, les mitochondries des patients DMD présentent aussi des morphologies aberrantes (428). De plus, plusieurs équipes s'accordent à dire que les mitochondries fonctionnent en étroite relation avec le réticulum sarcoplasmique lors des échanges calciques suite à une dépolarisation (429, 430). Il a aussi été montré qu'elles sont capables de capturer rapidement le calcium libéré dans le sarcoplasme (431, 432). Enfin, de

récentes études suggèrent un lien entre la surcharge calcique d'origine mitochondriale et la mort cellulaire par apoptose (433-435).

Intrigué par cette observation, les résultats de Claire Lacroisey ont éveillé mon attention. Claire est une doctorante de notre laboratoire, travaillant sur la dystrophine et ses partenaires. Elle utilise, entre autres, la microscopie électronique pour caractériser les événements subcellulaires survenant lors de la dégénérescence musculaire des mutants *dys-1(cx18)* ; *hll-1(cc561)* (Travaux menés en collaboration avec le laboratoire de Michel Labouesse, IGBMC, Strasbourg). Les clichés acquis au cours de ses études mettent en évidence des structures anormales au niveau de l'emplacement des mitochondries (Fig. 62).



**Figure 62 : Clichés de cellules musculaires obtenus en microscopie électronique (Travaux Claire Lacroisey) (Pour rappel voir fig. 18). A) Les mitochondries présentes dans les muscles des animaux sauvages sont agencées le long des dense bodies et des sarcomères et présentent une forme régulière. B) Les muscles des animaux mutants *dys-1 ; hll-1* présentent des dense bodies et des sarcomères déstructurés, ainsi que des structures anormales localisées à l'emplacement des mitochondries, ces structures pourraient être des vacuoles autophagiques**

car leur profil met en évidence de multiples membranes internes. Animaux cultivés 8 jours à 15°C, coupe transversale, barre d'échelle = 1  $\mu\text{m}$ .

Comme le montre la **figure 62**, ces structures pourraient expliquer l'aspect hypertrophié des mitochondries observées en fluorescence. Nous envisageons d'approfondir ces résultats avec notre souche exprimant la GFP. Le but consistera à localiser et caractériser les mitochondries dans les différents contextes génétiques, et déterminer si ces structures sont enrichies en GFP.

En conclusion, ces observations laissent supposer que la dégénérescence observée dans le modèle nématode DMD pourrait être due à des phénomènes apoptotique régis par un stress mitochondrial. De plus, ces événements prennent place avant l'apparition des dommages musculaires détectables, suggérant un rôle précoce dans la dégénérescence. Enfin, cette hypothèse est appuyée par le fait que traiter des souris *mdx* par un composé (Debio 025) diminuant la perméabilité des membranes mitochondriales ralentit les processus dégénératifs (**436**).

#### En conclusion :

L'interprétation de l'ensemble des résultats montre qu'il est difficile de privilégier une hypothèse pour expliquer l'évolution de la dégénérescence chez le nématode. Ces observations appuient l'idée que les phénomènes dégénératifs sont dus à une combinaison de facteurs, dont une fragilité structurale, et un dérèglement métabolique. La dégénérescence résulte donc, probablement, de la combinaison de phénomènes nécrotiques suite à des dommages mécaniques, et à des phénomènes apoptotiques dus à des troubles métaboliques, notamment au travers d'un stress mitochondrial. Il faut noter qu'en marge de ces perturbations, les phénomènes signalétiques régis par le DGC participent probablement à la dégénérescence (voir introduction). Mais rien ne vient réellement appuyer cette hypothèse dans ce manuscrit.

En ce qui concerne d'éventuelles pistes thérapeutiques, nos études suggèrent que la modulation des flux calciques prenant place au niveau des cellules musculaires pourrait être bénéfique pour les patients atteints de la myopathie de Duchenne. La modulation de l'influx nerveux semble aussi représenter une solution à explorer, et pourquoi pas une combinaison des deux. Enfin, l'inhibition des protéases calcium-dépendantes et la diminution de la perméabilité membranaire mitochondriale sont également des pistes à envisager.

Il faut noter que la pertinence de la piste thérapeutique visant à réduire le taux de calcium sarcoplasmique est confirmée par les résultats obtenus avec les souris *mdx* traitées aux sulfonamides (**Article 2**). Cette piste est également appuyée par le fait que des traitements

basés sur des bloqueurs de canaux calciques, tels que le diltiazem et le verapamil, réduisent la dégénérescence musculaire des souris *mdx*. Enfin, en accord avec l'hypothèse impliquant une mort cellulaire "calcium-dépendante", la surexpression de calpastatine (l'inhibiteur endogène des calpains) permet d'améliorer l'état des muscles des souris *mdx* (**437, 438**).

## **II. Le criblage sur animal entier**

Comme le présente ce manuscrit et discuté dans l'**article 5** qui suit, le criblage de molécules sur le modèle *C. elegans* se révèle être une approche utile pour l'avenir de la recherche médicale. En absence de cible à cribler et de modèles cellulaires exploitables, cette stratégie permet d'identifier rapidement et à moindre coût des molécules bioactives et potentiellement non toxiques pour les organismes supérieurs. De plus, avec cet animal, nous disposons de nombreux outils permettant d'identifier et de tester rapidement les cibles potentielles des composés identifiés. Cette approche peut alors conduire à mettre en évidence de nouvelles cibles biologiques utiles pour la recherche pharmaceutique traditionnelle. Il faut noter que cette stratégie peut être étendue à d'autres organismes couramment utilisés en laboratoire, tel que la mouche *Drosophila melanogaster* et le poisson zèbre *Danio rerio*. Même si la pertinence et l'utilité de ces trois modèles varie en fonction des maladies étudiées et des modèles cellulaires préexistants, ils représentent aujourd'hui une nouvelle option dans la recherche de traitements pharmacologiques.

De plus, ces nouvelles méthodes de criblage ne se limitent pas à une simple réponse binaire, consistant à dire si oui ou non la molécule testée a un effet sur le modèle utilisé. Elles génèrent également de nombreuses informations supplémentaires, telles que la toxicité des composés testés, mais aussi leurs impacts sur le développement, sur la reproduction, et sur le comportement moteur des individus. Au final, en marge des objectifs principaux, ces informations "phénotypiques" couplées aux cribles des autres laboratoires, pourraient permettre d'établir des bases de données exhaustives décrivant les relations structure/phénotype retrouvés avec ces composés. Comparées aux données structure/activité connues, ces informations pourraient s'avérer très utiles pour l'industrie chimique et la recherche fondamentale. Malheureusement, à l'heure actuelle, il n'existe pas de réelle volonté de donner un libre accès à ces informations. Le développement de ces molécules fait parti d'un processus long et coûteux pour chacun des laboratoires qui les développent. Les valoriser avant de les afficher à un large public n'est donc pas déraisonnable.

Il faut tout de même noter que l'exhaustivité des informations obtenues lors des campagnes de criblage est dépendante de l'observation finale effectuée. En effet, à ce jour, les automates disponibles pour réaliser ces essais sont encore à perfectionner, voire à développer. Comparés à une observation manuelle menée par un personnel chevronné, les automates actuels ne sont, dans la plupart des cas, pas plus rapides et encore limités dans le nombre de paramètres enregistrés. On peut tout même imaginer qu'ils permettront, dans un futur proche,

d'abolir le recours à l'observation humaine en caractérisant l'ensemble des perturbations détectables par un ensemble de valeurs numériques, et ceci en un court laps de temps.

Enfin, même si nous avons fait ici l'apologie du nématode comme outil de criblage, il faut garder en tête que les différences anatomiques et physiologiques qui séparent ces animaux de l'homme, feront qu'un grand nombre de molécules seront abandonnées une fois confrontées aux organismes supérieurs (car elles ne permettront pas de reproduire l'effet désiré). De la même façon, les cibles identifiées grâce à ces modèles ne se montreront pas forcément pertinentes chez l'homme en raison de la multiplicité et de la complexité des acteurs moléculaires impliqués dans les processus pathologiques en question. De plus, comme l'illustre le crible SMA, certains gènes impliqués dans des maladies humaines et conservés chez *C. elegans* induisent des phénotypes considérés comme éloignés des atteintes humaines ; dans ce cas l'utilisation et la pertinence de ces animaux pour la recherche pharmaceutique est discutable. Elle est d'autant plus dans le cas où des modèles cellulaires existent et peuvent être utilisés en criblage.

Par contre, cette approche permettra à coup sûr de mieux comprendre la biologie de ces animaux modèles, et conduira ainsi à apporter des indications sur les mécanismes moléculaires et cellulaires prenant places dans les organismes supérieurs.

Cette approche doit donc être vue comme une nouvelle stratégie de criblage pour la recherche de médicaments, mais en aucun cas comme un remplaçant aux techniques *in vitro* et cellulaires actuelles.

# High-throughput screening and small animal models, where are we ?

Jean Giacomotto<sup>1</sup>, Laurent Ségalat<sup>1\*</sup>.

- Accepted for publication in "British Journal of Pharmacology" (7/02/10)-

<sup>1</sup> CGMC; CNRS-UMR5534; Université Claude Bernard Lyon-1; Villeurbanne, 69622, France

\*To whom correspondence should be addressed :

CNRS-CGMC-UMR5534  
Université Lyon-1 Claude Bernard  
Batiment Mendel  
43 bld du 11 Novembre  
69622 Villeurbanne Cedex  
France

Phone 33 4 72 43 29 51 Fax 33 4 72 43 29 51

Email : [giacomottojean@gmail.com](mailto:giacomottojean@gmail.com)

---

**Abstract.** Current high-throughput screening methods for drug discovery rely on the existence of targets. Moreover, most of the hits generated during screenings turn out to be invalid after further testing in animal models. To by-pass these limitations, efforts are now being made to screen chemical libraries on whole animals. One of the most commonly used animal model in biology is the murine model *Mus musculus*. However, its cost limit its use in large-scale therapeutic screening. In contrast, the nematode *Caenorhabditis elegans*, the fruit fly *Drosophila melanogaster*, and the fish *Danio rerio* are gaining momentum as screening tools. These organisms combine genetic amenability, low cost, and culture conditions that are compatible with large-scale screens. Their main advantage is to allow high-throughput screening in a whole-animal context. Moreover, their use is not dependent on the prior identification of a target and permits the selection of compounds with an improved safety profile. This review surveys the versatility of these animal models for drug discovery and discuss the options available at this day.

---

**Keywords:** *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, high throughput screening, drug discovery, chemical genetics, disease, drug target.



## Introduction

During the last two decades, drug research has been subject to major mutations. Entire genome sequencing, DNA microarrays, miniaturization, informatics and robotics have drastically changed the approach of this art. Pharmaceutical companies were the first to fully combine these emerging technologies and knowledge to establish robust methods for drug discovery (**fig. 1.1**). One is called High Throughput Screening (HTS) and consists in random screens of compounds to find hits showing an activity or an affinity on a selected target and/or in a model considered representative of a disease (Spring, 2005). This approach has contributed to identify therapeutic compounds, pathway, cell functions, chemical probes, with the ultimate goal of comprehensively delineating relationships between chemical structures and biological activities. Another one is called virtual screening and consists in *in silico* intelligent drug design against characterized targets (Bajorath, 2002).

Despite numerous successes, the pharmaceutical industry is experiencing a slow-down in the development of new and innovative medical products, due to three major reasons. First, these methods are roughly reliant on the existence of identifiable and screenable targets (Lindsay, 2003). Despite a wealth of information about normal physiology and disease pathology, it is still difficult to predict which targets will effectively reverse a disease phenotype ; this fact is particularly true for loss-of-function disease where the identification of pharmaceutically relevant targets is often difficult (Segalat, 2007b). Secondly, mechanisms involved in some diseases cannot be reproduced *in vitro*. Cells and tissues are physiologically connected and this interplay may be crucial in the evolution of some disorders. Third, most of the hits generated by traditional screening turn out to be invalid once tested in mouse, resulting in a waste of funds and efforts. Absorption, solubility, distribution, metabolic stability, toxicological problems in later animal studies present numerous difficulties which turn to a dead-end for most hits (Bleicher *et al.*, 2003).

To by pass these limitations, efforts are now being made to screen chemical libraries on whole-animals (**fig. 1.2**). In medical sciences, the mouse *Mus musculus* is one of the most commonly used animal model due to its genetic, physiological and anatomical similarities to the human system (West *et al.*, 2000). However, its cost limit its use in large-scale therapeutic screening. On the contrary, with the development of robotic and automated imaging, several tiny animal models, like *C. elegans*, *D. melanogaster* and *D. rerio*,

are gaining momentum as screening tools for drug discovery (Lieschke *et al.*, 2007; Segalat, 2007a). These organisms combine genetic amenability, low cost, and culture conditions compatible with large-scale screening. Their main advantage is to allow high-throughput screening in a whole animal context. Moreover, their use is not dependent on the prior identification of target.

Finally, these new pharmaceutical screening tools will allow 1) the identification of new active compounds that may eventually be validated on mammals (**fig. 1.2**), 2) the identification of unsuspected targets and/or molecular mechanisms which could be used in traditional HTS based on target binding or function (**Fig. 1.3**), 3) the generation of supplementary information which can turn useful to establish a database linking phenotypic activity to chemical structure.

This review discusses the versatility of these models for drug discovery, and try to make an overview of the options currently available at each step of the screening process.

## Model attributes overview

*C. elegans* was introduced by Sydney Brenner in the 1960s as a model organism to study animal development and the nervous system. Since, this little worm has led to landmark discoveries on many molecular mechanisms such as cell death, ageing, development, and neuronal function (Kenyon, 2005; Lendahl *et al.*, 2002; Putcha *et al.*, 2004). It has also been used as a model for host-pathogen interactions and for neurotoxicological research (Leung *et al.*, 2008; Moy *et al.*, 2006; Peterson *et al.*, 2008). Its genome is fully sequenced and more than 50% of human genes have a *C. elegans* counterpart (Harris *et al.*, 2004). Several human diseases can be recapitulated in this model by knocking down a selected gene or by expressing a deleterious version of it. Unfortunately, the absence of tools to perform targeted mutations complexify this approach. However, many strains have already been generated by large-scale mutagenesis and are available at the Caenorhabditis Genetics Center (CGC) (**table 1**). Indeed, the conservation of such strains are easy and systematic since *C. elegans* can be stored indefinitely by cryo-conservation (Stiernagle, 2006). In parallel, the NemaGENETAG project has generated a large collection of 14,000 transposon-tagged mutants strains which can be obtained upon request (Bazopoulou *et al.*, 2009). Additionally, double-stranded RNA-mediated interference (RNAi) is an alternative and useful method for gene disruption in *C. elegans* (Fire *et al.*, 1998). Moreover, several

genetic tools have been developed to generate genetically engineered strains, like transgenesis or the MosTIC technology (Rieckher *et al.*, 2009; Robert *et al.*, 2009). Finally, the Wormbase website allows access to an exhaustive database containing comprehensive data on gene structures, mutants and RNAi phenotypes, microarray data, protein-protein interactions, and more (Chen *et al.*, 2005).

Moreover, due to its little size, its short life cycle, its simple growth conditions and its low-cost, this animal has extensively been used in large-scale genetic screens (Bazopoulou *et al.*, 2009; Sugimoto, 2004). The adult *C. elegans* reach ~1mm in long and ~80  $\mu\text{m}$  in diameter, whereas embryos are about ~50  $\mu\text{m}$  long and ~30  $\mu\text{m}$  in height. This little size allow the use of a specific automated pipetting system at all developmental stages (see below). Animals can easily be cultivated in multi-well plates in agar or liquid medium with a diet of *Escherichia coli*. Its rapid life cycle is temperature-dependent (3.5 days at 20°C) which is convenient for experiment planification. Moreover, its optically transparent body allow to detect functional and morphological changes without having to kill or dissect the organism.

Despite these advantages for modeling molecular disorders and for large-scale screening, *C. elegans* has several drawbacks. The major one is that some diseases cannot be reproduced because the animal does not have the corresponding genes or organs. In this case, an alternative could be the fly *Drosophila melanogaster* or the fish *Danio rerio*, closer to mammals in the evolutionary tree.

**The fruit fly *D. melanogaster*** was introduced as an animal model in the beginning of the 20th century. *D. melanogaster* has typically been used over the years for genetics, development, signal transduction and cell biology studies, but has also recently been employed for pharmacological research purposes (Arias, 2008; Manev *et al.*, 2004). The entire *Drosophila* genome has been sequenced and annotated, and more than 60% of human genes have functional orthologs in *D. melanogaster* (**table 1**) (Bernards *et al.*, 2001; Bier, 2005; Celniker *et al.*, 2003). Over 75% of the human disease genes in the Online Mendelian Inheritance in Man database present strong protein sequence conservation with *D. melanogaster* genes (Reiter *et al.*, 2001). Then, this animal model has become a popular organism for studying human diseases (Botas, 2007; Doronkin *et al.*, 2008). *D. melanogaster* also benefit from a comprehensive range of methods for carrying out molecular genetic research such as mutagenesis, RNAi and transgenesis (**table1**) (Matsushima *et al.*, 2007; Venken *et al.*, 2005). Moreover, there are several efforts under way to mutate every predicted

gene. Although *D. melanogaster* cannot be conserved frozen, it is easy to maintain, and thousands of strains are available from the Bloomington stock center (Matthews *et al.*, 2005). Additionally, an exhaustive database information relative to its genetics and its molecular biology is freely available (Drysdale, 2008). Indeed, the FlyBase database contains detailed phenotypic reports for over 2500 mutants and more are characterized every year.

Its size, although larger than *C. elegans*, allow manipulation of its eggs and its embryos (~100 $\mu\text{m}$ ) with a specific pipetting automate (see below). Although *D. melanogaster* has already proven its potential for large-scale genetic screening, this animal cannot be grown in liquid medium which limit its use in HTS (Nagy *et al.*, 2003; Nusslein-Volhard *et al.*, 1980). However, more and more chemical screens take advantage of it (Nichols, 2006; Segalat, 2007a; Whitworth *et al.*, 2006).

The high degree of functional conservation in cell-biological processes between mammals and invertebrates suggests that diseases resulting from disruption of conserved cellular processes can be recapitulated at a genetic and molecular level in flies and worms. However, one has to keep in mind that the anatomy and physiology of invertebrates are significantly different from those of humans and that, as a consequence, these animals can produce only a partial picture of the human symptoms. On the contrary, the **zebrafish (*Danio rerio*)** is a vertebrate model which is more similar to humans. During the last 20 years, this tropical aquarium fish was almost exclusively used to study organ development (Grunwald *et al.*, 2002; Streisinger *et al.*, 1989). Indeed, it was established as a model to bridge the gap between worm/fly and mouse/human for understanding embryonic development. Its interest for research increased substantially approximately 10 years ago, following the demonstration that it was amenable to large-scale forward genetic screens (Eisen, 1996). This resulted in the characterization of an exceptionally large number of genes involved in vertebrate pathways, and contributed to the establishment of the zebrafish as a relevant model for human diseases and pharmaceutical research (Alestrom *et al.*, 2006; Driever *et al.*, 1996). Moreover, the zebrafish genome has now been sequenced, and is part of a large database freely available at the Zebrafish Information Network (ZFIN) and at the FishMap website (Meli *et al.*, 2008; Sprague *et al.*, 2003). Additionally, ZFIN provides exhaustive information to serve the needs of the research community, such as methods, anatomical descriptions, developmental processes, mutants phenotype and more. Finally, working closely with

ZFIN, the Zebrafish International Resource Center (ZIRC) maintain numerous zebrafish strains and frozen sperm which can be obtained upon request (Henken *et al.*, 2004). Unfortunately, the number of available mutant strains with respect to the number of genes is still limited. The genetic resources for zebrafish continue to expand steadily with the existence of hundreds of genetic mutants from large scale mutagenesis experiments, the availability of transgenic morpholino knock-down techniques and of the Targeting Induced Local Lesion In Genome (TILLING) and other genetic manipulations such as the sleeping beauty transposase system which allow gene insertion under the control of tissue- and/or time-specific promoters (**table 1**) (Davidson *et al.*, 2003; Esengil *et al.*, 2008; Nasevicius *et al.*, 2000; Ogura *et al.*, 2009; Wienholds *et al.*, 2002).

An attractive feature of zebrafish assays for pharmacology investigations is the optical transparency of its embryos and its larvae which allow *in vivo* observation of morphological defects. Moreover, in contrast to rodents, the zebrafish embryos develop externally from the mothers and most of the internal organs, including the cardiovascular system, gut, liver, kidney and muscle develop rapidly in the first 24-48 hours (Westerfield, 1995). Then, a wide range of biological and disease process may be studied at an early developmental stages (Chico *et al.*, 2008). In addition, the zebrafish embryo is small (5 mm at 7 days post fertilization), inexpensive, hardy, and easy to produce in large numbers. Then, screens may be conducted in microtiter plates (Barros *et al.*, 2008; Hong, 2009).

### **Screen for what ?**

HTS with whole animals can be subdivided in two distinct approaches (**fig. 2**). **The first approach** is comparable to the classical forward genetic screens which consist in random genetic modifications of wild-type animals by mutagenesis. Similarly, chemical libraries may be tested on wild-type animals for their ability to produce a particular phenotype such as slow growth, lethality, uncoordinated movement, morphological defects and more (**fig. 2.a**). In contrast to traditional biochemical assays that focus on specific molecular targets, a screen based on a phenotypic observation has the advantage of being independent of the specific molecular target involved. Then, depending on the end-point measure (readout), a large variety of bio-active molecules may be detected in the same screen. Additionally, experiments could further lead to the identification of unsuspected targets (see below) (Artal-Sanz *et al.*, 2006; Perrimon *et al.*,

2007). An example of this approach is well illustrated by the screen made by Kwok *et al.* which screened 14,100 small molecules for bioactivity in wild-type *C. elegans* and identified 308 compounds that induce a variety of phenotypes, including slow growth, uncoordinated movements, and morphology defects (Kwok *et al.*, 2006). One of these compounds, named nemadipine-A, induces morphology and egg-laying defects. Through a genetic suppressor screen, Kwok *et al.* further identified *egl-19*, a calcium channel, as the sole candidate target of this compound in *C. elegans* (Burns *et al.*, 2006). Moreover, by showing that nemadipine-A can also antagonize vertebrate L-type calcium channels, they demonstrated the relevance of this approach for drug discovery.

**The second approach** consists in testing chemical libraries for their ability to reverse an abnormal phenotype to the wild-type phenotype (**fig. 2.b**). HTS is performed on animals that reproduce a disorder or at least, some features of it. For this purpose, mutants strains which mimic human disease are already available or may be generated by mutation, transgenesis or in certain case by chemical treatments (**table 2**). As an example, *C. elegans* and *D. melanogaster* models of Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's disease are available and are being exploited (Kuwahara *et al.*, 2008; Link, 2006; Nichols, 2006). In the case of Alzheimer, loss-of-function mutations in *C. elegans* homologs of presenilin cause a defect in egg-laying (Smialowska *et al.*, 2006). Then, the amount of eggs layed may be quantitated to monitor the therapeutical potential of chemical compounds. Comparably, amyloid deposits may be observed in transgenic *C. elegans* expressing the human  $\beta$ -amyloid peptide (Link, 2006). Since this accumulation induces a paralysis phenotype, a screen based on a locomotion readout could be designed (see below). Similarly, since *C. elegans* is killed by many pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*, a basic screen based on survival may lead to the identification of new anti-microbials agents (Moy *et al.*, 2006; Sifri *et al.*, 2005; Tenor *et al.*, 2004). Finally, in a more subtil approach, the help of fluorescent markers is an additional way of measuring a disorder parameter. Like *C. elegans*, many mutants and transgenic strains of *D. melanogaster* present relevant defects that may be used to design a screen (**table 2**). Nevertheless, culture conditions of *D. melanogaster* limit its use to embryos in an HTS process.

Although invertebrate models present a high degree of functional conservation with human (**table 1**), they

often show a partial picture of human processes and, in certain cases, cannot reproduce the disorder since they do not have the corresponding gene and organ. To bypass this drawback, the vertebrate fish *D. rerio* could be an alternative, in particular in immunity and cardiovascular disorders, but also in inflammation and in cancer (**table 2**). For example, zebrafish develops malignant tumours in response to mutagens, carcinogens or by gene mis-expression (Beckwith *et al.*, 2000; Mizgireuv *et al.*, 2006; Spitsbergen *et al.*, 2000). Inducing malignancy in transgenic fish carrying oncogenes with fluorescently tags, or fish with appropriate fluorescently marked cell types, results in fluorescent tumours, allowing recognition of tumour onset, location and the estimation of tumour bulk (Langenau *et al.*, 2005a; Langenau *et al.*, 2005b; Langenau *et al.*, 2003). This feature, coupled with the optical transparency of its larvae, may be used in large-scale screens to identify enhancers or suppressors of tumours (Stern *et al.*, 2003). Similarly, even if zebrafish do not spontaneously develop cardiovascular diseases analogous to those seen in humans, some related mechanisms may be modeled in zebrafish embryos such as cardiomyopathy, thrombosis, arteriogenesis and cardiac regeneration (Chico *et al.*, 2008). Unfortunately, at this day, the lack of appropriate tools for automated manipulation and analysis limit the throughput of screens based on the zebrafish model.

Finally, in comparison with *D. melanogaster* and *D. rerio*, an advantage of the *C. elegans* model for modeling molecular disorders is the possibility to interfere with almost any gene function at any time in its life cycle by delivering RNAi by feeding (Timmons *et al.*, 1998). Therefore, chemical screens with essential genes are also possible with this model. For this purpose, a *C. elegans* RNAi feeding library could be obtained from the Geneservice company (Cambridge, UK). This library consists of 16,757 bacterial strains dispensed in 384-well plates, which cover 87% of *C. elegans* genes. Since RNAi is delivered by feeding, it is easy to incorporate it in an HTS process in combination with chemical compounds. One has to keep in mind that RNAi is poorly active on the nervous system of *C. elegans*, whereas a lot of molecule may act in this way. However a recent study showed that this limitation could be overturned by using a specific strain (Kennedy *et al.*, 2004). Indeed, Seiburth *et al.* used an *eri-1* ; *lin-15B* strain to perform a large-scale RNAi screen that identified more than 100 novel genes involved in synaptic transmission (Seiburth *et al.*, 2005).

### Options in process design

Defining a relevant model is a crucial step for the success of a screening campaign. In addition, to identify hits among the multitude of tested compounds, a screen must generate comparable, homogeneous and reliable data. Moreover, it needs to be done in an automatic manner to allow a high-throughput (Zhang *et al.*, 1999). Even if small animal models have already proved their versatility for large-scale studies, scientists usually manipulate these organisms by manually collecting, sorting, and transferring individual animals. As a result, large-scale screens often take months or even years, increasing the risk of generating heterogeneous and non-quantitative data. Indeed, whole-animal screens are much more difficult to automate than *in vitro* screens. Animals size is not suitable with traditional HTS equipment, and culture volumes are often incompatible with large-scale chemical screens. However, emerging methods where culture is done in minute volumes in 96- or 384-well plates, coupled with the development of robotics, open the way to new possibilities (**table 1**) (Lehner *et al.*, 2006; Murphey *et al.*, 2006; Pulak, 2006; Vogt *et al.*, 2009). For example, the development of the COPAS Biosort (Union Biometrica, MA, USA), which allows the automatic dispensing of precise numbers of animals into multiwell plates, minimize the initial manipulation of individual animals and therefore dramatically increases the quality and the throughput of the screen. Indeed, the COPAS, like a flow-through sorter, can rapidly sorts objects based on several criteria including length, optical density, and several channels of fluorescence (Pulak, 2006). Although all *C. elegans* stages can be manipulated with this machine, only eggs and embryos of *D. melanogaster* and *D. rerio* can.

Another important point of the assay design is the compounds concentration. This question is well debated for *in vitro*- or cell-based assays. On the contrary, in the case of whole animals, since the target is not always known and the treatment usually delivered through the media, it is difficult to accurately predict the range of doses which have to be tested. Compounds penetrate by both ingestion and diffusion through the animal epiderm (Kaletta *et al.*, 2006). Indeed, the concentration of a given compound within the animals cannot be predicted and it varies depending on the chemical properties of the compound. As a consequence, negative results cannot be interpreted because it is hardly possible to determine if a negative result is due to poor penetration, docking problems, or a true absence of biological activity in the model. It is particularly true

for the *C. elegans* model, which is surrounded by a thick cuticle which provides protection from environmental chemicals (Page *et al.*, 2007). A recent study evaluated that the absorbed concentration of the 5-hydroxy tryptophane is approximately 100 to 1,000x lower than in the medium (Carre-Pierrat *et al.*, 2006). To avoid missing hits, a conceivable approach may be to test compounds at several concentrations, defined by preexisting data and by the molecular properties of the chemical library. If the number of assays are limited, the compounds may be tested at a high concentration in the medium. With this approach, a lot of compounds will display a toxic activity, but they could be further re-tested at a lower concentration.

### ***Options for automatic and quantitative read-out ?***

Another crucial step which has a profound effect upon the quality of the information produced, and upon the throughput, is the output measure (the readout). Since a machine is not appropriate to detect the unsuspected, whole animal screening have often relied on laborious observation and manual scoring by small teams of highly trained students and postdocs (Evanko, 2006). Moreover, data generated were often non quantitative and ambiguous. For example, a recent study described a valuable procedure to screen molecules for their ability to induce a phenotype, nevertheless, their throughput was hampered due to the manual interpretation of the data (Burns *et al.*, 2006). In this study, *C. elegans* larvae were deposited using the COPAS biosort into 24-well plates on top of the agar-chemical mixture. Three to five days later, images of the wells were acquired and archived using a HiDI2100 automated imaging system. With this automated method, up to 2,400 compounds per week could be screened. Unfortunately, in absence of robust statistical methods to extract data, phenotypes had to be characterized from the archived images which was not better or more rapid than manually scoring phenotype at the dissection microscope. Moreover, the manual interpretation of the data was ambiguous and non quantitative. There is thus a need for more rapid, and more consistent, methods for scoring phenotypes. It is obvious that the ultimate goal of the automatisation will be to attempt a comprehensive description of all "observable perturbation" using a large list of numerical parameters. This approach is very complex, it will be highly demanding of programming skills and need considerable progress of the current automated imaging systems. However, several methods already exist at this day to measure the switch between abnormal phenotype to wild-type phenotype, or reciprocally (**table 3**).

As an example, Gill *et al.* have developed a method to study the life span of worms. This "survival assay" combine automated worm-handling technology with automated real-time fluorescence detection (Gill *et al.*, 2003). To measure nematode death, they added to the culture the fluorescent dye SYTOX, a nucleic acid stain that binds to DNA in damaged cells. Then, fluorescence was measured using a traditional fluorescence plate reader, allowing the quantification of the amount of dead worms per well. This approach may, in principle, be applied to the identification of pharmacological agents that extend life span of worms or kill them, as well. Additionnaly, with addition of pathogens in the culture, this method may be used to screen for anti-microbial or anti-fungal compounds. The same approach could be developed for *D. melanogaster* et *D. rerio* (Gerhard, 2007; Kang *et al.*, 2002).

With traditional equipment, several other events may be measured in an automatic manner. For example, to measure egg-laying behavior of *C. elegans*, a pharmaceutical company has developed an indirect method, called the "chitinase assay" (Ellerbrock *et al.*, 2004). It consists of measuring the chitinase activity that is released from the eggs by hatching larvae. Therefore, this activity reflects the amount of hatching larvae per well. Since many disorders models, like neurodegenerative disorders, affect egg-laying behavior of *C. elegans*, this rapid measure could be used to monitor the efficiency of the compounds (Briese *et al.*, 2009; Liau *et al.*, 2007; Smialowska *et al.*, 2006). Nevertheless, one has to keep in mind that the more indirect the observation is, the more false negative are expected.

Additionally, neuro-degenerative, neuro-muscular, and several other disorders often result in locomotion or behavioral defects in these models (**table 2**). Since this type of injury is particularly relevant to human disease, different teams have developed systems to monitor locomotion and behavior in an automatic and quantitative manner (Buckingham *et al.*, 2008; Ramot *et al.*, 2008; Restif *et al.*, 2008; Tsechpenakis *et al.*, 2008; Tsibidis *et al.*, 2007). As an example, a worm-tracker system called the "thrashing assay" is used to evaluate the effect of drugs and mutations on locomotion (Tsechpenakis *et al.*, 2008). Nevertheless, these worm-trackers avoid excessive computational demand by extracting a limited set of features and are time-consuming at this day. In parallel, similar efforts are being made by *Drosophila* and Zebrafish laboratories (Branson *et al.*, 2009; Creton, 2009; Dankert *et al.*, 2009; Flinn *et al.*, 2008; Hicks *et al.*,

2006; Reiser, 2009; Rosato *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2009; Winter *et al.*, 2008).

Additionally, the optical transparency of the *C. elegans* body, the *D. melanogaster* embryos and the *D. rerio* larvae allows *in vivo* visualization and tracking of their cells, tissues and fluorescent markers. Furthermore, the known and invariant cell lineage of *C. elegans* may be used to establish robust and accurate measurements. Indeed, *C. elegans* is composed of 959 somatic cells including muscles cells (111), neurons (302), intestine (34 cells), epidermis (213 cells), which are not able to regenerate (Harris *et al.*, 2004). Although this last feature is advantageous for quantitative measurements, it may also be seen as a drawback since many diseases may be treated through the regeneration process.

As example of this approach, mutations in the *C. elegans* homologue of the human dystrophin, a protein involved in the Duchenne muscular dystrophy, result in a progressive paralysis phenotype (Gieseler *et al.*, 2000). Since this paralysis is due to a muscle degeneration, the use of fluorescent markers under the control of a muscle-specific promoter allow to monitor, *in vivo*, the degree of injury without having to estimate the locomotion or to perform a muscle-specific staining (**figure 3**). Then, with appropriate equipment, the fluorescent pattern of each animals may be collected to establish a quantitative measurement of the muscle degeneration (**figure 3**). Two systems are available at this day to monitor the fluorescent profile of *C. elegans*. The first one is the multi-well plate reader of the COPAS biosort which has been previously described (Pulak, 2006). The second one consists in a high-speed microfluidic analyser that can isolate and immobilize *C. elegans* animals in a well defined geometry. Then, fluorescent profiles may be recorded at a subcellular resolution in physiologically active animals (Rohde *et al.*, 2007). Although this recent technology has been designed for sorting, it is attractive for phenotypic analysis at a cellular and subcellular level.

The same strategy may be applied to *D. melanogaster* and *D. rerio* in their early stages (**table 3**). For example, several teams use fluorescent marker coupled to automated imaging systems and artificial intelligence-based image analysis to track the angiogenesis process and find compounds which modulate it (Tran *et al.*, 2007; Vogt *et al.*, 2009). Furthermore, their results demonstrated that it is feasible to adapt image-based high-content screening methodology to measure complex whole organism phenotypes in an automatic manner. Another example is described by Burns *et al.* who developed a rapid assay to quantify the effect of novel drugs on heart rate by generating transgenic zebrafish with fluorescent

cardiomyocytes. Embryos were distributed in 96-well plates and the heart rate of individual animals was measured by an automated imaging system (Burns *et al.*, 2005).

### ***After the screen ?***

One of the concerns of using small animal models for drug discovery is the determination of the effective dose for a lead compound. Dose-response experiments are easily feasible but one has to keep in mind that the compounds are provided to the animals through the media (Kaletta *et al.*, 2006). To meet this challenge, the results obtained using with these models will have to be linked to data obtained on laboratory rodents and, when possible, in humans. It is too early to establish if the range of doses to be tested in mammals can be extrapolated from data obtained on *C. elegans*, *D. melanogaster* and *D. rerio*. Furthermore, it may be different for each drug. At this day, the confirmation in mammals remains essential. Indeed, mammalian models will remain necessary in drug development to answer fundamental questions of drug pharmacology and toxicity.

For the future of drug discovery, the identification of novel targets seems critical. Then, the flexibility of small animal models is a powerful tool to rapidly understand the mechanism of action of each lead at a low cost (Artal-Sanz *et al.*, 2006; Kaletta *et al.*, 2006). Several approaches may be used to determine the targets and modes of action of active compounds, such as candidate-based approaches, affinity chromatography coupled to mass spectrometry, microarray technologies and more global approaches like genome-wide RNAi screen, random mutagenesis or metaboprofiling studies (Blaise *et al.*, 2007; Blaise *et al.*, 2009; Kaletta *et al.*, 2006; Lehner *et al.*, 2006; Sleno *et al.*, 2008).

For example, a screen of a collection of 1,000 already approved compounds conducted on the *C. elegans* model of dystrophin deficient muscular dystrophy led to the identification of several new active compounds (L. Segalat, unpublished results). Two of the most active hits obtained in this screen were methazolamide and dichlorphenamide, which are sulfonamides. Since this class of chemicals is known to be strong inhibitors of human carbonic anhydrase enzymes, implication of these enzymes was investigated in the worm (Giacomotto *et al.*, 2009). For this purpose, RNAi experiments against all putative carbonic anhydrase of the worm were performed, and conducted to identify CAH-4 as the sole target among the 6 carbonic anhydrase of the worm.

Alternatively, in the absence of candidate genes, the use of a global approach such as large-scale mutagenesis or genome-wide RNAi screens is an option which may rapidly conduct to the identification of potential targets. For example, since RNAi can be delivered by feeding in *C. elegans*, a secondary RNAi screen -based on the process used for hit identification- may be run in which *C. elegans* genes are tested one by one for their ability to modify the response to the drug. Then, candidate genes are identified by their ability to induce a resistance or a hypersensitivity to the hit when inactivated (Burns et al., 2006). The major drawback of this method is that the process needs considerable amount of chemicals.

### **Translation to human**

How predictable are the findings made on model organisms such as *C. elegans*, *D. melanogaster* or *Danio rerio*, when it comes to treating humans ?

One has to keep in mind that the anatomical and molecular differences of small model organisms with humans may cause the elimination of a significant fraction of the hits generated. At this date, the question of hit predictability in this strategy cannot be answered because there is not enough feedback. One may imagine that the number of compounds which can be translated to human may not be much higher than the attrition rate seen with cellular screens. Along the same lines, the targets identified in these models might help to understand normal and disease biology of these tiny animal but not necessarily be relevant for human.

The lead-to-drug bottleneck, which remains a critical problem of today's drug discovery, will likely not be alleviated by screening on small model organisms. These models should be viewed as complementary alternatives to cellular or in-vitro screening devices,

### **References**

Alestrom, P, Holter, JL, Nourizadeh-Lillabadi, R (2006) Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends Biotechnol* **24**(1): 15-21.

Allikian, MJ, Bhabha, G, Dospoy, P, Heydemann, A, Ryder, P, Earley, JU, Wolf, MJ, Rockman, HA, McNally, EM (2007) Reduced life span with heart and muscle dysfunction in *Drosophila* sarcoglycan mutants. *Hum Mol Genet* **16**(23): 2933-2943.

Amsterdam, A (2003) Insertional mutagenesis in zebrafish. *Dev Dyn* **228**(3): 523-534.

rather than as universal shortcuts to human treatments. Their limitations are numerous. However, the glass should be seen as half-full rather than half-empty. As it was already demonstrated in a few cases, the real added value of these models is more in their ability to reveal targets and pathways that would be missed by more conventional devices. Thus, they feed the downstream pipeline of drug discovery.

### **Conclusion**

All in all, whole-animal screening based on *C. elegans*, *D. melanogaster* and *D. rerio* appears as a new tool in the drug discovery process. Their added value for drug discovery varies from disease to disease, and mainly depends on what alternative options are. Indeed, they are complementary to *in vitro* and cellular systems because their small size and their culture conditions fulfill the requirements for large-scale screens. Moreover, such approaches may permit the selection of potential therapeutic molecules with an improved safety profile earlier in the drug discovery phase, saving both time and funds. Furthermore, the versatility of these small animals for genetic studies potentially allows the rapid target identification of each lead at a low cost. Such new target may eventually feed the traditional HTS strategy based on target binding or function.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM) and by the European Muscle Development Network (MYORES).

### **Statement of conflicts of interest**

The authors state that they have no conflict of interest.

Arias, AM (2008) *Drosophila melanogaster* and the development of biology in the 20th century. *Methods Mol Biol* **420**: 1-25.

Artal-Sanz, M, de Jong, L, Tavernarakis, N (2006) *Caenorhabditis elegans*: a versatile platform for drug discovery. *Biotechnol J* **1**(12): 1405-1418.

Ashrafi, K, Chang, FY, Watts, JL, Fraser, AG, Kamath, RS, Ahringer, J, Ruvkun, G (2003) Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* **421**(6920): 268-272.

Bajorath, J (2002) Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* **1**(11): 882-894.

Barros, TP, Alderton, WK, Reynolds, HM, Roach, AG, Berghmans, S (2008) Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *Br J Pharmacol* **154**(7): 1400-1413.

Bazopoulou, D, Tavernarakis, N (2009) The NemaGENETAG initiative: large scale transposon insertion gene-tagging in *Caenorhabditis elegans*. *Genetica* **137**(1): 39-46.

Beckwith, LG, Moore, JL, Tsao-Wu, GS, Harshbarger, JC, Cheng, KC (2000) Ethylnitrosourea induces neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Lab Invest* **80**(3): 379-385.

Bernards, A, Hariharan, IK (2001) Of flies and men--studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* **11**(3): 274-278.

Bier, E (2005) *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* **6**(1): 9-23.

Blaise, BJ, Giacomotto, J, Elena, B, Dumas, ME, Toulhoat, P, Segalat, L, Emsley, L (2007) Metabotyping of *Caenorhabditis elegans* reveals latent phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(50): 19808-19812.

Blaise, BJ, Giacomotto, J, Triba, MN, Toulhoat, P, Piotto, M, Emsley, L, Segalat, L, Dumas, ME, Elena, B (2009) Metabolic profiling strategy of *Caenorhabditis elegans* by whole-organism nuclear magnetic resonance. *J Proteome Res* **8**(5): 2542-2550.

Bleicher, KH, Bohm, HJ, Muller, K, Alanine, AI (2003) Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* **2**(5): 369-378.

Botas, J (2007) *Drosophila* researchers focus on human disease. *Nat Genet* **39**(5): 589-591.

Boyd, WA, Smith, MV, Kissling, GE, Freedman, JH (2009) Medium- and high-throughput screening of neurotoxicants using *C. elegans*. *Neurotoxicol Teratol*.

Branson, K, Robie, AA, Bender, J, Perona, P, Dickinson, MH (2009) High-throughput ethomics in large groups of *Drosophila*. *Nat Methods* **6**(6): 451-457.

Breger, J, Fuchs, BB, Aperis, G, Moy, TI, Ausubel, FM, Mylonakis, E (2007) Antifungal chemical

compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathog* **3**(2): e18.

Bretau, S, Lee, S, Guo, S (2004) Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. *Neurotoxicol Teratol* **26**(6): 857-864.

Briese, M, Esmaili, B, Fraboulet, S, Burt, EC, Christodoulou, S, Towers, PR, Davies, KE, Sattelle, DB (2009) Deletion of *smn-1*, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the spinal muscular atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan. *Hum Mol Genet* **18**(1): 97-104.

Buckingham, SD, Sattelle, DB (2008) Strategies for automated analysis of *C. elegans* locomotion. *Invert Neurosci* **8**(3): 121-131.

Burns, AR, Kwok, TC, Howard, A, Houston, E, Johanson, K, Chan, A, Cutler, SR, McCourt, P, Roy, PJ (2006) High-throughput screening of small molecules for bioactivity and target identification in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Protoc* **1**(4): 1906-1914.

Burns, CG, Milan, DJ, Grande, EJ, Rottbauer, W, MacRae, CA, Fishman, MC (2005) High-throughput assay for small molecules that modulate zebrafish embryonic heart rate. *Nat Chem Biol* **1**(5): 263-264.

Campbell, WA, Yang, H, Zetterberg, H, Baulac, S, Sears, JA, Liu, T, Wong, ST, Zhong, TP, Xia, W (2006) Zebrafish lacking Alzheimer presenilin enhancer 2 (*Pen-2*) demonstrate excessive p53-dependent apoptosis and neuronal loss. *J Neurochem* **96**(5): 1423-1440.

Carre-Pierrat, M, Mariol, MC, Chambonnier, L, Laugraud, A, Heskia, F, Giacomotto, J, Segalat, L (2006) Blocking of striated muscle degeneration by serotonin in *C. elegans*. *J Muscle Res Cell Motil* **27**(3-4): 253-258.

Celniker, SE, Rubin, GM (2003) The *Drosophila melanogaster* genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **4**: 89-117.

Chang, HC, Dimlich, DN, Yokokura, T, Mukherjee, A, Kankel, MW, Sen, A, Sridhar, V, Fulga, TA, Hart, AC, Van Vactor, D, Artavanis-Tsakonas, S (2008) Modeling spinal muscular atrophy in *Drosophila*. *PLoS One* **3**(9): e3209.

Chen, N, Harris, TW, Antoshechkin, I, Bastiani, C, Bieri, T, Blasiar, D, Bradnam, K, Canaran, P, Chan, J,



- Chen, CK, Chen, WJ, Cunningham, F, Davis, P, Kenny, E, Kishore, R, Lawson, D, Lee, R, Muller, HM, Nakamura, C, Pai, S, Ozersky, P, Petcherski, A, Rogers, A, Sabo, A, Schwarz, EM, Van Auken, K, Wang, Q, Durbin, R, Spieth, J, Sternberg, PW, Stein, LD (2005) WormBase: a comprehensive data resource for *Caenorhabditis* biology and genomics. *Nucleic Acids Res* **33**(Database issue): D383-389.
- Chico, TJ, Ingham, PW, Crossman, DC (2008) Modeling cardiovascular disease in the zebrafish. *Trends Cardiovasc Med* **18**(4): 150-155.
- Creton, R (2009) Automated analysis of behavior in zebrafish larvae. *Behav Brain Res* **203**(1): 127-136.
- Dankert, H, Wang, L, Hoopfer, ED, Anderson, DJ, Perona, P (2009) Automated monitoring and analysis of social behavior in *Drosophila*. *Nat Methods* **6**(4): 297-303.
- Davidson, AE, Balciunas, D, Mohn, D, Shaffer, J, Hermanson, S, Sivasubbu, S, Cliff, MP, Hackett, PB, Ekker, SC (2003) Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *Dev Biol* **263**(2): 191-202.
- Dionne, MS, Ghori, N, Schneider, DS (2003) *Drosophila melanogaster* is a genetically tractable model host for *Mycobacterium marinum*. *Infect Immun* **71**(6): 3540-3550.
- Doronkin, S, Reiter, LT (2008) *Drosophila* orthologues to human disease genes: an update on progress. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **82**: 1-32.
- Driever, W, Solnica-Krezel, L, Schier, AF, Neuhaus, SC, Malicki, J, Stemple, DL, Stainier, DY, Zwartkruis, F, Abdelilah, S, Rangini, Z, Belak, J, Boggs, C (1996) A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* **123**: 37-46.
- Drysdale, R (2008) FlyBase : a database for the *Drosophila* research community. *Methods Mol Biol* **420**: 45-59.
- Eisen, JS (1996) Zebrafish make a big splash. *Cell* **87**(6): 969-977.
- Ellerbrock, BR, Coscarelli, EM, Gurney, ME, Geary, TG (2004) Screening for presenilin inhibitors using the free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*. *J Biomol Screen* **9**(2): 147-152.
- Esengil, H, Chen, JK (2008) Gene regulation technologies in zebrafish. *Mol Biosyst* **4**(4): 300-308.
- Evanko, D (2006) In praise of manual high-throughput screening. *Nat Methods* **3**(9): 662-663.
- Fire, A, Xu, S, Montgomery, MK, Kostas, SA, Driver, SE, Mello, CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669): 806-811.
- Flinn, L, Breaud, S, Lo, C, Ingham, PW, Bandmann, O (2008) Zebrafish as a new animal model for movement disorders. *J Neurochem* **106**(5): 1991-1997.
- Flinn, L, Mortiboys, H, Volkmann, K, Koster, RW, Ingham, PW, Bandmann, O (2009) Complex I deficiency and dopaminergic neuronal cell loss in parkin-deficient zebrafish (*Danio rerio*). *Brain* **132**(Pt 6): 1613-1623.
- Gerhard, GS (2007) Small laboratory fish as models for aging research. *Ageing Res Rev* **6**(1): 64-72.
- Giacomotto, J, Pertl, C, Borrel, C, Walter, MC, Bulst, S, Johnsen, B, Baillie, DL, Lochmuller, H, Thirion, C, Segalat, L (2009) Evaluation of the therapeutic potential of carbonic anhydrase inhibitors in two animal models of dystrophin deficient muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*.
- Gieseler, K, Grisoni, K, Segalat, L (2000) Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **10**(18): 1092-1097.
- Gill, MS, Olsen, A, Sampayo, JN, Lithgow, GJ (2003) An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* **35**(6): 558-565.
- Grunwald, DJ, Eisen, JS (2002) Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* **3**(9): 717-724.
- Guyon, JR, Mosley, AN, Zhou, Y, O'Brien, KF, Sheng, X, Chiang, K, Davidson, AJ, Volinski, JM, Zon, LI, Kunkel, LM (2003) The dystrophin associated protein complex in zebrafish. *Hum Mol Genet* **12**(6): 601-615.
- Harris, TW, Chen, N, Cunningham, F, Tello-Ruiz, M, Antoshechkin, I, Bastiani, C, Bieri, T, Blasiar, D, Bradnam, K, Chan, J, Chen, CK, Chen, WJ, Davis, P, Kenny, E, Kishore, R, Lawson, D, Lee, R, Muller,

- HM, Nakamura, C, Ozersky, P, Petcherski, A, Rogers, A, Sabo, A, Schwarz, EM, Van Auken, K, Wang, Q, Durbin, R, Spieth, J, Sternberg, PW, Stein, LD (2004) WormBase: a multi-species resource for nematode biology and genomics. *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D411-417.
- Henken, DB, Rasooly, RS, Javois, L, Hewitt, AT (2004) The National Institutes of Health and the growth of the zebrafish as an experimental model organism. *Zebrafish* **1**(2): 105-110.
- Hicks, C, Sorocco, D, Levin, M (2006) Automated analysis of behavior: a computer-controlled system for drug screening and the investigation of learning. *J Neurobiol* **66**(9): 977-990.
- Hong, CC (2009) Large-scale small-molecule screen using zebrafish embryos. *Methods Mol Biol* **486**: 43-55.
- Ingham, PW (2009) The power of the zebrafish for disease analysis. *Hum Mol Genet* **18**(R1): R107-112.
- Jorgensen, EM, Mango, SE (2002) The art and design of genetic screens: caenorhabditis elegans. *Nat Rev Genet* **3**(5): 356-369.
- Kaletta, T, Hengartner, MO (2006) Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism. *Nat Rev Drug Discov* **5**(5): 387-398.
- Kang, HL, Benzer, S, Min, KT (2002) Life extension in Drosophila by feeding a drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(2): 838-843.
- Kennedy, S, Wang, D, Ruvkun, G (2004) A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in C. elegans. *Nature* **427**(6975): 645-649.
- Kenyon, C (2005) The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* **120**(4): 449-460.
- Kuwahara, T, Koyama, A, Koyama, S, Yoshina, S, Ren, CH, Kato, T, Mitani, S, Iwatsubo, T (2008) A systematic RNAi screen reveals involvement of endocytic pathway in neuronal dysfunction in alpha-synuclein transgenic C. elegans. *Hum Mol Genet* **17**(19): 2997-3009.
- Kwok, TC, Ricker, N, Fraser, R, Chan, AW, Burns, A, Stanley, EF, McCourt, P, Cutler, SR, Roy, PJ (2006) A small-molecule screen in C. elegans yields a new calcium channel antagonist. *Nature* **441**(7089): 91-95.
- Langenau, DM, Feng, H, Berghmans, S, Kanki, JP, Kutok, JL, Look, AT (2005a) Cre/lox-regulated transgenic zebrafish model with conditional myc-induced T cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(17): 6068-6073.
- Langenau, DM, Jette, C, Berghmans, S, Palomero, T, Kanki, JP, Kutok, JL, Look, AT (2005b) Suppression of apoptosis by bcl-2 overexpression in lymphoid cells of transgenic zebrafish. *Blood* **105**(8): 3278-3285.
- Langenau, DM, Traver, D, Ferrando, AA, Kutok, JL, Aster, JC, Kanki, JP, Lin, S, Prochownik, E, Trede, NS, Zon, LI, Look, AT (2003) Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science* **299**(5608): 887-890.
- Lehner, B, Tischler, J, Fraser, AG (2006) RNAi screens in Caenorhabditis elegans in a 96-well liquid format and their application to the systematic identification of genetic interactions. *Nat Protoc* **1**(3): 1617-1620.
- Lendahl, U, Orrenius, S (2002) [Sydney Brenner, Robert Horvitz and John Sulston. Winners of the 2002 Nobel Prize in medicine or physiology. Genetic regulation of organ development and programmed cell death]. *Lakartidningen* **99**(41): 4026-4032.
- Leung, MC, Williams, PL, Benedetto, A, Au, C, Helmcke, KJ, Aschner, M, Meyer, JN (2008) Caenorhabditis elegans: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol Sci* **106**(1): 5-28.
- Liau, WS, Gonzalez-Serricchio, AS, Deshommes, C, Chin, K, LaMunyon, CW (2007) A persistent mitochondrial deletion reduces fitness and sperm performance in heteroplasmic populations of C. elegans. *BMC Genet* **8**: 8.
- Lieschke, GJ, Currie, PD (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* **8**(5): 353-367.
- Lindsay, MA (2003) Target discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2**(10): 831-838.
- Link, CD (2006) C. elegans models of age-associated neurodegenerative diseases: lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* **41**(10): 1007-1013.

- Manev, H, Dimitrijevic, N (2004) *Drosophila* model for in vivo pharmacological analgesia research. *Eur J Pharmacol* **491**(2-3): 207-208.
- Matsushima, Y, Adan, C, Garesse, R, Kaguni, LS (2007) Functional analysis by inducible RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Methods Mol Biol* **372**: 207-217.
- Matthews, KA, Kaufman, TC, Gelbart, WM (2005) Research resources for *Drosophila*: the expanding universe. *Nat Rev Genet* **6**(3): 179-193.
- Meli, R, Prasad, A, Patowary, A, Lalwani, MK, Maini, J, Sharma, M, Singh, AR, Kumar, G, Jadhav, V, Scaria, V, Sivasubbu, S (2008) FishMap: a community resource for zebrafish genomics. *Zebrafish* **5**(2): 125-130.
- Mizgireuv, IV, Revskoy, SY (2006) Transplantable tumor lines generated in clonal zebrafish. *Cancer Res* **66**(6): 3120-3125.
- Moy, TI, Ball, AR, Anklesaria, Z, Casadei, G, Lewis, K, Ausubel, FM (2006) Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10414-10419.
- Murphey, RD, Zon, LI (2006) Small molecule screening in the zebrafish. *Methods* **39**(3): 255-261.
- Nagy, A, Perrimon, N, Sandmeyer, S, Plasterk, R (2003) Tailoring the genome: the power of genetic approaches. *Nat Genet* **33** Suppl: 276-284.
- Nasevicius, A, Ekker, SC (2000) Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* **26**(2): 216-220.
- Neely, MN, Pfeifer, JD, Caparon, M (2002) Streptococcus-zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infect Immun* **70**(7): 3904-3914.
- Nichols, CD (2006) *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacol Ther* **112**(3): 677-700.
- Nornes, S, Newman, M, Wells, S, Verdile, G, Martins, RN, Lardelli, M (2009) Independent and cooperative action of Psen2 with Psen1 in zebrafish embryos. *Exp Cell Res*.
- Nusslein-Volhard, C, Wieschaus, E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**(5785): 795-801.
- Ogura, E, Okuda, Y, Kondoh, H, Kamachi, Y (2009) Adaptation of GAL4 activators for GAL4 enhancer trapping in zebrafish. *Dev Dyn* **238**(3): 641-655.
- Page, AP, Johnstone, IL (2007) The cuticle. *WormBook*: 1-15.
- Parng, C, Seng, WL, Semino, C, McGrath, P (2002) Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Technol* **1**(1 Pt 1): 41-48.
- Patton, EE, Widlund, HR, Kutok, JL, Kopani, KR, Amatruda, JF, Murphey, RD, Berghmans, S, Mayhall, EA, Traver, D, Fletcher, CD, Aster, JC, Granter, SR, Look, AT, Lee, C, Fisher, DE, Zon, LI (2005) BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol* **15**(3): 249-254.
- Peng, H, Long, F, Zhou, J, Leung, G, Eisen, MB, Myers, EW (2007) Automatic image analysis for gene expression patterns of fly embryos. *BMC Cell Biol* **8** Suppl 1: S7.
- Perrimon, N, Friedman, A, Mathey-Prevot, B, Eggert, US (2007) Drug-target identification in *Drosophila* cells: combining high-throughput RNAi and small-molecule screens. *Drug Discov Today* **12**(1-2): 28-33.
- Peterson, RT, Nass, R, Boyd, WA, Freedman, JH, Dong, K, Narahashi, T (2008) Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. *Neurotoxicology* **29**(3): 546-555.
- Pulak, R (2006) Techniques for analysis, sorting, and dispensing of *C. elegans* on the COPAS flow-sorting system. *Methods Mol Biol* **351**: 275-286.
- Putchala, GV, Johnson, EM, Jr. (2004) Men are but worms: neuronal cell death in *C. elegans* and vertebrates. *Cell Death Differ* **11**(1): 38-48.
- Ramot, D, Johnson, BE, Berry, TL, Jr., Carnell, L, Goodman, MB (2008) The Parallel Worm Tracker: a platform for measuring average speed and drug-induced paralysis in nematodes. *PLoS One* **3**(5): e2208.
- Reiser, M (2009) The ethomics era? *Nat Methods* **6**(6): 413-414.

- Reiter, LT, Potocki, L, Chien, S, Gribskov, M, Bier, E (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* **11**(6): 1114-1125.
- Restif, C, Metaxas, D (2008) Tracking the swimming motions of *C. elegans* worms with applications in aging studies. *Med Image Comput Comput Assist Interv Int Conf Med Image Comput Comput Assist Interv* **11**(Pt 1): 35-42.
- Rieckher, M, Kourtis, N, Pasparaki, A, Tavernarakis, N (2009) Transgenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Mol Biol* **561**: 21-39.
- Robert, VJ, Katic, I, Bessereau, JL (2009) Mos1 transposition as a tool to engineer the *Caenorhabditis elegans* genome by homologous recombination. *Methods*.
- Roche, J, Lees, J, Packham, I, Chico, T (2009) The zebrafish as a novel tool for cardiovascular drug discovery. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* **4**(1): 1-5.
- Rogalski, TM, Mullen, GP, Bush, JA, Gilchrist, EJ, Moerman, DG (2001) UNC-52/perlecan isoform diversity and function in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 2): 171-176.
- Rohde, CB, Zeng, F, Gonzalez-Rubio, R, Angel, M, Yanik, MF (2007) Microfluidic system for on-chip high-throughput whole-animal sorting and screening at subcellular resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(35): 13891-13895.
- Rosato, E, Kyriacou, CP (2006) Analysis of locomotor activity rhythms in *Drosophila*. *Nat Protoc* **1**(2): 559-568.
- Sabaliauskas, NA, Foutz, CA, Mest, JR, Budgeon, LR, Sidor, AT, Gershenson, JA, Joshi, SB, Cheng, KC (2006) High-throughput zebrafish histology. *Methods* **39**(3): 246-254.
- Schlegel, A, Stainier, DY (2007) Lessons from "lower" organisms: what worms, flies, and zebrafish can teach us about human energy metabolism. *PLoS Genet* **3**(11): e199.
- Schmid, A, DiDonato, CJ (2007) Animal models of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* **22**(8): 1004-1012.
- Segalat, L (2007a) Invertebrate animal models of diseases as screening tools in drug discovery. *ACS Chem Biol* **2**(4): 231-236.
- Segalat, L (2007b) Loss-of-function genetic diseases and the concept of pharmaceutical targets. *Orphanet J Rare Dis* **2**: 30.
- Sharma, P, Keane, J, O'Kane, CJ, Asztalos, Z (2009) Automated measurement of *Drosophila* jump reflex habituation and its use for mutant screening. *J Neurosci Methods*.
- Sieburth, D, Ch'ng, Q, Dybbs, M, Tavazoie, M, Kennedy, S, Wang, D, Dupuy, D, Rual, JF, Hill, DE, Vidal, M, Ruvkun, G, Kaplan, JM (2005) Systematic analysis of genes required for synapse structure and function. *Nature* **436**(7050): 510-517.
- Sifri, CD, Begun, J, Ausubel, FM (2005) The worm has turned--microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Microbiol* **13**(3): 119-127.
- Sleno, L, Emili, A (2008) Proteomic methods for drug target discovery. *Curr Opin Chem Biol* **12**(1): 46-54.
- Smialowska, A, Baumeister, R (2006) Presenilin function in *Caenorhabditis elegans*. *Neurodegener Dis* **3**(4-5): 227-232.
- Solnica-Krezel, L, Schier, AF, Driever, W (1994) Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. *Genetics* **136**(4): 1401-1420.
- Song, Y, Cone, RD (2007) Creation of a genetic model of obesity in a teleost. *FASEB J* **21**(9): 2042-2049.
- Spitsbergen, JM, Tsai, HW, Reddy, A, Miller, T, Arbogast, D, Hendricks, JD, Bailey, GS (2000) Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine by three exposure routes at different developmental stages. *Toxicol Pathol* **28**(5): 716-725.
- Sprague, J, Clements, D, Conlin, T, Edwards, P, Frazer, K, Schaper, K, Segerdell, E, Song, P, Sprunger, B, Westerfield, M (2003) The Zebrafish Information Network (ZFIN): the zebrafish model organism database. *Nucleic Acids Res* **31**(1): 241-243.
- Spring, DR (2005) Chemical genetics to chemical genomics: small molecules offer big insights. *Chem Soc Rev* **34**(6): 472-482.

- Stern, HM, Zon, LI (2003) Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Cancer* **3**(7): 533-539.
- Stiernagle, T (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*: 1-11.
- Stilwell, GE, Saraswati, S, Littleton, JT, Chouinard, SW (2006) Development of a *Drosophila* seizure model for in vivo high-throughput drug screening. *Eur J Neurosci* **24**(8): 2211-2222.
- Streisinger, G, Coale, F, Taggart, C, Walker, C, Grunwald, DJ (1989) Clonal origins of cells in the pigmented retina of the zebrafish eye. *Dev Biol* **131**(1): 60-69.
- Sugimoto, A (2004) High-throughput RNAi in *Caenorhabditis elegans*: genome-wide screens and functional genomics. *Differentiation* **72**(2-3): 81-91.
- Tenor, JL, McCormick, BA, Ausubel, FM, Aballay, A (2004) *Caenorhabditis elegans*-based screen identifies *Salmonella* virulence factors required for conserved host-pathogen interactions. *Curr Biol* **14**(11): 1018-1024.
- Timmons, L, Fire, A (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**(6705): 854.
- Tran, TC, Sneed, B, Haider, J, Blavo, D, White, A, Aiyejorun, T, Baranowski, TC, Rubinstein, AL, Doan, TN, Dingleline, R, Sandberg, EM (2007) Automated, quantitative screening assay for antiangiogenic compounds using transgenic zebrafish. *Cancer Res* **67**(23): 11386-11392.
- Tschepnakis, G, Bianchi, L, Metaxas, D, Driscoll, M (2008) A novel computational approach for simultaneous tracking and feature extraction of *C. elegans* populations in fluid environments. *IEEE Trans Biomed Eng* **55**(5): 1539-1549.
- Tsibidis, GD, Tavernarakis, N (2007) Nemo: a computational tool for analyzing nematode locomotion. *BMC Neurosci* **8**: 86.
- van der Plas, MC, Pilgram, GS, de Jong, AW, Bansraj, MR, Fradkin, LG, Noordermeer, JN (2007) *Drosophila* Dystrophin is required for integrity of the musculature. *Mech Dev* **124**(7-8): 617-630.
- Venken, KJ, Bellen, HJ (2005) Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* **6**(3): 167-178.
- Vogt, A, Cholewinski, A, Shen, X, Nelson, SG, Lazo, JS, Tsang, M, Hukriede, NA (2009) Automated image-based phenotypic analysis in zebrafish embryos. *Dev Dyn* **238**(3): 656-663.
- West, DB, Iakougova, O, Olsson, C, Ross, D, Ohmen, J, Chatterjee, A (2000) Mouse genetics/genomics: an effective approach for drug target discovery and validation. *Med Res Rev* **20**(3): 216-230.
- Westerfield, M (1995) *The Zebrafish Book*. Eugene, OR, University of Oregon Press, 385.
- Whitworth, AJ, Wes, PD, Pallanck, LJ (2006) *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. *Drug Discov Today* **11**(3-4): 119-126.
- Wienholds, E, Schulte-Merker, S, Walderich, B, Plasterk, RH (2002) Target-selected inactivation of the zebrafish *rag1* gene. *Science* **297**(5578): 99-102.
- Winter, MJ, Redfern, WS, Hayfield, AJ, Owen, SF, Valentin, JP, Hutchinson, TH (2008) Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods* **57**(3): 176-187.
- Zhang, JH, Chung, TD, Oldenburg, KR (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **4**(2): 67-73.

**Table 1: Overview of animal models characteristics for drug discovery.**

	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. rerio</i>	<i>M. musculus</i>
<b>Practical issues</b>				
Generation time	3 to 5 days	10 to 14 days	3 to 4 months	3 to 4 weeks
Embryos size	50 μm	100 μm	1 mm	N/A
Adult size	1 mm	3 mm	6 cm	10 cm
Growth conditions	Solid or liquid medium	Solid medium	Liquid medium	Cage
Easiness to obtain individuals for testing	++++	++++	+++	+
<b>Ressource</b>				
Databases	Wormbase (Harris et al., 2004 ; Chen et al., 2005 ; Kaletta et al., 2006)	Flybase (Matthews et al., 2005 ; Drysdale, 2008)	ZFIN (Sprague et al., 2003 ; Henken et al., 2004 ; Meli et al., 2008)	N/A
Stock center	CGC (Stiernagle, 2006)	BDSC (Matthews et al., 2005)	ZIRC (Henken et al., 2004)	N/A
Storage	++++ (frozen)	++	+++ (sperm frozen)	+
Strains available	++++	+++	+	++
Characterized inbred strains	++	++	+	+++
Annual cost	++++	++++	+++	+
<b>Similarity to human</b>				
number of gene (approximately)	19,000	13,000	25,000	25,000
homology to human (genome)	>50 %	>60 %	>70 %	>90%
Anatomical similarity	+	++	+++	++++
Pathological similarity	+	+	++	++++
Molecular and genetic similarity	++	++	+++	++++
<b>Molecular tools</b>				
Targeted gene KO / Time	NO	NO	NO	YES Months
Forward genetic tools	Yes (Jorgensen et al., 2002)	Yes (Venken et al., 2005)	Yes (Solnica-Krezel et al., 1994 ; Amsterdam, 2003)	No
Reverse genetic tools	Yes (Bazopoulou et al., 2009 ; Fire et al., 1998)	Yes (Venken et al., 2005 ; Matsushima et al., 2007)	Yes (Nasevicius et al., 2000 ; Wienholds et al., 2002)	No (Excepted targeted KO)
Generation of transgenic organism	Weeks (Rieckher et al., 2009)	Weeks (Venken et al., 2005)	Months (Ogura et al., 2009 ; Esengil et al., 2008 ; Davidson et al., 2003)	Months
Tissue-specific promoters available	++++	++++	++	+
Antibody reagents	+	+	+	+++
<b>Issues for drug discovery</b>				
Current Use in drug discovery	+	+	++	++++
Available sorting equipment	Eggs to adults (Pulak, 2006 ; Rohde et al., 2007)	Eggs to larvae (Pulak, 2006)	Eggs to embryos (Pulak, 2006)	N/A
Culture in microtiter plate	Eggs to adults	Eggs to larvae	Eggs to larvae	N/A
Equipment cost	++++	++++	+++	+
screening throughput	medium to high	low to medium	low to medium	very low
Examples of chemical screen	Kwok et al., 2006 ; Burns et al., 2006 ; Gill et al., 2003 ; Breger et al., 2007 ; Boyd et al., 2009)	Stihwell et al., 2006	Hong, 2009 ; Murphey et al., 2006 ; Tran et al., 2007 ; Burns et al., 2005	N/A
Review on drug discovery	Segalat, 2007a ; Artal-Sanz et al., 2006 ; Kaletta et al., 2006	Nichols, 2006 ; Whitworth et al., 2006	Lieschke et al., 2007 ; Rocke et al., 2009 ; Parng et al., 2002	N/A

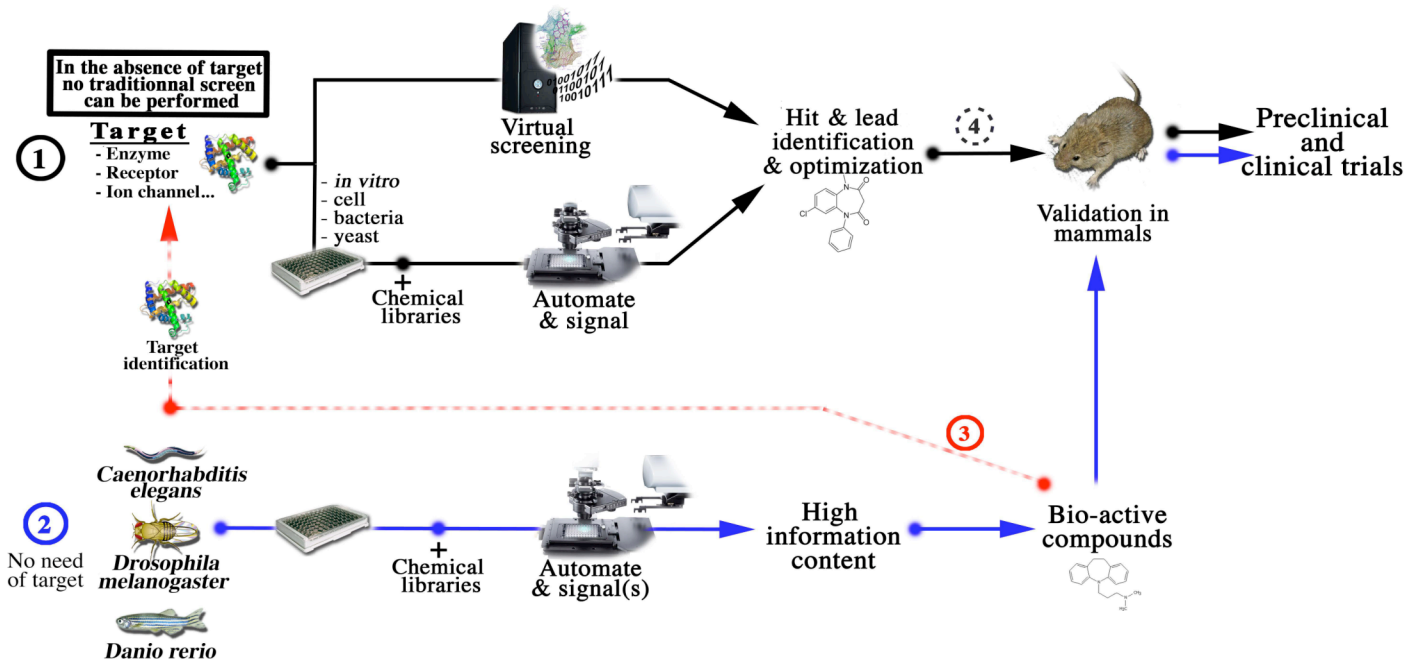
+, ++, +++, +++++, relative strength of the model in each category. CGC : Caenorhabditis Genetics Center, BDSC : Bloomington Drosophila Stock Center, ZFIN : Zebrafish Information Network, ZIRC : Zebrafish International Resource Center.

**Table 2: Example of disease models showing quantifiable defects.**

Disease or disorder	Example of model	Quantifiable phenotype / defect	Ref
<b>Alzheimer's Disease</b>			
<i>C. elegans</i>	Transgenics : Human Beta-amyloid expression Mutants : <i>sel-12</i> , homologue of Human presenilin	Paralysis due to amyloid deposit Egg-laying defect	Link, 2006 Smialowska et al., 2006
<i>D. melanogaster</i>	Transgenics : Human Beta-amyloid expression	Progressive locomotor defects, premature death	Nichols, 2006
<i>D. rerio</i>	Knockdown : Zebrafish <i>psen1</i> or <i>psen2</i> morpholinos injection Knockdown : Zebrafish <i>pen-2</i> morpholinos injection	Developmental and morphological defects Neuronal cells loss	Nornes et al., 2009 Campbell et al., 2006
<b>Parkinson's Disease</b>			
<i>C. elegans</i>	Transgenics : Human Alpha-synuclein expression	Locomotor defects, dopaminergic cell loss	Kuwahara et al., 2008
<i>D. melanogaster</i>	Transgenics : Human Alpha-synuclein expression	Locomotor defects	Nichols, 2006
<i>D. rerio</i>	Knockdown : Zebrafish parkin morpholinos injection Chemical Treatment : PD-inducing neurotoxins	Dopaminergic cell loss Behavioral and locomotor defects	Flinn et al., 2009 Bretaud et al., 2004
<b>Duchenne Muscular Dystrophy</b>			
<i>C. elegans</i>	Mutants : <i>dys-1</i> , homologue of human dystrophin	Progressive muscle degeneration and paralysis	Gieseler et al., 2000
<i>D. melanogaster</i>	RNAi : Reduction of all dystrophin isoform expression	Progressive muscle degeneration and increased pupae lethality	van der Plas et al., 2007
<i>D. rerio</i>	Knockdown : Zebrafish dystrophin morpholinos injection	Locomotor and morphological defects	Guyon et al., 2003
<b>Spinal Muscular Atrophy</b>			
<i>C. elegans</i>	Mutants : <i>smn-1</i> , homologue of human SMN RNAi : Reduction of <i>smn-1</i> expression	Locomotor defects, pharyngeal pumping defects Egg-laying defect	Briese et al., 2009 Briese et al., 2009
<i>D. melanogaster</i>	Mutants : Smn, homologue of human SMN	Larval lethality and developmental defects	Chang et al., 2008
<i>D. rerio</i>	Knockdown : Zebrafish Smn morpholinos injection	Embryonic lethality and developmental defects	Schmid et al., 2007
<b>Other muscular disorders</b>			
<i>C. elegans</i>	Mutants : <i>unc-52</i> , homologue of Human Perlecan	Progressive paralysis	Rogalski et al., 2001
<i>D. melanogaster</i>	Mutants : Drosophila Delta-sarcoglycan	Reduced life span and locomotor defects	Allikian et al., 2007
<i>D. rerio</i>	Mutants : Zebrafish laminin a2 ( <i>sapje</i> or <i>candyfloss</i> ) Mutants : Zebrafish <i>ryr1b</i> , homologue of human RYR1	Progressive detachment of muscle fibres Locomotor defects (Slow swimming behaviour)	Ingham, 2009 Ingham, 2009
<b>Cancer</b>			
<i>D. rerio</i>	Transgenics : Mouse c-myc expression Transgenics : Human <i>BRAF</i> melanocyte-specific expression Chemical carcinogen exposure	Lethal acute lymphoblastic leukemia Malignant melanoma Assorted tumours (Sarcoma, seminoma...)	Langenau et al., 2005a ; Langenau et al., 2003 Patton et al., 2005 Beckwith et al., 2000 ; Spitsbergen et al., 2000
<b>Fat metabolism</b>			
<i>C. elegans</i>	Mutant : <i>daf-2</i>	Fat accumulation	Ashrafi et al., 2003
<i>D. melanogaster</i>	Mutants : <i>Adp</i> (Adipose)	Fat accumulation and sterility	Schlegel et al., 2007
<i>D. rerio</i>	Transgenics : AgRP overexpression (Agouti-related Protein)	Fat accumulation	Song et al., 2007
<b>Pathogen / Immunity</b>			
<i>C. elegans</i>	A variety of Human pathogens	Premature death	Sifri et al., 2005
<i>D. melanogaster</i>	Tuberculosis-like disease ( <i>Mycobacterium marinum</i> )	Premature death	Dionne et al., 2003
<i>D. rerio</i>	Streptococcal infections ( <i>Streptococcus iniae</i> )	Premature death	Neely et al., 2002

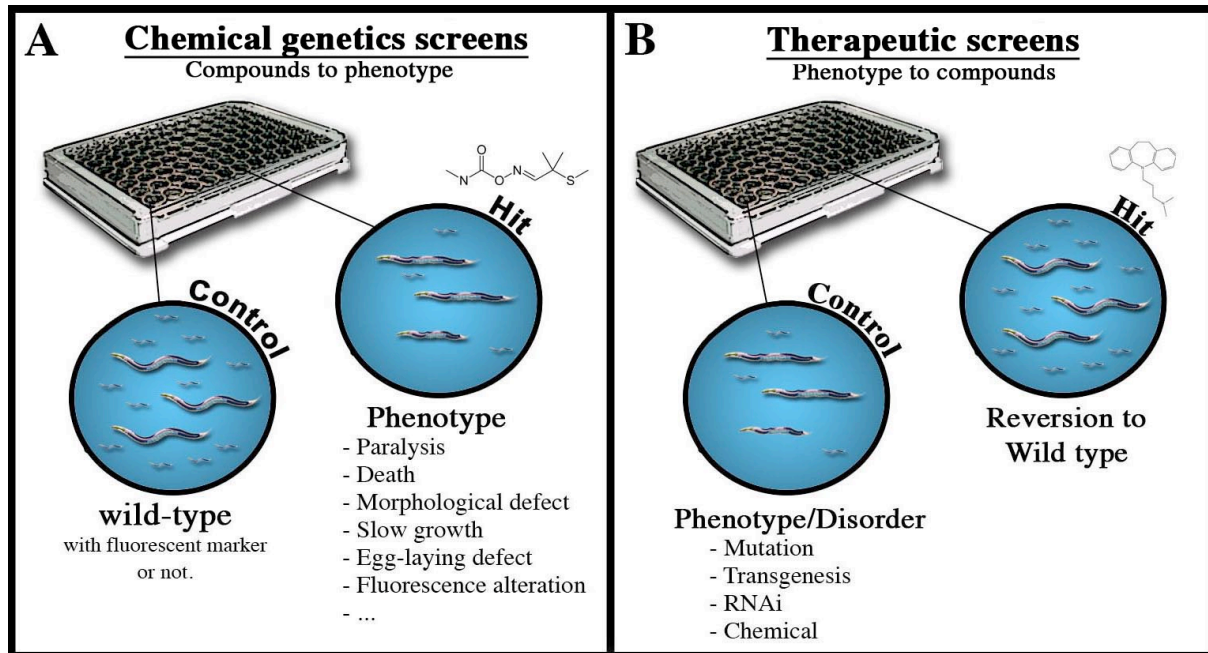
**Table 3 : Example of automated phenotypic observation.**

Example of observation	Example of automatic readout	References
<b><i>C. elegans</i></b>		
Global picture of well	Automated imaging of 24-well plate (solid media)	Burns et al., 2006
Life span / Death	Measurement of fluorescent dye SYTOX (marker of nematode death)	Gill et al., 2003
Egg-laying	Quantification of the chitinase released into the culture medium	Ellerbrock et al., 2004
Locomotion	Measurement of average speed and paralysis into 35 mm petri plates (solid media) Measurement of swimming into multiwell plate (liquid media)	Ramot et al., 2008 ; Tsibidis et al., 2007 Tsechpenakis et al., 2008 ; Restif et al., 2008
Fluorescent cells or tissues	Automated profiling of individual animals into multiwell plate (liquid media)	Pulak, 2006 ; Rohde et al., 2007
<b><i>D. melanogaster</i></b>		
Behaviour & Locomotion	Quantification of locomotor activity rhythms Measurement of jump reflex (habituation / learning) Measurement of aggression and courtship Measurement of locomotion and social behaviours	Branson et al., 2009 Sharma et al., 2009 Dankert et al., 2009 Reiser, 2009
Fluorescent cells or tissues	Automated imaging and analysis of <i>Drosophila</i> embryos	Pulak, 2006 ; Peng et al., 2007
<b><i>D. rerio</i></b>		
Histology overview	Automated process which generate digital larval slides for review and annotation	Sabalaiuskas et al., 2006
Locomotion / Behaviour	Analysis of location and orientation of zebrafish larvae into multiwell plate	Creton, 2009 ; Winter et al., 2008
Fluorescent cells or tissues	Automated imaging and analysis of zebrafish embryos into multiwell plate	Vogt et al., 2009 ; Tran et al., 2007 ; Burns et al., 2005

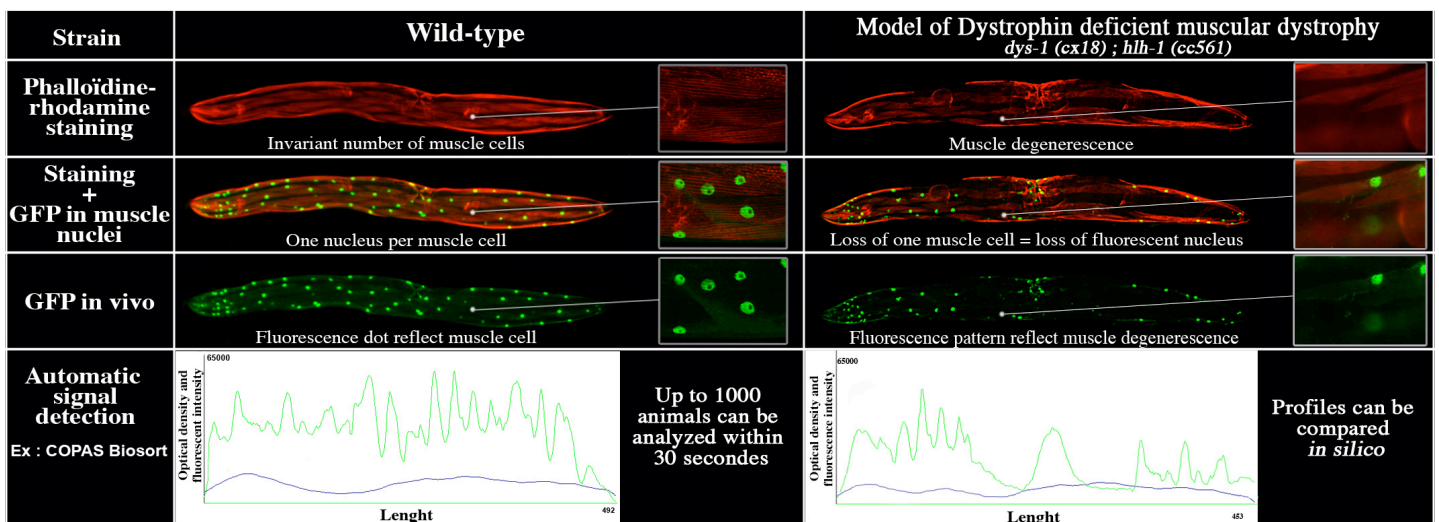


**Figure 1 : Whole-animal screening and drug discovery process.** Black arrows (1) show a schematic view of the different stages which came upon a drug discovery process based on traditional HTS. In the absence of target or in complex mechanism, screen can hardly set up. (2, Blue line) An alternative may come from phenotypic chemical screens with small animal models like *C. elegans*, *D. melanogaster* and *D. rerio*. (3, Red line) Identification of hits in these models may reveals new molecular mechanisms and targets. The target could be further used in traditional HTS. (4) *C. elegans*, *D. melanogaster* and *D. rerio* may also bridge the gap between traditional high-throughput screening and validation in mammalian models.





**Figure 2 :** HTS with whole animals can be separated in two distinct approaches. **A.** Hits are selected for their ability to induce a phenotype in a wild type strain (growth, behaviour, morphology defects or other detectable trait). **B.** Hits are selected for their ability to reverse an abnormal phenotype to the wild-type phenotype. Once a bioactive compound is identified, the flexibility and the versatility of these small animals models may rapidly conduct to understand the mechanism of action of each lead at a low cost.



**Figure 3 :** Example of disease model and engineering with *C. elegans*. Mutations in the *C. elegans* homologue of the human dystrophin result in a progressive paralysis phenotype due to a muscle degeneration. Traditionally, this phenotype is quantitated by manually scoring the number of absent muscle cells after labelling of actin fibers. However, this approach is laborious and time-consuming. The use of a fluorescent marker under the control of tissue-specific promoter allows the *in vivo* quantification of the disorder. Phenotype comparison is possible with the COPAS Biosort which records the fluorescence profile of individual animals (bottom panels).

# **REFERENCES**

## REFERENCES

1. Segalat, L. (2007) Invertebrate animal models of diseases as screening tools in drug discovery. *ACS Chem Biol*, **2**, 231-6.
2. Segalat, L. and Neri, C. (2003) [C. elegans as a model for human inherited degenerative diseases]. *Med Sci (Paris)*, **19**, 1218-25.
3. Gaud, A., Simon, J.M., Witzel, T., Carre-Pierrat, M., Wermuth, C.G. and Segalat, L. (2004) Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul Disord*, **14**, 365-70.
4. Wood, W. (1988) Introduction to C. elegans biology. In: Wood WB, editor. The nematode *Caenorhabditis*, Cold Spring Harbor, New York elegans. *Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
5. Sulston, J., Schierenberg, E., White, J.G., Thomson, J.N. (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, **100**, 64-119.
6. Riddle, D. (1988) The dauer larva. In: Wood WB, editor. The nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press* pp.393-412.
7. Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **77**, 71-94.
8. Sulston, J., and Hodgkin, J. (1988) Methods, In W. B. Wood (Ed.): The nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor laboratory press.*, pp. 587-606.
9. Riddle, D., Blumenthal, T., Meyer, B., and Priess, J. (1997) Introduction to C. elegans. In D. Riddle, T. Blumenthal, B. Meyer, and J. Priess (Eds): C. elegans II. *Cold Spring Harbor laboratory press.* , pp. 1-22.
10. Bargmann, C.I. and Avery, L. (1995) Laser killing of cells in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Cell Biol*, **48**, 225-50.
11. Perkins, L.A., Hedgecock, E.M., Thomson, J.N. and Culotti, J.G. (1986) Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, **117**, 456-87.
12. Smith, H. and Campbell, W.C. (1996) Effect of ivermectin on *Caenorhabditis elegans* larvae previously exposed to alcoholic immobilization. *J Parasitol*, **82**, 187-8.
13. Choy, R.K., Kemner, J.M. and Thomas, J.H. (2006) Fluoxetine-resistance genes in *Caenorhabditis elegans* function in the intestine and may act in drug transport. *Genetics*, **172**, 885-92.
14. Coulson, A., Huynh, C., Kozono, Y. and Shownkeen, R. (1995) The physical map of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Methods Cell Biol*, **48**, 533-50.
15. Reboul, J., Vaglio, P., Tzellas, N., Thierry-Mieg, N., Moore, T., Jackson, C., Shin-i, T., Kohara, Y., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J. *et al.* (2001) Open-reading-frame sequence tags (OSTs) support the existence of at least 17,300 genes in C. elegans. *Nat Genet*, **27**, 332-6.
16. Anderson, P. (1995) Mutagenesis. *Methods Cell Biol*, **48**, 31-58.
17. Zipperlen, P., Nairz, K., Rimann, I., Basler, K., Hafen, E., Hengartner, M. and Hajnal, A. (2005) A universal method for automated gene mapping. *Genome Biol*, **6**, R19.
18. Bazopoulou, D. and Tavernarakis, N. (2009) The NemaGENETAG initiative: large scale transposon insertion gene-tagging in *Caenorhabditis elegans*. *Genetica*.
19. 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.
20. Sharp, P.A. (2001) RNA interference--2001. *Genes Dev*, **15**, 485-90.
21. Tabara, H., Grishok, A. and Mello, C.C. (1998) RNAi in C. elegans: soaking in the genome sequence. *Science*, **282**, 430-1.
22. Timmons, L. and Fire, A. (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, **395**, 854.
23. Simmer, F., Moorman, C., van der Linden, A.M., Kuijk, E., van den Berghe, P.V., Kamath, R.S., Fraser, A.G., Ahringer, J. and Plasterk, R.H. (2003) Genome-wide RNAi of C. elegans using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol*, **1**, E12.
24. Lettre, G., Kritikou, E.A., Jaeggi, M., Calixto, A., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J. and Hengartner, M.O. (2004) Genome-wide RNAi identifies p53-dependent and -independent regulators of germ cell apoptosis in C. elegans. *Cell Death Differ*, **11**, 1198-203.
25. Fire, A. (1986) Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J*, **5**, 2673-2680.
26. Bessou, C., Giuglia, 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.

27. Baylis, H.A., Furuichi, T., Yoshikawa, F., Mikoshiba, K. and Sattelle, D.B. (1999) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are strongly expressed in the nervous system, pharynx, intestine, gonad and excretory cell of *Caenorhabditis elegans* and are encoded by a single gene (*itr-1*). *J Mol Biol*, **294**, 467-76.
28. Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A-S., McNamara, J. O., White, L. E. (2008) Neuroscience, Fourth Edition.
29. Hirsch, N.P. (2007) Neuromuscular junction in health and disease. *Br J Anaesth*, **99**, 132-8.
30. Priora, U., Quaglia, P., Vivalda, M., Giachino-Amista, M.T., Domeneghetti, G. and Sardi, R. (1987) [Infantile spinal muscular atrophy. Description of 2 cases of Werdnig-Hoffmann disease]. *Minerva Pediatr*, **39**, 709-14.
31. Oda, Y. (1999) Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int*, **49**, 921-37.
32. Yamakage, M. and Namiki, A. (2002) Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth*, **49**, 151-64.
33. Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P. and Striessnig, J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*, **57**, 411-25.
34. Naguib, M., Flood, P., McArdle, J.J. and Brenner, H.R. (2002) Advances in neurobiology of the neuromuscular junction: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology*, **96**, 202-31.
35. Ellisman, M.H. (1981) The membrane morphology of the neuromuscular junction, sarcolemma, sarcoplasmic reticulum and transverse tubule system in murine muscular dystrophy studied by freeze-fracture electron microscopy. *Brain Res*, **214**, 261-73.
36. Dolphin, A.C. (2006) A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol*, **147 Suppl 1**, S56-62.
37. Tupling, A.R. (2009) The decay phase of Ca<sup>2+</sup> transients in skeletal muscle: regulation and physiology. *Appl Physiol Nutr Metab*, **34**, 373-6.
38. Serysheva, II (2004) Structural insights into excitation-contraction coupling by electron cryomicroscopy. *Biochemistry (Mosc)*, **69**, 1226-32.
39. Cheng, W., Altafaj, X., Ronjat, M. and Coronado, R. (2005) Interaction between the dihydropyridine receptor Ca<sup>2+</sup> channel beta-subunit and ryanodine receptor type 1 strengthens excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 19225-30.
40. Rios, E. and Brum, G. (1987) Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature*, **325**, 717-20.
41. Rossi, A.E. and Dirksen, R.T. (2006) Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve*, **33**, 715-31.
42. Powell, J.A., Carrasco, M.A., Adams, D.S., Drouet, B., Rios, J., Muller, M., Estrada, M. and Jaimovich, E. (2001) IP<sub>3</sub> receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca(2+) signaling pathway in skeletal muscle. *J Cell Sci*, **114**, 3673-83.
43. Jaimovich, E. and Carrasco, M.A. (2002) IP<sub>3</sub> dependent Ca<sup>2+</sup> signals in muscle cells are involved in regulation of gene expression. *Biol Res*, **35**, 195-202.
44. Masumiya, H., Li, P., Zhang, L. and Chen, S.R. (2001) Ryanodine sensitizes the Ca(2+) release channel (ryanodine receptor) to Ca(2+) activation. *J Biol Chem*, **276**, 39727-35.
45. Takeshima, H., Iino, M., Takekura, H., Nishi, M., Kuno, J., Minowa, O., Takano, H. and Noda, T. (1994) Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature*, **369**, 556-9.
46. Nabauer, M., Callewaert, G., Cleemann, L. and Morad, M. (1989) Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science*, **244**, 800-3.
47. Tanabe, T., Beam, K.G., Powell, J.A. and Numa, S. (1988) Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature*, **336**, 134-9.
48. Pizarro, G., Csernoch, L., Uribe, I., Rodriguez, M. and Rios, E. (1991) The relationship between Q gamma and Ca release from the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle. *J Gen Physiol*, **97**, 913-47.
49. Franzini-Armstrong, C. and Protasi, F. (1997) Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev*, **77**, 699-729.
50. Suarez-Isla, B.A., Iribarra, V., Oberhauser, A., Larralde, L., Bull, R., Hidalgo, C. and Jaimovich, E. (1988) Inositol (1,4,5)-trisphosphate activates a calcium channel in isolated sarcoplasmic reticulum membranes. *Biophys J*, **54**, 737-41.
51. Volpe, P., Di Virgilio, F., Pozzan, T. and Salviati, G. (1986) Role of inositol 1,4,5-trisphosphate in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *FEBS Lett*, **197**, 1-4.
52. Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**, 315-25.

53. De Smedt, H., Missiaen, L., Parys, J.B., Henning, R.H., Sienaert, I., Vanlingen, S., Gijssens, A., Himpens, B. and Casteels, R. (1997) Isoform diversity of the inositol trisphosphate receptor in cell types of mouse origin. *Biochem J*, **322** ( Pt 2), 575-83.
54. Bolton, T.B., Prestwich, S.A., Zholos, A.V. and Gordienko, D.V. (1999) Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu Rev Physiol*, **61**, 85-115.
55. Grunwald, R. and Meissner, G. (1995) Luminal sites and C terminus accessibility of the skeletal muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem*, **270**, 11338-47.
56. Liu, J., Wang, F., Huang, C., Long, L.H., Wu, W.N., Cai, F., Wang, J.H., Ma, L.Q. and Chen, J.G. (2009) Activation of phosphatidylinositol-linked novel D1 dopamine receptor contributes to the calcium mobilization in cultured rat prefrontal cortical astrocytes. *Cell Mol Neurobiol*, **29**, 317-28.
57. Fulton, D., Condro, M.C., Pearce, K. and Glanzman, D.L. (2008) The potential role of postsynaptic phospholipase C activity in synaptic facilitation and behavioral sensitization in Aplysia. *J Neurophysiol*, **100**, 108-16.
58. Liu, Q.H., Zheng, Y.M., Korde, A.S., Yadav, V.R., Rathore, R., Wess, J. and Wang, Y.X. (2009) Membrane depolarization causes a direct activation of G protein-coupled receptors leading to local Ca<sup>2+</sup> release in smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 11418-23.
59. Jaimovich, E., Reyes, R., Liberona, J.L. and Powell, J.A. (2000) IP(3) receptors, IP(3) transients, and nucleus-associated Ca(2+) signals in cultured skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, **278**, C998-C1010.
60. Charge, S.B. and Rudnicki, M.A. (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, **84**, 209-38.
61. Tinsley, J.M., Blake, D.J., Zuellig, R.A. and Davies, K.E. (1994) Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8307-13.
62. Ibraghimov-Beskrovnaya, 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.
63. Ibraghimov-Beskrovnaya, 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.
64. Endo, T. (2005) Aberrant glycosylation of alpha-dystroglycan and congenital muscular dystrophies. *Acta Myol*, **24**, 64-9.
65. Minetti, C., Cordone, G., Beltrame, F., Bado, M. and Bonilla, E. (1998) Disorganization of dystrophin costameric lattice in Becker muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, **21**, 211-6.
66. Nicole, S., Davoine, C.S., Topaloglu, H., Cattolico, L., Barral, D., Beighton, P., Hamida, C.B., Hammouda, H., Cruaud, C., White, P.S. *et al.* (2000) Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). *Nat Genet*, **26**, 480-3.
67. Arikawa-Hirasawa, E., Rossi, S.G., Rotundo, R.L. and Yamada, Y. (2002) Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat Neurosci*, **5**, 119-23.
68. Miyagoe-Suzuki, Y., Nakagawa, M. and Takeda, S. (2000) Merosin and congenital muscular dystrophy. *Microsc Res Tech*, **48**, 181-91.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. Chardin, P., Cussac, D., Maignan, S. and Ducruix, A. (1995) The Grb2 adaptor. *FEBS Lett*, **369**, 47-51.
76. 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.

77. 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.
78. Sotgia, F., Lee, J.K., Das, K., Bedford, M., Petrucci, T.C., Macioce, P., Sargiacomo, M., Bricarelli, F.D., Minetti, C., Sudol, M. *et al.* (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.
79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. Lim, L.E., Duclos, F., Broux, O., Bourg, N., Sunada, Y., Allamand, V., Meyer, J., Richard, I., Moomaw, C., Slaughter, C. *et al.* (1995) Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet*, **11**, 257-65.
84. Noguchi, S., McNally, E.M., Ben Othmane, K., Hagiwara, Y., Mizuno, Y., Yoshida, M., Yamamoto, H., Bonnemann, C.G., Gussoni, E., Denton, P.H. *et al.* (1995) Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science*, **270**, 819-22.
85. Nigro, V., de Sa Moreira, E., Piluso, G., Vainzof, M., Belsito, A., Politano, L., Puca, A.A., Passos-Bueno, M.R. and Zatz, M. (1996) Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet*, **14**, 195-8.
86. Nigro, V., Piluso, G., Belsito, A., Politano, L., Puca, A.A., Papparella, S., Rossi, E., Viglietto, G., Esposito, M.G., Abbondanza, C. *et al.* (1996) Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum Mol Genet*, **5**, 1179-86.
87. 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.
88. 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.
89. Bushby, K.M. (1992) Recent advances in understanding muscular dystrophy. *Arch Dis Child*, **67**, 1310-2.
90. 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.
91. 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.
92. Ahn, A.H. and Kunkel, L.M. (1995) Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J Cell Biol*, **128**, 363-71.
93. 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.
94. 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.
95. Ponting, C.P. and Phillips, C. (1995) DHR domains in syntrophins, neuronal NO synthases and other intracellular proteins. *Trends Biochem Sci*, **20**, 102-3.
96. 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.
97. 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.

98. 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.
99. 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. *et al.* (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*, **84**, 757-67.
100. 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.
101. 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.
102. Gee, S.H., Blacher, R.W., Douville, P.J., Provost, P.R., Yurchenco, P.D. and Carbonetto, S. (1993) Laminin-binding protein 120 from brain is closely related to the dystrophin-associated glycoprotein, dystroglycan, and binds with high affinity to the major heparin binding domain of laminin. *J Biol Chem*, **268**, 14972-80.
103. 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.
104. 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. *et al.* (2006) The sarcolemmal calcium pump, alpha-1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex. *J Biol Chem*, **281**, 23341-8.
105. Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E. and Davies, K.E. (2002) Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*, **82**, 291-329.
106. Roberts, R.G. (2001) Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biol*, **2**, REVIEWS3006.
107. 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.
108. 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.
109. Sadoulet-Puccio, H.M. and Kunkel, L.M. (1996) Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol*, **6**, 25-35.
110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. 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.
114. 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.
115. 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.
116. Ichida, F., Tsubata, S., Bowles, K.R., Haneda, N., Uese, K., Miyawaki, T., Dreyer, W.J., Messina, J., Li, H., Bowles, N.E. *et al.* (2001) Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome. *Circulation*, **103**, 1256-63.
117. de Bono, M. and Maricq, A.V. (2005) Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. *Annu Rev Neurosci*, **28**, 451-501.
118. White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N. and Brenner, S. (1976) The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **275**, 327-48.
119. Waterston, R. (1988) Muscle. In: Wood WB, editor. The nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, pp. 281-335.
120. White, J., Southgate, E., Thompson, J.N., Brenner, S. (1986) The structure of the nervous system of the nematode *C. elegans*. *hil. Trans. R. Soc. London. B. Biol. Sciences*, **314**, 1-340.

121. Liu, Q., Chen, B., Gaier, E., Joshi, J. and Wang, Z.W. (2006) Low conductance gap junctions mediate specific electrical coupling in body-wall muscle cells of *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, **281**, 7881-9.
122. Moerman, D., Fire, A. (1997) Muscle : structure, function, development. In *C. elegans II* (Riddle, Deede). *Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, pp417-470.
123. Jospin, M., Jacquemond, V., Mariol, M.C., Segalat, L. and Allard, B. (2002) The L-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel EGL-19 controls body wall muscle function in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*, **159**, 337-48.
124. 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.
125. Dal Santo, P., Logan, M.A., Chisholm, A.D. and Jorgensen, E.M. (1999) The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in *C. elegans*. *Cell*, **98**, 757-67.
126. Yin, X., Gower, N.J., Baylis, H.A. and Strange, K. (2004) Inositol 1,4,5-trisphosphate signaling regulates rhythmic contractile activity of myoepithelial sheath cells in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*, **15**, 3938-49.
127. Espelt, M.V., Estevez, A.Y., Yin, X. and Strange, K. (2005) Oscillatory Ca<sup>2+</sup> signaling in the isolated *Caenorhabditis elegans* intestine: role of the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor and phospholipases C beta and gamma. *J Gen Physiol*, **126**, 379-92.
128. Gower, N.J., Walker, D.S. and Baylis, H.A. (2005) Inositol 1,4,5-trisphosphate signaling regulates mating behavior in *Caenorhabditis elegans* males. *Mol Biol Cell*, **16**, 3978-86.
129. Thomas-Virnic, C.L., Sims, P.A., Simske, J.S. and Hardin, J. (2004) The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates epidermal cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, **14**, 1882-7.
130. Walker, D.S., Vazquez-Manrique, R.P., Gower, N.J., Gregory, E., Schafer, W.R. and Baylis, H.A. (2009) Inositol 1,4,5-trisphosphate signalling regulates the avoidance response to nose touch in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, **5**, e1000636.
131. Grisoni, K., Martin, E., Gieseler, K., Mariol, M.C. and Segalat, L. (2002) Genetic evidence for a dystrophin-glycoprotein complex (DGC) in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, **294**, 77-86.
132. 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.
133. Avner, P. and Heard, E. (2001) X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet*, **2**, 59-67.
134. Emery, A.E. (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular diseases—a world survey. *Neuromuscul Disord*, **1**, 19-29.
135. 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.
136. Heath, R., Carter, N., Jeffery, S., Edwards, R., Watts, D., Watts, R. and Rodeck, C. (1984) Fetal plasma carbonic anhydrase III and creatine kinase in Duchenne dystrophy. *Ann N Y Acad Sci*, **429**, 620-3.
137. Heath, R., Carter, N.D., Jeffery, S., Edwards, R.J., Watts, D.C. and Watts, R.L. (1985) Evaluation of carrier detection of Duchenne muscular dystrophy using carbonic anhydrase III and creatine kinase. *Am J Med Genet*, **21**, 291-6.
138. Sun, S.C., Peng, Y.S. and He, J.B. (2008) [Changes of serum creatine kinase levels in children with Duchenne muscular dystrophy]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, **10**, 35-7.
139. Hyser, C.L., Griggs, R.C., Mendell, J.R., Polakowska, R., Quirk, S., Brooke, M.H., Fenichel, G.M. and Doherty, R.A. (1987) Use of serum creatine kinase, pyruvate kinase, and genetic linkage for carrier detection in Duchenne and Becker dystrophy. *Neurology*, **37**, 4-10.
140. 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.
141. Becker, P.E. and Kiener, F. (1955) [A new x-chromosomal muscular dystrophy.]. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr*, **193**, 427-48.
142. 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.
143. 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.
144. Roberts, R.G., Coffey, A.J., Bobrow, M. and Bentley, D.R. (1993) Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics*, **16**, 536-8.
145. 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.



146. Koenig, M., Beggs, A.H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Muller, C.R., Lindlof, M., Kaariainen, H. *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.
147. 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.
148. Bork, P. and Sudol, M. (1994) The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci*, **19**, 531-3.
149. 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.
150. Anderson, J.T., Rogers, R.P. and Jarrett, H.W. (1996) Ca<sup>2+</sup>-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem*, **271**, 6605-10.
151. Koenig, M., Monaco, A.P. and Kunkel, L.M. (1988) The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, **53**, 219-28.
152. 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.
153. Ahn, A.H. and Kunkel, L.M. (1993) The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet*, **3**, 283-91.
154. 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.
155. 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.
156. Nishio, H., Takeshima, Y., Narita, N., Yanagawa, H., Suzuki, 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.
157. 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.
158. 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.
159. 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. *et al.* (1993) Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat Genet*, **4**, 82-6.
160. 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.
161. Byers, T.J., Lidov, H.G. and Kunkel, L.M. (1993) An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet*, **4**, 77-81.
162. Rapaport, D., Fuchs, O., Nudel, U. and Yaffe, D. (1992) Expression of the Duchenne muscular dystrophy gene products in embryonic stem cells and their differentiated derivatives. *J Biol Chem*, **267**, 21289-92.
163. Karpati, G. (2002) Dystrophinopathies, In G. Karpati (Ed.): Structural and molecular basis of skeletal muscle diseases, ISN Neuropath Press. *ISN Neuropath Press*, pp. 6-23.
164. 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.
165. 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. *et al.* (1992) Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature*, **360**, 591-3.
166. 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 dystrophin muscularis (dy) locus. *Hum Genet*, **85**, 324-6.
167. 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.
168. Pons, F., Robert, A., Marini, J.F. and Leger, J.J. (1994) Does utrophin expression in muscles of mdx mice during postnatal development functionally compensate for dystrophin deficiency? *J Neurol Sci*, **122**, 162-70.
169. 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.

170. 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.
171. 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.
172. 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.
173. 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.
174. 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.
175. 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.
176. 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.
177. Duncan, C.J. (1978) Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: a strategy for controlling the dystrophic condition. *Experientia*, **34**, 1531-5.
178. Mallouk, N., Jacquemond, V. and Allard, B. (2000) Elevated subsarcolemmal Ca<sup>2+</sup> in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4950-5.
179. Carre-Pierrat, M., Grisoni, K., Gieseler, K., Mariol, M.C., Martin, E., Jospin, M., Allard, B. and Segalat, L. (2006) The SLO-1 BK channel of *Caenorhabditis elegans* is critical for muscle function and is involved in dystrophin-dependent muscle dystrophy. *J Mol Biol*, **358**, 387-95.
180. Mariol, M.C. and Segalat, L. (2001) Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. *Curr Biol*, **11**, 1691-4.
181. Gailly, P. (2002) New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*, **1600**, 38-44.
182. Constantin, B., Sebillle, S. and Cognard, C. (2006) New insights in the regulation of calcium transfers by muscle dystrophin-based cytoskeleton: implications in DMD. *J Muscle Res Cell Motil*, **27**, 375-86.
183. Alderton, J.M. and Steinhardt, R.A. (2000) How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc Med*, **10**, 268-72.
184. 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.
185. Willmann, R., Possekkel, S., Dubach-Powell, J., Meier, T. and Ruegg, M.A. (2009) Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, **19**, 241-9.
186. Collins, C.A. and Morgan, J.E. (2003) Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol*, **84**, 165-72.
187. Wells, D.J. and Wells, K.E. (2005) What do animal models have to tell us regarding Duchenne muscular dystrophy? *Acta Myol*, **24**, 172-80.
188. 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.
189. 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.
190. 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.
191. 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.
192. Muntoni, F., Mateddu, A., Marchei, F., Clerk, A. and Serra, G. (1993) Muscular weakness in the mdx mouse. *J Neurol Sci*, **120**, 71-7.
193. 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.
194. Grounds, M.D. and Torrisi, J. (2004) Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J*, **18**, 676-82.

195. 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.
196. 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.
197. 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. (1997) Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, **90**, 717-27.
198. 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.
199. 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.
200. 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.
201. 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.
202. Deconinck, N., Tinsley, J., De Backer, F., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Davies, K. and Gillis, J.M. (1997) Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice. *Nat Med*, **3**, 1216-21.
203. 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.
204. 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.
205. 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.
206. Anderson, J.E., McIntosh, L.M. and Poettcker, R. (1996) 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.
207. Campbell, E. and Ross, L.F. (2003) Parental attitudes regarding newborn screening of PKU and DMD. *Am J Med Genet A*, **120A**, 209-14.
208. Cossu, G. and Sampaolesi, M. (2007) New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends Mol Med*, **13**, 520-6.
209. 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.
210. 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.
211. 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.
212. Romero, N.B., Braun, S., Benveniste, O., Leturcq, F., Hogrel, J.Y., Morris, G.E., Barois, A., Eymard, B., Payan, C., Ortega, V. *et al.* (2004) Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Gene Ther*, **15**, 1065-76.
213. 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.
214. 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.
215. 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. *et al.* (2002) Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med*, **8**, 253-61.
216. Mouly, V., Aamiri, A., Perie, S., Mamchaoui, K., Barani, A., Bigot, A., Bouazza, B., Francois, V., Furling, D., Jacquemin, V. *et al.* (2005) Myoblast transfer therapy: is there any light at the end of the tunnel? *Acta Myol*, **24**, 128-33.

217. 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.
218. Skuk, D., Roy, B., Goulet, M., Chapdelaine, P., Bouchard, J.P., Roy, R., Dugre, F.J., Lachance, J.G., Deschenes, L., Helene, S. *et al.* (2004) Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells. *Mol Ther*, **9**, 475-82.
219. 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.
220. Minasi, M.G., Riminucci, M., De Angelis, L., Borello, U., Berarducci, B., Innocenzi, A., Caprioli, A., Sirabella, D., Baiocchi, M., De Maria, R. *et al.* (2002) The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*, **129**, 2773-83.
221. Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M. *et al.* (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, **418**, 41-9.
222. Torrente, Y., Belicchi, M., Sampaolesi, M., Pisati, F., Meregalli, M., D'Antona, G., Tonlorenzi, R., Porretti, L., Gavina, M., Mamchaoui, K. *et al.* (2004) Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest*, **114**, 182-95.
223. Dezawa, M., Ishikawa, H., Itokazu, Y., Yoshihara, T., Hoshino, M., Takeda, S., Ide, C. and Nabeshima, Y. (2005) Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*, **309**, 314-7.
224. Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B.G., Messina, G., Morosetti, R. *et al.* (2007) Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol*, **9**, 255-67.
225. Peault, B., Rudnicki, M., Torrente, Y., Cossu, G., Tremblay, J.P., Partridge, T., Gussoni, E., Kunkel, L.M. and Huard, J. (2007) Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther*, **15**, 867-77.
226. Tidball, J.G. and Spencer, M.J. (2003) Skipping to new gene therapies for muscular dystrophy. *Nat Med*, **9**, 997-8.
227. Lu, Q.L., Mann, C.J., Lou, F., Bou-Gharios, G., Morris, G.E., Xue, S.A., Fletcher, S., Partridge, T.A. and Wilton, S.D. (2003) Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med*, **9**, 1009-14.
228. Arechavala-Gomez, V., Graham, I.R., Popplewell, L.J., Adams, A.M., Aartsma-Rus, A., Kinali, M., Morgan, J.E., van Deutekom, J.C., Wilton, S.D., Dickson, G. *et al.* (2007) Comparative analysis of antisense oligonucleotide sequences for targeted skipping of exon 51 during dystrophin pre-mRNA splicing in human muscle. *Hum Gene Ther*, **18**, 798-810.
229. Aartsma-Rus, A., Janson, A.A., Kaman, W.E., Bremmer-Bout, M., den Dunnen, J.T., Baas, F., van Ommen, G.J. and van Deutekom, J.C. (2003) Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet*, **12**, 907-14.
230. Bremmer-Bout, M., Aartsma-Rus, A., de Meijer, E.J., Kaman, W.E., Janson, A.A., Vossen, R.H., van Ommen, G.J., den Dunnen, J.T. and van Deutekom, J.C. (2004) Targeted exon skipping in transgenic hDMD mice: A model for direct preclinical screening of human-specific antisense oligonucleotides. *Mol Ther*, **10**, 232-40.
231. Alter, J., Lou, F., Rabinowitz, A., Yin, H., Rosenfeld, J., Wilton, S.D., Partridge, T.A. and Lu, Q.L. (2006) Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med*, **12**, 175-7.
232. Howard, M.T., Shirts, B.H., Petros, L.M., Flanigan, K.M., Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. (2000) Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*, **48**, 164-9.
233. Welch, E.M., Barton, E.R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W.J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C.R., Hwang, S. *et al.* (2007) PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, **447**, 87-91.
234. Hirawat, S., Welch, E.M., Elfring, G.L., Northcutt, V.J., Paushkin, S., Hwang, S., Leonard, E.M., Almstead, N.G., Ju, W., Peltz, S.W. *et al.* (2007) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J Clin Pharmacol*, **47**, 430-44.
235. Tinsley, J., Deconinck, N., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Gillis, J.M. and Davies, K. (1998) Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med*, **4**, 1441-4.

236. Radley, H.G., De Luca, A., Lynch, G.S. and Grounds, M.D. (2007) Duchenne muscular dystrophy: focus on pharmaceutical and nutritional interventions. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 469-77.
237. Strober, J.B. (2006) Therapeutics in duchenne muscular dystrophy. *NeuroRx*, **3**, 225-34.
238. Rodino-Klapac, L.R., Chicoine, L.G., Kaspar, B.K. and Mendell, J.R. (2007) Gene therapy for duchenne muscular dystrophy: expectations and challenges. *Arch Neurol*, **64**, 1236-41.
239. 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.
240. De Luca, A., Pierno, S., Liantonio, A., Cetrone, M., Camerino, C., Frayssse, 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.
241. 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.
242. 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.
243. Gieseler, K., Abdel-Dayem, M. and Segalat, L. (1999) In vitro interactions of Caenorhabditis elegans dystrophin with dystrobrevin and syntrophin. *FEBS Lett*, **461**, 59-62.
244. Giuglia, J., Gieseler, K., Arpagaus, M. and Segalat, L. (1999) Mutations in the dystrophin-like dys-1 gene of Caenorhabditis elegans result in reduced acetylcholinesterase activity. *FEBS Lett*, **463**, 270-2.
245. Miller, K.G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J.A., Johnson, C.D. and Rand, J.B. (1996) A genetic selection for Caenorhabditis elegans synaptic transmission mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12593-8.
246. 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*, **88**, 642-9.
247. 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.
248. 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.
249. 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.
250. De Recondo, J., and De Recondo, A.M. (2001) Le muscle normal, . In J. De Recondo, and A.-M. De Recondo (Eds): *Pathologie du muscle strié*, Flammarion, Paris, pp. 1-24.
251. Pearn, J. (1978) Genetic studies of acute infantile spinal muscular atrophy (SMA type I). An analysis of sex ratios, segregation ratios, and sex influence. *J Med Genet*, **15**, 414-7.
252. Pearn, J. (1980) Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet*, **1**, 919-22.
253. Echaniz-Laguna, A., Miniou, P., Bartholdi, D. and Melki, J. (1999) The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements. *Am J Hum Genet*, **64**, 1365-70.
254. Monani, U.R., McPherson, J.D. and Burghes, A.H. (1999) Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochim Biophys Acta*, **1445**, 330-6.
255. Battaglia, G., Princivalle, A., Forti, F., Lizier, C. and Zeviani, M. (1997) Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. *Hum Mol Genet*, **6**, 1961-71.
256. Liu, Q. and Dreyfuss, G. (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J*, **15**, 3555-65.
257. Cifuentes-Diaz, C., Frugier, T., Tiziano, F.D., Lacene, E., Roblot, N., Joshi, V., Moreau, M.H. and Melki, J. (2001) Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J Cell Biol*, **152**, 1107-14.
258. Frugier, T., Tiziano, F.D., Cifuentes-Diaz, C., Miniou, P., Roblot, N., Dierich, A., Le Meur, M. and Melki, J. (2000) Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **9**, 849-58.
259. Nicole, S., Diaz, C.C., Frugier, T. and Melki, J. (2002) Spinal muscular atrophy: recent advances and future prospects. *Muscle Nerve*, **26**, 4-13.
260. Bach, J.R., Vega, J., Majors, J. and Friedman, A. (2003) Spinal muscular atrophy type 1 quality of life. *Am J Phys Med Rehabil*, **82**, 137-42.
261. Bach, J.R. and Bianchi, C. (2003) Prevention of pectus excavatum for children with spinal muscular atrophy type 1. *Am J Phys Med Rehabil*, **82**, 815-9.

262. Araki, S., Hayashi, M., Tamagawa, K., Saito, M., Kato, S., Komori, T., Sakakihara, Y., Mizutani, T. and Oda, M. (2003) Neuropathological analysis in spinal muscular atrophy type II. *Acta Neuropathol*, **106**, 441-8.
263. Brzustowicz, L.M., Lehner, T., Castilla, L.H., Penchaszadeh, G.K., Wilhelmsen, K.C., Daniels, R., Davies, K.E., Leppert, M., Ziter, F., Wood, D. *et al.* (1990) Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature*, **344**, 540-1.
264. Gilliam, T.C., Brzustowicz, L.M., Castilla, L.H., Lehner, T., Penchaszadeh, G.K., Daniels, R.J., Byth, B.C., Knowles, J., Hislop, J.E., Shapira, Y. *et al.* (1990) Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature*, **345**, 823-5.
265. Francis, M.J., Morrison, K.E., Campbell, L., Grewal, P.K., Christodoulou, Z., Daniels, R.J., Monaco, A.P., Frischauf, A.M., McPherson, J., Wasmuth, J. *et al.* (1993) A contig of non-chimaeric YACs containing the spinal muscular atrophy gene in 5q13. *Hum Mol Genet*, **2**, 1161-7.
266. Melki, J., Lefebvre, S., Burglen, L., Burlet, P., Clermont, O., Millasseau, P., Reboullet, S., Benichou, B., Zeviani, M., Le Paslier, D. *et al.* (1994) De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science*, **264**, 1474-7.
267. Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M. *et al.* (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, **80**, 155-65.
268. Roy, N., Mahadevan, M.S., McLean, M., Shutler, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X. *et al.* (1995) The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*, **80**, 167-78.
269. Burglen, L., Seroz, T., Miniou, P., Lefebvre, S., Burlet, P., Munnich, A., Pequignot, E.V., Egly, J.M. and Melki, J. (1997) The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIF, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Hum Genet*, **60**, 72-9.
270. Rochette, C.F., Gilbert, N. and Simard, L.R. (2001) SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. *Hum Genet*, **108**, 255-66.
271. Burglen, L., Lefebvre, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Cruaud, C., Munnich, A. and Melki, J. (1996) Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics*, **32**, 479-82.
272. Chen, Q., Baird, S.D., Mahadevan, M., Besner-Johnston, A., Farahani, R., Xuan, J., Kang, X., Lefebvre, C., Ikeda, J.E., Korneluk, R.G. *et al.* (1998) Sequence of a 131-kb region of 5q13.1 containing the spinal muscular atrophy candidate genes SMN and NAIP. *Genomics*, **48**, 121-7.
273. Hahnen, E., Schonling, J., Rudnik-Schoneborn, S., Raschke, H., Zerres, K. and Wirth, B. (1997) Missense mutations in exon 6 of the survival motor neuron gene in patients with spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mol Genet*, **6**, 821-5.
274. Lorson, C.L., Strasswimmer, J., Yao, J.M., Baleja, J.D., Hahnen, E., Wirth, B., Le, T., Burghes, A.H. and Androphy, E.J. (1998) SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet*, **19**, 63-6.
275. Wirth, B., Herz, M., Wetter, A., Moskau, S., Hahnen, E., Rudnik-Schoneborn, S., Wienker, T. and Zerres, K. (1999) Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet*, **64**, 1340-56.
276. Monani, U.R., Lorson, C.L., Parsons, D.W., Prior, T.W., Androphy, E.J., Burghes, A.H. and McPherson, J.D. (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet*, **8**, 1177-83.
277. Pellizzoni, L., Charroux, B. and Dreyfuss, G. (1999) SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11167-72.
278. Lorson, C.L. and Androphy, E.J. (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet*, **9**, 259-65.
279. Germain-Desprez, D., Brun, T., Rochette, C., Semionov, A., Rouget, R. and Simard, L.R. (2001) The SMN genes are subject to transcriptional regulation during cellular differentiation. *Gene*, **279**, 109-17.
280. Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J. and Wirth, B. (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6307-11.
281. Coovert, D.D., Le, T.T., McAndrew, P.E., Strasswimmer, J., Crawford, T.O., Mendell, J.R., Coulson, S.E., Androphy, E.J., Prior, T.W. and Burghes, A.H. (1997) The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **6**, 1205-14.
282. Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G. and Melki, J. (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*, **16**, 265-9.

283. Jarecki, J., Chen, X., Bernardino, A., Coovert, D.D., Whitney, M., Burghes, A., Stack, J. and Pollok, B.A. (2005) Diverse small-molecule modulators of SMN expression found by high-throughput compound screening: early leads towards a therapeutic for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **14**, 2003-18.
284. Liu, Q., Fischer, U., Wang, F. and Dreyfuss, G. (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell*, **90**, 1013-21.
285. Latchman, D.S. (1990) Cell-type-specific splicing factors and the regulation of alternative RNA splicing. *New Biol*, **2**, 297-303.
286. Paushkin, S., Gubitz, A.K., Massenet, S. and Dreyfuss, G. (2002) The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 305-12.
287. Fischer, U., Liu, Q. and Dreyfuss, G. (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell*, **90**, 1023-9.
288. Sagot, Y., Vejsada, R. and Kato, A.C. (1997) Clinical and molecular aspects of motoneuron diseases: animal models, neurotrophic factors and Bcl-2 oncoprotein. *Trends Pharmacol Sci*, **18**, 330-7.
289. Iwahashi, H., Eguchi, Y., Yasuhara, N., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y. and Tsujimoto, Y. (1997) Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy. *Nature*, **390**, 413-7.
290. Vyas, S., Bechade, C., Riveau, B., Downward, J. and Triller, A. (2002) Involvement of survival motor neuron (SMN) protein in cell death. *Hum Mol Genet*, **11**, 2751-64.
291. Broccolini, A., Engel, W.K. and Askanas, V. (1999) Localization of survival motor neuron protein in human apoptotic-like and regenerating muscle fibers, and neuromuscular junctions. *Neuroreport*, **10**, 1637-41.
292. Hsieh-Li, H.M., Chang, J.G., Jong, Y.J., Wu, M.H., Wang, N.M., Tsai, C.H. and Li, H. (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet*, **24**, 66-70.
293. Monani, U.R., Sendtner, M., Coovert, D.D., Parsons, D.W., Andreassi, C., Le, T.T., Jablonka, S., Schrank, B., Rossoll, W., Prior, T.W. *et al.* (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*(<sup>-/-</sup>) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **9**, 333-9.
294. Jablonka, S., Schrank, B., Kralewski, M., Rossoll, W. and Sendtner, M. (2000) Reduced survival motor neuron (*Smn*) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum Mol Genet*, **9**, 341-6.
295. Baron-Delage, S., Abadie, A., Echaniz-Laguna, A., Melki, J. and Beretta, L. (2000) Interferons and IRF-1 induce expression of the survival motor neuron (SMN) genes. *Mol Med*, **6**, 957-68.
296. Zhang, M.L., Lorson, C.L., Androphy, E.J. and Zhou, J. (2001) An in vivo reporter system for measuring increased inclusion of exon 7 in SMN2 mRNA: potential therapy of SMA. *Gene Ther*, **8**, 1532-8.
297. Chang, J.G., Hsieh-Li, H.M., Jong, Y.J., Wang, N.M., Tsai, C.H. and Li, H. (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9808-13.
298. Wirth, B., Brichta, L. and Hahnen, E. (2006) Spinal muscular atrophy and therapeutic prospects. *Prog Mol Subcell Biol*, **44**, 109-32.
299. Wirth, B., Brichta, L. and Hahnen, E. (2006) Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. *Semin Pediatr Neurol*, **13**, 121-31.
300. Swoboda, K.J., Scott, C.B., Reyna, S.P., Prior, T.W., LaSalle, B., Sorenson, S.L., Wood, J., Acsadi, G., Crawford, T.O., Kissel, J.T. *et al.* (2009) Phase II open label study of valproic acid in spinal muscular atrophy. *PLoS One*, **4**, e5268.
301. Bordet, T., Buisson, B., Michaud, M., Drouot, C., Galea, P., Delaage, P., Akentieva, N.P., Evers, A.S., Covey, D.F., Ostuni, M.A. *et al.* (2007) Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther*, **322**, 709-20.
302. Haddad, H., Cifuentes-Diaz, C., Miroglio, A., Roblot, N., Joshi, V. and Melki, J. (2003) Riluzole attenuates spinal muscular atrophy disease progression in a mouse model. *Muscle Nerve*, **28**, 432-7.
303. Bosboom, W.M., Vrancken, A.F., van den Berg, L.H., Wokke, J.H. and Iannaccone, S.T. (2009) Drug treatment for spinal muscular atrophy types II and III. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006282.
304. Bosboom, W.M., Vrancken, A.F., van den Berg, L.H., Wokke, J.H. and Iannaccone, S.T. (2009) Drug treatment for spinal muscular atrophy type I. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006281.
305. DiDonato, C.J., Parks, R.J. and Kothary, R. (2003) Development of a gene therapy strategy for the restoration of survival motor neuron protein expression: implications for spinal muscular atrophy therapy. *Hum Gene Ther*, **14**, 179-88.

306. Miguel-Aliaga, I., Culetto, E., Walker, D.S., Baylis, H.A., Sattelle, D.B. and Davies, K.E. (1999) The *Caenorhabditis elegans* orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability. *Hum Mol Genet*, **8**, 2133-43.
307. Gumieny, T.L., Lambie, E., Hartwig, E., Horvitz, H.R. and Hengartner, M.O. (1999) Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development*, **126**, 1011-22.
308. Morita, Y. and Tilly, J.L. (1999) Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol*, **213**, 1-17.
309. Briese, M., Esmaeili, B., Fraboulet, S., Burt, E.C., Christodoulou, S., Towers, P.R., Davies, K.E. and Sattelle, D.B. (2009) Deletion of *smn-1*, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the spinal muscular atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan. *Hum Mol Genet*, **18**, 97-104.
310. Stinchcomb, D.T., Shaw, J.E., Carr, S.H. and Hirsh, D. (1985) Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol*, **5**, 3484-96.
311. Schwartz, O. and Jampel, R.S. (1962) Congenital blepharophimosis associated with a unique generalized myopathy. *Arch Ophthalmol*, **68**, 52-7.
312. Aberfeld, D.C., Hinterbuchner, L.P. and Schneider, M. (1965) Myotonia, dwarfism, diffuse bone disease and unusual ocular and facial abnormalities (a new syndrome). *Brain*, **88**, 313-22.
313. Stum, M., Davoine, C.S., Vicart, S., Guillot-Noel, L., Topaloglu, H., Carod-Artal, F.J., Kayserili, H., Hentati, F., Merlini, L., Urtizberea, J.A. *et al.* (2006) Spectrum of HSPG2 (Perlecan) mutations in patients with Schwartz-Jampel syndrome. *Hum Mutat*, **27**, 1082-91.
314. Giedion, A. (1997) Heterogeneity in Schwartz-Jampel chondrodystrophic myotonia. *Pediatr Radiol*, **27**, 454.
315. 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. *et al.* (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.
316. Cohen, I.R., Grassel, S., Murdoch, A.D. and Iozzo, R.V. (1993) Structural characterization of the complete human perlecan gene and its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10404-8.
317. Costell, M., Mann, K., Yamada, Y. and Timpl, R. (1997) Characterization of recombinant perlecan domain I and its substitution by glycosaminoglycans and oligosaccharides. *Eur J Biochem*, **243**, 115-21.
318. Dolan, M., Horchar, T., Rigatti, B. and Hassell, J.R. (1997) Identification of sites in domain I of perlecan that regulate heparan sulfate synthesis. *J Biol Chem*, **272**, 4316-22.
319. Schulze, B., Sasaki, T., Costell, M., Mann, K. and Timpl, R. (1996) Structural and cell-adhesive properties of three recombinant fragments derived from perlecan domain III. *Matrix Biol*, **15**, 349-57.
320. Knox, S., Fosang, A.J., Last, K., Melrose, J. and Whitelock, J. (2005) Perlecan from human epithelial cells is a hybrid heparan/chondroitin/keratan sulfate proteoglycan. *FEBS Lett*, **579**, 5019-23.
321. Stum, M., Girard, E., Bangratz, M., Bernard, V., Herbin, M., Vignaud, A., Ferry, A., Davoine, C.S., Echaniz-Laguna, A., Rene, F. *et al.* (2008) Evidence of a dosage effect and a physiological endplate acetylcholinesterase deficiency in the first mouse models mimicking Schwartz-Jampel syndrome neuromyotonia. *Hum Mol Genet*, **17**, 3166-79.
322. Couchman, J.R. and Ljubimov, A.V. (1989) Mammalian tissue distribution of a large heparan sulfate proteoglycan detected by monoclonal antibodies. *Matrix*, **9**, 311-21.
323. Murdoch, A.D., Liu, B., Schwarting, R., Tuan, R.S. and Iozzo, R.V. (1994) Widespread expression of perlecan proteoglycan in basement membranes and extracellular matrices of human tissues as detected by a novel monoclonal antibody against domain III and by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*, **42**, 239-49.
324. SundarRaj, N., Fite, D., Ledbetter, S., Chakravarti, S. and Hassell, J.R. (1995) Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment. *J Cell Sci*, **108** ( Pt 7), 2663-72.
325. Handler, M., Yurchenco, P.D. and Iozzo, R.V. (1997) Developmental expression of perlecan during murine embryogenesis. *Dev Dyn*, **210**, 130-45.
326. Melrose, J., Smith, S. and Whitelock, J. (2004) Perlecan immunolocalizes to perichondrial vessels and canals in human fetal cartilaginous primordia in early vascular and matrix remodeling events associated with diarthrodial joint development. *J Histochem Cytochem*, **52**, 1405-13.
327. Iozzo, R.V. (2005) Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 646-56.
328. Knox, S.M. and Whitelock, J.M. (2006) Perlecan: how does one molecule do so many things? *Cell Mol Life Sci*, **63**, 2435-45.
329. Sasaki, T., Costell, M., Mann, K. and Timpl, R. (1998) Inhibition of glycosaminoglycan modification of perlecan domain I by site-directed mutagenesis changes protease sensitivity and laminin-1 binding activity. *FEBS Lett*, **435**, 169-72.



330. Rothblum, K., Stahl, R.C. and Carey, D.J. (2004) Constitutive release of alpha4 type V collagen N-terminal domain by Schwann cells and binding to cell surface and extracellular matrix heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, **279**, 51282-8.
331. Yurchenco, P.D., Cheng, Y.S. and Ruben, G.C. (1987) Self-assembly of a high molecular weight basement membrane heparan sulfate proteoglycan into dimers and oligomers. *J Biol Chem*, **262**, 17668-76.
332. Brown, J.C., Sasaki, T., Gohring, W., Yamada, Y. and Timpl, R. (1997) The C-terminal domain V of perlecan promotes beta1 integrin-mediated cell adhesion, binds heparin, nidogen and fibulin-2 and can be modified by glycosaminoglycans. *Eur J Biochem*, **250**, 39-46.
333. Friedrich, M.V., Gohring, W., Morgelin, M., Brancaccio, A., David, G. and Timpl, R. (1999) Structural basis of glycosaminoglycan modification and of heterotypic interactions of perlecan domain V. *J Mol Biol*, **294**, 259-70.
334. Hopf, M., Gohring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y. and Timpl, R. (1999) Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur J Biochem*, **259**, 917-25.
335. Hopf, M., Gohring, W., Mann, K. and Timpl, R. (2001) Mapping of binding sites for nidogens, fibulin-2, fibronectin and heparin to different IG modules of perlecan. *J Mol Biol*, **311**, 529-41.
336. Whitelock, J.M., Graham, L.D., Melrose, J., Murdoch, A.D., Iozzo, R.V. and Underwood, P.A. (1999) Human perlecan immunopurified from different endothelial cell sources has different adhesive properties for vascular cells. *Matrix Biol*, **18**, 163-78.
337. Tiedemann, K., Sasaki, T., Gustafsson, E., Gohring, W., Batge, B., Notbohm, H., Timpl, R., Wedel, T., Schlotzer-Schrehardt, U. and Reinhardt, D.P. (2005) Microfibrils at basement membrane zones interact with perlecan via fibrillin-1. *J Biol Chem*, **280**, 11404-12.
338. Allen, J.M., Bateman, J.F., Hansen, U., Wilson, R., Bruckner, P., Owens, R.T., Sasaki, T., Timpl, R. and Fitzgerald, J. (2006) WARP is a novel multimeric component of the chondrocyte pericellular matrix that interacts with perlecan. *J Biol Chem*, **281**, 7341-9.
339. Hummel, S., Osanger, A., Bajari, T.M., Balasubramani, M., Halfter, W., Nimpf, J. and Schneider, W.J. (2004) Extracellular matrices of the avian ovarian follicle. Molecular characterization of chicken perlecan. *J Biol Chem*, **279**, 23486-94.
340. Gohring, W., Sasaki, T., Heldin, C.H. and Timpl, R. (1998) Mapping of the binding of platelet-derived growth factor to distinct domains of the basement membrane proteins BM-40 and perlecan and distinction from the BM-40 collagen-binding epitope. *Eur J Biochem*, **255**, 60-6.
341. Mongiat, M., Taylor, K., Otto, J., Aho, S., Uitto, J., Whitelock, J.M. and Iozzo, R.V. (2000) The protein core of the proteoglycan perlecan binds specifically to fibroblast growth factor-7. *J Biol Chem*, **275**, 7095-100.
342. Sasaki, T., Larsson, H., Tisi, D., Claesson-Welsh, L., Hohenester, E. and Timpl, R. (2000) Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity. *J Mol Biol*, **301**, 1179-90.
343. Gonzalez, E.M., Reed, C.C., Bix, G., Fu, J., Zhang, Y., Gopalakrishnan, B., Greenspan, D.S. and Iozzo, R.V. (2005) BMP-1/Tolloid-like metalloproteases process endorepellin, the angiostatic C-terminal fragment of perlecan. *J Biol Chem*, **280**, 7080-7.
344. Bix, G., Fu, J., Gonzalez, E.M., Macro, L., Barker, A., Campbell, S., Zutter, M.M., Santoro, S.A., Kim, J.K., Hook, M. *et al.* (2004) Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through alpha2beta1 integrin. *J Cell Biol*, **166**, 97-109.
345. Mongiat, M., Fu, J., Oldershaw, R., Greenhalgh, R., Gown, A.M. and Iozzo, R.V. (2003) Perlecan protein core interacts with extracellular matrix protein 1 (ECM1), a glycoprotein involved in bone formation and angiogenesis. *J Biol Chem*, **278**, 17491-9.
346. Tapanadechopone, P., Hassell, J.R., Rigatti, B. and Couchman, J.R. (1999) Localization of glycosaminoglycan substitution sites on domain V of mouse perlecan. *Biochem Biophys Res Commun*, **265**, 680-90.
347. Talts, J.F., Andac, Z., Gohring, W., Brancaccio, A. and Timpl, R. (1999) Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J*, **18**, 863-70.
348. Tu, H., Sasaki, T., Snellman, A., Gohring, W., Pirila, P., Timpl, R. and Pihlajaniemi, T. (2002) The type XIII collagen ectodomain is a 150-nm rod and capable of binding to fibronectin, nidogen-2, perlecan, and heparin. *J Biol Chem*, **277**, 23092-9.
349. Kanagawa, M., Michele, D.E., Satz, J.S., Barresi, R., Kusano, H., Sasaki, T., Timpl, R., Henry, M.D. and Campbell, K.P. (2005) Disruption of perlecan binding and matrix assembly by post-translational or genetic disruption of dystroglycan function. *FEBS Lett*, **579**, 4792-6.

350. Cartaud, A., Stochlic, L., Guerra, M., Blanchard, B., Lambergeon, M., Krejci, E., Cartaud, J. and Legay, C. (2004) MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol*, **165**, 505-15.
351. Walker, H.A., Whitelock, J.M., Garl, P.J., Nemenoff, R.A., Stenmark, K.R. and Weiser-Evans, M.C. (2003) Perlecan up-regulation of FRNK suppresses smooth muscle cell proliferation via inhibition of FAK signaling. *Mol Biol Cell*, **14**, 1941-52.
352. Gonzalez, E.M., Mongiat, M., Slater, S.J., Baffa, R. and Iozzo, R.V. (2003) A novel interaction between perlecan protein core and progranulin: potential effects on tumor growth. *J Biol Chem*, **278**, 38113-6.
353. French, M.M., Gomes, R.R., Jr., Timpl, R., Hook, M., Czymmek, K., Farach-Carson, M.C. and Carson, D.D. (2002) Chondrogenic activity of the heparan sulfate proteoglycan perlecan maps to the N-terminal domain I. *J Bone Miner Res*, **17**, 48-55.
354. French, M.M., Smith, S.E., Akanbi, K., Sanford, T., Hecht, J., Farach-Carson, M.C. and Carson, D.D. (1999) Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity in vitro. *J Cell Biol*, **145**, 1103-15.
355. Gomes, R.R., Jr., Joshi, S.S., Farach-Carson, M.C. and Carson, D.D. (2006) Ribozyme-mediated perlecan knockdown impairs chondrogenic differentiation of C3H10T1/2 fibroblasts. *Differentiation*, **74**, 53-63.
356. Nishida, T., Kubota, S., Fukunaga, T., Kondo, S., Yosimichi, G., Nakanishi, T., Takano-Yamamoto, T. and Takigawa, M. (2003) CTGF/Hcs24, hypertrophic chondrocyte-specific gene product, interacts with perlecan in regulating the proliferation and differentiation of chondrocytes. *J Cell Physiol*, **196**, 265-75.
357. Govindraj, P., West, L., Smith, S. and Hassell, J.R. (2006) Modulation of FGF-2 binding to chondrocytes from the developing growth plate by perlecan. *Matrix Biol*, **25**, 232-9.
358. Gustafsson, E., Aszodi, A., Ortega, N., Hunziker, E.B., Denker, H.W., Werb, Z. and Fassler, R. (2003) Role of collagen type II and perlecan in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci*, **995**, 140-50.
359. Smirnov, S.P., Barzaghi, P., McKee, K.K., Ruegg, M.A. and Yurchenco, P.D. (2005) Conjugation of LG domains of agrins and perlecan to polymerizing laminin-2 promotes acetylcholine receptor clustering. *J Biol Chem*, **280**, 41449-57.
360. Nishimune, H., Sanes, J.R. and Carlson, S.S. (2004) A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature*, **432**, 580-7.
361. Topaloglu, H., Serdaroglu, A., Okan, M., Gucuyener, K. and Topcu, M. (1993) Improvement of myotonia with carbamazepine in three cases with the Schwartz-Jampel syndrome. *Neuropediatrics*, **24**, 232-4.
362. Noonan, D.M., Fulle, A., Valente, P., Cai, S., Horigan, E., Sasaki, M., Yamada, Y. and Hassell, J.R. (1991) The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem*, **266**, 22939-47.
363. Kallunki, P. and Tryggvason, K. (1992) Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Cell Biol*, **116**, 559-71.
364. Murdoch, A.D., Dodge, G.R., Cohen, I., Tuan, R.S. and Iozzo, R.V. (1992) Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Biol Chem*, **267**, 8544-57.
365. Rogalski, T.M., Williams, B.D., Mullen, G.P. and Moerman, D.G. (1993) Products of the unc-52 gene in *Caenorhabditis elegans* are homologous to the core protein of the mammalian basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *Genes Dev*, **7**, 1471-84.
366. Voigt, A., Pflanz, R., Schafer, U. and Jackle, H. (2002) Perlecan participates in proliferation activation of quiescent *Drosophila* neuroblasts. *Dev Dyn*, **224**, 403-12.
367. Datta, S. and Kankel, D.R. (1992) *l(1)trol* and *l(1)devl*, loci affecting the development of the adult central nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **130**, 523-37.
368. Park, Y., Rangel, C., Reynolds, M.M., Caldwell, M.C., Johns, M., Nayak, M., Welsh, C.J., McDermott, S. and Datta, S. (2003) *Drosophila* perlecan modulates FGF and hedgehog signals to activate neural stem cell division. *Dev Biol*, **253**, 247-57.
369. Friedrich, M.V., Schneider, M., Timpl, R. and Baumgartner, S. (2000) Perlecan domain V of *Drosophila melanogaster*. Sequence, recombinant analysis and tissue expression. *Eur J Biochem*, **267**, 3149-59.
370. Datta, S. (1995) Control of proliferation activation in quiescent neuroblasts of the *Drosophila* central nervous system. *Development*, **121**, 1173-82.

371. Caldwell, M.C. and Datta, S. (1998) Expression of cyclin E or DP/E2F rescues the G1 arrest of trol mutant neuroblasts in the Drosophila larval central nervous system. *Mech Dev*, **79**, 121-30.
372. Park, Y., Fujioka, M., Kobayashi, M., Jaynes, J.B. and Datta, S. (2001) even skipped is required to produce a trans-acting signal for larval neuroblast proliferation that can be mimicked by ecdysone. *Development*, **128**, 1899-909.
373. Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J.R. and Yamada, Y. (1999) Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet*, **23**, 354-8.
374. Costell, M., Gustafsson, E., Aszodi, A., Morgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R. and Fassler, R. (1999) Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol*, **147**, 1109-22.
375. 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.
376. Peng, H.B., Xie, H., Rossi, S.G. and Rotundo, R.L. (1999) Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan. *J Cell Biol*, **145**, 911-21.
377. Echaniz-Laguna, A., Rene, F., Marcel, C., Bangratz, M., Fontaine, B., Loeffler, J.P. and Nicole, S. (2009) Electrophysiological studies in a mouse model of Schwartz-Jampel syndrome demonstrate muscle fiber hyperactivity of peripheral nerve origin. *Muscle Nerve*, **40**, 55-61.
378. Rogalski, T.M., Gilchrist, E.J., Mullen, G.P. and Moerman, D.G. (1995) Mutations in the unc-52 gene responsible for body wall muscle defects in adult Caenorhabditis elegans are located in alternatively spliced exons. *Genetics*. Vol. 139, pp. 159-69.
379. Rogalski, T.M., Mullen, G.P., Bush, J.A., Gilchrist, E.J. and Moerman, D.G. (2001) UNC-52/perlecan isoform diversity and function in Caenorhabditis elegans. *Biochem Soc Trans*, **29**, 171-6.
380. Merz, D.C., Alves, G., Kawano, T., Zheng, H. and Culotti, J.G. (2003) UNC-52/perlecan affects gonadal leader cell migrations in C. elegans hermaphrodites through alterations in growth factor signaling. *Dev Biol*, **256**, 173-86.
381. Mullen, G.P., Rogalski, T.M., Bush, J.A., Gorji, P.R. and Moerman, D.G. (1999) Complex patterns of alternative splicing mediate the spatial and temporal distribution of perlecan/UNC-52 in Caenorhabditis elegans. *Mol Biol Cell*, **10**, 3205-21.
382. Mariol, M.C., Martin, E., Chambonnier, L. and Segalat, L. (2007) Dystrophin-dependent muscle degeneration requires a fully functional contractile machinery to occur in C. elegans. *Neuromuscul Disord*, **17**, 56-60.
383. Rogalski, T.M., Gilchrist, E.J., Mullen, G.P. and Moerman, D.G. (1995) Mutations in the unc-52 gene responsible for body wall muscle defects in adult Caenorhabditis elegans are located in alternatively spliced exons. *Genetics*, **139**, 159-69.
384. Francis, R. and Waterston, R.H. (1991) Muscle cell attachment in Caenorhabditis elegans. *J Cell Biol*, **114**, 465-79.
385. Hresko, M.C., Williams, B.D. and Waterston, R.H. (1994) Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in Caenorhabditis elegans. *J Cell Biol*, **124**, 491-506.
386. Squires, L.A. and Prangle, J. (1996) Neonatal diagnosis of Schwartz-Jampel syndrome with dramatic response to carbamazepine. *Pediatr Neurol*, **15**, 172-4.
387. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. and Feeney, P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, **46**, 3-26.
388. Supuran, C.T. (2008) Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov*, **7**, 168-81.
389. Supuran, C.T., Scozzafava, A. and Casini, A. (2003) Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev*, **23**, 146-89.
390. Wetzel, P., Kleinke, T., Papadopoulos, S. and Gros, G. (2002) Inhibition of muscle carbonic anhydrase slows the Ca(2+) transient in rat skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**, C1242-53.
391. Crocetti, L., Maresca, A., Temperini, C., Hall, R.A., Scozzafava, A., Muhlschlegel, F.A. and Supuran, C.T. (2009) A thiabendazole sulfonamide shows potent inhibitory activity against mammalian and nematode alpha-carbonic anhydrases. *Bioorg Med Chem Lett*, **19**, 1371-5.
392. Carre-Pierrat, M., Baillie, D., Johnsen, R., Hyde, R., Hart, A., Granger, L. and Segalat, L. (2006) Characterization of the Caenorhabditis elegans G protein-coupled serotonin receptors. *Invert Neurosci*, **6**, 189-205.
393. Gower, N.J., Temple, G.R., Schein, J.E., Marra, M., Walker, D.S. and Baylis, H.A. (2001) Dissection of the promoter region of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gene, itr-1, in C. elegans: a molecular basis for cell-specific expression of IP3R isoforms. *J Mol Biol*, **306**, 145-57.

394. Kennedy, S., Wang, D. and Ruvkun, G. (2004) A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature*, **427**, 645-9.
395. 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.
396. Nicholson, J.K., Connelly, J., Lindon, J.C. and Holmes, E. (2002) Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 153-61.
397. Lindon, J.C., Holmes, E. and Nicholson, J.K. (2003) So what's the deal with metabonomics? *Anal Chem*, **75**, 384A-391A.
398. Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Holmes, E., Antti, H., Bollard, M.E., Keun, H., Beckonert, O., Ebbels, T.M., Reilly, M.D., Robertson, D. *et al.* (2003) Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxicol Appl Pharmacol*, **187**, 137-46.
399. Gastpar, M. (1989) Clinical originality and new biology of trimipramine. *Drugs*, **38 Suppl 1**, 43-8; discussion 49-50.
400. Moss, S.J. and Smart, T.G. (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 240-50.
401. Ben-Ari, Y. (2006) Seizures beget seizures: the quest for GABA as a key player. *Crit Rev Neurobiol*, **18**, 135-44.
402. Marshall, F.H. (2008) The role of GABA(B) receptors in the regulation of excitatory neurotransmission. *Results Probl Cell Differ*, **44**, 87-98.
403. Borst, J.W., Laptinok, S.P., Westphal, A.H., Kuhnemuth, R., Hornen, H., Visser, N.V., Kalinin, S., Aker, J., van Hoek, A., Seidel, C.A. *et al.* (2008) Structural changes of yellow Cameleon domains observed by quantitative FRET analysis and polarized fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J*, **95**, 5399-411.
404. Franco, A., Jr. and Lansman, J.B. (1990) Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in mdx myotubes. *Nature*, **344**, 670-3.
405. Hopf, F.W., Turner, P.R., Denetclaw, W.F., Jr., Reddy, P. and Steinhardt, R.A. (1996) A critical evaluation of resting intracellular free calcium regulation in dystrophic mdx muscle. *Am J Physiol*, **271**, C1325-39.
406. Bodensteiner, J.B. and Engel, A.G. (1978) Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology*, **28**, 439-46.
407. Banks, G.B., Chamberlain, J.S. and Froehner, S.C. (2009) Truncated dystrophins can influence neuromuscular synapse structure. *Mol Cell Neurosci*, **40**, 433-41.
408. Banks, G.B., Fuhrer, C., Adams, M.E. and Froehner, S.C. (2003) The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: requirement for rapsyn and the utrophin/dystrophin-associated complex. *J Neurocytol*, **32**, 709-26.
409. Allard, B. (2006) Sarcolemmal ion channels in dystrophin-deficient skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil*, **27**, 367-73.
410. Deconinck, N., Ragot, T., Marechal, G., Perricaudet, M. and Gillis, J.M. (1996) Functional protection of dystrophic mouse (mdx) muscles after adenovirus-mediated transfer of a dystrophin minigene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3570-4.
411. Mancinelli, E., Sardini, A., D'Aumiller, A., Meola, G., Martucci, G., Cossu, G. and Wanke, E. (1989) Properties of acetylcholine-receptor activation in human Duchenne muscular dystrophy myotubes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **237**, 247-57.
412. Meola, G., Mancinelli, E., Geremia, L. and Scarlato, G. (1991) Increased acetylcholine sensitivity in Duchenne muscular dystrophy myotubes. *Ital J Neurol Sci*, **12**, 181-5.
413. Chen, L., Krause, M., Draper, B., Weintraub, H. and Fire, A. (1992) Body-wall muscle formation in *Caenorhabditis elegans* embryos that lack the MyoD homolog hlh-1. *Science*, **256**, 240-3.
414. Segalat, L., Elkes, D.A. and Kaplan, J.M. (1995) Modulation of serotonin-controlled behaviors by Go in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **267**, 1648-51.
415. Durbeej, M. and Campbell, K.P. (2002) Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 349-61.
416. Pardo, J.V., Siliciano, J.D. and Craig, S.W. (1983) A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 1008-12.
417. Campbell, K.P. (1995) Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*, **80**, 675-9.
418. Rybakova, I.N., Patel, J.R. and Ervasti, J.M. (2000) The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol*, **150**, 1209-14.
419. Danowski, B.A., Imanaka-Yoshida, K., Sanger, J.M. and Sanger, J.W. (1992) Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J Cell Biol*, **118**, 1411-20.

420. Williams, M.W. and Bloch, R.J. (1999) Differential distribution of dystrophin and beta-spectrin at the sarcolemma of fast twitch skeletal muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil*, **20**, 383-93.
421. Lecroisey, C., Segalat, L. and Gieseler, K. (2007) The *C. elegans* dense body: anchoring and signaling structure of the muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, **28**, 79-87.
422. Locke, C., Berry, K., Kautu, B., Lee, K., Caldwell, K. and Caldwell, G. (2008) Paradigms for pharmacological characterization of *C. elegans* synaptic transmission mutants. *J Vis Exp*.
423. Meltzer, H.Y. (1976) Skeletal muscle necrosis following membrane-active drugs plus serotonin. *J Neurol Sci*, **28**, 41-56.
424. 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.
425. 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*, **81**, 510-6.
426. Hajdich, E., Dombrowski, L., Darakhshan, F., Rencurel, F., Marette, A. and Hundal, H.S. (1999) Biochemical localisation of the 5-HT<sub>2A</sub> (serotonin) receptor in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 369-72.
427. Lauder, J.M., Wilkie, M.B., Wu, C. and Singh, S. (2000) Expression of 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the mouse embryo. *Int J Dev Neurosci*, **18**, 653-62.
428. Watkins, S.C. and Cullen, M.J. (1987) A qualitative and quantitative study of the ultrastructure of regenerating muscle fibres in Duchenne muscular dystrophy and polymyositis. *J Neurol Sci*, **82**, 181-92.
429. Challet, C., Maechler, P., Wollheim, C.B. and Ruegg, U.T. (2001) Mitochondrial calcium oscillations in C2C12 myotubes. *J Biol Chem*, **276**, 3791-7.
430. Arnaudeau, S., Kelley, W.L., Walsh, J.V., Jr. and Demaurex, N. (2001) Mitochondria recycle Ca<sup>2+</sup> to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *J Biol Chem*, **276**, 29430-9.
431. Gilabert, J.A. and Parekh, A.B. (2000) Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca<sup>2+</sup> current I(CRAC). *EMBO J*, **19**, 6401-7.
432. Suda, N., Franzius, D., Fleig, A., Nishimura, S., Boddington, M., Hoth, M., Takeshima, H. and Penner, R. (1997) Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in Chinese hamster ovary (CHO) cells co-expressing dihydropyridine and ryanodine receptors. *J Gen Physiol*, **109**, 619-31.
433. Bouchier-Hayes, L., Lartigue, L. and Newmeyer, D.D. (2005) Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*, **115**, 2640-7.
434. Orrenius, S., Gogvadze, V. and Zhivotovsky, B. (2007) Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **47**, 143-83.
435. Hajnoczky, G., Davies, E. and Madesh, M. (2003) Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**, 445-54.
436. Reutenauer, J., Dorchies, O.M., Patthey-Vuadens, O., Vuagniaux, G. and Ruegg, U.T. (2008) Investigation of Debio 025, a cyclophilin inhibitor, in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *Br J Pharmacol*, **155**, 574-84.
437. Spencer, M.J., Croall, D.E. and Tidball, J.G. (1995) Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J Biol Chem*, **270**, 10909-14.
438. Spencer, M.J. and Mellgren, R.L. (2002) Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum Mol Genet*, **11**, 2645-55.

# **ANNEXES**

## **Annexe 1 : Crible DMD en plaques 24 puits (milieu solide)**

### **1. Jour 0 : Ponte**

- 1.1. Placer 7 adultes 761 (gravides) sur boîtes fraîches.
- 1.2. Incuber les animaux à 15°C pendant 6 jours.

*Rmq : Arrêter la culture quand les nouveaux adultes ont pondu (On veut uniquement des adultes et des œufs... il faut éviter d'avoir des vers de stades L1, L2)*

### **2. Jour 1 : Stader les animaux pondus**

- 2.1. Enlever les 7 adultes 761 déposés la veille pour stader les animaux pondus.

### **3. Jour 5 : Culture de *E. coli* (OP50)**

- 3.1. Pour 4 plaques 24 puits, ensemercer un ERLÉN de 200 ml de LB avec une anse de *E. coli* (OP50).
- 3.2. Incubation à 37°C jusqu'à saturation (jour 6).

### **4. Jour 6 : Préparation des plaques de test, et culture.**

Pour une plaque de drogues (80 drogues) :

- 4.1. Faire fondre du NGM et le laisser refroidir dans un bain-marie à 60°C.
- 4.2. Annoter les plaques 24 puits (4) et les feuilles de suivi.
- 4.3. Ajouter les drogues à tester dans les plaques 24 puits à raison de 10µl par drogue (4 plaques 24 puits pour une plaque de drogue 96 puits),
- 4.4. Ajouter 10 µl DMSO pour les témoins négatifs LS761 (A6 et B6).
- 4.5. Ajouter 10 µl de méthazolamide à 44 mg/ml (DMSO) pour les témoins positifs LS761 (C6 et D6).
- 4.6. Solubiliser les drogues avec 1ml de NGM.
- 4.7. Recouvrir d'un film aluminium, puis vortexer pour homogénéiser.
- 4.8. Laisser solidifier 15 mn.
- 4.9. Centrifuger la culture de *E. coli* (200 ml de culture d'OP50 saturé) 5 mn à 5000 tr/mn.
- 4.10. Reprendre le culot de *E. coli* (OP50) avec 5ml de M9.
- 4.11. Déposer 50µl de cette préparation par puits et laisser sécher 1H sous une hôte aspirante.
- 4.12. Récupérer les animaux (œufs et adultes) issus des cultures préparées au J0 (via pipette pasteur et 1 ml de M9).
- 4.13. Filtrer cette population avec le « tamis à œufs » (filtre 37µm) pour séparer les adultes des œufs.

4.14. Vérifier la concentration en oeufs (Déposer 10 $\mu$ l du mélange M9/oeufs sur une boîte NGM classique sous la binoculaire).

*Rmq : Si nombre d'oeufs est inférieur à 50 pour 10 $\mu$ l, centrifuger le mélange à 2000 tr/mn, 2 mn et reprendre le culot avec un volume approprié de M9.*

4.15. Inoculer 10  $\mu$ l du mélange M9/œufs dans chaque puit.

4.16. Cultiver les vers 8 jours dans une étuve à température constante (15°C).

## 5. **Jour 14** : Analyse et sélection des hits

5.1. Sélectionner les puits positifs sous la loupe à fluorescence (Lumar V2)

5.2. Laver / collecter les puits positifs avec 1ml de M9, et déposer le vers dans des tubes eppendorf siliconés annotés.

5.3. Fixer les vers 1 heure avec 30  $\mu$ l de formaldéhyde 37%.

5.4. Centrifuger les tubes 2 mn à 6500 rpm; retirer le surnageant et resuspendre les nématodes avec 1 ml de M9.

5.5. Stocker les tubes à 4°C en attendant l'étape de coloration de l'actine.

## 6. **Coloration de l'actine (validation)** :

6.1. Centrifuger les tubes sélectionnés pour validation 2 mn à 6500 rpm; retirer le surnageant et resuspendre les nématodes avec 1 ml de M9.

6.2. Ajouter dans chaque tube 1 mL d'acétone glacial (-20°C).

6.3. Incuber les tubes dans un bloc froid 2 minutes à -20°C, agiter plusieurs fois les tubes pendant ce laps de temps.

6.4. Centrifuger les tubes 1 min. à 6500 rpm.

6.5. Rincer les culots de vers avec 1 ml de M9, centrifuger les tubes 1 min. à 6500 rpm et répéter le rinçage.

6.6. Centrifuger les tubes 1 min. à 6500 rpm.

6.7. Retirer le surnageant en laissant 500  $\mu$ l de M9.

6.8. Ajouter 3  $\mu$ l de conjugué phalloïdine-rhodamine (300 U).

6.9. Incuber les tubes 2 heures sous agitation ménagée.

6.10. Laisser les vers sédimenter au fond du tube avant de centrifuger.

6.11. Centrifuger les tubes 2 min. à 6500 rpm, puis retirer le surnageant avec une pipette Pasteur.

6.12. Rincer les animaux avec 1 ml de M9, répéter le lavage.

6.13. Retirer le surnageant et monter les animaux entre lame et lamelle avec un liquide de montage (ex: DAKO).

6.14. Stocker les lames à 4°C en attendant les observations microscopes.



**LB :**

- 10g Bacto Tryptone
- 5g Bacto Yeast extract
- 10g NaCl
- H<sub>2</sub>O qsp 1 litre

**M9 :**

- 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 5 g NaCl
- 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>
- H<sub>2</sub>O qsp 1 litre
- Stérilisation (autoclave)

**NGM :**

- 3g NaCl
- 17g Bacto-agar
- 2,5g Bacto-peptone
- 25ml KPO<sub>4</sub> (pH 6)
- 1ml Cholesterol (5mg/ml)
- H<sub>2</sub>O qsp 1 litre
- Autoclave 60 min
- 1ml CaCl<sub>2</sub> (1M)
- 1ml MgSO<sub>4</sub> (1M)

## **Annexe 2 : CRIBLE SMA**

### **1. Préparation des bactéries produisant les ARNdb (RNAi) :**

1.1. Inoculer des érlenmeyer de LBAT avec les souches d'intérêts (L4440, *pos-1*, *smn-1*).

⇒ Incuber à température ambiante ON.

1.2. Le lendemain, ajouter de l'IPTG (1mM final) lorsque les cultures sont entre 0,4 et 0,6 de DO.

⇒ Incuber à 37°C jusqu'à une DO de 0,8 à 1,2.

1.3. Centrifuger les cultures par lots de 30ml pour SMN, 10ml pour L4440 et Pos-1 (5mn, 5000 rpm DTAMB), éliminer le surnageant et congeler les culots à -20°C.

### **2. Entretien des animaux PD4251 : (J0)**

2.1. 4 jours avant le "start point" (J0), déposer **3 adultes PD4251** sur **5 à 6 boîtes NGM** classiques,

2.2. Incubation **6 jours à 23°C**.

### **3. Start point : (J4)**

3.1. Prendre pour deux plaques :

- Pipettes Multicanaux (300 et 10µl)
- 2 boîtes cônes 200µl
- 2 boîtes cônes 10µl
- 1 boîte cônes 300µl
- 2 plaques de drogues 96 puits centrifugées
- 4 plaques 96 puits greiner Bio-one fonds plats
- RNAi congeler (2x30ml SMN, 10ml L4440 et 10 ml POS-1)
- Aliquot Ampiciline 100mg/ml et IPTG 1M
- 2 x 50ml M9
- Cholesterol 5mg/ml
- 3 racks

3.2. Décongeler / Resuspendre les bactéries RNAi dans du M9+ (2x30ml pour *smn-1*, 10 pour les autres) : **M9+RNAi**,

3.3. **Annoter** les plaques de cribles (2 pour une plaque de drogue), et la feuille de suivi,

- 3.4. Pour une plaque de drogues (80 drogues), placer dans une des 2 plaques 96-puits tests :
- **300  $\mu$ l de M9+RNAi** (multicanaux et cône 300 $\mu$ l) (*Pos-1* : A1-D1, L44 : A12-H12, SMN : tout le reste)
  - **3  $\mu$ l de drogues** dans les puits tests (*Répartition identique aux plaques mères*) et **3  $\mu$ l de DMSO** dans les puits témoins (A1-H1 / A12-H12),
- 3.5. **Transférer 150  $\mu$ l** vers la plaque « clone » après avoir pipeté/refoulé,
- 3.6. Placer **3 larves L1** (pd4251) par puit avec le biosorter (Fichier NewL1settings),
- 3.7. Recouvrir la plaque avec un **film poreux** et placer un couvercle pour limiter l'évaporation.
- 3.8. Incuber les plaques **6 jours à 23°C**, agitation de 600<rpm<750 (*Titramax 1000*)

#### 4. Readout : (J6)

- 4.1. Arrêt des cultures. Vérifier l'état des cultures, les puits témoins *pos-1* doivent contenir des oeufs non développés ; les puits L4440, des adultes F1 vigoureux ; les puits témoins smn-1, 3 adultes F0 et une très faible quantité à une absence de descendance F1.
- 4.2. Noter manuellement les puits présentant des descendants sur la feuille de suivie (Estimation qualitative).
- 4.3. Passer les plaques au « Biosort Reflex » (*Fichier "SMN Reflex 800"*), en enregistrant les data dans un dossier annoté "Année-Mois-Jour".
- 4.4. Récupérer les data et les traiter avec le programme "SMN2.r" (logiciel R).

##### M9 :

- 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 5 g NaCl
- 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>
- H<sub>2</sub>O qsp 1 litre
- Stérilisation (autoclave)

##### M9+ : M9

- Cholesterol 2x (10 $\mu$ g/ml)
- Stock à 5mg/ml*
- Ampiciline (100 $\mu$ g/ml final)
- IPTG (1mM final)

##### LBAT :

- 10g Bacto Tryptone
- 5g Bacto Yeast extract
- 10g NaCl
- H<sub>2</sub>O qsp 1 litre
- Stérilisation (autoclave)
- 100  $\mu$ g/ml Ampiciline
- 125  $\mu$ g/ml Tétracycline

##### Plaque 96 à utiliser:

Greiner bio-one  
« CELLSTAR »  
thermosoudable, à fond plat.  
*Ref :655201 (Deutcher).*

## **Annexe 3 : Programme informatique pour le traitement des données du crible SMA.**

### **#Initialisation des constantes.**

```
COLOBS=11
COLOBSX=9

TOFMAX=1000
TOFMIN=40
EXTMAX=66000
PHGreenMIN=10000
NB_OBJETS_PAR_PUIT_MAX=80
NB_OBJETS_PAR_LIGNE_MAX= 8 * NB_OBJETS_PAR_PUIT_MAX
NBBARS=20

LIGNEMAX=8
COLMAX=12
MAXOBS=800
MINOBS=0
MAXOBSX=1000
MINOBSX=30

COLONNES=1:COLMAX
LIGNES=1:LIGNEMAX
```

```
#=====
#####
```

### **#Recherche des fichiers à traiter et création des dossiers pour sauver les résultats.**

```
PLAQUE=file.choose()
DOSSIER=dirname(PLAQUE)
PLAQUES =list.files(path= DOSSIER,pattern="txt",full.names=T)
NOMS_PLAQUES=as.character(strsplit(basename(PLAQUES),".txt"))
dir.create(paste(DOSSIER,"/Figures",sep=""), showWarnings=F)
NB_PLAQUES=length(PLAQUES)
```

```
#=====
#####
```

### **#Lecture des plaques, suppression des observations ayant des valeurs hors limites et compilation des données de toutes les plaques dans la variable "tab".**

```
for (k in 1:NB_PLAQUES)
{
  assign(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""),read.table(file =
PLAQUES[k],sep="\t",h=TRUE,fill=TRUE))
  #assign(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""),read.table(file =
PLAQUES[k],sep="\t",h=TRUE,fill=TRUE))
  assign(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""),subset(get(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep="")),g
et(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""))[,9]<=TOFMAX))
  assign(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""),subset(get(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep="")),g
et(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""))[,9]>=TOFMIN))
  assign(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""),subset(get(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep="")),g
et(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""))[,10]<= EXTMAX))
}
```

### Annexe 3 : Programme informatique pour le traitement des données du crible SMA.

```
assign(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""),subset(get(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep="")),get(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""))[,17]>= PHGreenMIN))
assign(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""),subset(get(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep="")),get(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""))[,2]!="NA"))

Plaque=array(NOMS_PLAQUES[k],dim=c(dim(get(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""))[1])[1],1))
assign(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""),cbind(get(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep="")),Plaque))

if(k==1)
{
  tab=get(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""))
}
if(k!=1)
{
  tab=rbind(tab,get(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep="")))
}
}
TITRES_COLONNES=colnames(tab)
```

```
#=====
=====#
```

#### #TRIE DES DONNEES SELON LES PLAQUES, LES LIGNES ET LES COLONNES. Calcul pour chaque puits du nombre d'objets observés et de la moyenne du paramètre mesuré.

```
for (k in NOMS_PLAQUES)
{
  for(i in LIGNES)
  {

    assign(paste(letters[i],"_",k,sep=""),subset(get(paste("tab_",k,sep="")),get(paste("tab_",k,sep=""))[,3]==LETTERS[i]))
      for(j in COLONNES)
      {

        assign(paste(letters[i],j,"_",k,sep=""),subset(get(paste(letters[i],"_",k,sep="")),get(paste(letters[i],"_",k,sep=""))[,4]==j))
          assign(paste("moy_",TITRES_COLONNES[COLOBS],"_",letters[i],j,"_",k,sep=""),mean(get(paste(letters[i],j,"_",k,sep=""))[,COLOBS]))
        )
      }
    }
  }
}
```

```
#=====
=====#
```

#### #Regroupement des PLAQUE par paires

```
m=1
while (m < NB_PLAQUES)
{
  k= NOMS_PLAQUES[m]
  l= NOMS_PLAQUES[m+1]
  i=1
```

*Annexe 3 : Programme informatique pour le traitement des données du crible SMA.*

```

while (i < length(LIGNES))
{

  assign(paste(letters[i], "_", k, sep=""), subset(get(paste("tab_", k, sep="")), get(paste("tab_", k, se
p="")))[,3]==LETTERS[i]))
  i=i+1

  assign(paste(letters[i], "_", k, sep=""), subset(get(paste("tab_", k, sep="")), get(paste("tab_", k, se
p="")))[,3]==LETTERS[i]))

  assign(paste(letters[i/2], "_", k, "_", l, sep=""), rbind(get(paste(letters[i-
1], "_", k, sep="")), get(paste(letters[i], "_", k, sep=""))))
  i=i+1
}
i=1
while (i < length(LIGNES))
{

  assign(paste(letters[i], "_", l, sep=""), subset(get(paste("tab_", l, sep="")), get(paste("tab_", l, se
p="")))[,3]==LETTERS[i]))
  i=i+1

  assign(paste(letters[i], "_", l, sep=""), subset(get(paste("tab_", l, sep="")), get(paste("tab_", l, se
p="")))[,3]==LETTERS[i]))

  assign(paste(letters[(i+length(LIGNES))/2], "_", k, "_", l, sep=""), rbind(get(paste(letters[i-
1], "_", l, sep="")), get(paste(letters[i], "_", l, sep=""))))
  i=i+1
}

m=m+2
}
m=1
while (m < NB_PLAQUES)
{
  k= NOMS_PLAQUES[m]
  l= NOMS_PLAQUES[m+1]
  for(i in LIGNES)
  {
    for(j in COLONNES)
    {

      assign(paste(letters[i], j, "_", k, "_", l, sep=""), subset(get(paste(letters[i], "_", k, "_", l, sep=""))
, get(paste(letters[i], "_", k, "_", l, sep=""))[,4]==j))
      assign(paste("moy_",
TITRES_COLONNES[COLOBS], "_", letters[i], j, "_", k, "_", l, sep=""), mean(get(paste(letters[i], j, "_", k, "_", l, sep="
"))[, COLOBS]))

      assign(paste("nb_", letters[i], j, "_", k, "_", l, sep=""), length(get(paste(letters[i], j, "_", k, "_", l,
sep=""))[,1]))
    }
  }
  m=m+2
}

#=====
#=====#

```

## #Définition des labels et de leur position sur l'axe des abscisse pour la figure "nb vers et moyenne de TOF"

```
abs=abs2=NULL
absdax=seq(1,96,6)

for(i in 1: LIGNEMAX)
{
  abs=c(abs,paste(letters[i], 1:12, sep=""))
  abs2=c(abs2,paste(letters[i], c(1,7), sep=""))
}

#Pour chaque plaques: Compilation du nombre d'individu et de la moyenne du

m=1
while (m < NB_PLAQUES)
{
  k= NOMS_PLAQUES[m]
  l= NOMS_PLAQUES[m+1]
  assign(paste("nb_",k,"_",l,sep=""),NULL)
  assign(paste("moy_",TITRES_COLONNES[COLOBS],"_",k,"_",l,sep=""),NULL)
  for(i in LIGNES)
  {
    for(j in COLONNES)
    {

      assign(paste("nb_",k,"_",l,sep=""),c(get(paste("nb_",k,"_",l,sep="")),get(paste("nb_",letters[
i], 1: COLMAX,"_",k,"_",l, sep="")[j])))

      assign(paste("moy_",TITRES_COLONNES[COLOBS],"_",k,"_",l,sep=""),c(get(paste("moy_",TITRES_COLO
NNES[COLOBS],"_",k,"_",l,sep="")),get(paste("moy_",TITRES_COLONNES[COLOBS],"_",letters[i], 1:
COLMAX,"_",k,"_",l, sep="")[j])))
    }
  }
  m=m+2
}
```

```
#=====
=====#
```

## # Création du PDF "nb vers et moyenne de TOF"

```
TITRE=paste(DOSSIER,"/FIGURES/","nb vers et moyenne de ",TITRES_COLONNES[COLOBS],".pdf",sep="")
pdf(TITRE,width=12,height=10)
```

```
m=1
while (m < NB_PLAQUES)
{
  k= NOMS_PLAQUES[m]
  l= NOMS_PLAQUES[m+1]
  par(mfrow=c(2,1))
  plot(get(paste("nb_",k,"_",l,sep="")),type="h",main=paste(k,"_",l," Nombre de vers par
puits"),xlab="puits",ylab="nb vers",col="red",xaxt="n",lwd=3)
  axis(1,absdax,abs2)
  top=max(get(paste("nb_",k,"_",l,sep="")))
  #pas=(top-100)/10
  #abline(h=seq(100,top,by= 100),lty=3) #quadrillage horizontal

  plot(get(paste("moy_",TITRES_COLONNES[COLOBS],"_",k,"_",l,sep="")),type="h",main=paste(k,"_",l
," Moyenne de ", TITRES_COLONNES[COLOBS] ,"par
puits"),xlab="puits",ylab=TITRES_COLONNES[COLOBS],col="green",xaxt="n",lwd=3)
  axis(1,absdax,abs2)
  top2=max(get(paste("moy_",TITRES_COLONNES[COLOBS],"_",k,"_",l,sep="")))
  #pas2=(top2-100)/10
}
```

### Annexe 3 : Programme informatique pour le traitement des données du crible SMA.

```
#abline(h=seq(100,top2,by=-100),lty=3)
m=m+2
}
dev.off()

#=====
#####

# Création du PDF "Puits"

Puits=paste(DOSSIER,"/FIGURES/", "Puits.pdf", sep="")
pdf(Puits,width=11,height=8)

m=1
while (m < NB_PLAQUES)
{
k= NOMS_PLAQUES[m]
l= NOMS_PLAQUES[m+1]
for(i in LIGNES)
{
par(mfrow=c(3,4)) #1 feuille "3 x 4" par ligne
for(j in COLONNES)
{
affich1=subset(get(paste(letters[i],j,"_",k,"_",l,sep=""))[,
COLOBS],get(paste(letters[i],j,"_",k,"_",l,sep=""))[, COLOBS]<=MAXOBS)
affich=subset(affich1,affich1>=MINOBS)
affich2=subset(get(paste(letters[i],j,"_",k,"_",l,sep=""))[,
COLOBSX],get(paste(letters[i],j,"_",k,"_",l,sep=""))[, COLOBSX]<=MAXOBSX)
affich2=subset(affich2,affich2>=MINOBSX)
if(length(affich)!=0)
{

plot(affich2,affich,ylim=c(0,
1.1*signif(max(tab[, COLOBS]),digits=1)),breaks=seq(0,
1.1*signif(max(tab[, COLOBS]),digits=1),signif(signif(max(tab[, COLOBS]),digits=1)/NBBARS,digits=1)),xlim=c(
0, 1.1*signif(max(tab[, COLOBSX]),digits=1)),main=paste(k,"_",l," puit ",
LETTERS[i],j,sep=""),cex.main=0.8,xlab=TITRES_COLONNES[COLOBSX],ylab=TITRES_COLONNES[COLOBS])

}
else
{
cat("Aucun éléments dans le puit ",letters[i],j," pour la plaque
",k,"_",l,"\n", sep="") #prévient lorsque qu'il n'y a pas de données sur le puit.
}
}
}
m=m+2
}
dev.off()

#=====
#####
```



## **Annexe 4 : Crible Schwartz-Jampel**

### **1. Préparer extemporanément la nourriture (OP50) :**

- 1.1. Inoculer des "ERLEN" de **LB** avec la souche (**OP50**) utilisée au laboratoire  
     $\Rightarrow$  Incuber à **37°C ON**
- 1.2. Le lendemain, attendre d'avoir une **DO >1.2**
- 1.3. Aliquoter la moitié de la culture à raison de **50ml** dans des **tubes 50ml** (Corning conical).
- 1.4. Centrifuger les tubes, **5mn**, à **5000 rpm** (Beckman GS-15R, rotor S4180), éliminer le surnageant.
- 1.5. Aliquoter le reste de la culture à raison de **50ml** sur les culots déjà obtenus.
- 1.6. Centrifuger les tubes, **5mn**, à **5000 rpm** (Beckman GS-15R, rotor S4180), éliminer le surnageant.
- 1.7. Les tubes 50 ml contiennent alors des culots issues de 100ml de culture. Marquer la date et stocker les culots à **-20°C**.

### **2. Repiquer les animaux LS1095 : (J-6)**

- 2.1. 6 jours avant le "start point" (J0), déposer **10 à 15 adultes LS1095** sur **10 à 15 boîtes NGM** classiques.
- 2.2. Incubation **6 jours à 23°C**.

### **3. Repiquer les animaux PD4251 : (J-6)**

- 3.1. 6 jours avant le "start point" (J0), déposer **3 adultes PD4251** sur **5 à 6 boîtes NGM** classiques.
- 3.2. Incubation **6 jours à 15°C**.

### **4. Start point : (J0)**

#### **4.1. Préparer le matériel :**

**Pour 2 plaques de drogues (96-puits):**

- 4 plaques 96 puits "greiner Bio-one" fonds plats.
- 2 plaques de drogues centrifugées.
- 2 tubes d'OP50 congelé (= 2X culot de 60 ml de culture OP50, DO >1,2).
- 2x 50ml M9.
- Cholesterol (5 mg/ml).
- Micropipettes multicanaux 300 $\mu$ l et 10 $\mu$ l.

- Micropipette P200.
- 1 boîte cônes 300µl.
- 2 boîtes cônes 200µl.
- 2 boîtes cônes 10µl.

**4.2. Préparer le M9+ :** Ajouter **100µl de cholestérol** (5mg/ml) pour **50 ml de M9** (10µg/ml final)

**4.3. Préparer le M9+(OP50-2X) :** Resuspendre/Décongeler **100 ml de culots d'OP50** dans **50 ml de M9+**. (concentrer 2X les culots)

*"Pour quatre plaques 96-puits, 60 ml de cette culture suffit (300 µl x 96 puits x 2 = 57.600 ml)"*

**4.4. Préparer les plaques de cultures (pour 2 plaques de drogues) :**

4.4.1 Annoter les plaques de crible et une feuille de suivie.

4.4.2 Répartir le **M9+(OP50-2X)** dans un rack.

4.4.3 Ajouter **300µl** de M9+(OP50-2X) dans chaque puits de deux plaques **96-puits** "greiner Bio-one" (multicanaux et cônes blancs 300µl).

4.4.4 Ajouter **3 µl de drogues** avec la micropipette multicanal (10µl) dans les puits correspondants (Répartition identique aux plaques mères).

4.4.5 **Transférer 150µl** dans une plaque « clone » après avoir pipeté/refoulé avec la micropipette multicanal (300µl).

**4.5. Ajouter les animaux :**

4.5.1 Récolter les animaux **LS1095** (4 boîtes de 6 jours à 23°C) avec du M9 et une pipette pasteur. Déposer ses animaux dans la cup du sortir.

4.5.2 Placer dans les colonnes "**1 à 11**", **4 jeunes adultes LS1095** par puit avec le biosorter  
**Fichier "LS1095 6Jours23"**

4.5.3 Laver la cup du sortir.

4.5.4 Récolter les animaux **PD4251** (2 à 4 boîtes de 6 jours à 15°C) avec du M9 et une pipette pasteur. Déposer ses animaux dans la cup du sortir

4.5.5 Placer dans la colonne "**12**", **2 jeunes adultes PD4251** par puit avec le biosorter  
**Fichier "PD4251 6Jours23"**

4.5.6 Recouvrir la plaque avec un **film poreux** et placer un couvercle pour limiter l'évaporation.

**4.6. Incubation 4 jours à 23°C**, agitation de 600<rpm<750 (Heidolf Titramax 1000)

**5. Readout : (J4)**

**5.1. Arrêt des cultures :**

Vérifier l'état des cultures, les témoins doivent être vigoureux avec une F2 au stade L1 et maximum L2. Les LS1095 doivent être paralysés (en forme de bâtonnet) avec une F1 au stade L1 maximum L2.

**5.2. Test de locomotion :**

5.2.1 Répartir les animaux d'une des deux plaques sur des boites de **NGM** préalablement marquées.

5.2.2 Laisser ces boites ouvertes **1 heure** sous une hotte aspirante.

5.2.3 Observer les animaux boites par boites et leur établir un **score qualitatif** (de 1 à 5). 1 représentant une mobilité équivalente au témoin PD4251 et 5 reflétant une absence complète de mobilité.

**5.3. Quantification de la fluorescence**

5.3.1 Répartir l'autre plaque sur deux plaques à fond conique, en laissant une ligne de rinçage entre chaque ligne (Voir tableau de répartition).

5.3.2 Vérifier les réservoirs du COPAS, changer le filtre du Reflex.

5.3.3 Lancer le programme d'hydratation du reflex.

5.3.4 Passer ces deux plaques au Reflex, fichier "**S-J Reflex PMT700**"

5.3.5 Créer un dossier "**Année-Mois-Jour**" et enregistrer la plaque avec la nomenclature appropriée pour stocker les data (Rincer entre les deux plaques).

**plaqXXXX-1 et plaqXXXX-2**

5.3.6 Récupérer les Data, les traiter avec le programme écrit sous R "**S-J400**".

*"Lancer le programme R. Spécifier le répertoire contenant le fichier "S-J400.R". Taper "source ("S-J400.r)".*

*Une fenêtre s'ouvre, choisissez le fichier plaqXXXX-1. Les figures s'éditent"*

**M9 :**

- 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

- 5 g NaCl

- 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>

- H<sub>2</sub>O qsp 1 litre

- Stérilisation (autoclave)

**Plaque 96 à fond plat à utiliser:**

- Greiner bio-one « CELLSTAR » thermosoudable, à fond plat. Réf :655201 (Dutscher).

**Film poreux :**

- Film poreux "AeraSeal"

Réf : 760214 Code B-NL-100 (Dutscher).

## **Annexe 5 : Programme informatique pour le traitement des données du crible Schwartz-Jampel.**

### **#Initialisation des constantes.**

```
COLOBS=11
COLOBSX=9

TOFMAX=1000
TOFMIN=400
EXTMAX=65000
PHGreenMIN=5000
NB_OBJETS_PAR_PUIT_MAX=80
NB_OBJETS_PAR_LIGNE_MAX= 8 * NB_OBJETS_PAR_PUIT_MAX
NBBARS=20

LIGNEMAX=8
COLMAX=12
MAXOBS=800
MINOBS=0
MAXOBSX=1000
MINOBSX=30

COLONNES=1:COLMAX
LIGNES=1:LIGNEMAX
```

```
#=====
=====#
```

### **#Recherche des fichiers à traiter et création des dossiers pour sauver les résultats.**

```
PLAQUE=file.choose()
DOSSIER=dirname(PLAQUE)
PLAQUES =list.files(path= DOSSIER,pattern="txt",full.names=T)
NOMS_PLAQUES=as.character(strsplit(basename(PLAQUES),".txt"))
dir.create(paste(DOSSIER,"/Figures",sep=""), showWarnings=F)
NB_PLAQUES=length(PLAQUES)
```

```
#=====
=====#
```

### **#Lecture des plaques, suppression des observations ayant des valeurs hors limites et compilation des données de toutes les plaques dans la variable "tab".**

```
for (k in 1:NB_PLAQUES)
{
  assign(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""),read.table(file =
PLAQUES[k],sep="\t",h=TRUE,fill=TRUE))
  #assign(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""),read.table(file =
PLAQUES[k],sep="\t",h=TRUE,fill=TRUE))
  assign(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""),subset(get(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep="")),get(
paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""))[,9]<=TOFMAX))
  assign(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""),subset(get(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep="")),get(
paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""))[,9]>=TOFMIN))
  assign(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep=""),subset(get(paste("tab_",NOMS_PLAQUES[k],sep="")),get(
```

*Annexe 5 : Programme informatique pour le traitement des données du crible Schwartz-Jampel.*

```
paste("tab_", NOMS_PLAQUES[k], sep=""), 10] <= EXTMAX))
  assign(paste("tab_", NOMS_PLAQUES[k], sep=""), subset(get(paste("tab_", NOMS_PLAQUES[k], sep="")), get(
paste("tab_", NOMS_PLAQUES[k], sep=""), 17) >= PHGreenMIN))
  assign(paste("tab_", NOMS_PLAQUES[k], sep=""), subset(get(paste("tab_", NOMS_PLAQUES[k], sep="")), get(
paste("tab_", NOMS_PLAQUES[k], sep=""), 2) != "NA"))

  Plaque=array(NOMS_PLAQUES[k], dim=c(dim(get(paste("tab_", NOMS_PLAQUES[k], sep=""))[1])[1], 1))
  assign(paste("tab_", NOMS_PLAQUES[k], sep=""), cbind(get(paste("tab_", NOMS_PLAQUES[k], sep="")), Plaqu
e))

  if(k==1)
  {
    tab=get(paste("tab_", NOMS_PLAQUES[k], sep=""))
  }
  if(k!=1)
  {
    tab=rbind(tab, get(paste("tab_", NOMS_PLAQUES[k], sep="")))
  }
}
TITRES_COLONNES=colnames(tab)

#=====
#-----#
#TRIE DES DONNEES SELON LES PLAQUES, LES LIGNES ET LES
COLONNES. Calcul pour chaque puits du nombre d'objets observés
et de la moyenne du paramètre mesuré.

for (k in NOMS_PLAQUES)
  {
    for(i in LIGNES)
    {

      assign(paste(letters[i], "_", k, sep=""), subset(get(paste("tab_", k, sep="")), get(paste("tab_", k, sep="
"))[3]==LETTERS[i]))
      for(j in COLONNES)
      {

        assign(paste(letters[i], j, "_", k, sep=""), subset(get(paste(letters[i], "_", k, sep="")), get(paste(lett
ers[i], "_", k, sep=""))[4]==j))
        assign(paste("moy_",
TITRES_COLONNES[COLOBS], "_", letters[i], j, "_", k, sep=""), mean(get(paste(letters[i], j, "_", k, sep=""))[ COLOBS]))

        assign(paste("nb_", letters[i], j, "_", k, sep=""), length(get(paste(letters[i], j, "_", k, sep=""))[1]))
      }
    }
  }

#=====
#-----#

#Regroupement des PLAQUES par paires

m=1

while (m < NB_PLAQUES)
  {
    k= NOMS_PLAQUES[m]
    l= NOMS_PLAQUES[m+1]
    i=1
    while (i < length(LIGNES))
    {
      assign(paste(letters[i], "_", k, sep=""), subset(get(paste("tab_", k, sep="")), get(paste("tab_", k, sep="
```

*Annexe 5 : Programme informatique pour le traitement des données du crible Schwartz-Jampel.*

```

""))[,3]==LETTERS[i]))
      i=i+1
      assign(paste(letters[i],"_",k,sep=""),subset(get(paste("tab_",k,sep="")),get(paste("tab_",k,sep="
""))[,3]==LETTERS[i]))

      assign(paste(letters[i/2],"_",k,"_",l,sep=""),rbind(get(paste(letters[i-
1],"_",k,sep="")),get(paste(letters[i],"_",k,sep=""))))
      i=i+1
    }
    i=1
    while (i < length(LIGNES))
    {
      assign(paste(letters[i],"_",l,sep=""),subset(get(paste("tab_",l,sep="")),get(paste("tab_",l,sep="
""))[,3]==LETTERS[i]))
      i=i+1

      assign(paste(letters[i],"_",l,sep=""),subset(get(paste("tab_",l,sep="")),get(paste("tab_",l,sep="
""))[,3]==LETTERS[i]))

      assign(paste(letters[(i+length(LIGNES))/2],"_",k,"_",l,sep=""),rbind(get(paste(letters[i-
1],"_",l,sep="")),get(paste(letters[i],"_",l,sep=""))))
      i=i+1
    }
    m=m+2
  }
m=1
while (m < NB_PLAQUES)
{
  k= NOMS_PLAQUES[m]
  l= NOMS_PLAQUES[m+1]
  for(i in LIGNES)
  {
    for(j in COLONNES)
    {
      assign(paste(letters[i],j,"_",k,"_",l,sep=""),subset(get(paste(letters[i],"_",k,"_",l,sep="")),ge
t(paste(letters[i],"_",k,"_",l,sep=""))[,4]==j))
      assign(paste("moy_",
TITRES_COLONNES[COLOBS],"_",letters[i],j,"_",k,"_",l,sep=""),mean(get(paste(letters[i],j,"_",k,"_",l,sep="))
[, COLOBS]))

      assign(paste("nb_",letters[i],j,"_",k,"_",l,sep=""),length(get(paste(letters[i],j,"_",k,"_",l,sep
=""))[,1]))
    }
  }
  m=m+2
}

```

```

#=====
#####

```

**#Définition des labels et de leur position sur l'axe des abscisse pour la figure "nb vers et moyenne de"**

```

abs=abs2=NULL
absdax=seq(1,96,6)

for(i in 1: LIGNEMAX)
{
  abs=c(abs,paste(letters[i], 1:12, sep=""))
  abs2=c(abs2,paste(letters[i], c(1,7), sep=""))
}

```

#Pour chaque plaques: Compilation du nombre d'individu et de la moyenne du

*Annexe 5 : Programme informatique pour le traitement des données du crible Schwartz-Jampel.*

```
m=1
while (m < NB_PLAQUES)
{
  k= NOMS_PLAQUES[m]
  l= NOMS_PLAQUES[m+1]
  assign(paste("nb_",k,"_",l,sep=""),NULL)
  assign(paste("moy_",TITRES_COLONNES[COLOBS],"_",k,"_",l,sep=""),NULL)
  for(i in LIGNES)
  {
    for(j in COLONNES)
    {

      assign(paste("nb_",k,"_",l,sep=""),c(get(paste("nb_",k,"_",l,sep="")),get(paste("nb_",letters[i],
1: COLMAX,"_",k,"_",l, sep="")[j])))

      assign(paste("moy_",TITRES_COLONNES[COLOBS],"_",k,"_",l,sep=""),c(get(paste("moy_",TITRES_COLONNE
S[COLOBS],"_",k,"_",l,sep="")),get(paste("moy_",TITRES_COLONNES[COLOBS],"_",letters[i], 1:
COLMAX,"_",k,"_",l, sep="")[j])))
    }
  }
  m=m+2
}

#=====
#####

# Création du PDF "nb vers et moyenne de GREEN"

TITRE=paste(DOSSIER,"/FIGURES/", "nb vers et moyenne de ",TITRES_COLONNES[COLOBS], ".pdf", sep="")
pdf(TITRE,width=12,height=10)

m=1
while (m < NB_PLAQUES)
{
  k= NOMS_PLAQUES[m]
  l= NOMS_PLAQUES[m+1]
  par(mfrow=c(2,1))
  plot(get(paste("nb_",k,"_",l,sep="")),type="h",main=paste(k,"_",l," Nombre de vers par
puits"),xlab="puits",ylab="nb vers",col="red",xaxt="n",lwd=3)
  axis(1,absdax,abs2)
  top=max(get(paste("nb_",k,"_",l,sep="")))
  #pas=(top-100)/10
  #abline(h=seq(100,top,by= 100),lty=3) #quadrillage horizontal

  plot(get(paste("moy_",TITRES_COLONNES[COLOBS],"_",k,"_",l,sep="")),type="h",main=paste(k,"_",l,"
Moyenne de ", TITRES_COLONNES[COLOBS] ,"par
puits"),xlab="puits",ylab=TITRES_COLONNES[COLOBS],col="green",xaxt="n",lwd=3)
  axis(1,absdax,abs2)
  top2=max(get(paste("moy_",TITRES_COLONNES[COLOBS],"_",k,"_",l,sep="")))
  #pas2=(top2-100)/10
  #abline(h=seq(100,top2,by=-100),lty=3)
  m=m+2
}
dev.off()

#=====
#####
```

## # Création du PDF "Puits"

```
Puits=paste(DOSSIER,"/FIGURES/", "Puits.pdf", sep="")
pdf(Puits,width=11,height=8)

m=1
while (m < NB_PLAQUES)
  {
    k= NOMS_PLAQUES[m]
    l= NOMS_PLAQUES[m+1]
    for(i in LIGNES)
      {
        par(mfrow=c(3,4)) #1 feuille "3 x 4" par ligne
        for(j in COLONNES)
          {
            affich1=subset(get(paste(letters[i],j,"_",k,"_",l,sep=""))[,
COLOBS],get(paste(letters[i],j,"_",k,"_",l,sep=""))[, COLOBS]<=MAXOBS)
            affich=subset(affich1,affich1>=MINOBS)
            affich2=subset(get(paste(letters[i],j,"_",k,"_",l,sep=""))[,
COLOBSX],get(paste(letters[i],j,"_",k,"_",l,sep=""))[, COLOBSX]<=MAXOBSX)
            affich2=subset(affich2,affich2>=MINOBSX)
            if(length(affich)!=0)
              {

                plot(affich2,affich,ylim=c(0,
1.1*signif(max(tab[,COLOBS]),digits=1)),breaks=seq(0,
1.1*signif(max(tab[,COLOBS]),digits=1),signif(signif(max(tab[,COLOBS]),digits=1)/NBBARS,digits=1)),xlim=c(0,
1.1*signif(max(tab[,COLOBSX]),digits=1)),main=paste(k,"_",l," puit ",
LETTERS[i],j,sep=""),cex.main=0.8,xlab=TITRES_COLONNES[COLOBSX],ylab=TITRES_COLONNES[COLOBS])

              }
            else
              {
                cat("Aucun éléments dans le puit ",letters[i],j," pour la plaque
",k,"_",l,"\n",sep="") #prévient lorsque qu'il n'y a pas de données sur le puit.
              }
          }
        }
      m=m+2
    }
dev.off()
#=====
=====
```



## UTILISATION DU NÉMATODE *CAENORHABDITIS ELEGANS* COMME OUTIL DE CRIBLAGE DANS LA RECHERCHE DE TRAITEMENTS ET DE CIBLES CONTRE PLUSIEURS MALADIES NEUROMUSCULAIRES.

Les techniques de criblage actuelles (*in vitro* et *in silico*) sont dépendantes des efforts menés en biologie médicinale pour identifier des cibles biologiques pertinentes ; cibles difficiles à définir pour les maladies génétiques dites "perte de fonction". De plus, les composés issus de ces cribles s'avèrent souvent inefficaces et/ou toxiques une fois confrontés à la complexité physiologique d'un organisme entier. Pour contourner ce problème, nous proposons d'utiliser le nématode *C. elegans*, notamment pour des maladies répondant aux critères suivants : i) physiopathologie complexe et/ou mal comprise excluant le développement à court terme de médicaments sur une base rationnelle, ii) peu d'espoir de thérapie génique/cellulaire à court terme, iii) conservation chez *C. elegans* du gène relié à la maladie humaine et induisant un phénotype exploitable une fois inactivé.

Nous démontrons ici que ce petit nématode permet de tester, à moindre coût, un grand nombre de composés chimiques tout en conservant la complexité physiologique d'un animal entier. De plus, la souplesse génétique de cet animal permet d'apporter rapidement des informations sur le mode d'action des composés identifiés. Ainsi, en plus du but initial visant à identifier des molécules bioactives à intérêt thérapeutique, cette approche peut permettre de dégager de nouvelles cibles moléculaires utiles pour l'industrie chimique, et cruciales pour la recherche de traitements contre les maladies perte de fonction.

Finalement, nous présentons comment mettre en place une telle stratégie, notamment pour la myopathie de Duchenne, l'amyotrophie spinale et le syndrome de Schwartz-Jampel. Enfin, nous présentons les résultats obtenus lors des différentes campagnes de criblage, les validations des molécules les plus prometteuses et les travaux effectués pour tenter de comprendre leur mode d'action chez le nématode.

**Mots clés :** *Caenorhabditis elegans*, Criblage pharmaceutique, Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), Dystrophine, souris *mdx*, Spinal Muscular Atrophy (SMA), Syndrome de Schwartz-Jampel, HSPG-2, Perlecan, Anhydrase Carbonique, Sérotonine, Métabolomique.



## CAENORHABDITIS ELEGANS AS CHEMICAL SCREENING TOOL TO FIND COMPOUNDS AND TARGETS AGAINST NEUROMUSCULAR DISEASES.

Current high-throughput screening methods for drug discovery rely on the existence of targets. Moreover, most of the hits generated during screenings turn out to be invalid after further testing in animal models. To by-pass these limitations, efforts are now being made to screen chemical libraries on whole animals. One of the most commonly used animal model in biology is the murine model *Mus musculus*. However, its cost limit its use in large-scale therapeutic screening. In contrast, the nematode *Caenorhabditis elegans* is gaining momentum as screening chemical tool. This tiny worm combine genetic amenability, low cost, and culture conditions that are compatible with large-scale screens. Its main advantage is to allow high-throughput screening in a whole-animal context. Moreover, its use is not dependent on the prior identification of a target and permits the selection of compounds with an improved safety profile.

Here, we introduce this approach with the Duchenne Muscular Dystrophy, the Spinal Muscular Dystrophy and the Schwartz-Jampel syndrome. We present the methodology used with each model to screen up to 7,000 compounds and the results of these screening campaigns. We further present the validation of our best hits and try to understand their mechanism of action.

**Key words:** *Caenorhabditis elegans*, *mdx* mice, Chemical screen, Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), Dystrophin, Spinal Muscular Astrophy (SMA), Survival of Motor Neuron (SMN), Schwartz-Jampel syndrome, HSPG-2, Perlecan, Carbonic Anhydrase, Serotonin, Metabolomic.

Centre de Génétique moléculaire et cellulaire,  
CNRS- UMR 5534  
Laboratoire Génétique de *Caenorhabditis elegans*  
16, rue Raphaël Dubois  
69622 Villeurbanne

