



**HAL**  
open science

# La déficience en Adénylosuccinate Lyase - de la déficience métabolique aux défauts musculaires en utilisant le *Caenorhabditis elegans* comme modèle animal

Roxane Marsac

► **To cite this version:**

Roxane Marsac. La déficience en Adénylosuccinate Lyase - de la déficience métabolique aux défauts musculaires en utilisant le *Caenorhabditis elegans* comme modèle animal. Génétique. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0321 . tel-02486193

**HAL Id: tel-02486193**

**<https://theses.hal.science/tel-02486193>**

Submitted on 20 Feb 2020

**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.

# UNIVERSITE DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE, N° 154

Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR CNRS 5095

Equipe : Génétique des Réseaux Métaboliques

## Thèse

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX**

Spécialité : Génétique

**La déficience en Adénylosuccinate Lyase - de la déficience  
métabolique aux défauts musculaires en utilisant *Caenorhabditis  
elegans* comme modèle animal**

Présentée et soutenue publiquement par

**Roxane MARSAC**

le 10 décembre 2019

Thèse dirigée par le Docteur José-Eduardo GOMES

Jury

**Professeur Thierry NOEL**, PU, Université de Bordeaux

**Docteur Florence SOLARI**, CR INSERM, Université de Lyon

**Docteur Renaud LEGOUIS**, DR INSERM, Université de Paris Sud

**Docteur Marie GENDREL**, MCU, ENS de Paris

**Professeur Sophie JAVERZAT**, PU, Université de Bordeaux

**Docteur José-Eduardo GOMES**, MCU, Université de Bordeaux

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Examinateur



## **The Adenylosuccinate lyase deficiency - from metabolic deficiency to muscular defect using *C. elegans* as an animal model**

The purine biosynthesis pathway is a metabolic network conserved from prokaryotes to humans, ensuring ATP and GTP homeostasis. Purines can either be synthesized *de novo*, reused, or produced by interconversion of extant metabolites using the so-called recycling pathway. Moreover, intermediates can act as signal metabolites regulating gene expression. This pathway is well characterized in microorganisms such as yeast or bacteria, but little is known about its regulation in metazoans. Different diseases are associated with deficiencies in purine synthesis enzymes leading to neuromuscular defects, autistic spectrum behaviors and psychomotor delay in humans. We focused our analysis on the deficiency of Adenylosuccinate Lyase (ADSL), which is an enzyme involved in the purine *de novo* and the recycling pathways causing neuronal and muscular symptoms in patients.

To better understand mechanisms underlying this deficiency, we have established *C. elegans* as a metazoan model organism to study the purine biosynthesis pathway, specially the ADSL deficiency. In our study, by sequence alignment, HPLC profiling and functional complementation in yeast, we have shown that both the *de novo* and the recycling pathway are functionally conserved in *C. elegans*. Thanks to our study, we are able to ascribe developmental and tissue specific phenotypes to separable steps of the purine metabolism network in a metazoan model organism. Our analysis shows that ADSL activity in the recycling pathway plays a crucial role for germline maintenance, for muscle integrity and during the post-embryonic development.

## **La déficience en Adénylosuccinate Lyase - de la déficience métabolique aux défauts musculaires en utilisant le *Caenorhabditis elegans* comme modèle animal**

La voie de biosynthèse des purines est un réseau métabolique conservé de procaryotes à l'Homme, assurant l'homéostasie de l'ATP et du GTP. Les purines peuvent être synthétisées *de novo*, réutilisées ou produites par interconversion de métabolites existants à l'aide de la voie dite de recyclage. De plus, les intermédiaires peuvent agir en tant que métabolites signals régulant l'expression génique. Cette voie est bien caractérisée chez des micro-organismes tels la levure ou la bactérie, mais peu de choses sont connues chez les métazoaires. Différentes maladies sont associées à des déficiences enzymatiques de la voie de biosynthèse des purines conduisant à des anomalies neuro-musculaires, des comportements du spectre autistique et à un retard psychomoteur chez l'Homme. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la déficience en Adénylosuccinate Lyase (ADSL), une enzyme impliquée dans la voie *de novo* et dans la voie de recyclage des purines, responsable des symptômes neuronaux et musculaires chez les patients.

Pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à cette déficience, nous avons établi *C. elegans* comme organisme modèle métazoaire pour étudier la voie de la biosynthèse des purines, et en particulier le déficit en ADSL. Dans notre étude, par alignement de séquence, profil HPLC et complémentation fonctionnelle chez la levure, nous avons montré que la voie *de novo* et la voie de recyclage sont fonctionnellement conservées chez *C. elegans*. Grâce à notre étude, nous sommes en mesure d'attribuer des phénotypes développementaux et tissus spécifiques à des étapes séparables du métabolisme des purines dans un organisme modèle métazoaire. Notre analyse montre que l'activité ADSL dans la voie de recyclage joue un rôle crucial pour le maintien de la lignée germinale, pour l'intégrité musculaire et pendant le développement post-embryonnaire.



## Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier l'ensemble des **membres du jury** d'avoir pris le temps de lire et d'examiner mon travail de doctorat, de faire le déplacement pour venir m'écouter et discuter avec moi.

Je remercie également l'**AFM-Téléthon** qui a cru en ce projet et en moi en finançant ce travail de thèse pendant trois ans.

Merci à **Catherine** et **Isabelle** qui se sont démenées pour mon contrat doctoral afin de me sortir des méandres de l'administration universitaire.

Je remercie **José**, mon directeur de thèse, qui a lui aussi suffisamment cru en moi pour faire une demande de financement avec et pour moi. Merci d'avoir renouvelé ta confiance en moi, de m'avoir encadrée tout ce temps et de m'avoir permis de grandir et de devenir indépendante.

J'ai eu la chance de passer 3 ans (et même plus) dans une équipe où les personnes sont complémentaires. Merci à **Bertrand**, chef de mon équipe d'accueil, d'avoir été à l'écoute et d'être de bon conseil, merci pour sa bienveillance. Merci à **Benoît** qui est une bible vivante de la biochimie. Et merci à **Michel** dont la gentillesse n'a pas de limite, merci d'être toujours aussi enthousiaste et de toujours avoir une parole bienveillante.

A **Jojo**, dont les fous rires incontrôlables vont me manquer. Merci pour ta bonne humeur et ton énergie.

A **Christelle** avec qui j'ai partagé le bureau des étudiants et bien plus encore. Merci pour ton soutien au quotidien et pour les longues discussions que nous avons pu avoir.

Merci à tous de m'avoir aidée, soutenue, conseillée.

Je tiens particulièrement à remercier **Laëtitia**, ma morue, une collègue et amie. Merci pour tout ce temps passé ensemble, toutes ces fois où nous avons discuté autant professionnellement que personnellement. Ta « folie » a rendu plus douce cette période stressante. Ton soutien m'a fait le plus grand bien. Tes conseils ont (souvent) été entendus. Merci pour toutes ces rigolades, ces sous-entendus, ces psychothérapies de comptoir, etc... Merci...

Ensuite, je tiens à remercier mes amies, **Anne**, **Marion Blonde**, **Amandine**, **Marion Brune**, **Amanda** de m'avoir supportée et suivie depuis toutes ces années. D'avoir subi mes absences, mes indisponibilités, mes histoires de vers auxquelles, je suppose, elles n'ont pas du comprendre grand chose. Merci d'être toujours là. Friends Forever!!!

Un énorme Merci à **Gaëtan**, mon binôme de toujours. Nous avons partagé cette expérience du doctorat en décalé mais nous nous sommes toujours soutenus, y compris dans les

moments de doutes et de pertitions. Merci pour ces discussions sans fin. Merci pour ton soutien et tes conseils. Et pas merci de me mettre la pression sans le vouloir avec toutes tes publiés et tous les congrès que tu fais ;)

Enfin, je tiens à remercier **ma famille**.

**Mon grand-père** qui est un peu dépassé par les évènements mais qui s'inquiète toujours pour moi et pour mon avenir. J'aurais tellement aimé que tu puisses être là le jour de ma soutenance...

Merci à mon frère, **William**, et à **Laurent**, mon beau-père qui, je le sais, me soutiennent de loin.

Mon plus grand merci va ensuite à ma mère, **Hélène**. Une femme formidable qui s'est pliée en quatre, qui a fait des sacrifices, pour que j'arrive à réaliser mon rêve. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi, pour tout ton soutien, ton aide, tes conseils, ta force et ton courage. Merci d'avoir toujours cru en moi, bien plus que moi je n'ai cru en moi et ce, depuis toujours. Merci pour tout.

Pour finir, je remercie mon compagnon, **Gérald**, qui m'a soutenue comme jamais pendant ces trois ans. Qui m'a soulagée dans le quotidien afin que je puisse me concentrer exclusivement sur ma thèse. Merci à toi d'être toi, merci de m'avoir encouragée, re-motivée, soutenue, conseillée, remise dans le droit chemin lorsqu'il le fallait. Merci pour tout ce que tu as fait. Et merci à **ton fils** qui m'a bien embêtée avec ses questions pour savoir ce que je faisais et qui m'a soutenue à sa façon ;)

Merci à tous...

# Avant-propos

## Publications :

- **Marsac R**, Pinson B, Saint-Marc C, Olmedo M, Artal-Sanz M, Daignan-Fornier B, Gomes JE. « Purine homeostasis is necessary for developmental timing, germline maintenance and muscle integrity in *Caenorhabditis elegans* ». Genetics. 2019 Jan 30. pii: genetics 301062.2018. doi: 10.1534/genetics.118.301062
- Rodríguez-Palero MJ, López-Díaz A, **Marsac R**, Gomes JE, Olmedo M, Artal-Sanz M. « An automated method for the analysis of food intake behaviour in *Caenorhabditis elegans* ». Sci Rep. 2018 Feb 26;8(1):3633. doi: 10.1038/s41598-018-21964-z.

## Communications :

### Communication Orale soumise à comité de lecture :

- **Marsac R**, Pinson B, Saint-Marc C, Olmedo M, Artal-Sanz M, Daignan-Fornier B, Gomes JE. (Janvier 2018). « Adenylosuccinate Lyase (ADSL) deficiency in the recycling pathway is responsible for post-embryonic developmental delay, germline maintenance and muscle defects. » (Ver midi, Marseille, France)

### Communications Affichées soumises à comité de lecture :

- **Marsac R**, Pinson B, Saint-Marc C, Olmedo M, Artal-Sanz M, Daignan-Fornier B, Gomes JE. (Mars 2019). « Purine Homeostasis Is Necessary for Developmental Timing, Germline Maintenance and Muscle Integrity in *Caenorhabditis elegans* ». (Myology, Bordeaux, France)
- **Marsac R**, Pinson B, Saint-Marc C, Olmedo M, Artal-Sanz M, Daignan-Fornier B, Gomes JE. (Mars 2019). « Purine Homeostasis Is Necessary for Developmental Timing, Germline Maintenance and Muscle Integrity in *Caenorhabditis elegans* ». (Ver midi, Paris, France)
- **Marsac R**, Pinson B, Saint-Marc C, Olmedo M, Artal-Sanz M, Daignan-Fornier B, Gomes JE. (Juin 2017). « La déficience en Adenylosuccinate Lyase - de la déficience métabolique aux défauts musculaires en utilisant *C. elegans* comme animale modèle ». (Conférence des jeunes chercheurs de l'AFM-Téléthon, Paris, France)

## Encadrement :

**Mai-juin 2017 : Solenne Boutet**, 2ème année de Licence de Biologie à l'Université de La Rochelle.



## **Abréviations**

ADA : Adénosine DésAminase

ADK : Adénosine Kinase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADSL : Adénylo Succinate Lyase

ADSS : AdényloSuccinate Synthase

ADSSL1 : AdényloSuccinate Synthétase-like 1

AICAR : Forme déphosphorylée du ZMP

AMD : Adénosine désaminase

AMP : Adénosine MonoPhosphate

AMPD : AMP Désaminase

AMPK : Adenosine Monophosphate activated Protein Kinase

APRT : Adénosine PhosphoRibosylTransférase

ARN : Acide Ribo-Nucléique

ATIC : 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleotide Formyltransferase

BWM : Body wall muscle - muscle de la paroi du corps

CDD : Cytidine désaminase

DICS : Déficit Immunitaire Combiné Sévère

DTC : Distal Tip Cell

FEM : Feminization

GMP : Guanosine MonoPhosphate

GMPS : GMP synthase

GPPAT : Glutamine PhosphoribosylPyrophosphate AmidoTransferase

GSC : Germline stem cells - Cellules souches de la lignée germinale

HER : Hermaphrodization

HPRT : Hypoxanthine Guanine Phospho-RibosylTransférase

IGF : Insulin/Insulin Like Growth Factor

IMD1 : Inosine-5'-Monophosphate Déshydrogénase

IMP : Inosine MonoPhosphate

JNM : Jonctions neuro-musculaires

kb : kilobase

MEF : Mouse Embryonic Fibroblasts

NAD<sup>+</sup> : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NBRP : National BioResource Project

NRF2 : Nuclear Respiratory Factor-2

pb : paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

PKM2 : Pyruvate kinase

PNP : Purine Nucléoside Phosphorylase

PRPP : PhosphoRibosyl PyroPhosphate

R5P : Ribose-5-Phosphate

SAdo : Succinyl Adénosine

SAH : Succinyl AdénosylHomocystéine

SAM : Succinyl AdénosylMéthionine

SAMP : Succinyl AMP

SEN1 : Sentrin/SUMO protéase spécifique 1

SKS : Syndrome de Kelley-Seegmiller

SZMP : Succinilo ZMP

TRA : Transformer

XMP : Xanthosine Monophosphate

ZMP : 5-aminoimidazole- 4-carboxyamide ribonucléotide

## Table des matières

I. Introduction	1
A. Le métabolisme des purines	1
1. Les purines	2
2. La voie de biosynthèse des purines et ses régulations	3
3. ZMP, sZMP et sAMP, des intermédiaires métaboliques aux effets régulateurs	7
B. Les pathologies liées à des déficiences enzymatiques de la voie de biosynthèse des purines	9
1. Les pathologies en amont de la voie de novo	9
2. Les pathologies liées à la voie de recyclage	9
1. Les pathologies affectant le système immunitaire	10
2. Les pathologies induisant l'excrétion d'acide urique	10
3. Les pathologies affectant spécifiquement le muscle squelettique	12
4. La pathologie liée au cycle du méthyle	13
3. La pathologie liée à la voie de novo	13
C. La déficience en ADSL	13
D. Le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	18
1. Généralités et praticité en laboratoire	18
2. Cycle de vie	20
3. Les muscles striés	20
1. Structure	21
2. Développement du muscle strié	23
3. Contraction musculaire	26
4. Le système nerveux	28
1. Structure	28
2. Conduction du signal nerveux	29
5. Lignée germinale et différenciation sexuelle	30
1. Structure et mise en place de la lignée germinale	30
2. Détermination sexuelle de la lignée germinale	32
E. Objectif de la thèse	34
II. Résultats	36
A. Analyse fonctionnelle de la voie de biosynthèse des purines chez <i>C. elegans</i>	36
1. Analyse bio-informatique	36
2. Complémentation hétérologue chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
3. Analyse des profils métabolomiques des mutants de <i>C. elegans</i>	42
B. Lignée germinale et stérilité	45
1. Le maintien de la lignée germinale au stade adulte chez <i>adsl-1</i> ( $\Delta$ )	47
2. Sauvetage métabolique du phénotype de stérilité du mutant <i>adsl-1</i> ( $\Delta$ )	47
3. Analyse de la fertilité du mutant <i>atic-1</i> ( $\Delta$ )	49

4. Létalité embryonnaire	52
C. Le développement post-embryonnaire	53
1. Développement post-embryonnaire de la taille	53
1. Mesure de taille au stade adulte	53
2. Mesure de taille au cours du développement post-embryonnaire	55
2. Durée du développement post-embryonnaire	55
D. La durée de vie	58
E. La fonction neuronale	59
1. La jonction neuro-musculaire	59
2. La réponse mécano-sensorielle	60
F. La motricité et le muscle	62
1. La motricité et l'accumulation de ZMP	62
2. La motricité du mutant <i>adsl-1</i> ( $\Delta$ )	65
3. La motricité du mutant <i>adsl-1</i> ( $\Delta$ ) au cours développement post-embryonnaire	66
4. Le muscle au stade adulte	66
5. Structure du muscle au cours du développement post-embryonnaire	68
1. Structure générale du BWM au cours du développement post-embryonnaire	68
2. Les fibres de myosine au cours du développement post-embryonnaire	68
G. La déficience en ADSL : Voie de novo vs. voie de recyclage	70
H. Sauvetage du mutant <i>adsl-1</i> ( $\Delta$ ) par <i>adsl-1</i> (WT)	71
III. Discussion	75
A. Voie des purines et lignée germinale	76
1. La déficience en ATIC responsable d'une baisse de fertilité	76
2. Le recyclage des purines et le maintien des GSCs	78
B. Métabolisme des purines et développement post-embryonnaire	81
1. Les purines et la taille	81
2. La voie de recyclage et la vitesse de développement post-embryonnaire	82
3. La transition stade L4 vers le stade adulte : la phase de léthargie	83
4. ADSL pendant le développement embryonnaire	84
5. Développement et disponibilité en ATP	86
C. ZMP et SZMP et longévité	87
1. L'accumulation de ZMP et la longévité	87
2. L'accumulation de SZMP et la longévité	88
D. Métabolisme des purines et fonction neuro-musculaire	89
1. La fonction neuronale et les déficiences en ATIC et ADSL	89
2. La fonction musculaire et les déficiences en ATIC et ADSL au stade adulte	90
1. La déficience en ATIC et la motricité	91
2. La déficience en ADSL et le muscle	92
E. Les défauts musculaires au cours du développement post-embryonnaire	93

IV. Perspectives	96
A. Expression spatio-temporelle de ADSL-1 et ATIC-1	96
B. Analyse fonctionnelle tissus spécifiques de ADSL-1	96
C. Analyse de relations d'épistasie	98
1. Les effets de l'accumulation de SAMP	98
2. La carence en AMP	98
3. La balance entre les purines A et les purines G	99
D. Approches gènes candidats	100
1. Le gène hétérochronique lin-42	100
2. La voie GLP-1/Notch	100
3. Le facteur myogénique HLH-1	101
VI. Conclusions	102
1. Le nématode <i>C. elegans</i> comme modèle animal de la déficience en ADSL	103
2. L'effet pléiotrope d' <i>adsl-1</i>	104
3. Vers une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la déficience en ADSL	104
V. Matériel et Méthodes	107
A. Souches de <i>C. elegans</i> et culture	107
B. Synchronisation des nématodes	108
C. RNAi	108
D. Sauvetage d' <i>adsl-1</i> ( $\Delta$ )	109
E. Imagerie	109
F. Profil métabolique par HPLC	110
G. Longévité	110
H. Locomotion et tests de comportement	110
I. Développement post-embryonnaire	111
J. Fertilité	111
K. Statistiques	111
VI. Bibliographie	112
VII. Annexes	126
A. Article 1	126
B. Article 2	146
C. Séquences des mutants <i>adsl-1</i> ( $\Delta$ ), <i>atic-1</i> ( $\Delta$ ) et <i>ppat-1</i> ( $\Delta$ )	158



## **Table des illustrations**

Figure 1 : Structures moléculaires des purines.

Figure 2 : Voie de biosynthèse des purines.

Figure 3 : Les effets du ZMP sur le métabolisme.

Figure 4 : Identification du SZMP comme régulateur de PKM2.

Figure 5 : Le nématode *Caenorhabditis elegans*.

Figure 6 : Le muscle de la paroi du corps (BWM) chez le nématode *Caenorhabditis elegans*.

Figure 6 Bis : Le muscle squelettique chez les vertébrés.

Figure 7 : Jonction neuro-musculaire.

Figure 8 : Le système nerveux du nématode *C. elegans*.

Figure 9 : La lignée germinale du nématode *C. elegans*.

Figure 10 : Alignements de séquence de PPAT-1, ADSL-1 et ATIC-1 de *C. elegans* avec l'orthologue le plus proche chez l'Homme (*H. sapiens*), le rat (*Rattus norvegicus*), la mouche (*Drosophila melanogaster*) et la levure (*S. cerevisiae*).

Figure 11 : Conservation de la voie de biosynthèse des purines chez *C. elegans*.

Figure 12 : Complémentation hétérologue chez la levure *S. cerevisiae*.

Figure 13 : Schémas des voies de biosynthèse des purines prédites chez les mutants *adsl-1(Δ)*, *atic-1(Δ)* et *ppat-1(Δ)*.

Figure 14 : Profils métaboliques obtenus par HPLC chez *C. elegans*.

Figure 15 : Lignée germinale au stade adulte chez *adsl-1(Δ)*.

Figure 16 : La fertilité du mutant *atic-1(Δ)* et l'accumulation de ZMP.

Figure 17 : La létalité embryonnaire.

Figure 18 : Le développement post-embryonnaire de la longueur de *C. elegans*.

Figure 19 : La durée du développement post-embryonnaire de *C. elegans*.

Figure 20 : La longévité des mutants de la voie de biosynthèse des purines chez *C. elegans*.

Figure 21 : La fonction neuronale des mutants de la voie de biosynthèse des purines chez *C. elegans*.

Figure 22 : Test de motricité chez *C. elegans*.

Figure 23 : Motricité et traitement à l'AICAR chez *C. elegans*.

Figure 24 : Motricité au cours du développement post-embryonnaire chez *C. elegans*.

Figure 25 : Structure des fibres de myosine chez les mutants de la voie de biosynthèse des purines chez *C. elegans*.

Figure 26 : Structure des muscles striés du *C. elegans* au cours du développement post-embryonnaire.

Figure 27 : Lignée germinale dans un contexte d'ARN interférant.

Figure 28 : La bioluminescence au cours des phases de développement post-embryonnaire.

Figure 29 : Profil métabolomique obtenu par HPLC de la souche sauvage au cours du développement.

Figure 30 : La longévité du *C. elegans* nourri avec une *E. coli* MG1655.

Figure 31 : Le phénotype *muV* obtenu suite au sauvetage du mutant *adsl-1(Δ)* par *adsl-1(WT)*.

Figure 32 : Schéma récapitulant génotypes, phénotypes, causes connues, conséquences possibles et expériences proposées.

## **Table des tableaux**

Tableau 1: Liste des pathologies associées à la voie de biosynthèse des purines chez l'Homme.

Tableau 2 : Sauvetage par supplémentation en nucléosides/nucléotides de la stérilité du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ).

Tableau 3 : Phénotype de lignée germinale et de vulve chez *adsl-1*(RNAi) et *adss-1*(RNAi).



# **I. Introduction**

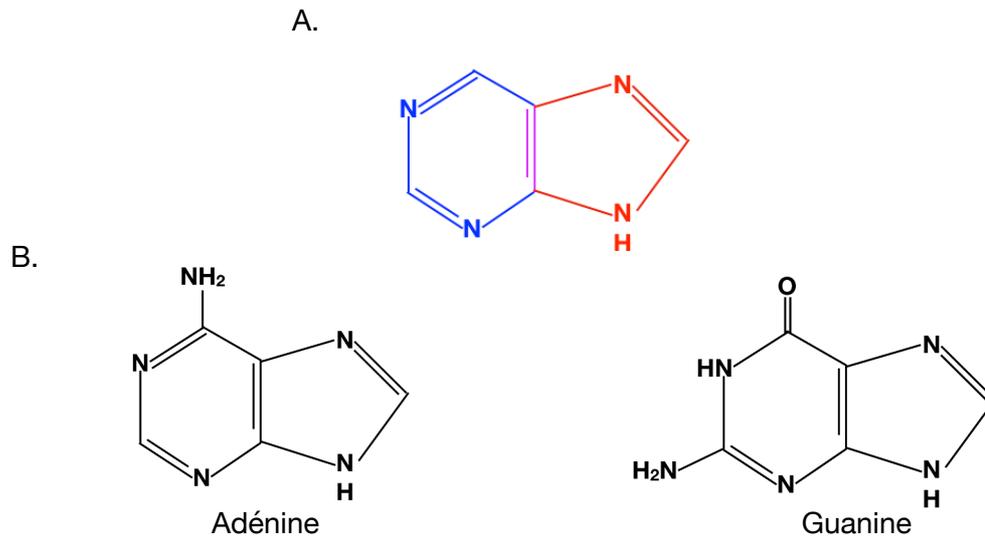
## **A. Le métabolisme des purines**

Le métabolisme est l'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent au sein d'un être vivant, d'une cellule. Au cours de sa vie, la cellule va se développer, se maintenir en vie mais aussi se reproduire et/ou se renouveler. La cellule interagit avec son environnement et est soumise à des signaux externes qui vont avoir des effets sur la signalisation interne de la cellule pour la prolifération, la différenciation ou encore la mort cellulaire. Ainsi, la cellule a besoin de compenser ces signaux extérieurs pour maintenir un équilibre, c'est l'homéostasie cellulaire.

Lorsque la cellule se reproduit ou se renouvelle, elle va le faire par division cellulaire (par scissiparité pour les procaryotes et par mitose pour les eucaryotes). Pour cela, les cellules ont besoin de produire des acides nucléiques afin de fournir les bases (A, T, G et C) nécessaire à la copie de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique). En effet, les nucléotides sont les unités monomériques des acides nucléiques. Au cours de sa vie, la cellule va transcrire les gènes portés par l'ADN en ARN (Acide Ribo-Nucléique) messenger - composé des bases A, U, G et C - afin d'être eux-mêmes traduits en protéines. Sans ARN, la synthèse protéique n'est pas possible, le matériel génétique n'est pas répliqué et les divisions cellulaires n'ont pas lieu.

Purines (A et G) et pyrimidines (C, T et U) composent l'ADN et l'ARN notamment mais sont aussi des molécules essentielles à de nombreuses fonctions cellulaires nécessaires à la vie de la cellule. Les nucléotides participent activement à la majorité des réactions biochimiques de la cellule.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la voie de biosynthèse des purines.



**Figure 1 : Structures moléculaires des purines.** A. Structure générale d'une molécule de purine. En bleu, le cycle pyrimidique, en rouge le cycle imidazole, en violet la partie commune aux deux cycles. B. Structure moléculaire de l'Adénine et de la Guanine.

## 1. Les purines

Les purines sont des molécules azotées hétérocycliques constituées d'un cycle pyrimidine fusionné à un cycle imidazole (définition Wikipédia, Figure 1A). Elles regroupent deux bases nucléiques, l'Adénine (A) et la Guanine (G) (Figure 1B). Adénine et Guanine sont des précurseurs d'autres molécules intervenant dans des voies de signalisations (AMP cyclique, GMP cyclique ou Guanosine) et peuvent servir de co-facteurs pour de nombreuses réactions enzymatiques (NAD, Co-enzyme A...) (Theodoulou *et al.* 2014 ; Sultani *et al.* 2017). L'ajout d'un sucre sur des bases constitue les nucléosides, Adénosine et Guanosine respectivement dans le cas de l'Adénine et de la Guanine. La plupart des nucléosides n'ont pas de rôles biologiques. L'Adénosine est une exception. Chez les mammifères, l'Adénosine peut agir comme une « hormone locale ». Ce nucléoside se retrouve dans la circulation sanguine et va pouvoir agir localement sur des types cellulaires spécifiques. Il va pouvoir influencer la dilatation des vaisseaux sanguins, la contraction des muscles lisses, la décharge neuronale, la libération de neurotransmetteurs, etc... (Garrett et Grisham, Biochemistry, Second Edition). Les nucléotides sont des nucléosides phosphates dont l'ATP et le GTP font partie. L'ATP (Adénosine triphosphate) fournit l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme, pour la locomotion, les divisions cellulaires ou encore pour le transport actif de molécules à travers les membranes biologiques. Le GTP (Guanosine triphosphate) sert de source immédiate d'énergie pour les réactions endergoniques de la synthèse des protéines. En outre, les nucléotides agissent dans la régulation métabolique en réponse aux enzymes clés du métabolisme intermédiaire et à la concentration relative en AMP, ADP et ATP. Ainsi, les purines sont impliquées dans beaucoup de fonctions cellulaires comme les divisions, la transcription et la traduction, le transport, la neurotransmission, la prolifération

cellulaire ou encore la régénération cellulaire par exemple (Abbracchio et Burnstock, 1998 ; Burnstock *et al.* 2011).

Les purines sont des molécules essentielles à la vie de la cellule. Ainsi, une perturbation de leur métabolisme peut être à l'origine de pathologies diversifiées qui seront décrites dans la partie I. B.

## 2. La voie de biosynthèse des purines et ses régulations

Les purines sont synthétisées par la voie des purines. Cette voie est très conservée de la bactérie à l'Homme même s'il existe quelques variations avec des réactions spécifiques à certaines espèces (Ljungdahl et Daignan-Fornier, 2012) (Figure 2).

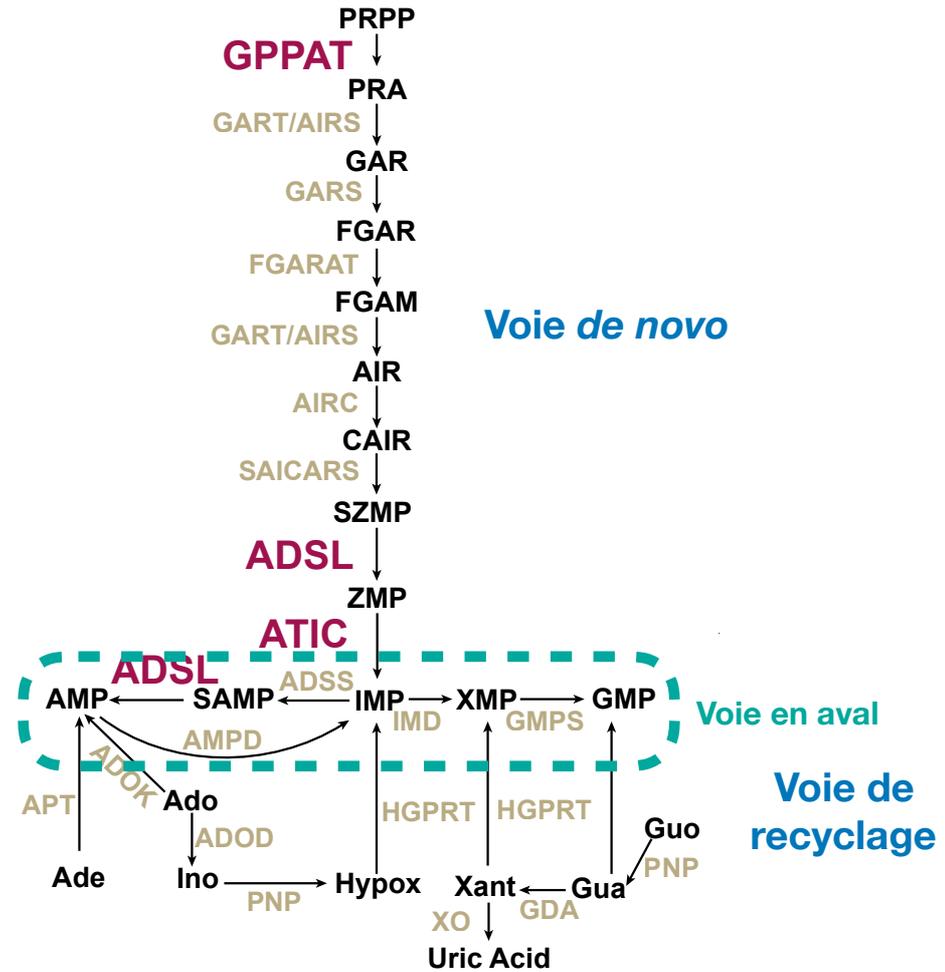
La voie de biosynthèse des purines est composée de deux parties : la voie *de novo* et la voie de recyclage (Berg *et al.* 2002).

La synthèse *de novo* de purines se fait de façon intéressante. Trois réactions seront nécessaires pour produire du R5P (Ribose-5-Phosphate) à partir du glucose dont l'une nécessite l'hydrolyse d'un ATP. Puis, les atomes formant l'anneau purique sont ajoutés successivement au R5P. Les purines sont directement synthétisées comme des dérivés de nucléotides en ajoutant les atomes de l'anneau purique sur le ribose. Premièrement, le R5P est activé par un transfert direct d'un pyrophosphoryl de l'ATP sur le Carbone 1 du ribose pour former du PRPP. Le PRPP (PhosphoRibosyl PyroPhosphate) est ainsi un substrat limitant pour la synthèse des purines. Le PRPP est ensuite converti en 10 étapes en IMP (Inosine MonoPhosphate). L'avant dernière étape de la voie *de novo* permet la conversion du SZMP (Succinyl ZMP) en ZMP (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide) par l'ADSL (ADénylo Succinate Lyase). Le ZMP est métabolisé par l'ATIC (5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleotide Formyltransferase) pour être converti en IMP. Il faut noter que sept ATP sont hydrolysés pour synthétiser de l'IMP à partir du glucose (Figure 2A).

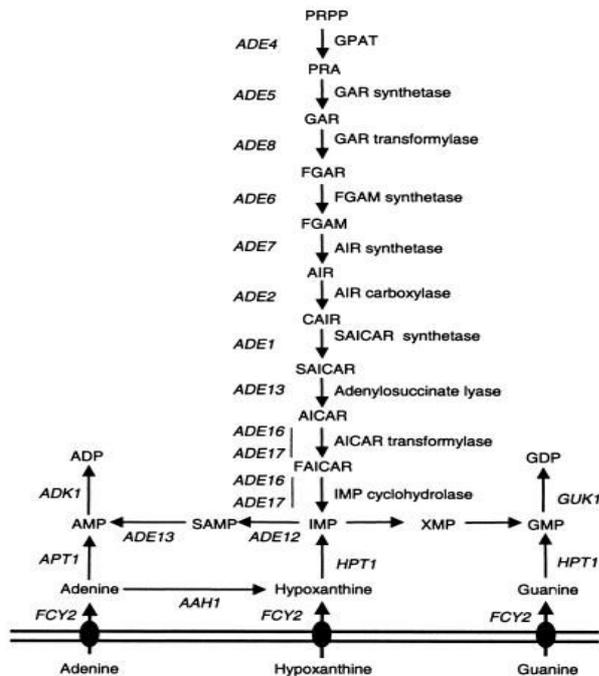
La voie de recyclage permet, quant à elle, d'utiliser les purines pré-existantes - l'IMP synthétisé par la voie *de novo* ou les purines disponibles dans le milieu intra - ou extra-cellulaire - afin de synthétiser de l'AMP (Adénosine MonoPhosphate) et du GMP (Guanosine MonoPhosphate). L'enzyme ADSL intervient également au niveau de la voie de recyclage permettant la conversion du SAMP (Succinyl AMP) en AMP. L'enzyme ADSL catalyse donc deux réactions non séquentielles dans la voie de synthèse des nucléotides puriques conduisant à un clivage non hydrolytique des groupes succinyles pour donner du fumarate. La partie commune entre voie *de novo* et voie de recyclage est aussi appelée « voie en aval » (Figure 2A). Il faut également noter qu'il y a hydrolyse d'un ATP pour synthétiser du GMP à partir d'IMP (Garrett et Grisham, Biochemistry, Second Edition).

La voie *de novo* est donc beaucoup plus consommatrice d'énergie que la voie de recyclage.

A.



B.



C.

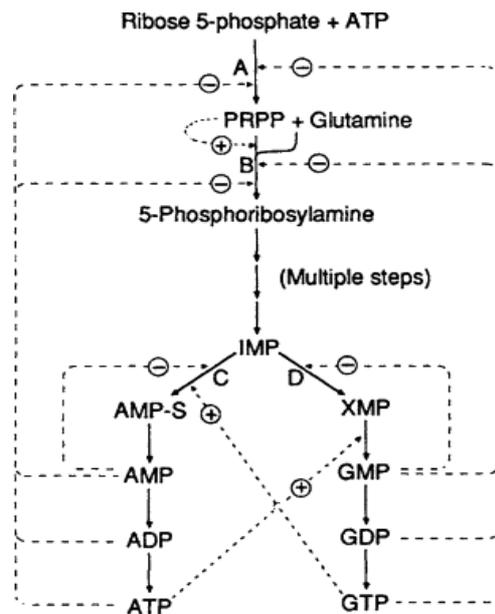


Figure 2 : Voie de biosynthèse des purines. A. Voie de biosynthèse des purines chez *C. elegans* (d'après Marsac *et al.* 2018). B. Voie de biosynthèse des purines chez *S. cerevisiae* (de Rébora *et al.* 2001). Ici, SAICAR = SZMP et AICAR = ZMP. C. Régulation schématique de la voie de biosynthèse des purines (de Bhagavan et Chung-Eun Ha, 2011).

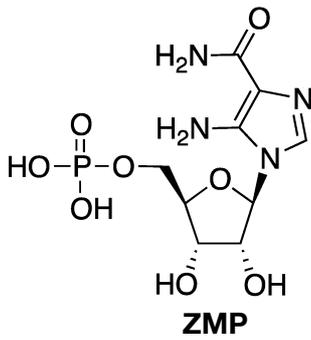
Presque tous les organismes peuvent produire des purines et des pyrimidines par la voie *de novo*. Un grand nombre d'organismes a aussi une voie de recyclage pour récupérer des composants des purines et des pyrimidines disponibles dans la nourriture ou libérés pendant le renouvellement des acides nucléiques et leurs dégradations (ARN messager par exemple). Cependant, comme nous l'avons vu, la voie *de novo* consomme bien plus d'ATP que la voie de recyclage. Ainsi, ces deux voies n'auront sans doute pas les mêmes flux selon les conditions environnementales mais aussi selon le stade de développement d'un individu.

Afin de subvenir aux besoins variables de la cellule, les voies métaboliques sont finement régulées. En effet, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'ATP rétrocontrôle négativement la voie de synthèse *de novo* lorsque le produit final est présent en quantité suffisante pour la vie de la cellule (Figure 2C). L'AMP, l'ADP et l'ATP mais aussi le GMP, le GDP et le GTP, produits finaux de la voie des purines, inhibent la liaison du PRPP à GPPAT (Glutamine Phosphoribosyl-Pyrophosphate AmidoTransferase - première enzyme de la voie *de novo*) de façon allostérique. Aussi bien chez la levure que chez la bactérie, les purines de type A vont se lier à GPPAT sur un site qui leur est spécifique alors que les purines de type G vont se lier sur un autre site de GPPAT qui leur est aussi spécifique (Rébora *et al.* 2001 ; Smith 1998). L'inhibition par ces nucléotides est compétitive vis à vis du PRPP, ce qui assure une activité enzymatique résiduelle qui est exprimée jusqu'à ce que les quantités de nucléotides A et de nucléotides G soient toutes deux suffisantes. L'enzyme ADSS (Adénylosuccinate Synthase) est elle aussi compétitivement inhibée par l'AMP alors que le GMP inhibe AMD (Adénosine désaminase). Le niveau d'IMP est donc régulé par les niveaux relatifs d'AMP et de GMP. Ainsi, les niveaux de ces deux purines sont auto-corrigés et permettent de conserver la balance de synthèse d'AMP et de GMP afin de satisfaire les besoins de la cellule (Figure 2C). De plus, la fixation du SZMP (Rébora *et al.* 2001) ou du ZMP (Rébora *et al.* 2005 ; Pinson *et al.* 2009) sur des paires de facteurs de transcription, Bas1p-Pho2p et Pho4-Pho2, va également permettre de réguler l'expression des gènes *ADE* - gènes codant pour les enzymes de la voie des purines chez *S. cerevisiae*.

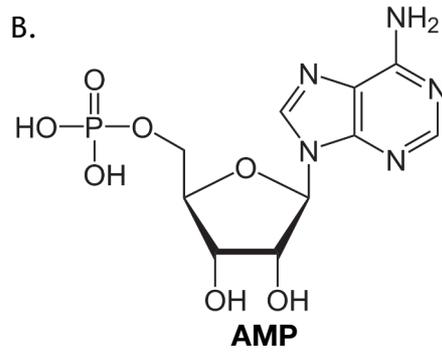
Il faut également noter que la biosynthèse des purines est dépendante du cycle du folate. Des antagonistes du métabolisme du folate inhibent de façon indirecte la formation de purines et donc la synthèse d'acides nucléiques, la croissance cellulaire et la division cellulaire. Ainsi, les cellules se divisant rapidement sont plus sensibles à ces antagonistes (comme le Méthotrexate) que les cellules se divisant à une vitesse normale. Ceci a conduit à des utilisations d'antagonistes du métabolisme des folates en thérapies anti-cancéreuses par exemple. A noter que l'acide folique est une vitamine (Vitamine B9) pour les animaux et se retrouve dans l'alimentation (Garrett et Grisham, Biochemistry, Second Edition).

Ainsi, les produits finaux, mais aussi des intermédiaires, peuvent réguler des voies métaboliques. Des intermédiaires de la voie de biosynthèse des purines peuvent avoir d'autres effets que nous allons voir ci-après.

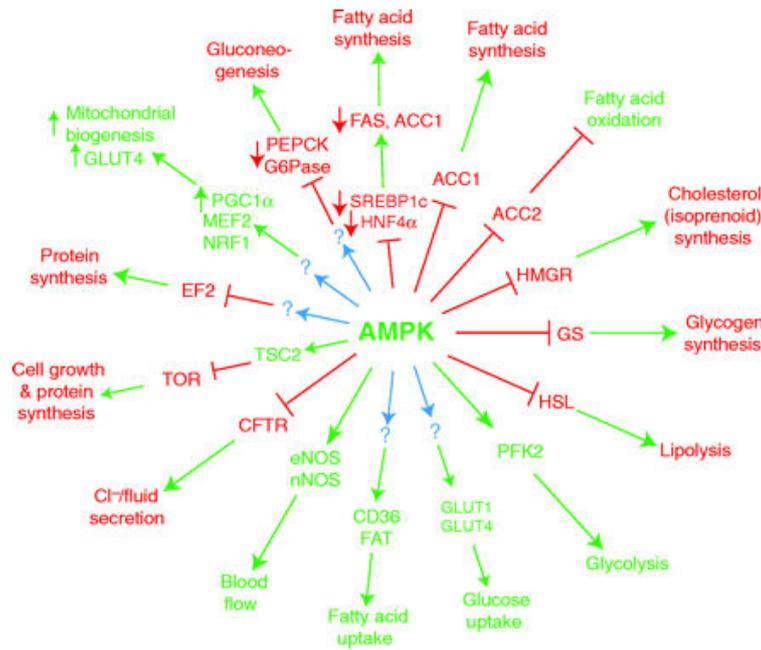
A.



B.



C.



D.

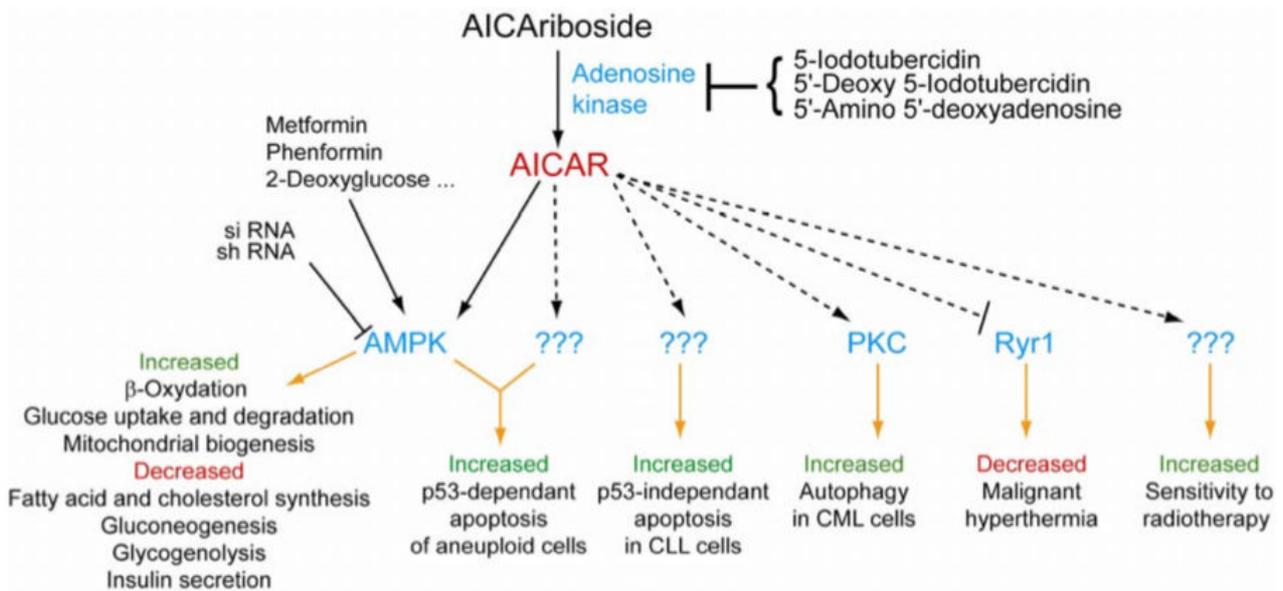


Figure 3 : Les effets du ZMP sur le métabolisme. A. Molécule de ZMP. B. Molécule d'AMP. C. Les cibles de l'AMPK. Les protéines cibles et les processus activés par l'activation de l'AMPK sont en vert, ceux qui sont inhibés sont en rouge. Lorsque l'effet est causé par un changement dans l'expression des gènes, une flèche verte pointant vers le haut à côté de la protéine indique une augmentation, tandis qu'une flèche rouge pointant vers le bas indique une diminution de l'expression (de Grahame Hardie, 2004). D. Représentation schématique des cibles cellulaires du ZMP et de ces effets biologiques associés (de Daignan-Fornier et Pinson, 2012). Ici AICAR = ZMP.

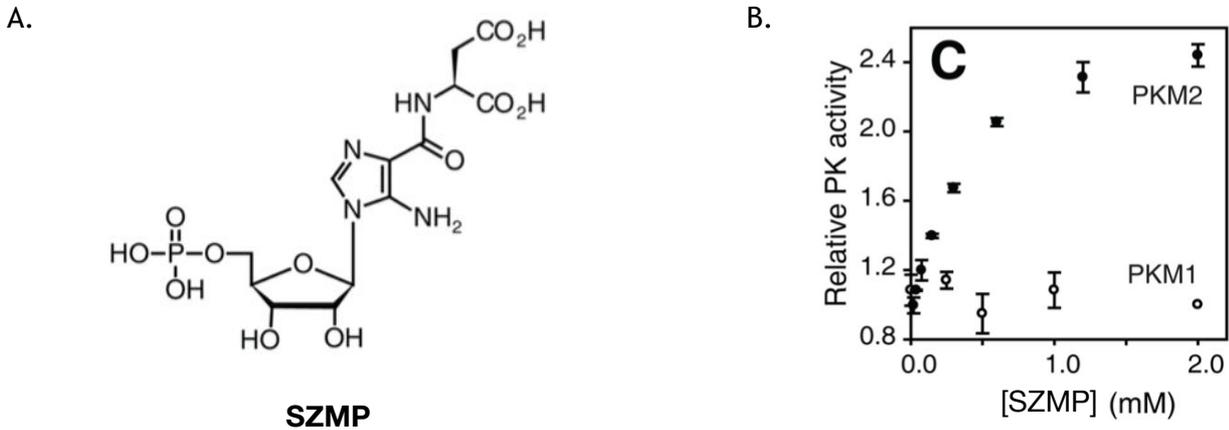
### 3. ZMP, sZMP et sAMP, des intermédiaires métaboliques aux effets régulateurs

Comme vu précédemment, le ZMP (substrat d'ATIC) est capable d'activer la voie *de novo* en se fixant à des facteurs de transcription. Cependant, le ZMP a d'autres propriétés qui ne sont pas liées à la voie des purines et qui peuvent être étudiées en utilisant un précurseur exogène : l'AICAR.

L'AICAR (forme riboside du ZMP) exogène, lorsqu'il est ajouté dans le milieu de culture, est transporté - *via* des transporteurs membranaires - dans les cellules à l'intérieur desquelles il va être phosphorylé en ZMP (Ceschin *et al.* 2014). Le ZMP est structuralement proche de l'AMP (Figure 3A et B) et va agir comme AMP mimétique et donc activer l'AMPK (Adenosine Monophosphate activated Protein Kinase). Ainsi, l'ajout de AICAR, dans le milieu, va permettre la sur-activation de l'AMPK sans modifier les niveaux d'équilibre de l'AMP, l'ADP ou l'ATP contrairement à d'autres activateurs de l'AMPK (Sullivan *et al.* 1994 ; Corton *et al.* 1995). L'activation de l'AMPK va induire un métabolisme catabolique en phosphorylant différentes cibles (Figure 3C). La cellule est donc dans un état de « stress » et va réagir pour rééquilibrer le niveau d'ATP. D'autres études montrent aussi des effets AMPK indépendant (Daignan-Fornier et Pinson 2012) (Figure 3D). Par exemple, l'effet puissant de l'AICAR sur l'induction de l'apoptose dans les cellules aneuploïdes a été aboli par le shARN sur l'AMPK, mais cet effet n'est que partiellement reproduit par d'autres activateurs de l'AMPK tels que la Metformine ou le 2-désoxyglucose (Tang *et al.* 2011). De façon plus précise, un traitement à l'AICAR sur les cellules aneuploïdes entraîne un défaut de prolifération de ces cellules. Or, il a été montré que 90% des tumeurs solides sont aneuploïdes (Albertson *et al.* 2003). Le ZMP a donc un potentiel effet anticancéreux. Il a également été montré que l'AICAR inhibe la prolifération de plusieurs types cellulaires (sein, prostate, moelle osseuse...) en les bloquant en phase G1-S et induisant une apoptose *via* une augmentation de l'expression de p21, p27 et p53 (molécules régulatrices du cycle cellulaire, de l'autophagie ou encore de l'apoptose) (Sengupta *et al.* 2007 ; Rattan *et al.* 2005). Cet exemple illustre la complexité des effets de l'AICAR, et par extension du ZMP, et attire l'attention sur le fait qu'une analyse minutieuse est nécessaire pour déterminer si un effet du ZMP est totalement dépendant de l'AMPK ou non.

Il est connu que PKM2 joue un rôle important dans la croissance et la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses en condition de stress. Le SZMP a, quant à lui, été montré comme pouvant lier et stimuler directement l'isoforme 2 de la pyruvate kinase (PKM2) dans les cellules cancéreuses (Figure 4B). En condition de privation de glucose, la concentration en SZMP augmente et entraîne une stimulation de la PKM2. Le changement de niveau de SZMP (dont l'origine reste mal comprise) dans les cellules cancéreuses altère le niveau d'énergie, la consommation de glucose et la production de lactate. L'interaction SZMP-PKM2 favorise ainsi la survie des cellules cancéreuses. Il y a une régulation décrite comme allostérique qui pourrait expliquer comment les cellules cancéreuses coordonnent différentes voies métaboliques (comme

la voie des purines ou la glycolyse) afin d'optimiser leur croissance dans des conditions où les nutriments sont limités, ce qui est par ailleurs couramment observé dans le micro-environnement tumoral (Keller *et al.* 2012).



**Figure 4 : Identification du SZMP comme régulateur de PKM2.** A. Molécule de SZMP. B. Effet de la synthèse enzymatique du ZMP sur l'activité de (●) PKM2 et de (○) PKM1 (de Keller *et al.*, 2012).

Enfin, l'ajout de SAMP dans des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas augmente l'exocytose de façon dépendante de l'expression de sentrin/SUMO protéase spécifique 1 (SENP1). Ainsi, le SAMP restaure le défaut d'exocytose induit par le glucose dans les cellules  $\beta$  humaines de patients ayant un diabète de type 2. Le SAMP pourrait être utilisé comme une drogue permettant d'inverser le dysfonctionnement des cellules  $\beta$  dans les diabètes de type 2 (Gooding *et al.* 2015).

En conclusion, l'accumulation des substrats SZMP, ZMP ou SAMP peut perturber l'homéostasie cellulaire compte tenu de leurs rôles régulateurs de métabolismes, rôles qu'ils peuvent jouer ailleurs qu'au niveau de la voie de biosynthèse des purines. Ces intermédiaires sont donc potentiellement capables d'entraîner, par eux mêmes, de graves conséquences phénotypiques lorsque qu'ils s'accumulent. Les déficiences enzymatiques à l'origine de ces accumulations sont elles-même liées à des pathologie que nous allons décrire juste après.

## **B. Les pathologies liées à des déficiences enzymatiques de la voie de biosynthèse des purines**

Chez l'Homme, une dizaine de maladies génétiques rares ont été décrites dans la littérature comme étant liées à des mutations dans les gènes qui codent les enzymes de la voie de biosynthèse des purines. Pour certaines d'entre elles, l'étiologie est connue alors que pour d'autres, très peu de choses sont connues (se référer au Tableau 1).

### 1. Les pathologies en amont de la voie *de novo*

Deux pathologies sont liées à la synthèse du PRPP (premier intermédiaire de la voie *de novo*) : l'hyper-activité de la PRPP Synthétase sévère (ORPHA:411543) et le syndrome d'arts (ou syndrome d'ataxie surdité atrophie létalité - ORPHA:1187).

Dans le cas de l'hyper-activité de la PRPP Synthétase sévère, les patients ont une sur-activation de la biosynthèse des purines, notamment de la voie *de novo* puisqu'il n'y a pas de rétro-inhibition possible de la voie par le GDP. Plus exactement, les substitutions, qui ont lieu à divers endroits dans la séquence protéique selon les patients, entraînent une altération des mécanismes allostériques régulant à la fois l'inhibition enzymatique par les nucléotides puriques et l'activation par les phosphates inorganiques. Cette pathologie a une prévalence de <1/1 000 000 et est une maladie liée à l'X associée à une hyper-uricémie et à la goutte. Parfois, les patients ont des anomalies neuro-développementales, particulièrement une surdité neuro-sensorielle (Becker *et al.* 1988 ; Roessler *et al.* 1993). D'autres souffrent d'hypotonie et de retard de locomotion en plus de la surdité.

La seconde pathologie est à l'inverse de la première puisqu'il s'agit d'une déficience en PRPP synthétase (de Brouwer *et al.* 2007) due à une substitution affectant le site catalytique de l'enzyme. Elle a également une prévalence de <1/1 000 000 et est aussi liée à l'X. Les patients souffrent d'hypotonie, d'ataxie, d'un retard de développement moteur, d'une perte de l'audition et de la vision et d'un déficit intellectuel. Les enfants sont aussi plus susceptibles aux infections. Un traitement par S-adénosylméthionine est en cours d'évaluation.

Ces deux pathologies suggèrent que la synthèse de PRPP est essentielle pour la fonction neuro-motrice mais aussi pour le système auditif.

### 2. Les pathologies liées à la voie de recyclage

De nombreuses pathologies affectant la biosynthèse des purines concernent la voie de recyclage (voie en aval y compris) suggérant un rôle majeur de cette partie de la voie chez l'Homme.

## 1. Les pathologies affectant le système immunitaire

Deux pathologies dues à des déficiences enzymatiques au niveau de la voie de recyclage des purines sont connues et décrites pour affecter particulièrement le système immunitaire.

Une déficience en Adénosine DésAminase (ADA - enzyme qui convertit l'Adénosine en Inosine), due à la production d'une protéine non fonctionnelle, conduit à un Déficit Immunitaire Combiné Sévère (DICS) caractérisé par une lymphopénie profonde (déplétion sévère des lymphocytes T et B). Il y aurait, par exemple, une apoptose importante des lymphocytes T dans le thymus (Bradford *et al.* 2017 ; Apasov *et al.* 2001). Sa prévalence est de 1/100 000 à 500 00 et les traitements proposés sont la transplantation de moëlle osseuse ou une supplémentation enzymatique (ORPHA:277).

Le déficit en Purine Nucléoside Phosphorylase (PNP - enzyme convertissant l'Inosine en Hypoxanthine) (ORPHA:760), due principalement à une instabilité post-traductionnelle de la protéine, est lui aussi à l'origine d'un déficit immunitaire induisant des infections virales à répétition chez les patients, notamment entre 5 et 6 ans. Il y a, en effet, un déficit en lymphocyte T associé à une hypo-uricémie sévère (Stoop *et al.* 1977). Deux tiers des malades présentent également des troubles neurologiques tels qu'une ataxie, une tétraplégie spastique ou des tremblements. Un tiers des malades souffrent d'anémie. Il s'agit d'une maladie autosomique récessive avec une prévalence inconnue. Les malades doivent éviter toute infection et une transplantation médullaire est possible.

Les déficiences enzymatiques impliquées dans ces deux pathologies ne permettent plus de produire de l'Hypoxanthine (Figure 2A et B) à partir de l'Inosine. Ceci suggère que le défaut du système immunitaire peut être dû à la quantité d'Hypoxanthine disponible qui n'est potentiellement plus suffisante ou bien que l'accumulation d'Inosine et/ou d'Adénosine pourrait être toxique pour ces cellules. La production des lymphocytes, dont la prolifération est importante ( $10^8$  lymphocytes produits / jour), serait particulièrement sensibles à ces déficiences enzymatiques.

## 2. Les pathologies induisant l'excrétion d'acide urique

Trois pathologies dues à des déficiences enzymatiques dans la voie de recyclage des purines sont à l'origine de l'excrétion d'acide urique.

Le déficit en Adénosine PhosphoRibosylTransférase (APRT - enzyme convertissant l'Adénine en AMP) (Figure 2A et B), due à un épissage aberrant ou à une baisse d'activité de l'enzyme, est une pathologie autosomique récessive avec une prévalence de 1-9/100 000 (ORPHA:976) qui affecte de la même manière enfants et adultes et hommes et femmes. Les symptômes incluent de l'urolithiase mais aussi une néphropathie cristalline secondaire à la

précipitation de 2,8-DHA dans le parenchyme rénal (néphropathie DHA) pouvant aller jusqu'à l'insuffisance rénale aiguë nécessitant parfois une dialyse et une transplantation. Il existe deux types de déficience en APRT : le type I, caractérisé par une absence totale d'activité APRT et le type II, caractérisé par une activité résiduelle de 10 à 25%. Cependant, cette différence d'activité ne semble pas avoir de signification clinique. Un traitement à l'allopurinol (médicament hypouricémiant, faisant baisser l'uricémie et soignant la goutte) associé à un apport riche en liquide et un régime pauvre en purines permet de prévenir la formation de calculs et les insuffisances rénales. Un traitement préventif permet d'éviter les complications rénales (Sahota *et al.* 2001).

Il existe deux formes de déficit en HPRT (Hypoxanthine Guanine Phospho-RibosylTransférase). L'HPRT permet à la fois la conversion de l'Hypoxanthine en IMP mais aussi de la Guanine en GMP (Figure 2A et B). Le premier est la forme la plus légère : le Syndrome de Kelley-Seegmiller (SKS - ORPHA:79233). Il s'agit d'une pathologie liée à l'X, récessive, apparaissant généralement pendant la petite enfance. Ce syndrome est probablement sous diagnostiqué donc la prévalence de cette maladie est inconnue. Il implique une surproduction d'acide urique avec lithiase urinaire et une goutte précoce (dès la puberté). Des cristaux orange peuvent apparaître dans les couches. Les patients peuvent avoir des troubles de l'attention divers. La surproduction d'acide urique serait due à un défaut de recyclage des purines entraînant une hyper-uricémie pouvant induire la formation de cristaux et une arthrite goutteuse (Zoref-Shani *et al.* 2000). Un traitement des symptômes est possible par prise d'allopurinol et par alcalinisation urinaire et une hydratation abondante. La seconde forme du déficit en HPRT est la forme la plus sévère, c'est le syndrome de Lesch-Nyhan (ORPHA:510) avec une prévalence entre 1/380 000 et 1/235 000. Le syndrome de Lesch-Nyhan est dû à un déficit total de l'HPRT conduisant à un défaut du recyclage des purines alors que leurs synthèses est accrue (Lesch et Nyhan, 1964). Il s'agit d'une pathologie récessive liée à l'X apparaissant à la petite enfance. Les patients sont normaux à la naissance mais très rapidement un retard psychomoteur apparaît avec une hypotonie et des mouvements athétoïdes. Les enfants atteints ont également une cristallurie entraînant une obstruction urinaire. L'hypotonie de repos associée à une dystonie d'action sévère peut empêcher le passage en position debout, la marche et induire des mouvements involontaires qui sont augmentés par le stress. La spasticité et le Babinski arrivent de façon plus tardive. Les patients s'auto-mutilent et sont parfois agressifs. Ils peuvent aussi avoir un retard mental plus ou moins important. En 2010, Cristini *et al.* ont examiné les effets de la déficience en HPRT sur la différenciation neuronale. Les auteurs ont conclu que chez les patients Lesch-Nyhan, la neurogenèse est aberrante suggérant ainsi un rôle d'HPRT dans le neuro-développement. Les patients peuvent aussi souffrir d'anémie et la surproduction d'acide urique entraîne rarement des insuffisance rénales. Fu *et al.* en 2015 ont montré qu'il y avait une forte corrélation entre la sévérité de la pathologie et le recyclage de l'Hypoxanthine et de la Guanine. Les purines intracellulaires sont en quantité normale alors que l'excrétion de purines dans le milieu extra-cellulaire est importante. Il y aurait donc une compensation de la synthèse purique qui a été montrée par une augmentation des purinosomes. En revanche, la synthèse des purines ne semble pas corrélée avec la sévérité des symptômes. Un traitement à l'allopurinol, une alcalinisation et une forte

hydratation permettent de réduire la surproduction d'acide urique et donc de diminuer les calculs et la goutte. Spasticité et dystonie sont traitées par benzodiazépines et inhibiteurs d'acide gamma-aminobutyrique.

Seule l'une des trois pathologies citées ci-dessus montre, en plus de l'excrétion d'acide urique (produit issu de la dégradation de l'hypoxanthine dans la voie de recyclage des purines) donnant la goutte, des symptômes neuro-musculaires. Ceci suggère donc que l'accumulation d'acide urique n'est pas à l'origine des défauts neuro-musculaires observés dans le syndrome de Lesch-Nyhan.

### 3. Les pathologies affectant spécifiquement le muscle squelettique

Deux déficiences enzymatiques dans la voie de recyclage des purines induisent spécifiquement des défauts au niveau du muscle squelettique.

La première est la myopathie distale associée à l'AdényloSuccinate Synthétase-like 1 (ADSSL1 - isozyme musculaire de l'AdényloSuccinate Synthase (ADSS)) (ORPHA:482601). Cette pathologie est due à une mutation entraînant un décalage du cadre de lecture et à un STOP prématuré. C'est une maladie musculaire autosomique récessive ayant une prévalence de <1/1 000 000. A l'adolescence, les patients voient apparaître une faiblesse musculaire distale affectant notamment les membres inférieurs. Ils peuvent également souffrir d'hyporéflexie. L'ADSS permet la conversion de l'IMP en SAMP et son isoforme, ADSSL1, est une enzyme spécifique du muscle ayant une expression forte dans le muscle squelettique. Ainsi, la déficience en cette enzyme induit des lésions dans les fibres musculaires avec des myofibres faiblement compactées et des fibres désorganisées (Park *et al.* 2016).

La seconde est le déficit en AMP Désaminase (AMPD - enzyme permettant la rétroconversion de l'AMP en IMP). Une mutation faux-sens, principalement, sera à l'origine d'une protéine tronquée. Il s'agit d'une pathologie autosomique récessive dont la prévalence est inconnue, pouvant apparaître à tout âge (ORPHA:45) et qui se stabilise après quelques années. Les patients souffrent de douleurs musculaires induites par l'exercice associées parfois à une rhabdomyolyse et/ou une augmentation de la créatine kinase dans le sérum. Pendant l'enfance, les patients peuvent être hypotoniques. Les patients présentent souvent une fatigue chronique avec une perte de la productivité et une prédisposition au stress (Genetta *et al.* 2001 ; Verzijl *et al.* 1998). Il s'agit d'une pathologie affectant exclusivement les muscles squelettiques. En effet, Sabina *et al.* (1980) ont montré que la perturbation du cycle des purines résulte en une altération du contenu en ATP musculaire, ces changements pouvant être à l'origine des dysfonctionnements musculaires observés. L'administration de D-Ribose semble être bénéfique pour les patients mais son effet n'est que de courte durée (quelques jours).

Les enzymes impliquées dans ces pathologies sont toutes deux directement liées à la synthèse d'AMP via l'IMP. Cette séquence métabolique semble particulièrement importante pour le muscle squelettique qui est spécifiquement affecté dans ces deux pathologies.

#### 4. La pathologie liée au cycle du méthyle

Une perturbation du cycle du méthyle peut être à l'origine de modifications du niveau d'expression de certains gènes et entraîner des perturbations de l'homéostasie cellulaire. L'un des exemples cités est celui de la déficience en Adénosine Kinase (ADK). Cette pathologie entraîne une encéphalopathie associée à une hyperméthioninémie (ORPHA:289290) avec une prévalence inconnue. ADK permet la conversion de l'Adénosine en AMP (Figure 2A et B). Des mutations proches du site catalytique ou du site de liaison de l'Adénosine induisent une perte partielle ou totale de l'activité d'ADK. Sa déficience entraîne une augmentation des niveaux de Succinyl AdénosylMéthionine (SAM) et de Succinyl AdénosylHomocystéine (SAH). Les patients souffrent d'hypotonie, de retard psychomoteur profond, de dysmorphie et de dysfonctionnement du foie en excréant de l'Adénosine dans les urines. Certains patients souffrent également de malformations cardiaques.

Bjursell *et al.* (2011) concluent que les symptômes résultent de la toxicité directe de l'Adénosine qui s'accumule mais aussi de la perturbation d'un grand nombre de réactions impliquant des méthyltransférases.

#### 3. La pathologie liée à la voie *de novo*

Il existe une seule pathologie connue et décrite chez l'Homme affectant exclusivement la voie *de novo*, c'est l'AICA-Ribosidurie. Une patiente unique a été décrite par Marie *et al.* en 2004 ayant un test urinaire de Bratton-Marshall positif avec une excrétion massive de ZMP (le substrat d'ATIC). Dans son cas, sur l'allèle 1, la mutation a lieu dans la région transformylase de la protéine alors que la mutation dans l'allèle 2 induit un changement du cadre de lecture de la séquence ADN. Ce changement affecte un site de liaison à un ion potassium dans la protéine aviaire. Cet ion est proposé comme ayant un rôle dans la stabilisation de la structure tertiaire de la protéine. Le ZMP s'accumule dans les érythrocytes et les fibroblastes. La patiente a des symptômes dysmorphiques, des anomalies neurologiques graves, une hypotonie musculaire, un retard psychomoteur important, de l'épilepsie ainsi qu'une cécité congénitale (ORPHA:250977).

### **C. La déficience en ADSL**

Enfin, il existe une dernière pathologie, la déficience en ADSL, qui affecte à la fois la voie *de novo* et la voie de recyclage. Au cours de ce mémoire, nous porterons un intérêt particulier à cette pathologie.

La déficience en ADSL (ORPHA:46) est une pathologie autosomique récessive rare (prévalence de  $<1/1\ 000\ 000$ ) décrite pour la première fois en 1984 par Jaeken et Van den Berghe. Les patients présentent une accumulation de SAICAR et de SAdo (Succinyl Adénosine), les formes déphosphorylées du SZMP et du SAMP respectivement (substrats d'ADSL), dans les fluides corporels (fluide cérébro-spinal, urine et plasma), produits qui n'y sont normalement pas retrouvés.

Les patients peuvent être classés selon la sévérité de la pathologie :

- La forme fatale néonatale : les patients souffrent d'encéphalopathies, n'ont pas de mouvements spontanés et ont une importante faiblesse respiratoire entraînant la mort dans les premières semaines de vie. Un défaut de croissance intra-utérin peut être diagnostiqué grâce à une microcéphalie et une hypokinésie fatale conduisant à une hypoplasie pulmonaire.

- La forme de type I : il s'agit également d'une forme sévère. Elle concerne la majorité des patients qui ont principalement des atteintes neurologiques dont un retard psychomoteur sévère et une microcéphalie. Dans les premiers mois de leur vie, les patients présentent un arrêt du développement, un défaut dans le contact oeil-oeil et un défaut de la vue.

- La forme de type II : il s'agit de la forme modérée pour laquelle les patients présentent, vers l'âge de 1 an, un retard psychomoteur modéré avec un contact oeil-oeil qui est perturbé de façon transitoire. Plus tard, les patients montrent un défaut de la parole et une ataxie entraînant une perturbation de la marche (Jurecka *et al.* 2015).

De façon plus générale, l'encéphalopathie se manifeste de façon très précoce mais de manière non spécifique : l'enfant peut se nourrir peu, être léthargique, vomir souvent et devenir irritable. Des œdèmes cérébraux se développent rapidement. Plus tardivement, il peut y avoir l'apparition de somnolence, convulsions, hoquets, épisodes d'apnée, hypotonie marquée, irritabilité, convulsions et coma. La déficience en ADSL peut également causer des épilepsies dès la première année de vie. Des symptômes du spectre de l'autisme apparaissent dans quelques cas (Van den Berghe *et al.* 1997). Enfin, les patients présentent souvent une légère dysmorphie (brachycéphalie, strabisme divergent, petit nez avec narines antéversées, fine lèvre supérieure) (Holder-Espinasse *et al.* 2002).

Le diagnostic des patients n'est pas toujours évident compte tenu de la large variété des symptômes et de leur gravité. Lorsqu'un clinicien est confronté à ce panel de symptômes, il est alors recommandé de doser les succinyl-purines dans les urines notamment. Un diagnostic moléculaire peut ensuite être envisagé ainsi qu'un dosage de l'activité enzymatique résiduelle.

Chez l'Homme, le gène *ADSL* est constitué de 13 exons et a un promoteur de type gène de ménage selon Kmoch *et al.* (2000). C'est-à-dire que ce promoteur possède un haut taux de G+C avec une fréquence élevée de CpG et une absence de boîte TATA ou CAAT et une absence de motifs suggérant une expression tissu spécifique. *ADSL* est transcrit dans presque tous les tissus avec deux variants (épissage alternatif de l'exon 12). Le variant long code pour une protéine ADSL active alors que le variant court est catalytiquement inactif et son rôle biologique

est peu clair (Kmoch *et al.* 2000). La protéine ADSL se présente sous la forme d'un homotétramère de 50kDA ayant ainsi 4 sites catalytiques actifs.

Actuellement, une cinquantaine de mutations, souvent faux-sens, dans *ADSL* ont été identifiées chez les patients atteints de la déficience en ADSL. Ces mutations conduisent à la production d'une protéine altérée pouvant affecter l'épissage, la région régulatrice ou encore le site actif (Marie *et al.* 2002 ; Köhler *et al.* 1999 ; van Werkhoven *et al.* 2013). Dans un cas décrit, la mutation qui a été trouvée induit une instabilité structurale de la protéine. Dans un autre cas, la mutation affecte le promoteur du gène *ADSL* entraînant une baisse de 25% de sa fonction et affectant la liaison du NRF2 (Nuclear Respiratory Factor-2) qui est un activateur de la transcription. Les auteurs suggèrent que NRF2 pourrait réguler l'expression des gènes de la vie des purines (Marie *et al.* 2002).

Afin d'expliquer les mécanismes physiopathologiques de la déficience en ADSL, plusieurs hypothèses ont vu le jour et seront présentées en suivant.

Une première hypothèse évoquée pouvant expliquer tout ou partie des symptômes observés chez les patients est la toxicité des métabolites/substrats qui s'accumulent comme le SZMP ou le SAMP (Stone *et al.* 1992). Plus exactement, c'est le ratio SAdo/SAICAR dans le fluide cérébro-spinal qui corrèlerait avec les trois groupes phénotypiques. Un ratio SAdo/SAICAR inférieur à 1 corrèlerait avec la forme néonatale, un ratio proche de 1 avec la forme de type I et un ratio supérieur à 2 avec la forme de type II. Il a même été avancé que le SAdo aurait des effets neuro-protecteurs contre l'accumulation de SAICAR. Cependant, cette hypothèse n'a jamais pu être vérifiée chez l'Homme. En effet, l'analyse biochimique des complexes d'ADSL mutants a montré que les deux substrats étaient utilisés de la même manière. Finalement, les ratios observés seraient plutôt dus à l'âge auquel le prélèvement est fait (Zikanova *et al.* 2010).

En 2012, Baresova *et al.* ont conclu que la sévérité des phénotypes ne corrèlait probablement pas avec le ratio SAdo/SAICAR comme suggéré par Gitiaux *et al.* (2009) mais serait inversement corrélée avec la capacité à former des purinosomes. Le purinosome est un complexe multi-enzymes de la voie de synthèse *de novo* des purines - incluant ADSL - que les cellules assemblent de façon transitoire dans leur cytosol selon les besoins en purines. Le purinosome permettrait de faciliter le passage du substrat entre chaque enzyme de la voie *de novo* qui est une voie linéaire (An *et al.* 2008). Selon l'hypothèse des auteurs, ces complexes nécessiteraient la présence à la fois des protéines ATIC et ADSL structuralement stables mais aussi celle des autres enzymes de la voie *de novo* (Zikanova *et al.* 2010). Ainsi, la sévérité des symptômes des patients déficients en ADSL serait déterminée par la stabilité structurale et la capacité catalytique résiduelle de la protéine mutée ADSL correspondante, qui est un pré-requis pour la formation et la stabilité du purinosome. Cependant, bien que des images montrent la proximité qu'il peut exister entre les enzymes constituant ce purinosome dans le cytoplasme, aucune cristallographie n'en a démontré son existence réelle à l'heure actuelle (Pedley et Benkovic, 2017).

Une autre hypothèse est liée à la baisse générale de synthèse de purines causée par la déficience en ADSL qui agit à la fois dans la voie *de novo* et la voie de recyclage. En effet, un manque de purines pourrait affecter le développement embryonnaire. Des prélèvements réalisés dans différents tissus (foie, rein, muscles, fibroblastes) de patients ne montrent cependant pas de baisse du niveau de purines (Van den Berghe et Jaeken, 1986). Toutefois, une déficience en purines pourrait avoir lieu dans d'autres tissus ou dans certains types sub-tissulaires. En outre, pendant l'embryogenèse, peu de choses sont connues sur les quantités de purines produites et nécessaires.

Pour plusieurs des pathologies décrites ci dessus, très peu de choses sont connues quant aux mécanismes moléculaires impliqués. Comme nous avons pu le voir pour la déficience en ADSL, plusieurs hypothèses existent afin d'expliquer les phénotypes observés chez les patients dont la physiopathologie est variée. En effet, les purines sont des molécules aux multiples effets dont la régulation est nécessaire (cf. I. A. 2 et I. A. 3.). De plus, les besoins en purines (produits initiaux, intermédiaires ou finaux) et/ou en activité enzymatique peuvent différer entre les tissus, les types cellulaires ou même sub-cellulaires. Enfin, les besoins peuvent aussi varier au cours du développement (post-) embryonnaire.

Les données que nous avons concernant les régulations de la voie de biosynthèse des purines et les effets de certains de ses intermédiaires nous viennent tous d'études réalisées chez la levure ou la bactérie. Ces deux modèles unicellulaires ont permis de mieux comprendre le fonctionnement de cette voie. Cependant, ils ne nous permettent pas de comprendre l'éthiologie des patients et surtout de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans leurs symptômes. Il est donc désormais nécessaire d'étudier la voie de biosynthèse des purines chez un organisme multi-cellulaire ayant notamment une fonction neuro-musculaire similaire à celle de l'Homme puisqu'il s'agit de l'atteinte la plus importante chez les patients.

Face à l'ensemble de ces challenges et afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la déficience en ADSL, nous avons décidé d'établir un nouveau modèle animal métazoaire : le nématode *Caenorhabditis elegans*.

Nom de la pathologie	Gène muté	Numéro ORPHA	Prévalence	Symtômes	Causes	Traitements
Hyper-activité de la PRPP Synthétase sévère	<i>PRPP synthase</i>	411543	<1/1 000 000	Hyper-uricémie, surdité, retard psychomoteur	?	Inhibiteur de la XO
Syndrome des arts (D�ficiency en PRPP synthétase)	<i>PRPP synthase</i>	1187	<1/1 000 000	Retard psychomoteur, surdité, hypotonie, déficit visuel, susceptibilité aux infections	?	S-adénosylméthionine en cours d'évaluation
AICA-Ribosidurie	<i>ATIC</i>	250977	Un seul patient décrit	Dysmorphie, retard psychomoteur, épilepsie, c�civit�	?	/
D�ficiency en ADA	<i>ADA</i>	277	1/100 000 à 500 000 naissances	Déficit immunitaire combiné sévère	Accumulation toxique de d�oxyATP	Transplantation de moëlle osseuse ou supplémentation enzymatique
Déficit en PNP	<i>PNP</i>	760	?	Déficit immunitaire, troubles neurologiques, anémie	Accumulation toxique de d�oxyGTP	Transplantation médullaire
Déficit en APRT	<i>APRT</i>	976	1-9/100 000	Troubles rénaux	Accumulation de DHA	Allopurinol, régime pauvre en purine et riche en liquide
Syndrome de Kelley-Seegmiller	<i>HPRT</i>	79233	?	Troubles rénaux, troubles de l'attention, arthrite	?	Allopurinol, régime pauvre en purine et riche en liquide
D�ficiency en ADK	<i>ADK</i>	289290	?	Hypotonie, retard psychomoteur, dysmorphie, défaut du foie, malformations cardiaques	Toxicité de l'Adénosine	/
Syndrome de Lesch-Nyhan	<i>HPRT</i>	510	1/380 000 à 1/235 000	Retard psychomoteur et mental, hypotonie, hyperuricémie, automutilation, agressivité	Neurog�n�se aberrante	Allopurinol, benzodiazépines, inhibiteur d'acide gamma-aminobutyrique
Myopathie distale associée à ADSSL-1	<i>ADSS</i>	482601	<1/1 000 000	Myopathie des membres inférieurs	Lésions des fibres musculaires	/
Déficit en AMPD	<i>AMPD</i>	45	?	Douleur musculaire, hypotonie, fatigue chronique, stress	?	Administration de D-Ribose
D�ficiency en ADSL	<i>ADSL</i>	46	<1/1 000 000	Retard psychomoteur, autisme, hypotonie, défaut de croissance, microcéphalie, défaut de la vue, ataxie	?	/

**Tableau 1 : Liste des pathologies associées à la voie de biosynthèse des purines chez l'Homme.** En jaune, les pathologies associées à la voie *de novo*, en bleu les pathologies associées à la voie de recyclage et en rouge les pathologies associées à la voie « en aval ».

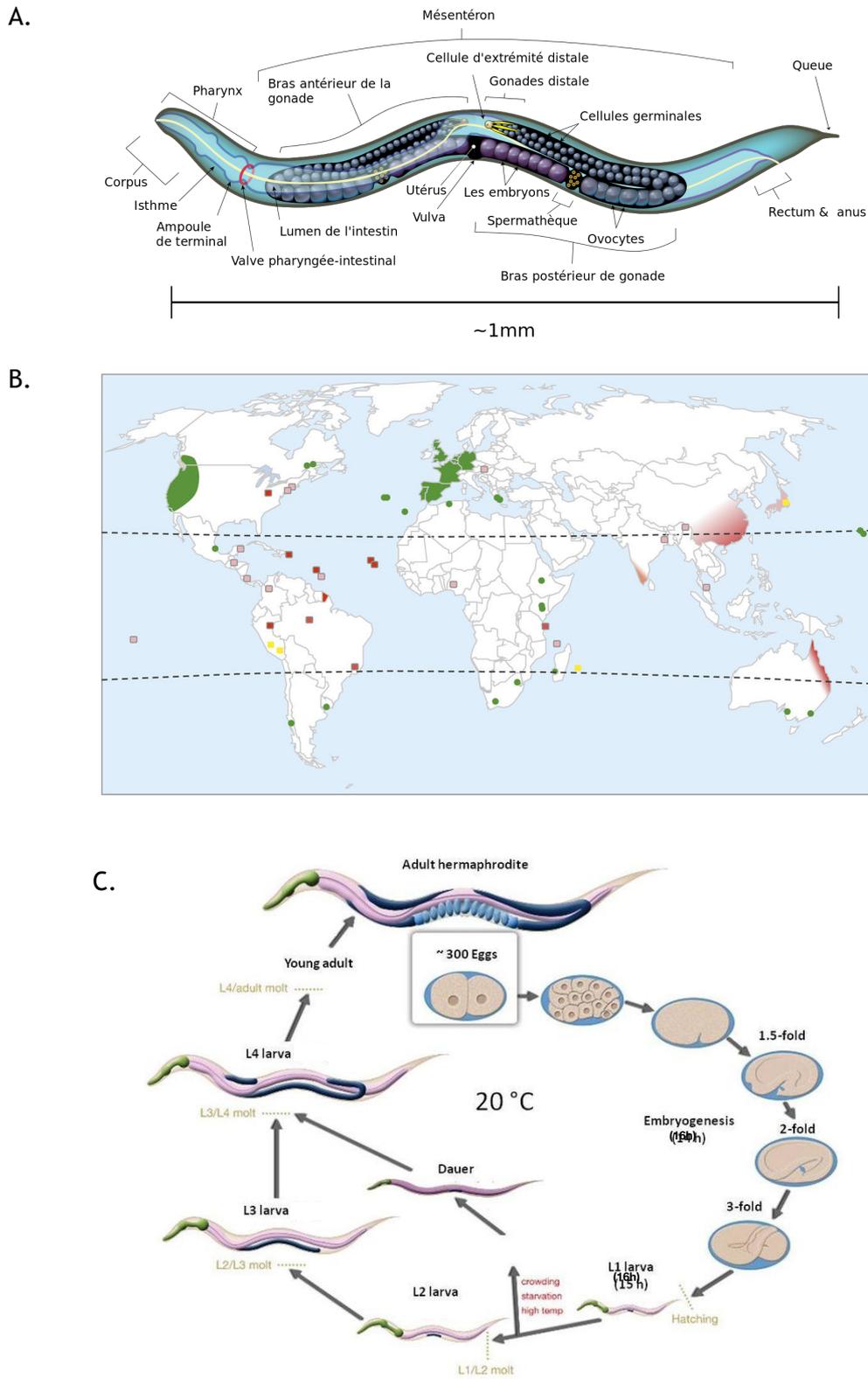
## D. Le nématode *Caenorhabditis elegans*

Le nématode *Caenorhabditis elegans* est un métazoaire invertébré couramment utilisé dans la recherche en biologie.

### 1. Généralités et praticité en laboratoire

Dans la nature, ce nématode d'environ 1 mm à l'âge adulte (Figure 5A), découvert et publié à la fin du 19ème siècle par Emile Maupas, se retrouve dans les zones tempérées humides, riches en végétation en décomposition. Il a d'abord été découvert dans des habitats d'influence humaine (composte, vergers, jardins potagers ou botaniques) puis dans des environnements plus naturels tels que des zones humides de type sous-bois (Barrière et Félix, 2005, 2007). En effet, il va se nourrir principalement des levures, champignons et bactéries qui poussent sur les fruits pourris ou les tiges humides. Le *C. elegans* se retrouve sur plusieurs continents (Europe, Amériques du Sud et du Nord, Afrique, Océanie et parfois en Asie). Il a même été isolé sur plusieurs îles comme Hawaii, Madère ou la Réunion (Figure 5B). Afin de coloniser de nouveaux habitats lointains, il peut se déplacer à l'aide d'autres animaux « taxi ». Pour cela, les vers vont s'agréger les uns sur les autres afin de faire une colonne et de pouvoir atteindre des animaux plus grands qu'eux capables de se déplacer sur de plus grandes distances comme sur des escargots (Schulenburg et Félix, 2017). Il survit à des températures allant d'environ 10°C à 25°C.

En laboratoire, c'est Sydney Brenner, biologiste moléculaire, qui, en 1963, va faire du *C. elegans* un organisme modèle très utilisé pour sa facilité d'utilisation et son anatomie relativement simple. Ellsworth Dougherty avait auparavant mis en place sa culture en laboratoire. Le nématode se cultive sur des boîtes de pétri sur un milieu gélosé peu couteux et prenant peu de place, mange une bactérie *Escherichia coli* non pathogène, se développe en seulement trois jours à 20° et produit environ 300 embryons par autofécondation (Figure 5C). De plus, il est très résistant à la déshydratation ou à la privation alimentaire et il peut se conserver à -80°C ou dans de l'azote liquide. Son génome entièrement séquencé et annoté a permis la création de banques de mutants et donc de faire de la génétique classique ou inverse aisément. Son corps transparent a notamment permis de réaliser l'ensemble du lignage des 959 cellules somatiques d'un nématode adulte sauvage hermaphrodite (Sulston *et al.* 1983). C'est ainsi que Ellis et Horvitz en 1986 ont pu décrire pour la première fois les mécanismes de l'apoptose. Sa grande constance anatomique et physiologique a permis l'étude de nombreux processus physio-(patho)logiques pertinents pour tous les eucaryotes comme l'étude du développement, des voies de signalisation ou même des neurosciences par exemple. Un autre aspect pratique est que *C. elegans* est un animal hermaphrodite auto-fécondant. Ceci signifie qu'il est possible d'avoir une population clonale à partir d'un unique individu homozygote pour un gène donné. Il existe tout de même entre 0,1 % et 0,2 % d'individus mâles qui sont en fait dû à une erreur dans la ségrégation des chromosomes



**Figure 5 : Le nématode *Caenorhabditis elegans*.** A. Morphologie du nématode *C. elegans* (de Wikipédia). B. Distribution mondiale du *C. elegans*. L'ombrage vert met en évidence les zones où *C. elegans* a été collecté à plusieurs reprises. Les points verts indiquent les îles ou les endroits où *C. elegans* a été collecté au moins une fois. Les carrés jaunes représentent les zones où de nombreuses espèces de *Caenorhabditis* ont été échantillonnées et où *C. elegans* est présent mais rare (souvent trouvé en altitude). Les zones ombrées de rouge indiquent que *C. elegans* n'a jamais été collecté malgré l'échantillonnage intensif de nombreuses autres espèces de *Caenorhabditis*. Les zones ombrées en rose indiquent que *C. elegans* n'a pas été collecté, malgré l'échantillonnage de plusieurs autres espèces de *Caenorhabditis*. Le blanc représente des zones qui n'ont jamais été échantillonnées pour *C. elegans* ou très rarement (de Frézal et Félix, 2015). C. Cycle de vie à 20°C du *C. elegans* (de [wormatlas.org](http://wormatlas.org)).

X lors de la méiose et dont l'utilité est importante lorsqu'il s'agit de réaliser des croisements entre différentes souches.

## 2. Cycle de vie

Le cycle de vie du nématode *C. elegans* est dépendant de la température. Ainsi, plus la température est basse, plus il se développe lentement, plus la température est haute et plus vite il se développe. Nous parlerons de sa vitesse de développement à 20°C (Figure 5C).

Après la fécondation, il y a formation d'une coquille autour de l'oeuf. Cette coquille est imperméable et va permettre à l'embryon de se développer indépendamment de la mère, qui elle est soumise aux variations environnementales. Les embryons ne sont cependant pas pondus immédiatement après la formation de la coquille puisqu'ils sont retenus dans l'utérus de la mère jusqu'au stade ~ 24 cellules. L'embryogenèse dure environ 16 heures et permet l'éclosion d'une larve de stade L1 avec 558 noyaux. A l'éclosion, les nématodes commencent à se nourrir et vont ainsi commencer leur développement post-embryonnaire. Le stade L1 dure environ 16 heures, le stade L2 dure environ 8 heures, le stade L3 dure environ 7 heures, et enfin, le stade L4 dure environ 9 heures. Chaque stade se termine avec une phase de léthargie pendant laquelle le ver est inactif et cesse de s'alimenter. Pendant cette période, il y a production d'une nouvelle cuticule et perte de l'ancienne, c'est la mue. Douze heures après la dernière mue, les nématodes hermaphrodites, désormais adultes, vont commencer à produire des embryons pendant environ 6 jours. Enfin, les nématodes vivent en moyenne 3 semaines lorsque les conditions de vie sont optimales en laboratoire.

Si au moment de l'éclosion la nourriture n'est pas disponible immédiatement, les nématodes ne commencent pas leur développement et font une « diapause ». Il existe également un autre stade alternatif entre les stades L2 et la L3 lorsque les conditions environnementales ne sont pas optimales (privation alimentaire, température trop élevée, surpopulation), c'est le stade Dauer. Dans cet état alternatif, les nématodes peuvent survivre jusqu'à trois mois en faisant baisser leur métabolisme au niveau minimal et en ne produisant pas de gamètes. De plus, leur cuticule devient plus résistante aux agressions environnementales et aux agents corrosifs (tel que le SDS), leur conférant ainsi une meilleure protection. Dès que les nématodes sont en contact avec de la nourriture, ils reprennent leur cycle de vie pour devenir des larves L4 puis des adultes fertiles (revue dans Schulenburg et Félix, 2017).

## 3. Les muscles striés

Le nématode *C. elegans* présente deux types de muscles. Le muscle du pharynx, muscle non strié, permet à l'individu de faire progresser les bactéries ou les levures dans cet organe pour les ingérer afin d'être ensuite digérées par l'intestin. Le pharynx est utilisé comme modèle pour étudier le muscle cardiaque et les pathologies qui y sont liées puisqu'il réalise un « pompage » comme le fait le coeur. Il est également utilisé comme modèle pour étudier plus largement

l'organogenèse (Mango, 2007). Chez le nématode, d'autres organes ont des cellules musculaires non striées (intestin, rectum, anus...).

Le nématode a également des muscles striés, équivalant des muscles squelettiques des vertébrés, qui se trouvent le long de la paroi du corps et sont l'équivalent de nos muscles « moteurs » et posturaux (triceps, biceps, abdominaux par exemple). D'un point de vue anatomique et physiologique mais aussi d'un point de vue développemental (voir ci-dessous), les muscles du nématode *C. elegans* sont semblables aux muscles présents chez l'Homme, ce qui en fait un bon modèle d'étude pour les myopathies notamment. Effectivement, nous verrons que tant un niveau de la structure, de la fonction mais aussi du développement, le muscle du nématode partagent des caractéristiques avec ceux des mammifères bien que cependant, les BWM soient plus simple.

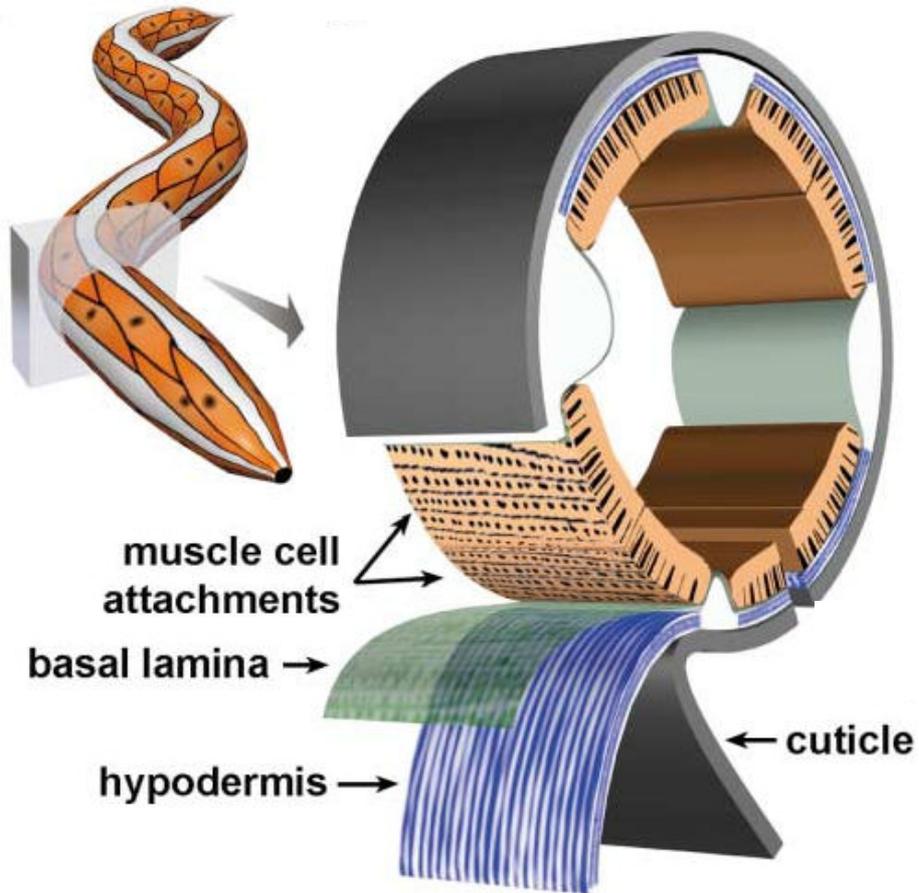
Dans cette étude, nous nous intéresserons uniquement au muscle de la paroi du corps aussi appelé Body Wall Muscle (BWM) dont la mise en place et la structure seront détaillées ci-après. Ces muscles sont nécessaires au mouvement sinusoïdal du nématode sur un milieu semi-solide et au mouvement en forme de C en milieu liquide.

## 1. Structure

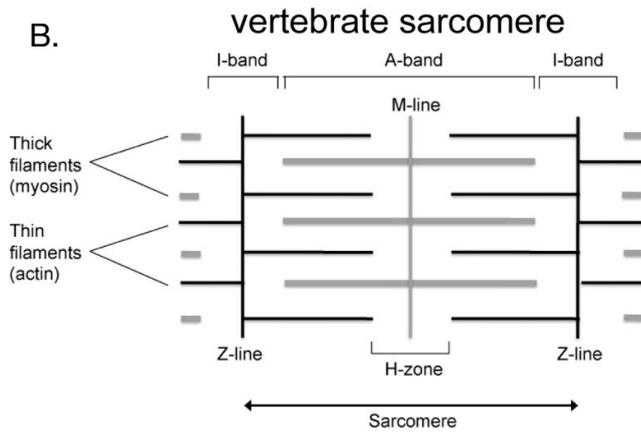
Chez *C. elegans*, les 95 cellules musculaires de la paroi du corps en forme de losange sont disposées par paires en quinconce dans quatre faisceaux longitudinaux situés dans quatre quadrants. Typiquement, une cellule musculaire comprend trois parties : le fuseau de filaments contractiles, un corps cellulaire de petite taille contenant le noyau, et le cytoplasme avec les mitochondries et les bras musculaires s'étendant jusqu'aux cordons nerveux ventraux ou dorsaux ou jusqu'à l'anneau nerveux (neurites contenus dans les ganglions de la tête) (Figure 6).

Comme chez les vertébrés (Figure 6B), les sarcomères constituent l'unité de base structurelle et fonctionnelle du muscle. Dans le muscle strié, ces unités sont répétées, donnant au muscle son apparence « striée » (Figure 6C). Chaque sarcomère est composé de fibres de myosine contenant des filaments épais (ou bande A) associés à la ligne M et d'actine composés de filaments fins (ou bande I) associés au disque Z - analogue des corps denses, situés à la fin de chaque sarcomère. Les bandes H correspondent à la région centrale des bandes A et des lignes M où chaque filament de myosine est relié bout à bout à son filament voisin. Les corps denses ont pour fonction d'ancrer et d'aligner les filaments fins dans le muscle strié. Les filaments épais sont attachés aux lignes M. Les disques Z et la ligne M étendent la profondeur totale du réseau et ancrent tous les filaments à la membrane cellulaire, à l'hypoderme et à la cuticule sous jacente. Les muscles sont reliés à la cuticule par des organites fibreux de l'hypoderme et ont donc de multiples points d'attaches uniformément répartis sur l'hypoderme et la cuticule (Cox et Hardin, 2004). Les filaments contractiles forment une couche ancrée au sarcolemme distal de chaque cellule.

A.



B.



C.

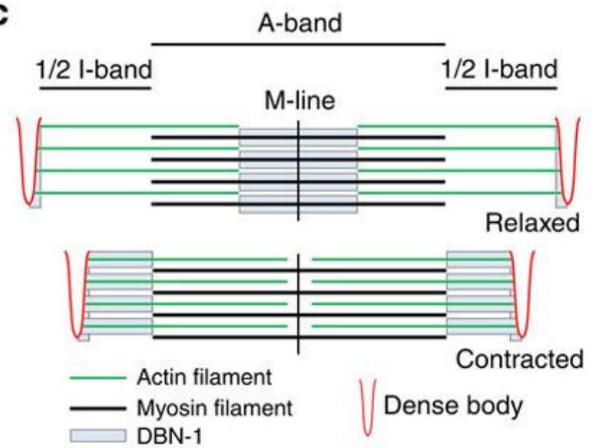


Figure 6 : Le muscle de la paroi du corps (BWM) chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. A. Coupe transversale d'un ver adulte soulignant que le muscle de la paroi du corps est constitué de quatre quadrants (en beige). Chaque quadrant est constitué de paires imbriquées de cellules mononucléées en forme de fuseau. Le réseau de myofilaments est limité à un côté de la cellule plutôt que de remplir la totalité de la section transversale comme dans une cellule musculaire striée de vertébré. B. Dessin d'un sarcomère typique dans un muscle strié de vertébré. C. Dessin d'un sarcomère typique dans le muscle strié du *C. elegans* (de Mackinnon *et al.* 2002).

Chez *C. elegans*, le réticulum sarcoplasmique est constitué d'un réseau d'organites membraneux vésiculaires entourant le réseau de myofilaments. Les vésicules s'étendent autour du corps dense et sont adjacentes à la membrane plasmique apicale sous le réseau d'organites et sont localisées aléatoirement entre les corps denses. Il existe un espace de 12 à 14 nm entre les vésicules du réticulum sarcoplasmique (Waterston, 1988).

Les muscles sont toujours séparés de l'hypoderme sous jacent et du tissu nerveux par une mince lame basale (Figure 6A).

Il faut noter que contrairement aux vertébrés, les muscles du *C. elegans* n'ont pas de cellules satellites, ce qui implique qu'il n'y a pas de régénération musculaire chez cet organisme. Ainsi, à l'âge adulte, les BWM cells sont totalement post-mitotiques et restent mononucléés car il n'y a pas de fusion. Les noyaux des cellules musculaires sont ovoïdes, de taille intermédiaire entre les noyaux neuronaux et hypodermiques et possèdent un petit nucléole sphérique.

## 2. Développement du muscle strié

Les cellules du BWM se développent pendant l'embryogenèse. Le développement embryonnaire est contrôlé au départ par les gènes exprimés par la mère, puis ce développement est ensuite contrôlé par les gènes exprimés par le zygote (Baugh et Hunter, 2006). Chez les vertébrés, c'est l'expression d'un ensemble de gènes appartenant à la famille des facteurs myogéniques qui va permettre le développement musculaire. Chez *C. elegans*, il existe un facteur myogénique, c'est *hlh-1* - l'unique homologue de *MyoD* chez les vertébrés. Ce dernier est exprimé à la fois dans les progéniteurs du BWM mais aussi dans les cellules musculaires au stade adulte. Quatre autres facteurs de transcription sont nécessaires au bon développement et fonctionnement des cellules musculaires : MAB-5, HND-1, FOZI-1 et UNC-120. Ceux-ci vont permettre l'expression de gènes impliqués dans la myogenèse du muscle qui consiste en 4 grandes étapes : la migration cellulaire, la polymérisation des filaments contractiles, l'attachement des cellules à l'hypoderme et enfin le développement des bras musculaires (structure permettant les jonctions neuro-musculaires - voir ci-après).

En bref, chez les vertébrés, au moment de la gastrulation, il y a création du mésoderme entre l'ectoderme et l'endoderme. Ce mésoderme va être à l'origine du tissu musculaire notamment. Les muscles dérivent du mésoderme paraxial qui devient des somites, d'abord dans la région antérieure puis ils s'ajoutent petit à petit vers la région postérieure. Puis, les cellules de la partie ventrale des somites vont donner le sclérotome ventral (qui donnera le cartilage, les vertèbres et les côtes). Les cellules de la partie dorsale forment le dermomyotome dorsal (qui donnera le derme, les muscles du tronc et des membres) (Tajbakhsh et Buckingham, 2000). Lors de la formation du myotome, les cellules progénitrices de la lèvre dorsomédiane et ventrolatérale vont donner les régions épaxiale et hypaxiale du myotome (Kahane *et al.* 2002), étant à l'origine des muscles du dos et latéraux du tronc. D'autres cellules progénitrices de la lèvre ventrolatérale

vont migrer pour donner les bourgeons des membres (Dietrich et al. 1999) (Figure 6 Bis A). Les cellules se différencient en myoblastes grâce aux MRFs (Myogenic Regulatory Factors), dont MyoD (Kassar-Duchossoy *et al.* 2004) (Figure 6 Bis B). Cette différenciation permet aux myoblastes de devenir des myocytes qui fusionneront pour donner des myotubes multinucléés. Ces myotubes vont mettre en place les sarcomères (Figure 6B) et les structures d'ancrage pour donner les fibres musculaires.

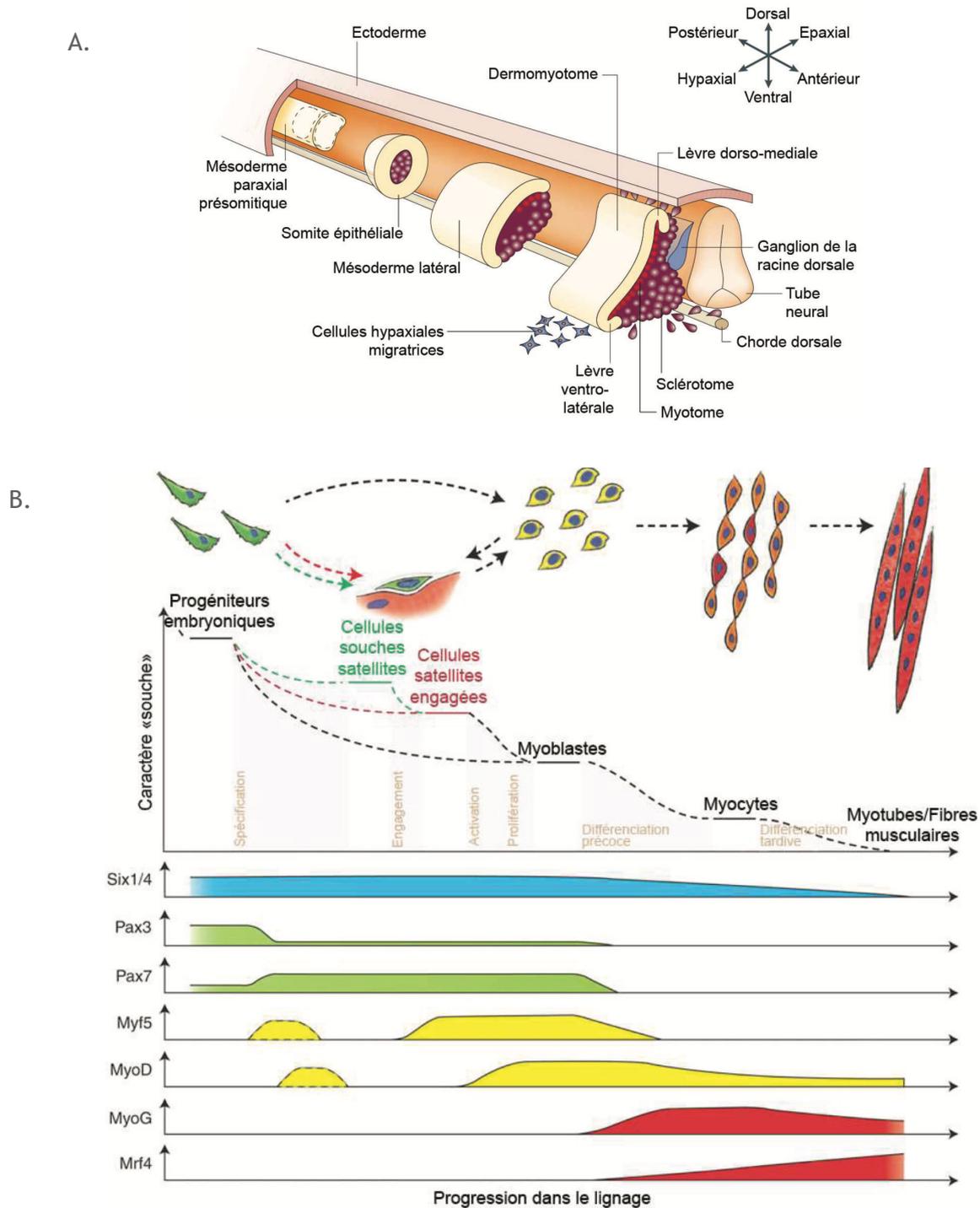


Figure 6 Bis: Le muscle squelettique chez les vertébrés. A. Schéma représentant le développement des somites et du myotome (adaptée de Parker *et al.* 2003, tiré de la thèse de N. Brouilly). B. Schéma représentant la myogenèse et le rôle des facteurs de transcriptions myogéniques (adapté de Bentzinger *et al.* 2012).

Chez *C. elegans*, avant la gastrulation, les cellules de l'hypoderme ventral et dorsal contiennent des myotactines (protéines hypodermiques impliquées dans l'adhésion des cellules aux muscles) distribuées de façon diffuse. Les myoblastes naissent après la fin de la gastrulation et sont alignés sur deux rangées latérales. Vinculines, intégrines et myosines sont toujours diffuses dans le muscle. Puis, les cellules musculaires migrent vers l'hypoderme ventral et dorsal. Les cellules de l'hypoderme dorsal ont alors presque complété leurs interdigitations. La migration des cellules musculaires embryonnaires est nécessaire à la mise en place de quadrants (4 bandes de cellules musculaires impliquées dans la locomotion). A la fin de la migration, les 2 bandes de cellules formant un quadrant s'aplatissent à la surface de l'hypoderme et deviennent jointives pour former le contact entre les cellules musculaires (Hresko *et al.* 1994). L'attachement des cellules musculaires à l'hypoderme commence dès la fin de la migration. Dans l'hypoderme, les composants des hémidesmosomes (assurant l'arrangement des cellules épithéliales sur la lame basale) s'accumulent autour des cellules musculaires en contact dans cette région. Plus tard, les cellules musculaires deviennent organisées en quatre quadrants. Chez *C. elegans*, les cellules musculaires sont toujours arrondies mais deviennent polarisées. Les composants du muscle du nématode sont localisés proches des sites de contacts muscle-muscle ou muscle-hypoderme. Au niveau de la membrane basale, myotactines et UNC-52 (permettant l'attachement des myofilaments à la membrane de la cellule musculaire) sont localisées au contact muscle-muscle. Les composants des hémidesmosomes se restreignent dans les régions de l'hypoderme adjacents aux cellules musculaires alors que les cellules dorsales de l'hypoderme ont terminé leurs interdigitations. Ensuite, les cellules musculaires s'aplatissent et myotactines et UNC-52 de la lame basale co-localisent avec les composants du muscle. Les structures d'attachement et les différents composants s'organisent en sarcomères. Plus exactement, UNC-52 et les intégrines s'organisent le long de la membrane basale des cellules musculaires et les composants des corps denses et des lignes M s'assemblent à ce même niveau. Les filaments épais s'assemblent avec les lignes M alors que les filaments fins s'assemblent avec les corps denses. Finalement, la myotactine s'associe avec les hémidesmosomes (Sulston *et al.* 1983 ; Hresko *et al.* 1994 ; Rogalski *et al.* 2001) (Figure 6C).

A l'éclosion, le nématode a 81 cellules du BWM. Les 14 autres se développeront post-embryonnairement (Krause, 1995 ; Moerman et Fire, 1997). A chaque stade larvaire, la masse cellulaire du muscle augmente. En effet, au stade L1, les cellules musculaires ont une largeur de 2 sarcomères. Puis, au cours du développement larvaire, de nouveaux sarcomères sont ajoutés (jusqu'à 10 sarcomères au total chez l'adulte). Au stade adulte, chaque cellule peut faire environ 100  $\mu\text{m}$  de long chez l'adulte, les filaments individuels font 10  $\mu\text{m}$  et les corps denses et lignes M augmentent également en taille grâce à des grappes d'intégrines plus larges (Moerman et Williams, 2006). L'appareil contractile est alors parallèle à l'hypoderme et à la cuticule. Enfin, les organites cellulaires tels que le noyau, le réticulum endoplasmique, les ribosomes, les mitochondries sont situés dans la partie la plus profonde de la cellule musculaire.

### 3. Contraction musculaire

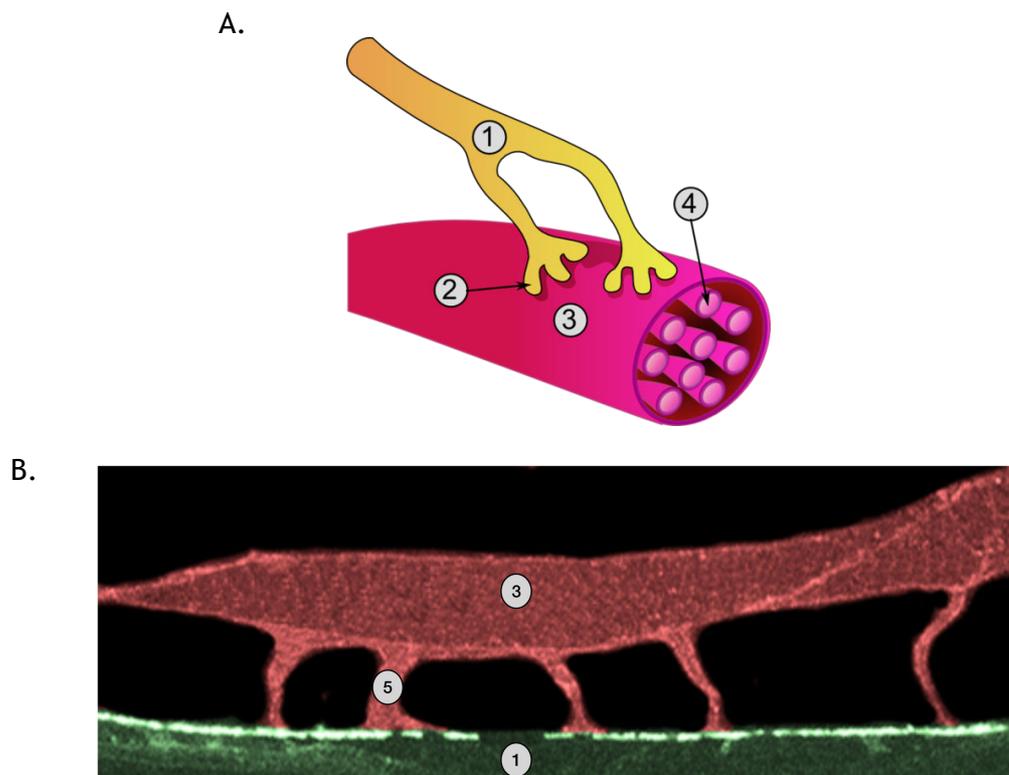
Les cellules musculaires du nématode ont deux types d'innervations : une innervation excitatrice dite cholinergique et une innervation inhibitrice dite GABAergique. La plupart des connexions synaptiques morphologiquement identifiables chez un animal sauvage sont décrites. Celles-ci consistent en environ 5000 synapses chimiques, 2000 jonctions neuro-musculaires et 600 jonctions intermédiaires (White *et al.* 1986). Un autre article décrit que la majorité des neurones sont non ramifiés et bipolaires faisant en moyenne 58,6 synapses et jonctions neuro-musculaires avec seulement deux neurites (Chen *et al.* 2006).

Chez d'autres organismes, ce sont les neurones qui envoient des projections à leurs cellules musculaires cibles pour former des synapses (Figure 7A). Chez *C. elegans*, les jonctions neuro-musculaires sont fabriquées par des bras développés de cellules musculaires vers les neurones moteurs (Stretton, 1976 ; Sulston et Horvitz, 1977 ; Sulston *et al.* 1983 ; White *et al.* 1986 ; Dixon et Roy, 2005 ; Dixon *et al.* 2006) (Figure 7B). Ces bras musculaires sont structurellement simples. Ils sont constitués d'une tige et d'une extrémité courbée entrant en contact avec le neurone. Les JNM sont faites en passant par les neurones en contact avec ces bras musculaires (White *et al.* 1986). Le guidage axonal va permettre un déplacement sporadiquement vers l'extérieur de ce réseau de projections musculaires afin que les neurones deviennent accessibles aux bras musculaires dans les régions synaptiques.

Le couplage excitation-contraction musculaire est le processus par lequel un potentiel d'action déclenche la contraction d'une cellule musculaire.

Suite à l'arrivée d'un potentiel d'action, l'activation des cellules musculaires se fait par la libération d'acétylcholine au niveau des synapses, comme chez les vertébrés. Il y a alors une augmentation du niveau de calcium intracellulaire qui est nécessaire à la contraction et fait intervenir des canaux calciques voltage-dépendants. Le calcium va alors libérer les sites d'interactions entre les filaments d'actine et de myosine. Lorsque la tête de myosine tire sur l'actine, cela génère une force qui doit ensuite être transduite en dehors de la cellule musculaire. En effet, cette force passe du muscle à l'hypoderme puis de l'hypoderme à la cuticule *via* les organites fibreux.

Chez *C. elegans*, les cellules musculaires soient mononucléées et ne fusionnent pas contrairement aux cellules musculaires squelettiques des vertébrés. Cependant, de part sa similarité structurelle et fonctionnelle, ces différentes caractéristiques font du *C. elegans* un modèle simple pour l'étude des tissus musculaires.



**Figure 7 : Jonction neuro-musculaire.** A. JNM de vertébrés simplifiée. B. Image de JNM de *C. elegans*. Les bras musculaires émergent du corps cellulaire et s'étendent vers le bas, en touchant les nerfs au bout des bras (Image de Andres Villu Maricq). (1) Axone du moto-neurone. (2) Axone terminal. (3) Cellule musculaire. (4) Myofibrille. (5) Bras musculaire.

## 4. Le système nerveux

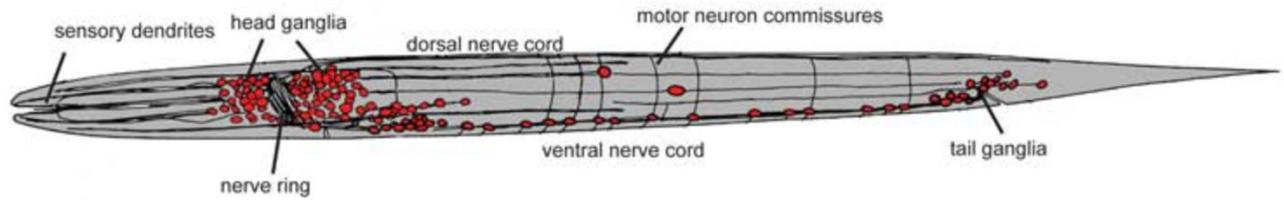
### 1. Structure

Le système nerveux du nématode *C. elegans* est relativement simple. Il est composé de 302 neurones pour l'hermaphrodite et 383 pour le mâle. Le ver a plusieurs ganglions dans la queue et dans la tête et un cordon nerveux ventral (White *et al.* 1986). De plus, les neurones de *C. elegans* sont systématiquement positionnés de la même manière d'un individu à l'autre (Figure 8A). Le réseau neuronal est lui aussi très reproductible d'un individu à l'autre bien qu'il existe des variations entre les individus en terme de nombres de connexions formées entre les partenaires neuronaux. Grâce au lignage cellulaire de Sulston, il a pu être montré que pratiquement tous les neurones de *C. elegans* naissent de divisions cellulaires asymétriques. En effet, les neurones de *C. elegans* sont largement dérivés de nombreuses lignées de manière non clonale (Figure 8B). D'apparence simple, les neurones du nématode sont des dispositifs sophistiqués pour le traitement des informations avec un schéma complexe pour relier les autres neurones et co-exprimant un grand nombre de molécules de signalisation (neurotransmetteurs et récepteurs).

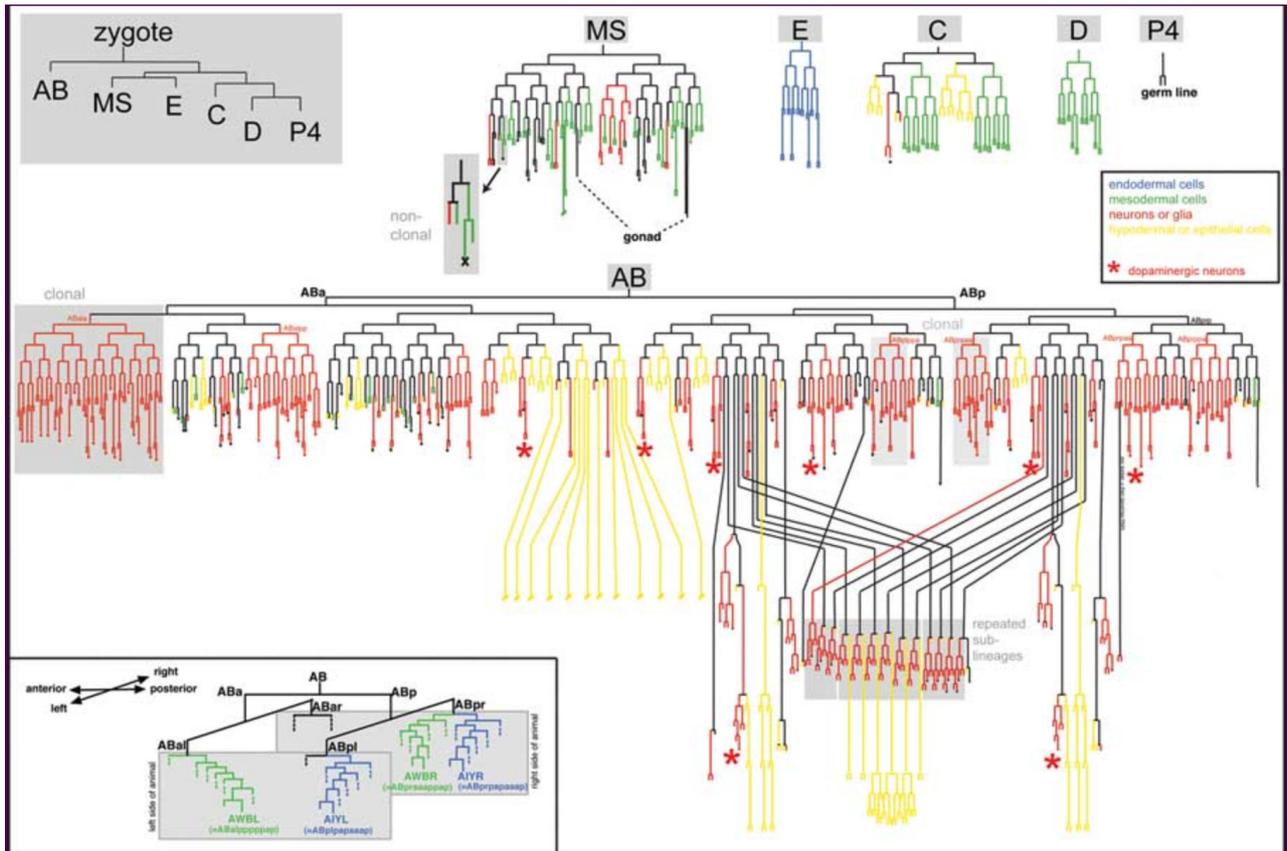
La majorité des neurones du nématode a une structure simple avec seulement une ou plusieurs neurites (2 en général) sortant du corps cellulaire (les neurones mécano-sensoriels ont des neurites très ramifiées). Les neurites forment des synapses entre elles dans l'anneau nerveux (autour du pharynx), le cordon nerveux dorsal et ventral et le neutrophile de la queue. Il existe également des cellules de soutien ressemblant à des cellules gliales et qui sont principalement associées aux neurones sensoriels.

Grâce à la génétique du nématode *C. elegans*, de nombreux mutants ont permis de trouver les gènes nécessaires à la spécification des cellules du système nerveux. Par la production de gènes rapporteurs, les régions régulatrices de la spécification neuronale ont également pu être décrites. Ainsi, les chercheurs ont identifié les gènes et les mécanismes nécessaires à la génération et à la spécification neuronale, à la mort cellulaire, la formation de synapses, la migration de précurseurs, etc... Les chercheurs ont aussi étudié des comportements simples et complexes comme la chimiotaxie, les réactions au toucher, la reproduction, le sommeil, etc...

A.



B.



**Figure 8 : Le système nerveux du nématode *C. elegans*.** A. Organisation générale du système nerveux du *C. elegans*. Les neurones sont en rouge. Au premier stade larvaire, représenté schématiquement ici, il y a 222 neurones. Au cours du développement larvaire, un certain nombre de neurones sont ajoutés, ce qui donne un nombre total de 302 neurones chez les adultes hermaphrodites et de 383 neurones chez les mâles adultes (de Wormbook). B. Lignage complet du système nerveux du *C. elegans*. Le panneau en haut à gauche indique les blastomères embryonnaires. Toutes les autres lignées sont des descendants de ces blastomères. Quelques traits spécifiques sont soulignés dans les cases grises et avec les étoiles rouges (neurones dopaminergiques) pour illustrer la diversité de la lignée des neurones partageant un neurotransmetteur. L'encart montre deux exemples de deux paires de neurones à symétrie bilatérale (adapté de Sulston *et al.* 1983)

## 2. Conduction du signal nerveux

Chez *C. elegans*, la conduction du signal semble être passive puisqu'il n'y a pas de potentiel d'action dépendant du sodium ni de gènes codants pour les canaux sodiques voltage dépendant. Malgré les 7 000 synapses chimiques et connexions fonctionnelles et 2 000 JNM

(White *et al.* 1986), le *C. elegans* n'envoie pas de branches terminales avec des boutons pour faire des synapses. En effet, les connexions se font en passant côte à côte lorsque les neurites se croisent principalement.

*C. elegans* utilise les neurotransmetteurs les plus courants, notamment l'acétylcholine, le glutamate, l'acide gamma-amino butyrique (GABA), la dopamine et la sérotonine, et dispose de plusieurs récepteurs pour leurs détections (Hobert, 2013).

Du point de vue des détails cellulaires et moléculaires, la plupart des problèmes de neurobiologie peuvent être étudiés chez le ver. Bien que le système nerveux de *C. elegans* soit plus simple que celui d'autres animaux, la caractérisation approfondie de ce système et son nombre constant de neurones permettent de faciliter la compréhension de mécanismes neurologiques. De plus, grâce au séquençage du génome du nématode *C. elegans*, il a pu être mis en évidence un haut degré de conservation à l'échelle moléculaire entre le système nerveux des vertébrés et celui du nématode (Bargmann, 1998).

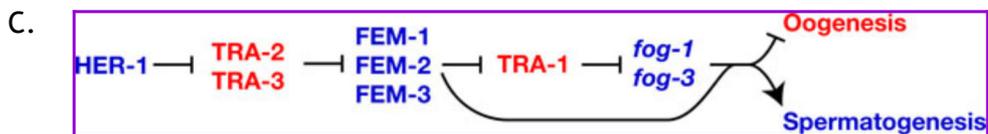
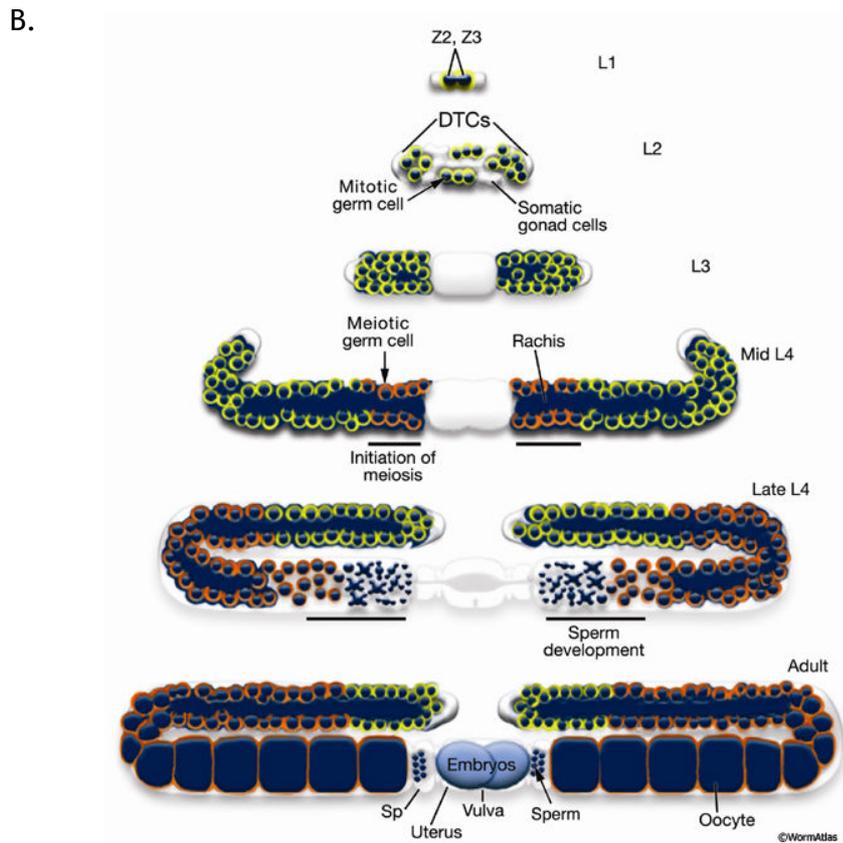
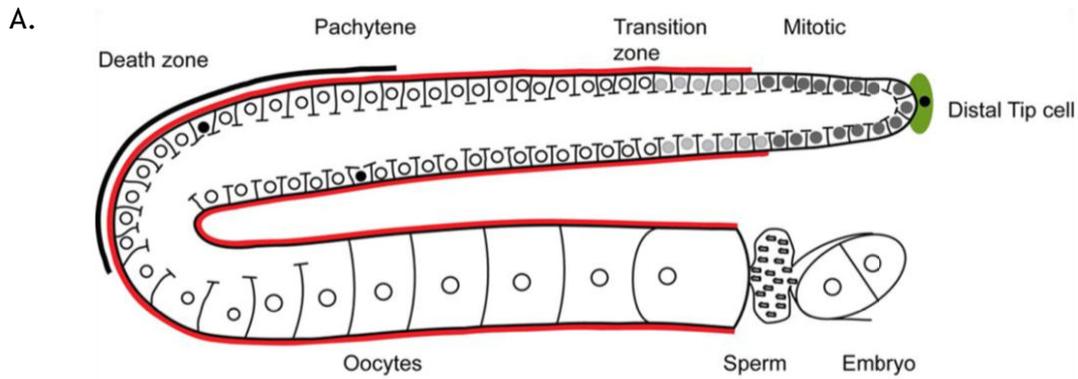
## 5. Lignée germinale et différenciation sexuelle

### 1. Structure et mise en place de la lignée germinale

Chez le nématode *C. elegans*, la majorité des individus sont hermaphrodites auto-fertiles avec un caryotype XX alors que les mâles n'ont qu'un seul chromosome X.

La gonade somatique est située au centre du corps, à côté de l'intestin. Chez les hermaphrodites, la gonade est constituée de deux tubes (antérieur et postérieur) en forme de U en miroir qui se rejoignent dans l'utérus central (Figure 5A). Chez les mâles, la gonade est constituée d'un seul lobe en forme de U. Les deux gonades hébergent la lignée germinale où se développent les ovocytes et le sperme (Hubbard et Greenstein, 2005). La gonade somatique et la lignée germinale se développent ensemble au cours des stades larvaires jusqu'à ce que les animaux atteignent la maturité au début du stade adulte.

Chez l'hermaphrodite, à l'extrémité distale de chaque gonade, une cellule somatique force les cellules germinales adjacentes à rester en mitose et à proliférer. Lorsque les cellules s'éloignent de l'extrémité distale, elles commencent la méiose jusqu'au stade pachytène (dans la zone pachytène) où elles vont s'arrêter pendant plusieurs heures. C'est à ce stade que les cellules vont produire des ARN messagers et des protéines qui diffuseront dans toute la lignée germinale afin de contribuer à la formation d'ovocytes matures. Plus on s'approche du coude de



**Figure 9 : La lignée germinale du nématode *C. elegans*.** A. Gonade de *C. elegans* hermaphrodite. Les cellules germinales sont dérivées d’une population de cellules souches situées à l’extrémité distale de la gonade (par rapport à l’utérus). Ces cellules souches germinales donnent naissance aux spermatozoïdes pendant les stades larvaires, puis commutent vers la production d’ovocytes au stade adulte (de Wormbook). B. Développement de la lignée germinale (adapté de Schedl, 1997). C. Voie simplifiée de la détermination sexuelle. Les protéines FOG-1, FOG-3 et FEM favorisent la spermatogénèse. Les protéines sont indiquées en majuscules et les gènes en italiques minuscules pour indiquer que TRA-1 contrôle la transcription des gènes *fog-1* et *fog-3*. Les interactions positives sont indiquées par une flèche et les négatives par un " - | ". Les gènes qui favorisent la spermatogénèse sont bleus et ceux qui favorisent l’ovogénèse sont rouges (de Wormbook).

la gonade, plus il y a de cellules en méiose afin de devenir un ovocyte mature ou d'entrer en apoptose. Les molécules peuvent être partagées entre les cellules de la lignée germinale puisqu'elles font partie d'un syncytium. Chaque noyau est situé à la surface du tube formant la lignée germinale en étant partiellement enfermé mais en étant ouvert sur un large cytoplasme commun au centre du tube (Figure 9A).

L'auto-fertilité des hermaphrodites est obtenue par une période transitoire de spermatogenèse au stade L3 puis par le passage à l'ovogenèse au stade L4. C'est également à ce stade que les spermatozoïdes migrent dans la spermathèque qui est la zone de stockage du sperme endogène mais aussi exogène (provenant d'un mâle). De part la position de la spermathèque, les ovocytes vont traverser cette zone de stockage et être potentiellement fécondés avant d'être pondus (sous forme d'embryon en cas de fécondation) (revue par Kimble et Crittenden, 2007).

Les mâles adultes sont plus minces que les hermaphrodites (en raison de leurs gonades plus petites et de l'absence d'embryons en développement) et leurs queues sont aplaties en un éventail de matériaux cuticulaires avec 18 projections de neurones et des cellules de soutien associées appelées rayons. Leur corps est adapté pour trouver et s'accoupler avec des femelles ou des vers hermaphrodites (Wolff et Zarkower, 2008). Comme chez les hermaphrodites, les cellules de l'extrémité distale situées à une extrémité de la gonade créent une niche de cellules souches. Lorsque les cellules germinales s'éloignent de l'extrémité distale, elles entrent en méiose, progressent jusqu'au stade pachytène et s'arrêtent. Cependant, une fois qu'elles ont repris leur différenciation, elles se développent en spermatocytes primaires, chacun passant par la méiose pour produire quatre spermatozoïdes et un corps résiduel. En général, les spermatozoïdes masculins sont plus gros que ceux fabriqués par les hermaphrodites et concurrencent mieux pour la fécondation (LaMunyon et Ward, 1998 ; Singson *et al.* 1999).

Les structures d'accouplement sexuelles secondaires sont la vulve chez les hermaphrodites et la queue en éventail chez les mâles (Emmons, 2005 ; Herman, 2006). La vulve se développe au centre de l'épiderme sur la face ventrale de l'hermaphrodite et constitue le canal permettant l'entrée du sperme du mâle et la ponte par l'utérus (Sternberg, 2005).

## 2. Détermination sexuelle de la lignée germinale

Chez le nématode *C. elegans*, l'auto-fertilité des hermaphrodites se fait grâce à une première phase de spermatogenèse au stade L3 puis une transition vers l'ovogenèse en fin de stade L4 ou jeune adulte (Figure 9B). La figure 9C montre une version simplifiée de la voie de détermination du sexe de la lignée germinale.

La production de sperme nécessite l'expression des gènes *fog-1* et *fog-3* ainsi que les trois gènes *fem-1*, *fem-2* et *fem-3*. L'état de phosphorylation de FOG-3 (probablement par MPK-1 - homologue d'ERK) module l'initiation et le maintien du programme de spermatogenèse. Pour la spermatogenèse, la protéine TRA-1 (TRAnsformer) doit être dégradée pour permettre la production de spermatozoïdes. Pour cela, les FEMs (FEMinization) vont servir d'adaptateurs au système ubiquitine-protéasome qui va ainsi induire l'ubiquitylation et la dégradation de TRA-1. Les FEMs peuvent jouer leurs rôles d'adaptateurs car TRA-2 est inhibée par la protéine HER-1 (HERmaphrodization) (Zarkower, 2006 ; Gilder *et al.* 2013 ; Starostina *et al.* 2007) (figure 13).

Au cours de l'ovogenèse, TRA-1 va inhiber la transcription de gènes impliqués dans le développement des gamètes mâles pour permettre la production d'ovocytes. En effet, les FEMs vont être inhibées par le récepteur trans-membranaire TRA-2 et ne pourront pas servir d'adaptateurs au système ubiquitine-protéasome.

L'étude de la lignée germinale a été un modèle pour la méiose, le développement des gamètes, la fécondation, la biologie des cellules souches (due à la balance prolifération/différenciation) et même pour la formation de tumeurs (Kimble et Crittenden, 2005).

## **E. Objectif de la thèse**

La voie de biosynthèse des purines est étudiée depuis longtemps dans différents modèles protozoaires mais aussi métazoaires.

De nombreux travaux ont déjà été réalisés chez la drosophile afin d'étudier des aspects développementaux notamment. Effectivement, des mutants de la voie *de novo* (PPAT, PFAS, GART et PAICS) (Figure 2A et B) conduisent à des défauts dans la formation des pattes, des soies, des ailes et une baisse de la production du pigment rouge des yeux (Long *et al.* 2006 ; Johnstone *et al.* 1985 ; Tiong *et al.* 1989 et 1990 ; O' Dannel *et al.* 2000). Les mutants de la voie de recyclages, IMPDH et GMPS ont un défaut du guidage des axones des photorécepteurs de l'oeil (Long *et al.* 2006). Cependant, tous ces mutants présentent une létalité pupale très importante qui est en corrélation avec l'activité résiduelle mesurée de la protéine mutée (Clark, 1994). Ainsi, chez la drosophile, les gènes de la voie de biosynthèse des purines semblent avoir un rôle développemental spécifique dont les mécanismes sont peu connus. Le poisson zèbre a également été utilisé comme modèle pour étudier les pathologies liées aux purines notamment parce les embryons sont accessibles et transparents facilitant les observations. Seuls les gènes *paics* et *adss* (Figure 2A et B) ont été décrits comme étant essentiels au bon développement de l'oeil chez ce modèle (Amsterdam *et al.* 2004). Il n'existe pas d'autres mutants chez le poisson zèbre décrits dans la littérature. Des knock-down d'*adss* et de *gmgs* induisent aussi des défauts oculaires. Les auteurs suggèrent que ce phénotype serait lié à la quantité insuffisante d'ATP produite entraînant une modification du cycle cellulaire dans ce tissu (Lister *et al.* 2002). Cependant, chacun des mutants cités précédemment présentent une forte létalité embryonnaire. Enfin, la souris étant largement utilisée comme modèle animal pour étudier des pathologies humaines, plusieurs KO (knock-out) sont décrits pour les gènes *Ada*, *Aprt*, *Pnp*, *Ampd1*, *Adk* et *Hprt* (Figure 2A et B). Pour les déficiences dont l'étiologie est connue, les modèles de souris *Ada*, *Aprt*, *Pnp* et *Ampd1* reproduisent les symptômes observés chez les patients (Blackburn *et al.* 1998 ; Somech *et al.* 2013 ; Redhead *et al.* 1996). Les souris KO pour *Ampd1* sont symptomatiques, comme c'est très souvent le cas chez les patients atteints de cette même déficience (Cheng *et al.* 2014). Les modèles *Hprt* et *Adk* ne présentent que quelques symptômes retrouvés chez la patients et la composante neuro-musculaire est mineure chez ce modèle alors qu'il s'agit de l'atteinte principale chez les patients (Hooper *et al.* 1987 ; Kuehn *et al.* 1987). Ainsi, bien que ce modèle soit pertinents pour certaines pathologies ou pour l'étude de phénotypes particuliers, il ne permet pas de reproduire bon nombre des symptômes retrouvés chez les patients.

En outre, seuls quelques KO dans différents modèles sont décrit dans la littérature et des mutants tels que le KO du gène *adsl* sont souvent annoncés comme perspective mais à l'heure actuelle, ils n'ont jamais été publiés.

Notre objectif est de mieux comprendre le lien entre les déficiences enzymatiques dues à des mutations dans les gènes codants pour les enzymes de la voie de biosynthèse des purines et les symptômes observés chez les patients. Nous avons donc décidé d'établir le nématode *Caenorhabditis elegans* comme modèle animal métazoaire pour étudier ces pathologies compte tenu de ses nombreux avantages en laboratoire et de ses caractéristiques phénotypiques sauvages largement décrites.

Après avoir décrit la voie de biosynthèse des purines chez *C. elegans* et après avoir fait une analyse fonctionnelle, nous étions confiants dans la mise en place de ce métazoaire comme modèle animal pour étudier les pathologies liées à la voie de biosynthèse des purines. Ainsi, nous avons pu réaliser une analyse phénotypique de différents mutants de la voie chez l'adulte mais aussi au cours du développement post-embryonnaire. Ce travail a été combiné à des analyses des relations d'épistasie afin de montrer quelle(s) est/sont la/les cause(s) des phénotypes observés.

## II. Résultats

Afin d'établir le nématode *C. elegans* comme modèle animal pour étudier la voie de biosynthèse des purines, il a d'abord fallu identifier les gènes de la voie. Le génome du ver étant entièrement séquencé et annoté, une analyse bio-informatique a pu être faite. Ensuite, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle des gènes identifiés par deux approches complémentaires.

Par la suite, nous avons pu réaliser une analyse de phénotypes de différents mutants de la voie, tels que la lignée germinale, la stérilité, la longévité, la fonction neuronale, le développement post-embryonnaire et le muscle. Des analyses des relations d'épistasie permettront de séparer les causes de certains des phénotypes observés. L'ensemble des expériences menées dans cette étude ont été réalisées à 20°C.

Ce travail est notamment orienté sur la déficience en ADSL qui est une pathologie humaine pour laquelle les mécanismes moléculaires impliqués dans les symptômes des patients sont peu, voir même pas connus.

### A. Analyse fonctionnelle de la voie de biosynthèse des purines chez *C. elegans*

#### 1. Analyse bio-informatique

Avant que je commence mon travail de thèse, une analyse bio-informatique a été réalisée afin d'identifier les gènes de la voie de biosynthèse des purines chez *C. elegans*.

Le génome du nématode est entièrement séquencé depuis 1998 et est publié dans la revue *Science* par le « *C. elegans* sequencing consortium ». La voie de synthèse des purines est très conservée de la bactérie à l'Homme. Ainsi, dans un premier temps, les séquences protéiques de l'Homme (*Homo sapiens*) et de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) ont été utilisées comme référence afin d'identifier les gènes de la voie des purines chez *C. elegans*. De façon spécifique, pour PPAT-1, ATIC-1 et ADSL-1, les séquences protéiques ont été alignées avec celles du rat (*Rattus norvegicus*) et de la mouche (*Drosophila melanogaster*) en plus de l'Homme et de la levure (Figure 10).

Il a été trouvé, en moyenne, 40% d'identité de la levure à l'Homme et 60% de similarité sur la totalité des gènes de la voie (Figure 11A). Ainsi, tant la voie *de novo* que la voie de recyclage sont conservées chez *C. elegans*. De plus, pour chacune des enzymes de la voie, nous n'avons pu identifier qu'un seul gène (sauf pour la Xanthine oxydase - XO - qui a trois orthologues : GAD-3, F15E6.6 et F55B11.1) (Figure 11A et B).

PPAT-1

C. elegans -----MCGIFGIVAAAGNYEHL--NVLAAAGLAAQLQHRG 31
H. sapiens -----MELEBELGIRECGVFGCIASGEWPTQLDVFHVITLGLVGLQHRG 44
R. norvegicus -----MELEBESGIRECGVFGCIASGDWPTQLDVFHVITLGLVGLQHRG 44
D. melanogaster MMAQSDSGNCCAKLNKDECCQKTKDVLISGVSPKMFDPKIYKSVQPKGEDATGMCCEGVFAAIACGDYPTQLDFAQMICLGLVLAQHRG 90
S. cerevisiae -----MCGILLGLVLANQTT---PVAPELDCGCTFLQHRG 31
C. elegans TESICLVESDGIIRDRHVEIIRKHGHLVRDVIITEDNISRMNQCOSIIGHNRYSTAGKKSCTINCQOPFVVVITAMCTVAIAHNGELVDAKQKR 121
H. sapiens QESAGIVTSDGSSVPTFKSHKMGMLVNHVFTEDNLKKLYVSNLIGHTRYATTGRC--ELENQOPFVVETLHGKTAVAHNGELVNAARLR 132
R. norvegicus QESAGIVTSDGSSVPTFKSHKMGMLVNHVFTEDNLKKLYVSNLIGHTRYATTGRC--ELENQOPFVVETLHGKTAVAHNGELVNAARLR 132
D. melanogaster QESAGIVTSLGKSSKNFSYHKGMCMTNNTNDEAIRKL-KGNLIGHTRYSTAGAS--EUVNCOPEFVVHTHGALAIHNGELVNCESLR 177
S. cerevisiae QDAAGIATGGS--RGRYIQCXKNGMARDVFTQQRVSG--AGSMGTAHLRYETAGSS--ANSEAOPFVYVNSPYG--ENLAHNGLVNVTASLR 115
C. elegans KEVLEHE-CVGLSTDTDSSELIACMIAKAIALNVKCKYQGEBCITITRELAVTMSALNMSYSLI-VMTFPRLIYARDFEENRPLCVGTVYSK- 208
H. sapiens KKLIRH-CVGLSTSDSEMITQLLAYTPPQ-E---QDDTPDWVARIKMLMKEAFTAYSLI-TMHRDVIYAVRDPYGNRPLCGRLIPVS 215
R. norvegicus KKLIRH-CVGLSTSDSEMITQLLAYTPPQ-E---QDDTPDWVARIKMLMKEAFTAYSLI-TMHRDVIYAVRDPYGNRPLCGRLIPVS 215
D. melanogaster REVLEER-CVGLSTHSDSELIACSLCCAPEDDVS---EHDGNNWPARTRHFMTLAPLSLVSLV-VMHKDKIYAVRDSYGNRPLCGKIIVPD 261
S. cerevisiae RYMDEADVHRHINSDSSELLNIFAAELEKHN--KYRVNNEVFFHALEGVYRLCRGGYACVGLLAGFALGFRDENGIRPLRFLGEREN-- 201
C. elegans -----NGNEFAFIASSESCAFPA-NAKLDPEVRPGEIVELSTGGIKSVWQ---MKENTFLAMCIFEVYFARNDSIEEGQVQTVRE 286
H. sapiens DINDKEKKTSETEGWVVSSESCSFLSIGARYYREVLPGEIVETSRHNVDIIDI-TSRSEGNFVAFCIFEVYFARFDSMFEIQMVYTVRY 304
R. norvegicus DINDKEKKTSETEGWVVSSESCSFLSIGARYYREVLPGEIVETSRHGVRIIDI-IIPRNGDFVAFCIFEVYFARFDSMFEIQMVYTVRY 304
D. melanogaster AGH-ANINDQLAEGWVVSSESCGFLSIGARYVREVEPGEITHELSRNGYRTVVDI-VERPDYKRMFAFCIFEVYFARSDSMFEGQMVYSARL 349
S. cerevisiae -----BDGKDYMLIASESVVFAKHNFTKYRDLKPEAVITPKNCSKGEPEPKQVFINSVYRPTDFEYVVFARFDSVLDGTSVYHTRL 283
C. elegans ECGKTMAL-----EDDLEADVGNVFDSSLSAAGYASQSGITVEVFLHRNSYVGRSFTPEPDEMRCNAIKMKFVGLKKKIHGQRIVLVD 371
H. sapiens RCGQQLAI-----EAFVADLVSTVPESATPAALAYAGKCGLPYVEVLCKNRYVGRFTIOPNMLRQLGVAKKFGVLSDNFKGKRIVLVD 389
R. norvegicus RCGQQLAI-----EAFVADLVSTVPESATPAALAYAGKCGLPYVEVLCKNRYVGRFTIOPNMLRQLGVAKKFGVLSDNFKGKRIVLVD 389
D. melanogaster CCGQQLAR-----ESPADLVSSVPESATAAARHAGYARESLPFGVEVLCKNRYVGRFTIOPSTRLRQLGVAKKFGALANVEGKRIVLVD 434
S. cerevisiae AMGSKLAENILKQLKPEEIDVVIIEVDRTARTCALCANVLCRXPYREGVFNRYVGRFTIOPNQRERVSSVRRKLNFMESFEGKQKVLVD 373
C. elegans DSIVRGNTMRTLVMIRDAGAKEVHIRIASPPVRFPCFMGINIPTKRELIAAEKTIPEITCQFVGADSVRYLSVGLVSSVQKGER--- 457
H. sapiens DSIVRGNTISPIIKLLKESGAKVHIRVASPPIKYPCFMGINIPTRELIANKPEFDHLAEYLGANSVVYLSVEGLVSSVQCEKFKKQK 479
R. norvegicus DSIVRGNTISPIIKLLKESGAKVHIRVASPPIKYPCFMGINIPTRELIANKPEFEYLAEYLGANSVVYLSVEGLVSSVQCEKFKKQK 479
D. melanogaster DSIVRGNTIGPIIKLLRDAGATEVHIRIASPPVRFPCFMGINIPTRELIANKLNADOLADHVGAESLAYLSVEGLVKAQVMKNAH--- 520
S. cerevisiae DSIVRGTTSKETVNMMAKESGATKVFYFASAFARHYNHIGTDLTDTKNLIAYNRTDEEVAEVIQCEFRVYIQLSELEIDICTKTKITKFE- 462
C. elegans -----AANFSPGHCTACTGKYVVAIDL----- 480
H. sapiens EKKHDIMIQENGNLECFEKGHCTACTGKYV---ELEW----- 517
R. norvegicus VKKRDIITIQENGNLEFYEKGHCTACTGQYV---DLEW----- 517
D. melanogaster -----VNPLKAGYCTACTGGEYPEGIPEELSW----- 547
S. cerevisiae -----DGVFTGNYVTVGVEDGYIQELEEKRESIANNSMDKAEVDIGLYNCADY----- 510

ATIC-1

C. elegans MTDGKSLAIIISVSDKTGLIPLAHGLVMSAGITLISAGGTAKAIRDQCHVDVADVTRFPEMLGGRVKTLPVAVHAGILARDTESDRKLE 90
H. sapiens -MAPGQLAIFSVSDKTGLVEFARNLIALGLNLVASGGTAKAIRDAGLAVRDVSEITGFPPEMLGGRVKTLPVAVHAGILARNIPEDNADMA 89
R. norvegicus -MASSQLAIFSVSDKTGLVEFARNLIALGLNLVASGGTAKAIRDAGLAVRDVSEITGFPPEMLGGRVKTLPVAVHAGILARNIPEDNADMA 89
D. melanogaster -MSSSKIALISVSDKTGLLDLGLKSLVALCFDLVASGGTATSTRGAGLKVDRVSEITGFPPEMLGGRVKTLPVAVHAGILARDTESDLADM 89
S. cerevisiae MANYTKTALISVYDKTGLLDLARGLIEKNVRIISAGGTAIRMDAGFPTEDVSAITTHAFPEMLGGRVKTLPVAVHAGILARDTESDRKLE 90
C. elegans KHNIISFVSVVVCNLYPPEKKTQVSKDCSVEEAVENIDIGGVTLRRAAKNHERVSVLCEADVDYDHIISSELKSG---GTTRERRQLLALKAF 177
H. sapiens RLDELNLRVVAICNLYPPEKKTQVSKDCSVEEAVENIDIGGVTLRRAAKNHRVTVVCEBEDYVYVVSTEMQSSSEKDTSEBTRRQLALKAF 179
R. norvegicus RLDELNLRVVCNLYPPEKKTQVSPDVTVFAAVEIDIGGVTLRRAAKNHRVTVVCEBEDYGAVAEMQSSGSKDTSEBTRRQLALKAF 179
D. melanogaster KQGEELIQVVCNLYPPEKKTQVSKDCSVEEAVENIDIGGVTLRRAAKNHERVTVVCEAVDYDRVLSSELKAS--GNTTETROQLALKAF 177
S. cerevisiae EQHTEKVDYVVCNLYPPEKKTQVSKDCSVEEAVENIDIGGVTLRRAAKNHRVTVVCEBEDYKDYSEFTELSLSN--EISQDLRRLALKAF 178
C. elegans EHTATSYDESIISGEMRRRERAGNGERAIPLRYGTNPHQKDDAELYIVEDEMPKVLNNGSPGYNLIDGLNGWQLVKELSDATKMPAAASFKH 267
H. sapiens THTAQYDEAISDYFRKQY--SRGVSQPLRYGMNPHQKPAQLYT-LQPKLPIITVNLGAPGFINLCDALNAWQLVKELKEATGIPAAASFKH 267
R. norvegicus THTAQYDEAISDYFRKQY--SRGVSQPLRYGMNPHQKPAQLYT-LQPKLPIITVNLGAPGFINLCDALNAWQLVKELKEATGIPAAASFKH 267
D. melanogaster THTATYDAISDYFRKQY--GSGVSQLPLRYGMNPHQKPAQLYT-QLAKLPIITVNLGAPGFINLCDALNGWQLVRLKKAQLPAATSPKH 265
S. cerevisiae EHTATYDAISDIFRQY--SGQAQITLRYGANPHQKPAQAVVSSQDLSLQKVLGSGSPGYNLIDALNSWLVKELKASINLPAASFKH 267
C. elegans VSPAGAAVGLPLNEEAACMVSDTIPIDTKKPSLAAAYARARGADRMSSFGDFVALSENCELTAKIINREVSDGVVAPDFEPAALSLIA 357
H. sapiens VSPAGAAVGLPLSEDEAKVCMVYDLYK--TLTPEAAAYARARGADRMSSFGDFVALSDVCDVPTAKIISREVSDGVIAPGYEBEALITLS 355
R. norvegicus VSPAGAAVGLPLSEDEARVCMVYDLYK--TLTPLAIAYARARGADRMSSFGDFVALSDVCDVPTAKIISREVSDGVIAPGYEBEALKITLS 355
D. melanogaster VSPAGAAVGLPLNPAQAKLCMVDDLYE--QLTPLATAYARARGADRMSSFGDFVALSDVCDVPTAKIISREVSDGVIAPGYEBEALILK 353
S. cerevisiae VSPAGAAVGLPLSDVEKQVYVADIE--E--NLSPLACAAYARARGADRMSSFGDFVALSNVTVPTAKIISREVSDGVIAPGYEBEALILS 354
C. elegans KKKNGNYCVLKNIPNYLPESEERTVFLGLRLQKRNNAVINAETFNNVVGSANBLNKAIDDLIVATIAIKYAQNSVCEAHRGQVIGMG 447
H. sapiens KKKNGNYCVLQMPQSYKEDENEVRTLFLGLRLSQKRNNGVVDSLSFNSVVKNNKDLPEALRDLIVATIAIKYQNSVCAKNGQVIGIG 445
R. norvegicus KKKNGNYCVLQMDQSYKEDENEVRTLFLGLRLSQKRNNGVVDSLSFNSVVKNNKDLPEALRDLIVATIAIKYQNSVCAKNGQVIGIG 445
D. melanogaster KKKNGGYCQLQMDPNYVPSAVERKTHFGLTLEQKRNDVIDASLSFNSVVKRGLPEVAVRDLIVATIAIKYQNSVCAKNGQVIGIG 443
S. cerevisiae KKKSEKYCQLQMDPNYVEAVERRQYVGVVLEQKRNDVINOSTEKEIVSQNNKTECATIDLTIVATIAIKYQNSVCAKNGVIGIG 444
C. elegans AGQQSRIHCTRLAGDKANWNLROHPTVLSLPKRNATKRSKSNNAIDVLCSGVIGSEI-AIDQWQQYFNEPVEPEAEEDDRKQWLSQQTGV 536
H. sapiens AGQQSRIHCTRLAGDKANYWLRHHPOVLSMKPFITGVKRAEESNAIDQVYVTTGTEDE-DLIKWKALFEEVPELLTEABKKENWEKLTGV 534
R. norvegicus AGQQSRIHCTRLAGDKANSWLRHHFVLSMKPFITGVKRAEESNAIDQVYVTTGTEGE-DLVKWKALFEEVPELLTEABKKENWDLKSGV 534
D. melanogaster AGQQSRIHCTRLAGDKADNWLROHPTVLSGKMKFAGVRAEESNAIDNYVNGTGVKDM-PLSQFEGMFKKAPQLTSEORVVEWIKQISNV 532
S. cerevisiae AGQQSRIHCTRLAGDKADNWFROHPTVLEIKWAKGVKRAEESNAIDLVTGCTPEPELSEYQSFEEFKPPTPEERKEWLSKLTNV 534
C. elegans VMSSDAFFFRDNVDKARQFVSYVAHPGGSVRDDITKEACDEHGITLHTGLRFLFH 594
H. sapiens SISSDAFFFRDNVDRAKRSVAYIAAPSGSAADKVVIEACDELGITLAHTNLRFLFH 592
R. norvegicus SVSSDAFFFRDNVDRAKRSVAYIAPSGSTADKVVIEACDELGITLAHTNLRFLFH 592
D. melanogaster ALGSDAFFFRDNVDRAKRSVAYIAPSGSTADKVVIEACDEHGITMAHTNLRFLFH 590
S. cerevisiae SLSSDAFFFRDNVYRAVKSQVYIAAPSGSADKVVVFAADSFDLVYVENPRLFLFH 592

ADSL-1

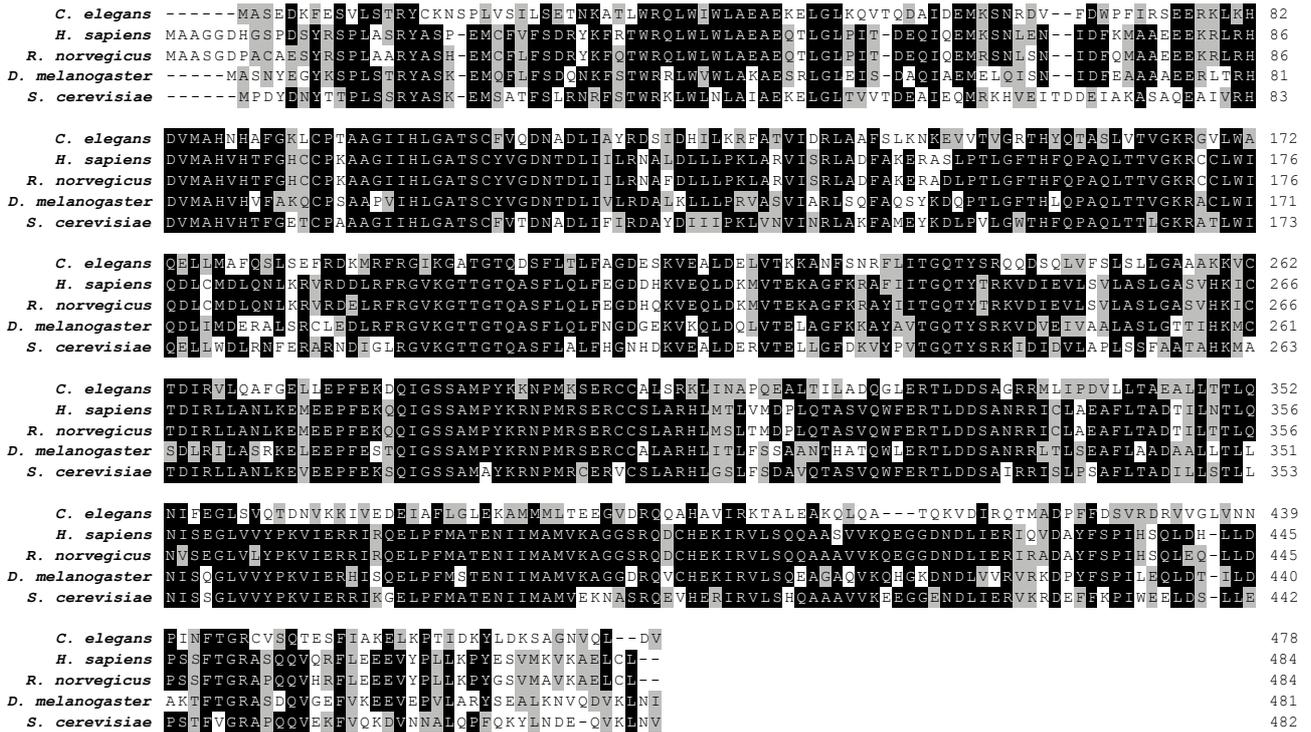


Figure 10 : Alignements de séquences de PPAT-1, ADSL-1 et ATIC-1 de *C. elegans* avec l'orthologue le plus proche chez l'Homme (*H. sapiens*), le rat (*Rattus norvegicus*), la mouche (*Drosophila melanogaster*) et la levure (*S. cerevisiae*). Les cases grises indiquent des résidus similaires, les cases noires indiquent des résidus identiques, les cases blanches indiquent des résidus différents.

A.

	Enzyme	<i>C. elegans</i>	Human	% Similarity	% Identity	Yeast	% Similarity	% Identity
1	GPPAT	PPAT-1	PPAT	63	46	ADE4	51	32
2	GART/AIRS	F38B6.4 (N-ter)	GART	62	44	ADE5,7	58	39
3	GARS	F38B6.4 (C-ter)				ADE8	51	30
4	FGARAT	F10F2.2	PFAS	62	47	ADE6	52	34
5	AIRC	PACS-1 (C-ter)	PAICS	69	51	ADE2	47	32
6	SAICARS	PACS-1 (N-ter)				ADE1	40	20
7	ADSL	ADSL-1	ADSL	64	47	ADE13	61	43
8	ATIC	ATIC-1	ATIC	75	60	ADE16/17	72	57
9	ADSS	ADSS-1	ADSS	69	54	ADE12	70	51
10	AMPD	AMPD-1	AMPD	72	59	AMD1	67	49
11	ADOD	C06G3.5	ADA	58	40	-	-	-
12	ADOK	R07H5.8	ADK	69	51	ADO1	60	43
13	APRT	T19B4.3	APRT	65	46	APT1	61	43
14	PNP	K02D7.1	PNP	64	47	PNP1	56	40
15	HGPRT	HPRT-1	HPRT	62	49	HPT1	44	25
16	IMD	T22D1.3	IMPDH	73	57	IMD1	66	46
17	GMPS	GMPS-1	GMPS	65	51	GUA1	51	36
18	GDA	CPIN-1	GDA	38	22	GUD1	37	21
19	XO	GAD-3	XDH	50	35	-	-	-
19	XO	F15E6.6	XDH	55	38	-	-	-
19	XO	F55B11.1	XDH	61	47	-	-	-

B.

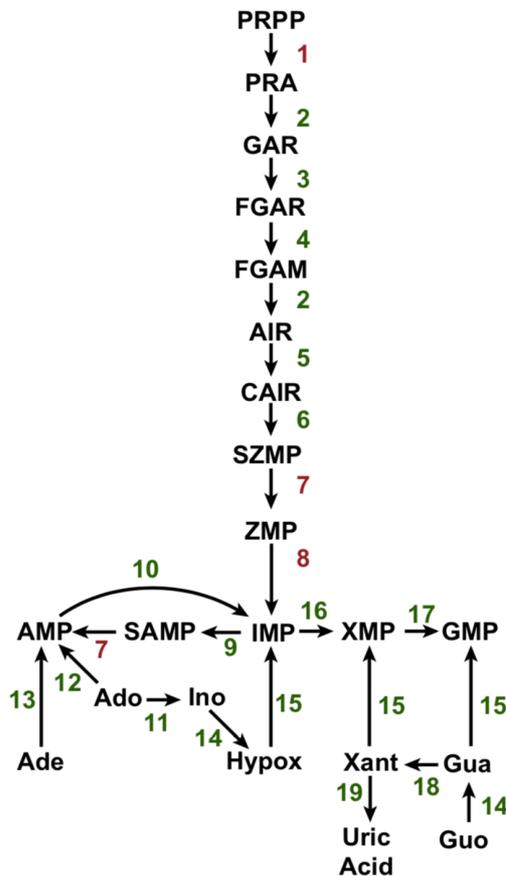


Figure 11 : Conservation de la voie de biosynthèse des purines chez *C. elegans*. A. Table de comparaison des séquences protéiques avec les orthologues de l'Homme et de la levure *S. cerevisiae*. B. Voie schématique de la biosynthèse des purines chez *C. elegans*.

En outre, nous n'avons pas pu trouver d'orthologues pour les gènes de la voie de l'histidine. En effet, chez la levure *S. cerevisiae*, la voie de l'histidine produit du ZMP grâce à *his1*, *his4*, *his6* et *his7*. Ce ZMP peut ainsi contribuer à la voie *de novo* des purines et être métabolisé par *ade16 ade17* - orthologue de *atic-1* - chez la levure (Figure 2B). Ce résultat est consistant avec la perte de la voie de l'histidine chez *C. elegans* rapporté par Payne et Loomis en 2006.

Ceci signifie donc que seule la voie *de novo* des purines permet la production de ZMP chez *C. elegans*. N'ayant qu'un orthologue connu par enzyme et pas de voie de l'histidine, les analyses des relations d'épistasie réalisées chez le nématode seront simplifiées par rapport à d'autres modèles tels que la levure.

Les gènes codant ADSL, ATIC, GPPAT, ADSS, AMPD et HPRT chez *C. elegans* sont appelés respectivement *adsl-1*, *atic-1*, *ppat-1*, *adss-1*, *ampd-1* et *hpert-1* (Figure 2A). Dans la suite de l'étude, nous aurons un intérêt particulier pour les trois premiers.

## 2. Complémentation hétérologue chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Par la suite, une analyse de la conservation fonctionnelle de *ppat-1*, *adsl-1* et *atic-1* a été réalisée par complémentation hétérologue chez la levure *S. cerevisiae*.

Une souche mutante *ade13Δ* ou *ade16Δ ade17Δ* ou *ade4Δ* a été transformée avec un plasmide contenant la séquence homologue sauvage chez *C. elegans* *adsl-1*, *atic-1* ou *ppat-1* respectivement (Figure 2A et B). L'expression de *adsl-1* permet de restaurer la prototrophie de la levure *ade13Δ* alors que l'expression de *atic-1b* permet de restaurer celle de la souche *ade16Δ ade17Δ*.

En revanche, l'expression de *ppat-1* ne semble pas suffisante pour restaurer la prototrophie du mutant *ade4Δ* puisqu'il n'y a pas de croissance de la souche de levure transformée (Figure 12).

Grâce à ces résultats nous avons pu confirmer que *adsl-1* code pour l'enzyme ADSL et que *atic-1* code effectivement pour l'enzyme ATIC. En ce qui concerne *ppat-1*, nous n'avons pas pu mettre en évidence que ce gène code pour l'enzyme GPPAT grâce à cette expérience.

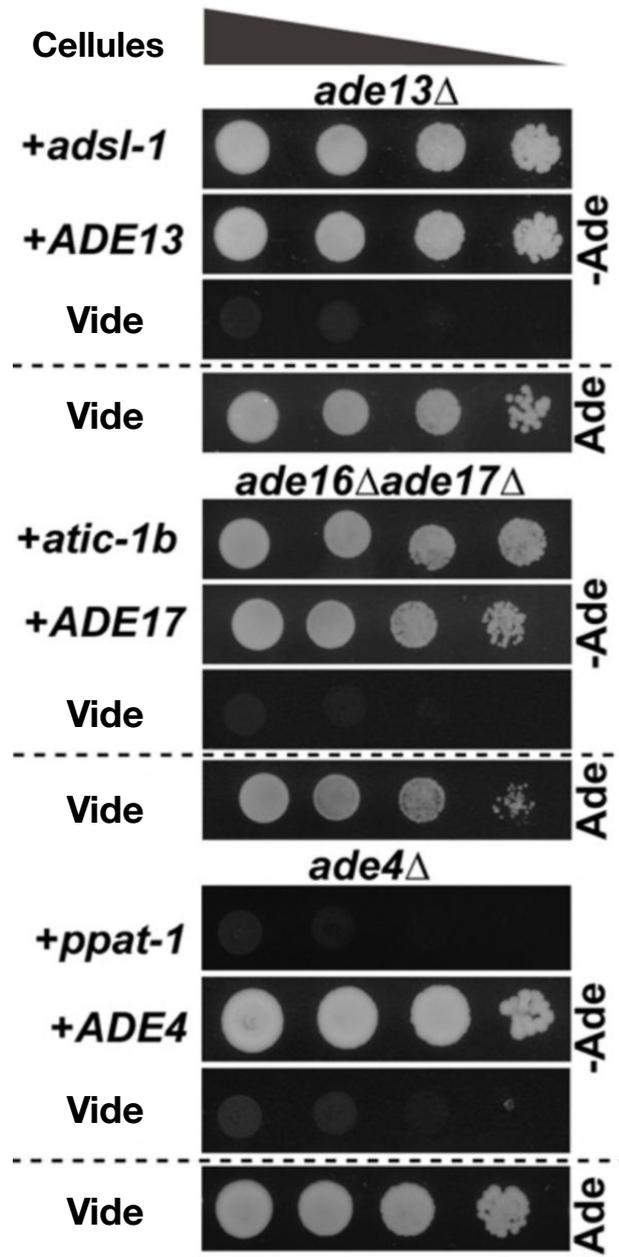


Figure 12 : Complémentation hétérologue chez la levure *S. cerevisiae*. Test en goutte pour évaluer l'auxotrophie à l'Adénine chez les mutants de levure *S. cerevisiae* déficientes pour les enzymes ADSL (*ade13Δ*), ATIC (*ade16Δ ade17Δ*) et GPPAT (*ade4Δ*) exprimants les gènes de *C. elegans* *adsl-1*, *atic-1* et *ppat-1* respectivement. L'expression des gènes de *S. cerevisiae* ADE13, ADE17 et ADE4 a été utilisée comme contrôle positif. Le vecteur d'expression sans insert a été utilisé comme contrôle négatif. Une culture avec de l'Adénine est montrée comme contrôle de l'auxotrophie. Dans tous les tests en goutte présentés, quatre gouttes par condition sont montrées et correspondent à des dilutions cellulaires en série au 1/10ème de suspensions cellulaires. Les concentrations cellulaires sont décroissantes de gauche à droite.

### 3. Analyse des profils métabolomiques des mutants de *C. elegans*

Pour la suite de l'étude, nous avons réalisé une validation *in vivo* de la conservation fonctionnelle des activités de ADSL, ATIC et GPPAT chez *C. elegans*. Pour cela, nous avons utilisé des mutants nuls consistant en des délétions importantes de la partie codante du gène (délétion de 792 paires de base pour *adsl-1*, délétion de 463 paires de base et insertion de 16 paires de base pour *atic-1* et délétion de 457 paires de base pour *ppat-1*). Il s'agit respectivement des mutants *adsl-1*( $\Delta$ ), *atic-1*( $\Delta$ ) et *ppat-1*( $\Delta$ ) (Annexe C).

Ainsi, dans le simple mutant *adsl-1*( $\Delta$ ), il est attendu une accumulation de SZMP et de SAMP, les deux substrats de l'enzyme ADSL. Dans le mutant *atic-1*( $\Delta$ ), une accumulation de ZMP devrait avoir lieu alors que dans le mutant *ppat-1*( $\Delta$ ), il ne devrait pas y avoir d'accumulation d'intermédiaire de la voie *de novo* (Figure 13).

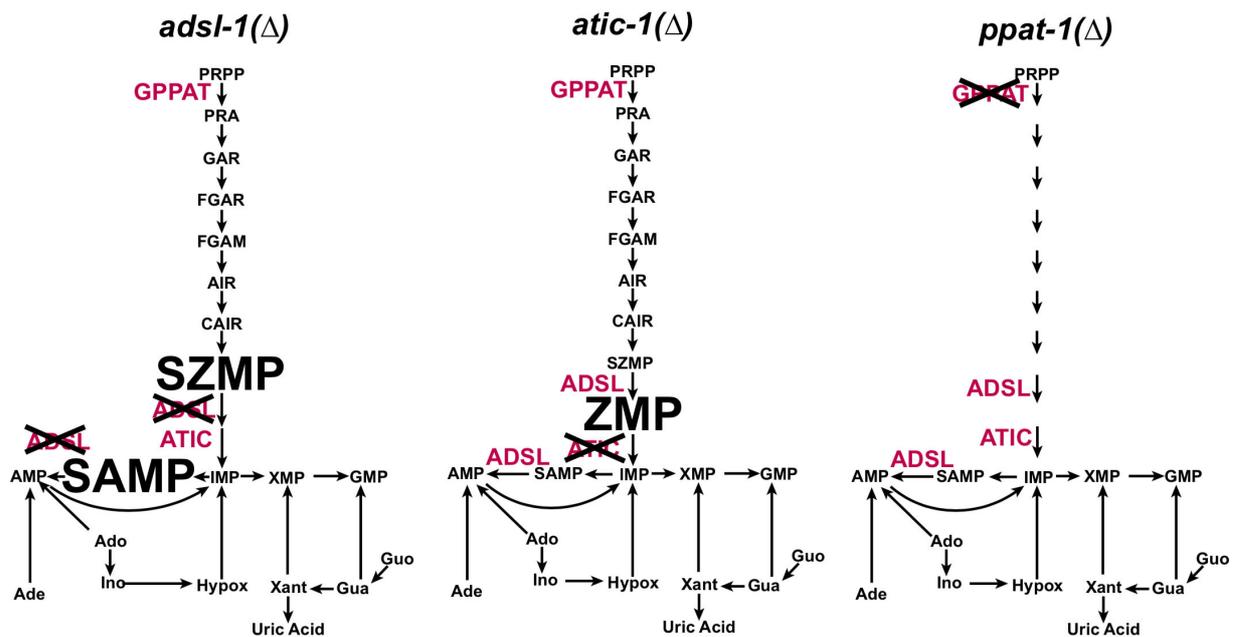
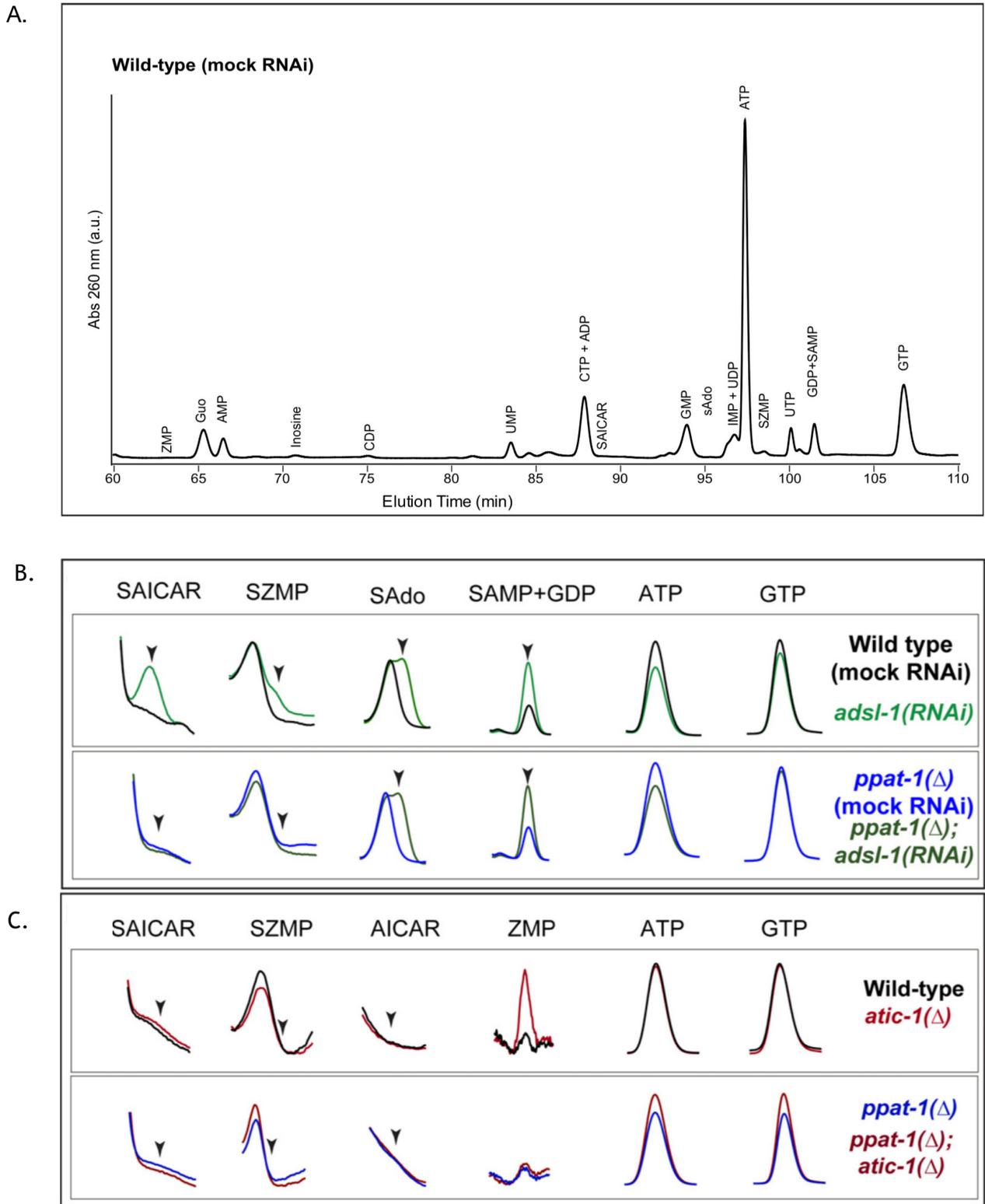


Figure 13 : Schémas des voies de biosynthèse des purines prédites chez les mutants *adsl-1*( $\Delta$ ), *atic-1*( $\Delta$ ) et *ppat-1*( $\Delta$ ). Les grandes polices représentent l'accumulation de métabolites intermédiaires attendus.

Afin de tester ces hypothèses, j'ai réalisé une analyse métabolomique par HPLC permettant d'obtenir des profils métaboliques chez nos différents mutants. Dans notre cas, j'ai normalisé les données par rapport au poids sec des nématodes (*cf.* Matériels et méthodes) afin de faire une analyse semi-quantitative (Figure 14A).



**Figure 14 : Profils métaboliques obtenus par HPLC chez *C. elegans*.** A. Exemple représentatif d'un chromatogramme, absorbance à 260 nm, de vers de type sauvage, avec un plasmide RNAi vide (témoin). B. Zoom sur les pics de chromatographie HPLC de métabolites spécifiques : SAICAR (forme riboside du SZMP), SZMP, sAdo (succinyladénosine, forme riboside du SAMP), SAMP, ATP et GTP, sur *adsl-1(RNAi)* et *ppat-1(Δ)* ; *adsl-1(RNAi)*. C. Zoom sur les pics de chromatogramme HPLC de métabolites spécifiques : SAICAR (forme riboside du SZMP), SZMP, AICAR (forme riboside du ZMP), ZMP, ATP et GTP, dans *atic-1(Δ)* et *ppat-1(Δ)* ; *atic-1(Δ)*. Adé, adénine ; Ado, adénosine ; SAdo, succinyl-adénosine ; Ino, Inosine ; Hypox, hypoxantine ; Xant, Xantine ; Gua, guanine ; Guo, guanosine. En (B) et (C), les échelles sont ajustées différemment selon les métabolites afin de mettre en évidence les différences entre les génotypes.

Pour le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ), compte tenu de sa stérilité à l'état homozygote (phénotype qui sera décrit plus tard), nous devons maintenir la souche à l'état hétérozygote à l'aide d'un chromosome balancer. Il s'agit d'un chromosome modifié permettant de maintenir une population à l'état hétérozygote en supprimant les recombinaisons homologues. Les chromosomes balancer ont aussi des marqueurs dominants permettant de sélectionner les individus ayant ce type de chromosome. Ces chromosomes ont une incidence négative sur la reproduction ou la survie de l'individu lorsqu'il se retrouve à l'état homozygote. En effet, lors de l'autofécondation, un quart des descendants issus d'un hétérozygote portant un balancer seront morts puisqu'à l'état homozygote ce chromosome induit une létalité précoce. Ne pouvant sélectionner manuellement ou automatiquement une quantité suffisante d'individus homozygotes *adsl-1*( $\Delta$ ) afin de réaliser une analyse par HPLC (environ 10 000 vers sont nécessaires pour une extraction métabolique), nous avons testé notre hypothèse d'accumulation de métabolites en traitant la souche N2 - souche sauvage de référence tout au long de l'étude - avec la RNAi d'*adsl-1*. Dans ces conditions, nous avons alors pu voir une accumulation robuste de SAMP et de SZMP mais aussi de leurs formes ribosides respectives : SAdo et SAICAR respectivement, par rapport à la souche sauvage. Ceci signifie donc que la voie *de novo* mais aussi la voie de recyclage sont conservées chez le nématode *C. elegans* et que le gène *adsl-1* est requis pour l'activité de l'enzyme ADSL *in vivo*. Nous pouvons noter également une baisse d'environ 20% de la quantité d'ATP dans la souche *adsl-1*(RNAi) (Figure 14B).

Pour le mutant *atic-1*( $\Delta$ ), nous avons pu montrer une faible mais consistante accumulation de ZMP comparée à la souche N2, comme ce qui était attendu. Le reste du profil métabolomique est identique à celui de la souche sauvage (Figure 14C).

Les accumulations de SZMP et de ZMP chez *adsl-1*(RNAi) et *atic-1*( $\Delta$ ) sont existantes mais restent modestes lorsqu'on les compare à l'accumulation importante de SAMP. Cette donnée suggère que, chez les nématodes adultes en condition standard de culture, la voie de recyclage a un flux plus important que celui de la voie *de novo*.

En ce qui concerne le mutant *ppat-1*( $\Delta$ ), comme attendu, nous n'avons pas pu montrer de différence de profil métabolomique avec la souche de référence. A ce stade, il nous est impossible de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse de la fonction conservée de *ppat-1* puisqu'il n'y a pas d'accumulation de PRPP, substrat de GPPAT.

Les analyses métabolomiques par HPLC de *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*(RNAi) et *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *atic-1*( $\Delta$ ) ont montré une accumulation de SAMP uniquement chez le premier double mutant et pas de SZMP. Pour le second double mutant, les analyses HPLC n'ont pas montré d'accumulation de ZMP ou même d'autres intermédiaires de la voie. Ces données montrent donc que *ppat-1* est requis pour la voie *de novo* de biosynthèse des purines chez le nématode *C. elegans* et est en amont de *adsl-1* et *atic-1*. *ppat-1* serait donc requis pour l'activité de GPPAT (Figure 14B et C).

Dans la suite de l'étude, je réaliserais des analyses des relations d'épistasie. C'est pourquoi, j'ai construit deux doubles mutants : *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*( $\Delta$ ) et *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *atic-1*( $\Delta$ ). GPPAT étant en amont de ATIC et ADSL dans la voie *de novo*, nous nous attendons à ce que les accumulations de SZMP et ZMP soient bloquées respectivement si la fonction de *ppat-1* est conservée. Les analyses des profils métabolomiques (Figure 14B et C) confirment ces hypothèses d'accumulation et de non accumulation.

En conclusion, grâce à l'ensemble de ces analyses métabolomiques par HPLC, J'ai pu montrer la conservation fonctionnelle de ADSL et ATIC et que *ppat-1* est requis pour la voie *de novo* et semble nécessaire pour la fonction de GPPAT (première enzyme de la voie *de novo*) chez *C. elegans*.

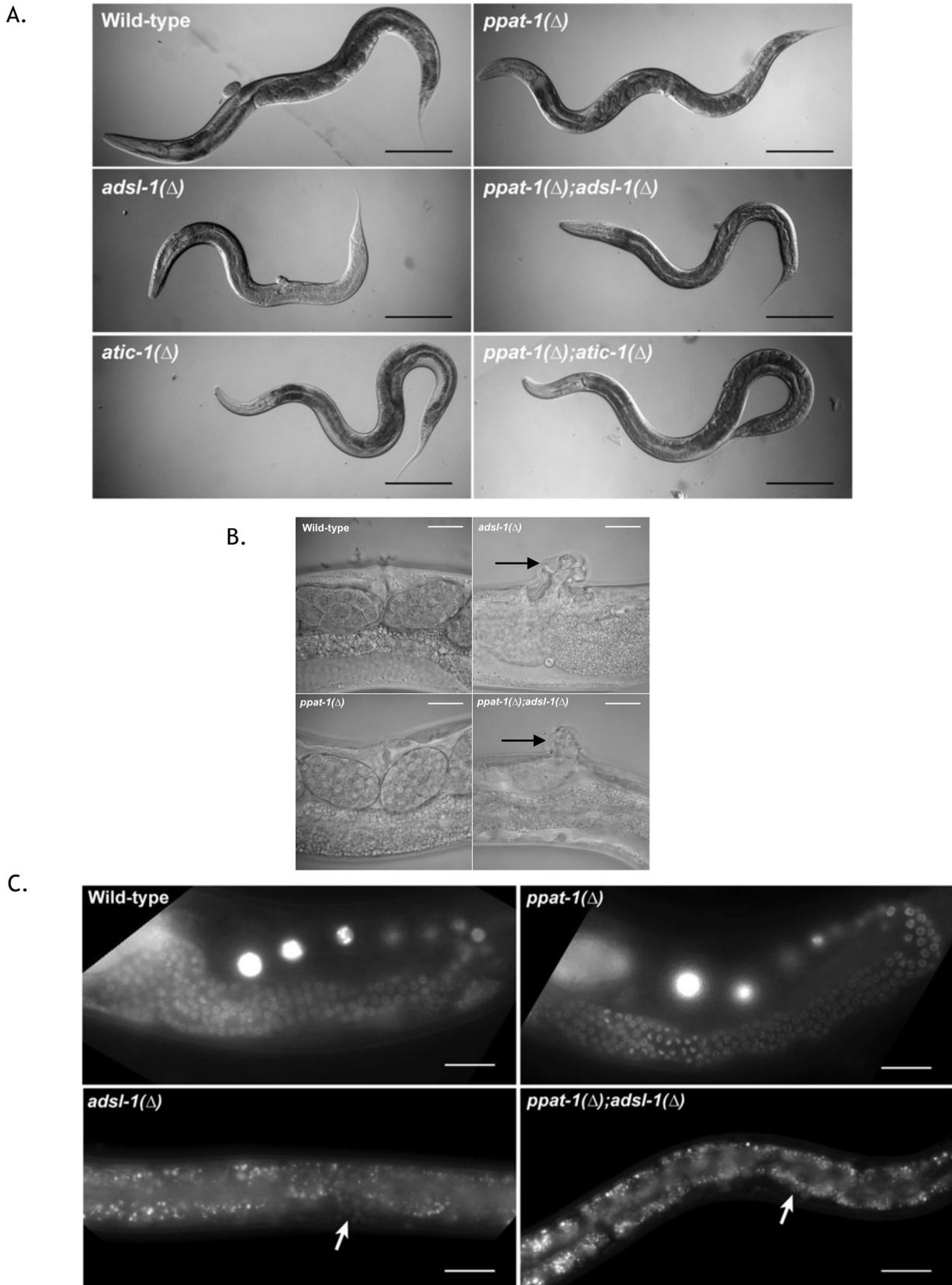
En outre, la validation des deux doubles mutants *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*( $\Delta$ ) et *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *atic-1*( $\Delta$ ) va permettre une analyse des relations épistatiques. En effet, il a été montré que le SAMP et le SZMP (les deux substrats d'ADSL) sont des métabolites pouvant avoir des rôles régulateurs chez plusieurs organismes modèles et semblant être impliqués dans l'éthiologie des patients déficients en ADSL (Rébora *et al.* 2001 ; Pinson *et al.* 2009 ; Keller *et al.* 2012 ; Gooding *et al.* 2015) (*cf.* I. A. 3. et I. B.). Ainsi, la perte de fonction de *ppat-1* nous permettra de distinguer les effets de l'accumulation de SZMP de la perte de la voie *de novo*. De plus, afin de distinguer les effets d'ADSL strictement dans la voie *de novo* (conversion de SZMP en ZMP) de ceux dans la voie de recyclage (conversion du SAMP en AMP), j'utiliserais les nématodes déficients en ATIC. Cette enzyme intervient seulement dans la voie *de novo* et sa déficience entraîne une accumulation de ZMP (Figure 13). Cet intermédiaire partage des cibles communes avec le SZMP chez la levure (Rébora *et al.* 2001 ; Pinson *et al.* 2009). Ici aussi, les analyses des relations d'épistasie permettront de distinguer les effets dus à l'accumulation du ZMP grâce au double mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *atic-1*( $\Delta$ ).

Dans cette étude, j'aurais un intérêt particulier pour le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) et j'essayerais de déterminer les mécanismes sous-jacents aux phénotypes qui lui sont associés à l'aide, notamment, des autres mutants précédemment cités.

## **B. Lignée germinale et stérilité**

Le premier phénotype auquel je me suis intéressée est la stérilité du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ). La stérilité est un phénotype fort qui peut avoir différentes causes et se présenter sous différentes formes.

Il peut s'agir d'une absence de spermatozoïdes. Dans ce cas, lors du développement post-embryonnaire, il n'y a pas de production de spermatozoïdes mais uniquement d'ovocytes. Ainsi, si l'on croise ces vers avec des individus mâles, il devrait y avoir une descendance.



**Figure 15 : Lignée germinale au stade adulte chez *adsl-1(Δ)*.** A. Images DIC de l'ensemble du corps représentant des jeunes adultes représentatifs pour chacun des génotypes étudiés (barre = 200  $\mu$ m). B. Images DIC représentatives de la région de la vulve chez de jeunes adultes (barre = 20  $\mu$ m). Les flèches pointent les vulves protubérantes. C. Images en fluorescence de vers exprimant *H2B::GFP* dans la lignée germinale sous le contrôle du promoteur *pie-1*. Les flèches indiquent les rares noyaux exprimant *H2B::GFP* ; le motif irrégulier tout le long de *adsl-1(Δ)* et de *ppat-1(Δ)* ; *adsl-1(Δ)* correspond à une auto-fluorescence intestinale (barre = 25  $\mu$ m).

Il peut également s'agir d'une absence de lignée germinale femelle, partielle ou totale, pouvant avoir plusieurs origines possibles. Cela peut être dû à un défaut de prolifération des cellules de la lignée germinale, un excès d'apoptose de ces cellules ou même un déséquilibre entre prolifération/différenciation.

### 1. Le maintien de la lignée germinale au stade adulte chez *adsl-1*( $\Delta$ )

J'ai souhaité déterminer le type de stérilité du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ). Des premières images réalisées au microscope Nomarski en contraste de phase nous ont montrées que certains individus ont une vulve protubérante. Ce phénotype peut limiter ou empêcher la ponte d'embryons fécondés mais dans notre cas, ces individus restent rares. La majorité des nématodes a une vulve non protubérante. Nous voyons également qu'au stade adulte il n'y a pas d'ovocytes ni de spermatozoïdes. Les premières images laissent également penser qu'il n'y a pas ou très peu de lignée germinale femelle avec seulement quelques noyaux à proximité de la vulve. La même observation a été faite concernant le double mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*( $\Delta$ ) alors que le simple mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) est similaire à la souche sauvage (deux lignées germinales en forme de U présentant un grand nombre de noyaux, des ovocytes et des embryons ainsi qu'une vulve normale) (Figure 15A et B).

Afin de caractériser plus en détails les cellules souches de la lignée germinale (GSCs), j'ai utilisé un rapporteur transgénique spécifique de la lignée germinale exprimant une fusion *H2B::GFP* dans toute la lignée germinale, sous le contrôle du promoteur *pie-1* (Praitis *et al.* 2001).

Les images montrent que le mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) est similaire à la souche sauvage avec environ 700 noyaux *H2B::GFP* positifs, des ovocytes, des embryons et une vulve normale. En revanche, chez le simple mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) et le double mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*( $\Delta$ ) la stérilité est complète puisque seule, au maximum, une dizaine de noyaux sont visibles. De façon plus détaillée, 52% des individus *adsl-1*( $\Delta$ ) ou *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*( $\Delta$ ) n'ont pas de noyau *H2B::GFP* détectables, 44% ont moins de dix noyaux détectables et seuls 4% des individus ont plus de dix noyaux positifs *H2B::GFP* (Figure 15C).

En conclusion, *adsl-1*, indépendamment de *ppat-1*, est nécessaire pour la prolifération et/ou le maintien/la spécification des GSCs au stade adulte. En outre, *adsl-1* est épistastique sur *ppat-1* donc l'accumulation de SZMP ne semble pas responsable de ce phénotype de stérilité.

### 2. Sauvetage métabolique du phénotype de stérilité du mutant *adsl-1*( $\Delta$ )

Chi *et al.* en 2016 ont montré qu'une déficience en Cytidine Désaminase (CDD - enzyme catalysant la désamination hydrolytique irréversible de la Cytidine en Uridine) dans la voie de recyclage des pyrimidines était également à l'origine d'une stérilité complète. En effet, les

nématodes mutants vont montrer un arrêt de la prolifération mitotique et donc un arrêt de la croissance de la gonade au stade L2. Dans cet article, ce phénotype a pu être sauvé simplement en ajoutant dans le milieu de culture des nématodes des pyrimidines sous forme de nucléosides. Une supplémentation en Uridine, produit de la CDD, ou en Thymidine, dérivé de l'Uridine, permet un sauvetage total du phénotype de stérilité du double mutant *cdd-1/2* de *C. elegans*.

J'ai donc voulu essayer de faire une supplémentation en purines afin de sauver la stérilité du mutant *adsl-1(Δ)* comme cela a pu être fait pour les pyrimidines.

Ainsi, j'ai réalisé une supplémentation avec différentes purines, à différentes concentrations, dans le milieu de culture des nématodes depuis l'éclosion jusqu'au stade adulte. Dans chacune des conditions, la souche sauvage et le mutant *ppat-1(Δ)* sont fertiles et semblent identiques l'un à l'autre. De plus, la supplémentation ne semble pas avoir d'effet sur la souche sauvage et sur le mutant *ppat-1(Δ)* puisqu'ils sont phénotypiquement identiques à ce qui peut être observé en condition standard de culture.

De façon attendue, la supplémentation en Inosine (10mM, 20mM ou 100mM) n'a pas d'effet sur la stérilité des mutants *adsl-1(Δ)* et *ppat-1(Δ)* ; *adsl-1(Δ)*. En effet, l'Inosine est en amont de l'enzyme ADSL dans la voie de recyclage (Figure 2A). Il en est de même pour la supplémentation avec 0,1mM, 1mM et 20mM d'Hypoxanthine (métabolite également en amont de ADSL dans la voie de recyclage).

Afin de faire une supplémentation en aval de l'enzyme ADSL dans la voie de recyclage, j'ai testé une supplémentation en Adénine (10mM et 20mM) et en Adénosine (10mM et 20mM) (Figure 2A). Cependant, l'ajout de ces deux métabolites séparément n'a pas d'effet sur la stérilité des mutants *adsl-1(Δ)* et *ppat-1(Δ)* ; *adsl-1(Δ)*.

J'ai également testé une supplémentation avec deux pyrimidines (Uracile 20mM et Uridine 100mM) puisqu'il était possible de sauver la stérilité des mutants *cdd-1/2* avec 100 mM d'Uridine (Chi *et al.* 2016). Je n'ai pas obtenu de sauvetage de la stérilité chez *adsl-1(Δ)* et *ppat-1(Δ)* ; *adsl-1(Δ)* (Tableau 2).

Enfin, j'ai voulu me placer dans un contexte similaire à celui des patients déficients en ADSL pour lesquels une activité résiduelle d'ADSL est détectée. J'ai testé si une supplémentation en Adénosine ou en AICAR (forme riboside du ZMP) dans le cas d'une perte de fonction partielle d'*adsl-1* pouvait sauver la stérilité chez le nématode. Pour cela, j'ai ajouté 20mM d'Adénosine ou 0,1mM d'AICAR dans le milieu de culture de nématode *adsl-1(RNAi)*. Dans le cas de la supplémentation en Adénosine, j'ai observé une stérilité de près de 31% alors qu'en absence de ce métabolite elle n'était que de 17%. Une RNAi contrôle avec et sans Adénosine dans le milieu n'induit pas de stérilité chez *C. elegans*. Ceci laisse penser que l'Adénosine peut être convertie en AMP qui sera lui-même rétro-converti en IMP puis métabolisé en SAMP (Figure 2A) et que l'accumulation de l'un de ces intermédiaires pourrait entraîner une augmentation de la stérilité chez *C. elegans*. En outre, la supplémentation en AICAR semble induire une stérilité chez la souche sauvage et chez la souche *adsl-1(RNAi)* dans des proportions similaires. Ceci suggère

que l'accumulation de ZMP (forme phosphorylée de l'AICAR) pourrait affecter la lignée germinale (Tableau 2).

En résumé, je n'ai pas pu mettre en évidence d'effet positif d'une supplémentation en nucléotides ou nucléosides puriques sur la stérilité liée au défaut de GSCs chez le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ).

Stérilité (%)	N2	<i>ppat-1</i> ( $\Delta$ )	<i>adsl-1</i> ( $\Delta$ )	<i>ppat-1</i> ( $\Delta$ ) <i>adsl-1</i> ( $\Delta$ )	N2 <i>RNAi</i> <i>vide</i>	N2 <i>adsl-1</i> ( <i>RNAi</i> )
Ade 10 mM	0	0	100	100	/	/
Ade 20 mM	0	0	100	100	/	/
Hypox 0,1 mM	0	0	100	100	/	/
Hypox 1 mM	0	0	100	100	/	/
Hypox 20 mM	0	0	100	100	/	/
Ino 10 mM	0	0	100	100	/	/
Ino 20 mM	0	0	100	100	/	/
Ino 100 mM	0	0	100	100	/	/
Uri 100 mM	0	0	100	100	/	/
Ura 20 mM	0	0	100	100	/	/
Ado 10 mM	0	0	100	100	/	/
Ado 20 mM	0	0	100	100	0	3,8
AICAR 0,1 mM	/	/	/	/	6,1	9,6
$\phi$	0	0	100	100	0	17

Tableau 2 : Sauvetage par supplémentation en nucléosides/nucléotides de la stérilité du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ). En jaune, les supplémentations réalisées sur les souches mutantes. En bleu, les supplémentations réalisées sur des nématodes traités par RNAi (Ade = Adénine, Hypox = Hypoxanthine, Ino = Inosine, Uri = Uridine, Ura = Uracile, Ado = Adénosine).

### 3. Analyse de la fertilité du mutant *atic-1*( $\Delta$ )

Dans la littérature, il a été montré que le nombre de descendants produits par autofécondation est dépendant de la source alimentaire mais aussi du statut métabolique (Houthoofd *et al.* 2002). Par exemple, une supplémentation en Vitamine B12 en nourrissant les nématodes avec *Comamonas aquatica* plutôt qu'avec *E. coli* OP50 accélère le développement et réduit également la fertilité *via* le cycle de la méthionine (Watson *et al.* 2014). J'ai donc voulu

savoir si une perturbation de la voie *de novo* des purines pouvait également avoir un impact sur la fertilité.

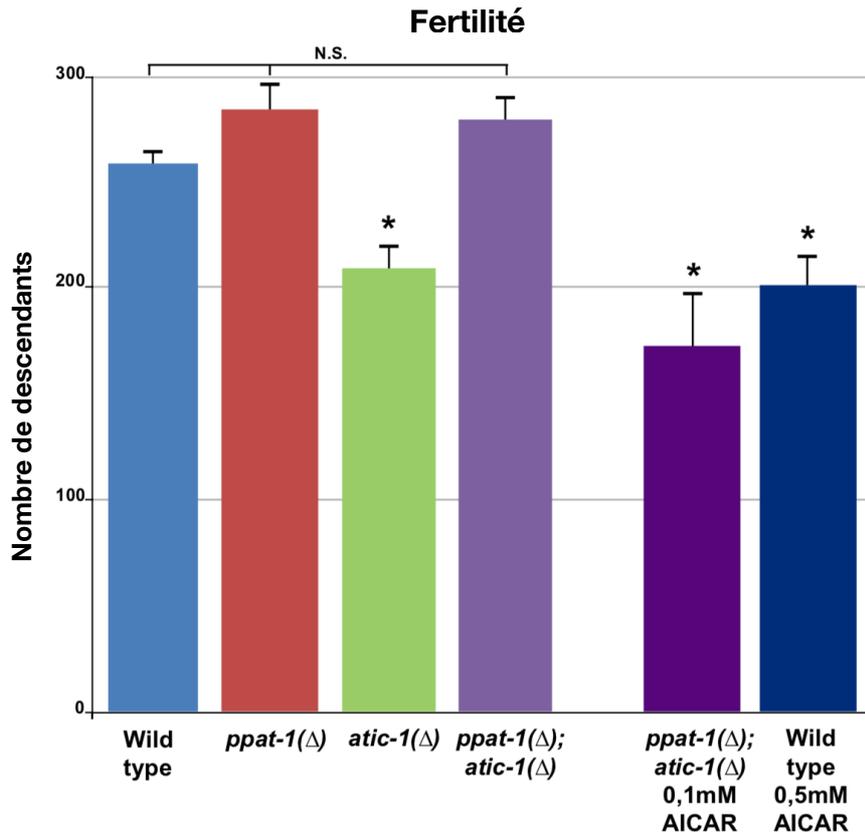
Comme mentionné précédemment, le mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) a une lignée germinale similaire à celle de la souche sauvage. Une observation au microscope Nomarski des mutants *atic-1*( $\Delta$ ) et *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *atic-1*( $\Delta$ ) ne semble pas indiquer de défaut visible de la lignée germinale (Figure 15).

Cependant, afin de tester un possible effet du métabolisme des purines sur la lignée germinale, j'ai compté le nombre total d'embryons pondus par individu tout au long de leur vie reproductive. Pour la souche sauvage et pour le simple mutant *ppat-1*( $\Delta$ ), j'ai observé environ 270 embryons pondus, ce qui correspond à ce qui peut être trouvé dans la littérature pour la souche de référence en condition standard de culture. En ce qui concerne le simple mutant *atic-1*( $\Delta$ ), seuls 210 embryons sont pondus en moyenne, ce qui est significativement différent de ce qui est observé pour la souche sauvage. L'analyse des relations d'épistasie, grâce au double mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *atic-1*( $\Delta$ ), met en évidence un effet possible de l'accumulation du ZMP (puisque celui-ci a une fertilité de type sauvage) plutôt qu'un effet dû à un défaut dans la voie *de novo* des purines. *ppat-1* est donc épistatique sur *atic-1* en ce qui concerne le défaut de fertilité du mutant *atic-1*( $\Delta$ ) (Figure 16A).

Pour vérifier cette hypothèse de l'effet de l'accumulation du ZMP sur la fertilité, j'ai supplémenté le milieu de culture des nématodes avec de l'AICAR. Pour la souche sauvage, j'ai utilisé 0,5mM d'AICAR et pour le double mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *atic-1*( $\Delta$ ) seulement 0,1mM d'AICAR. J'ai pensé que le double mutant est capable d'accumuler facilement du ZMP puisqu'il est KO pour l'enzyme métabolisant cet intermédiaire et nécessitait donc un ajout moins important d'AICAR dans le milieu que la souche sauvage (Figure 13). De plus, j'ai supplémenté le milieu avec la forme riboside du ZMP car les cellules sont généralement incapables de transporter dans le milieu intracellulaire les nucléotides phosphorylés. Une fois la forme riboside dans le milieu intracellulaire, elle est phosphorylée par la ADK en ZMP. J'ai vérifié l'internalisation et l'état de phosphorylation de l'AICAR/ZMP en réalisant une analyse métabolomique par HPLC. Dans les deux conditions avec ajout d'AICAR dans le milieu, j'ai pu voir une accumulation d'AICAR mais aussi de ZMP (Figure 16B). L'AICAR est donc internalisé et phosphorylé en ZMP chez le nématode *C. elegans*. Dans ces conditions d'ajout d'AICAR dans le milieu de culture, la souche sauvage et le double mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *atic-1*( $\Delta$ ) montrent une baisse significative de leur fertilité au niveau de celle du simple mutant *atic-1*( $\Delta$ ) sans AICAR (Figure 16A).

En conclusion, j'ai pu montrer qu'une coupure de la voie *de novo* des purines n'entraîne pas de défaut de fertilité. En revanche, une accumulation de ZMP (substrat d'ATIC) est à l'origine de la baisse de fertilité observée chez le mutant *atic-1*( $\Delta$ ).

A.



B.

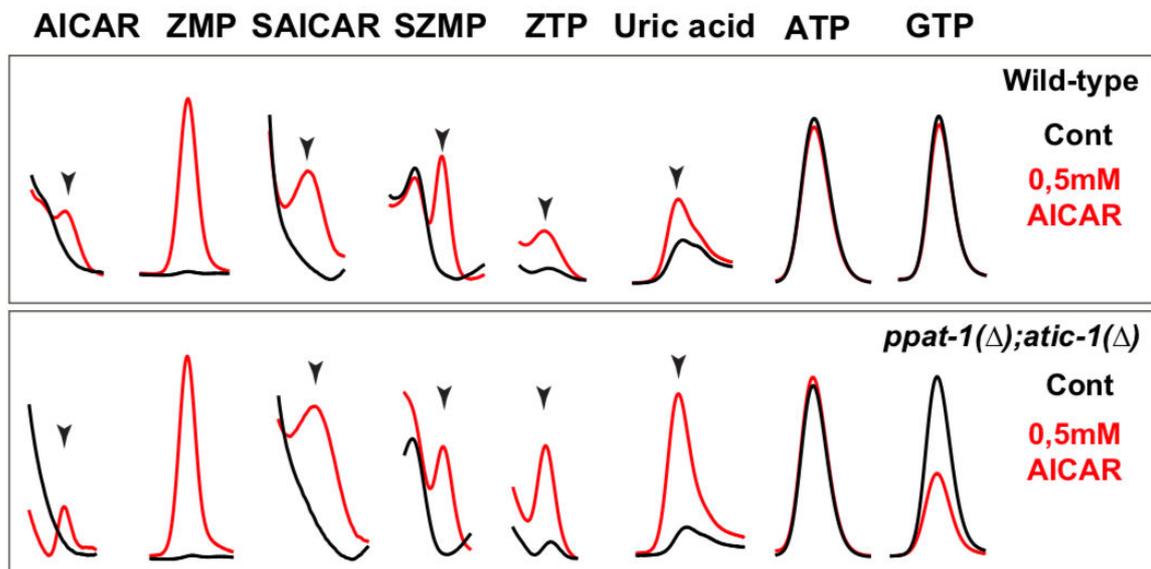
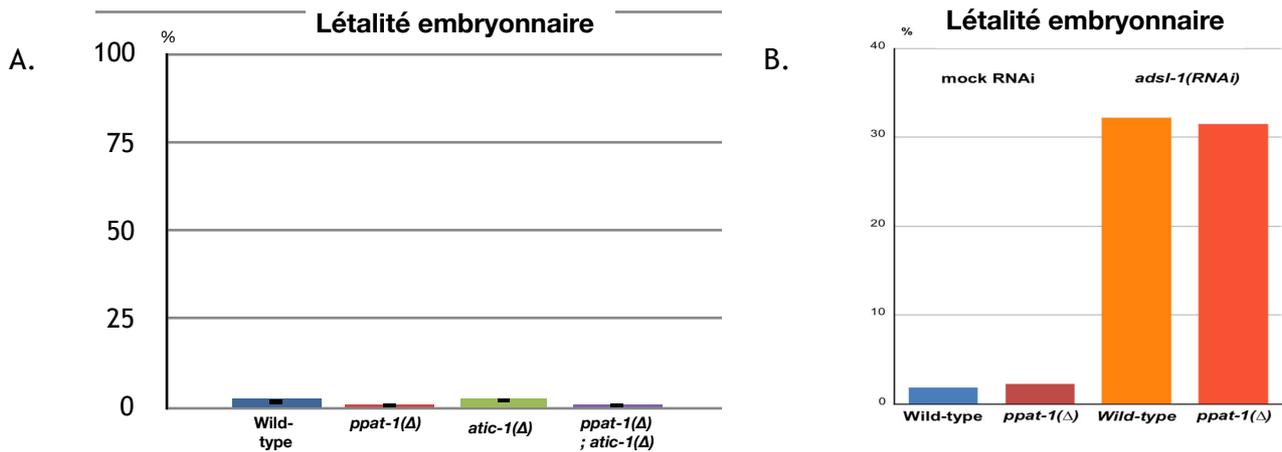


Figure 16 : La fertilité du mutant *atic-1(Δ)* et l'accumulation de ZMP. A. Graphique illustrant le nombre moyen d'embryons pondus par les mutants de la voie *de novo* et par le double mutant *ppat-1(Δ)* ; *atic-1(Δ)* et la souche sauvage traitées respectivement avec 0,1 mM et 0,5 mM d'AICAR (barre d'erreur = erreur standard de la moyenne ; n = 30 mères dans tous les échantillons ; \* = différence statistiquement significative par rapport au sauvage ; Test de Student). B. Zoom sur les pics de chromatogrammes obtenus par HPLC de métabolites spécifiques AICAR, ZMP, SAICAR, SZMP, ZTP, acide urique, ATP et GTP après un traitement à 0,5 mM d'AICAR.

#### 4. Létalité embryonnaire

Un autre aspect de la fertilité est la létalité embryonnaire. En effet, un individu peut être capable de produire des embryons mais ceux-ci peuvent ne pas être viables. Compte tenu de l'importance de la voie de biosynthèse des purines, nous pouvons penser que tout ou partie de la descendance de mutants de cette voie ne sera pas viable.



**Figure 17 : La létalité embryonnaire.** A. Graphique illustrant le pourcentage de létalité embryonnaire (embryons non éclos) chez les mutants de la voie *de novo*. B. Graphique illustrant le pourcentage de létalité embryonnaire dans le cas d'une RNAi de *adsI-1* et d'une RNAi vide (contrôle) chez la souche sauvage et chez le mutant *ppat-1(Δ)*.

J'ai compté le nombre d'embryons morts (non éclos) 48H après la ponte pour la souche sauvage et les mutants *ppat-1(Δ)*, *atic-1(Δ)* et *ppat-1(Δ); atic-1(Δ)*. J'ai trouvé une létalité inférieure à 0,5% pour chacune des souches comme attendu (Figure 17A).

En ce qui concerne les mutants *adsI-1(Δ)* et *ppat-1(Δ); adsI-1(Δ)*, je n'ai pas pu réaliser ce test directement puisque ces deux mutants sont stériles. Ainsi, dans un premier temps j'ai analysé la progéniture des hétérozygotes *adsI-1(Δ)/+*. J'ai observé seulement 7,7% de létalité embryonnaire alors que si l'expression zygotique d'*adsI-1* était strictement essentielle, nous devrions avoir une létalité de 25% selon les proportions Mendéliennes. Ceci suggère que, soit *adsI-1* n'est pas indispensable au développement de l'embryon, soit que la contribution maternelle est en partie suffisante au développement embryonnaire. Afin de se départir de la contribution maternelle, j'ai réalisé une ARN interférence d'*adsI-1* pour réduire les ARN messagers de la mère. Pour ne pas induire de stérilité, j'ai réalisé la RNAi à partir du stade L4. Ceci entraîne donc une perte de fonction partielle. J'ai alors pu observer une létalité de 32% chez *adsI-1(RNAi)* et *ppat-1(Δ); adsI-1(RNAi)*. Ces données suggèrent donc que *adsI-1* est nécessaire au développement embryonnaire mais aussi que la voie *de novo* ne contribue pas ou peu à ce

développement (ce qui correspond au résultat vu précédemment concernant la létalité des mutants *ppat-1(Δ)*, *atic-1(Δ)* et *ppat-1(Δ) ; atic-1(Δ)* (Figure 17B).

En conclusion, *adsl-1*, indépendamment de *ppat-1*, semble nécessaire au développement embryonnaire chez *C. elegans*. J'ai également montré l'existence d'une contribution maternelle de *adsl-1* permettant le développement embryonnaire des mutants *adsl-1(Δ)*.

## C. Le développement post-embryonnaire

Lorsqu'on observe les images au Nomarski de nos différentes souches de nématodes, nous pouvons aisément voir que les mutants *adsl-1(Δ)* et *ppat-1(Δ) ; adsl-1(Δ)* semblent plus petits que la souche N2 de référence alors que les autres mutants semblent avoir une taille similaire à la souche contrôle (Figure 15A). J'ai donc voulu quantifier ce phénotype de taille chez l'adulte dans un premier temps puis au cours du développement post-embryonnaire.

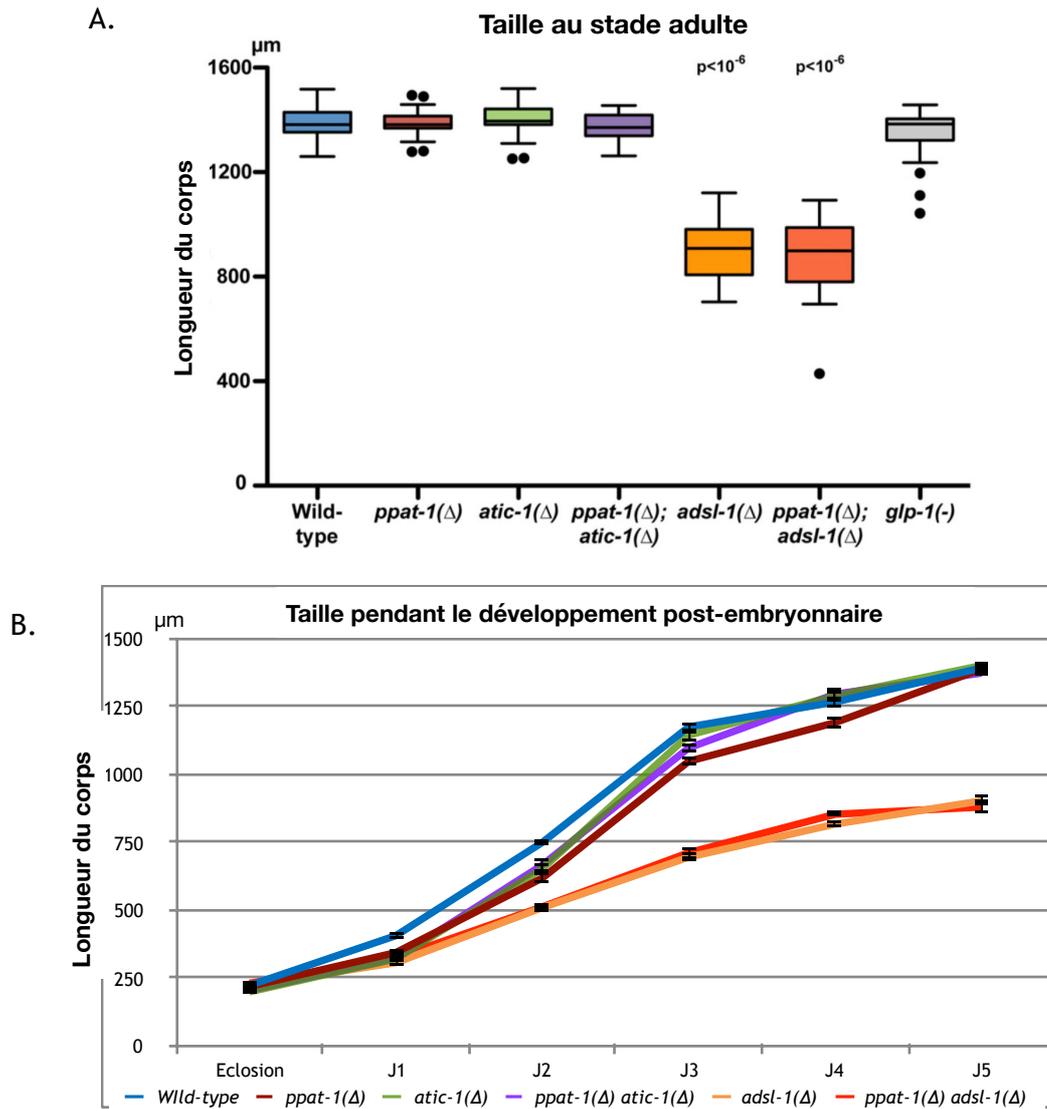
### 1. Développement post-embryonnaire de la taille

Afin d'analyser la taille des nématodes, j'ai utilisé des populations synchronisées puis réalisé trois mesures individuelles de la longueur du corps pour chaque nématode analysé.

#### 1. Mesure de taille au stade adulte

Grâce à cette analyse, j'ai montré qu'une perturbation de la voie *de novo* (*ppat-1(Δ)* et *ppat-1(Δ) ; atic-1(Δ)*) et une accumulation de ZMP (*atic-1(Δ)*) n'affecte pas la longueur du corps des nématodes au stade adulte puisque les mutants *ppat-1(Δ)*, *atic-1(Δ)* et *ppat-1(Δ) ; atic-1(Δ)* ont une taille similaire à celle du sauvage. En revanche, j'ai confirmé que les mutants *adsl-1(Δ)* et *ppat-1(Δ) ; adsl-1(Δ)* sont significativement plus petits que la souche de référence avec une réduction d'environ 30% de la longueur du corps.

Chez les mutants *adsl-1(Δ)* et *ppat-1(Δ) ; adsl-1(Δ)*, au Nomarski, nous ne voyons pas de défauts des tissus somatiques comme le pharynx, l'intestin ou l'hypoderme sauf au niveau de la vulve. Les individus sont également viables et mobiles. Ceci suggère que le lignage spécifique des cellules et la morphogenèse ne sont pas affectés chez ces deux mutants. Cependant, ces deux souches n'ont pas ou très peu de lignée germinale comme nous l'avons vu plus haut. Or, ce tissu prend un énorme volume chez l'adulte. Ainsi, je me suis demandé si cette absence de lignée germinale chez *adsl-1(Δ)* et *ppat-1(Δ) ; adsl-1(Δ)* pouvait être à l'origine de la taille réduite de ces mutants.



**Figure 18 : Le développement post-embryonnaire de la longueur de *C. elegans*.** A. Boite à moustache décrivant la longueur du corps de tous les mutants de la voie de biosynthèse des purines et de *glp-1(-)* (moyennes statistiquement différentes - ANOVA unidirectionnelle - les valeurs de p indiquées correspondent à la comparaison avec la souche sauvage avec le Test t - Bonferroni multiple - sinon la comparaison avec le sauvage ne montre aucune différence significative - n = 30 nématodes). B. Graphique illustrant le développement de la taille depuis l'éclosion jusqu'au stade adulte des mutants de la voie de biosynthèse des purines.

Afin de tester cette hypothèse, j'ai mesuré la taille d'une souche *glp-1(e2141)* qui est connue pour ne pas avoir de lignée germinale au stade adulte lorsqu'elle est cultivée à 25°C (Priess *et al.* 1987). Au stade adulte, cette souche a une taille similaire à celle de la souche de référence (Figure 18A).

En conclusion, j'ai montré qu'une déficience de la voie *de novo* ou une accumulation de ZMP ou de SZMP n'affecte pas la taille adulte des nématodes. Une absence de lignée germinale n'affecte pas non plus la taille au stade adulte. En revanche, *adsl-1* est nécessaire afin d'avoir une longueur de corps similaire à celle de la souche sauvage indépendamment de *ppat-1*.

## 2. Mesure de taille au cours du développement post-embryonnaire

Par la suite, je me suis demandée si le défaut de taille observé chez les mutants *adsl-1*( $\Delta$ ) et *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*( $\Delta$ ) se manifeste dès le développement post-embryonnaire et s'il apparaît à un stade particulier. J'ai donc mesuré la taille des nématodes à l'éclosion puis toutes les 24H pendant 5 jours, de la même façon que pour les mesures au stade adulte.

Ainsi, nous pouvons voir qu'à l'éclosion tous les mutants que nous étudions ont une taille similaire à celle de la souche sauvage. Puis, dès 48H après éclosion les mutants *adsl-1*( $\Delta$ ) et *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*( $\Delta$ ) ont une taille significativement réduite par rapport à la souche sauvage et ce défaut de taille augmente au cours du développement post-embryonnaire puisque la différence de taille augmente. En ce qui concerne les mutants de la voie *de novo*, *ppat-1*( $\Delta$ ), *atic-1*( $\Delta$ ) et *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *atic-1*( $\Delta$ ), ils n'ont pas de défaut de la taille au cours du développement post-embryonnaire (Figure 18B).

En conclusion, j'ai montré que le défaut de taille lié à la déficience en ADSL se manifeste post-embryonnairement. En revanche, à l'éclosion il n'y a pas de défaut de la longueur du corps. Ceci suggère une possible contribution maternelle au stade embryonnaire.

## 2. Durée du développement post-embryonnaire

La petite taille des mutants *adsl-1*( $\Delta$ ) et *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*( $\Delta$ ) au stade adulte, alors qu'à l'éclosion elle est similaire à celle du sauvage, nous a fait nous demander si le développement post-embryonnaire pouvait être affecté lorsqu'il y a une perturbation de la voie de biosynthèse des purines.

Le développement post-embryonnaire de *C. elegans* est composé de quatre stades larvaires distincts. Entre chaque stade larvaire, le ver passe par une phase de léthargie pendant laquelle il cesse toute activité, y compris de se nourrir. C'est pendant cette phase que le nématode réalise une mue afin de changer de cuticule (Cassada et Russell, 1975). De plus, cette séquence d'évènements est hautement reproductible en condition standard de culture (Byerly et al. 1976).

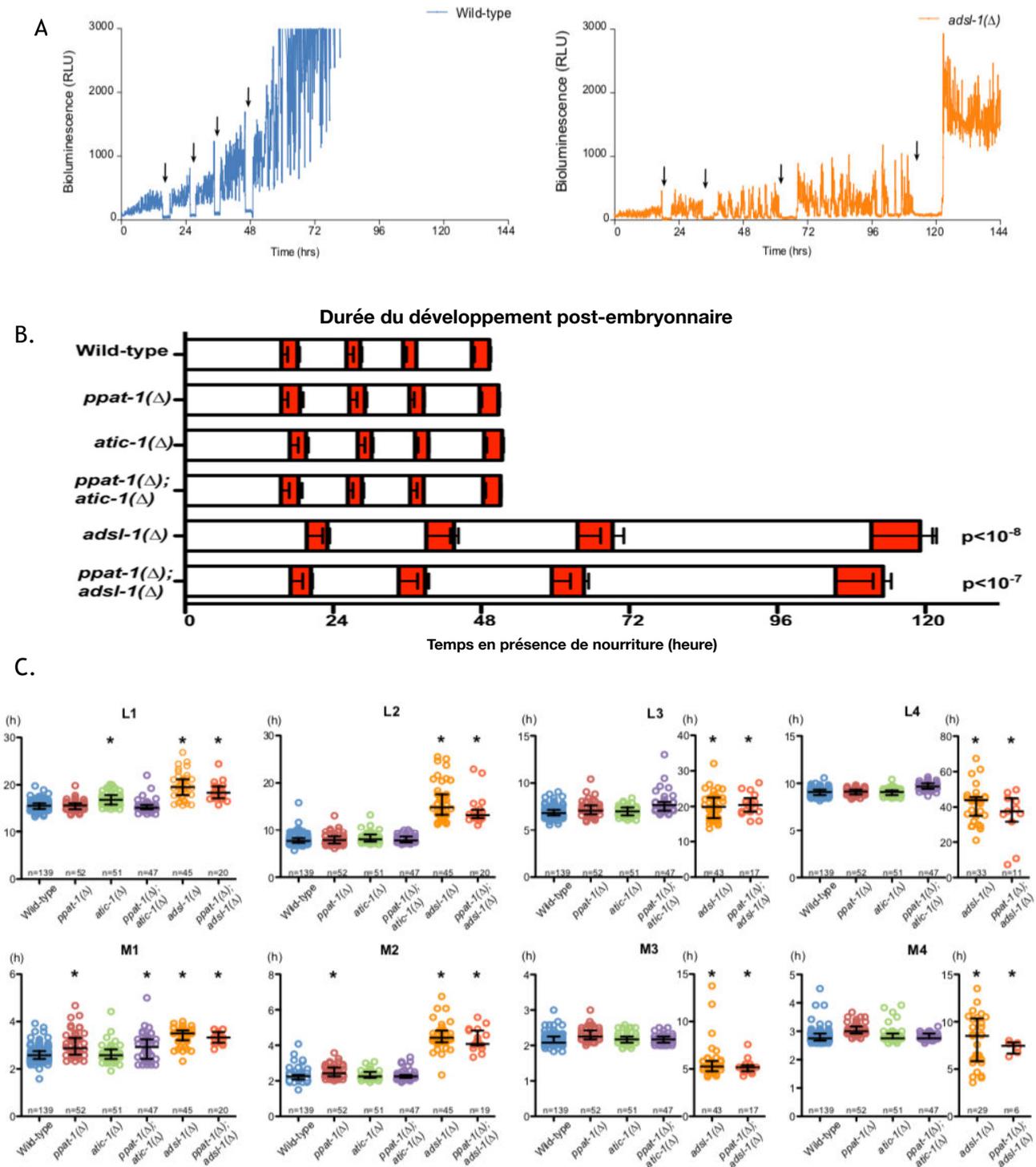
Dans le but de mesurer précisément la durée de chaque stade larvaire et de chaque phase de léthargie, Olmedo et al. (2015) ont utilisé ces caractéristiques afin de mettre en place une nouvelle technique de mesure à haut débit, méthode que j'ai moi même utilisée grâce à une collaboration avec l'équipe de Marta Artal Sanz à Séville. En bref, après synchronisation, les larves L1, portant un transgène luciférase, sont mises individuellement dans un puit d'une plaque 96 puits. Puis, de la *E. coli* OP50 est ajoutée avec de la D-Luciférine. Les larves vont alors

commencer à se nourrir de bactéries mais aussi de D-Luciférine. Cette dernière sera dégradée par la luciférase exprimée par le ver et produira une luminescence qui sera visible grâce à la transparence de ce métazoaire et qui sera mesurée grâce à un luminomètre. A l'inverse, lorsque les nématodes entrent en phase de léthargie, ils cessent de se nourrir de bactéries mais aussi de D-Luciférine. Il n'y a donc plus d'émission de luminescence. A la fin de leurs mues, les nématodes recommencent à se nourrir et il y a de nouveau de la luminescence (Figure 19A). Ces transitions entraînent une augmentation ou une chute drastique du signal lumineux qui peut être mesuré toutes les cinq minutes. Ce système étant automatisé, il est possible de faire des mesures pendant 5 jours ou plus. Grâce à cette technique, j'ai pu obtenir la durée précise de chaque stade larvaire et de chaque phase de léthargie pour chacun des nématodes de la plaque 96 puits.

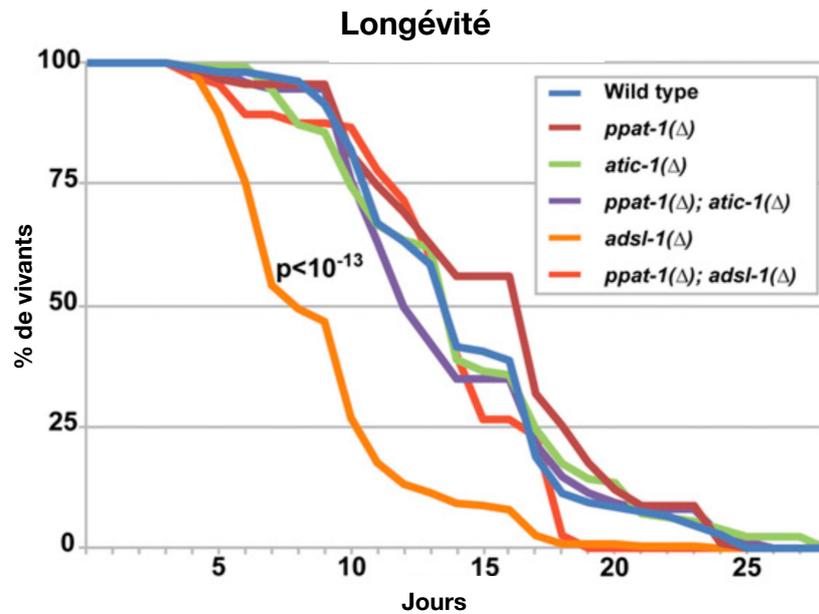
Ainsi, pour les mutants *adsl-1(Δ)* et *ppat-1(Δ)* ; *adsl-1(Δ)*, nous pouvons voir qu'ils ont un développement post-embryonnaire fortement ralenti puisqu'ils ont besoin de deux fois plus de temps pour atteindre le stade adulte en comparaison avec la souche sauvage (Figure 19B). En outre, lorsqu'on regarde plus en détails, nous pouvons voir que chaque stades larvaires et chaque phases de léthargies sont affectées chez ces deux mutants et que le retard est de plus en plus prononcé plus on progresse dans le développement post-embryonnaire (Figure 19C). Grâce à cette analyse, pour la première fois, je suis capable de dire avec certitude que ces deux mutants atteignent le stade adulte. En effet, le stade adulte est souvent défini morphologiquement par la présence d'une lignée germinale aboutie en forme de U et notamment d'une vulve dont le développement est terminé. Or, je ne pouvais pas me baser sur ces critères chez *adsl-1(Δ)* et *ppat-1(Δ)* ; *adsl-1(Δ)* puisqu'ils sont stériles et leur vulve ne se développe pas complètement.

En ce qui concerne les mutants de la voie *de novo*, *ppat-1(Δ)*, *atic-1(Δ)* et *ppat-1(Δ)* ; *atic-1(Δ)*, leur durée de développement post-embryonnaire est strictement similaire à celle de la souche sauvage y compris lorsqu'on regarde spécifiquement chaque stades larvaires et chaque phases de léthargies (Figure 19B et C).

En conclusion, je n'ai pas pu voir d'effet d'une perturbation de la voie *de novo* ni d'une accumulation de ZMP ou de SZMP sur la durée du développement post-embryonnaire. En revanche, la déficience en ADSL entraîne un ralentissement croissant du développement post-embryonnaire indépendamment de *ppat-1* puisque *adsl-1* est épistatique sur *ppat-1*.



**Figure 19 : La durée du développement post-embryonnaire de *C. elegans*.** A. Profils représentatifs de bioluminescence d'un seul individu de type sauvage (gauche, ligne bleue) et d'un mutant *adsl-1(Δ)* (droite, ligne orange) au fil du temps. Les flèches indiquent une diminution de la luminescence observée pendant la phase léthargique. B. Graphique illustrant la durée des stades du développement post-embryonnaires. Les barres blanches représentent les stades larvaires, de L1 à L4 (de gauche à droite), les barres oranges représentent les phases léthargiques consécutives à chaque stade larvaire (les durées moyennes du développement larvaire, de t0 à la sortie de la quatrième phase léthargique, sont statistiquement différentes - ANOVA unidirectionnelle - les valeurs de P indiquées se rapportent à la comparaison avec la souche sauvage selon un test t de Bonferroni - autrement, la comparaison avec le type sauvage ne fait apparaître aucune différence significative). C. Représentation détaillée des données primaires présentées à la figure 19B. Chaque cercle correspond à une observation individuelle, les barres indiquent les médianes, les 2e et 3e quartiles. L1 à L4 font référence aux quatre stades larvaires et M1 à M4, aux phases léthargiques suivant chaque stade larvaire. Pour une meilleure visualisation, *adsl-1(Δ)* et *ppat-1(Δ) ; adsl-1(Δ)* en L3, L4, M3 et M4 sont représentés sur une échelle de temps différente. (\* - différence statistiquement significative par rapport à un nématode de type sauvage ; ANOVA unidirectionnelle)



**Figure 20 :** La longévité des mutants de la voie de biosynthèse des purines chez *C. elegans*. Graphique illustrant la fraction de nématodes vivants au cours du temps pour tous les génotypes étudiés (valeur de  $p$  indiquée pour la comparaison *adsl-1*(Δ) par rapport à la souche sauvage), tous les autres génotypes ne sont pas significativement différents du sauvage et sont significativement différents de *adsl-1*(Δ) - test du grade de log avec correction de Bonferroni ; combinaison totale de trois expériences indépendantes pour chaque génotype (type sauvage  $n = 106$ , *ppat-1*(Δ)  $n = 91$ , *atic-1*(Δ)  $n = 126$ , *ppat-1*(Δ) ; *atic-1*(Δ)  $n = 149$ , *adsl-1*(Δ)  $n = 227$ , *ppat-1*(Δ) ; *adsl-1*(Δ)  $n = 113$ ).

## D. La durée de vie

Dans la suite de l'étude, je me suis intéressée à la durée de vie des mutants de la voie de biosynthèse des purines. Effectivement, il est connu que le développement post-embryonnaire, le métabolisme et la lignée germinale peuvent affecter la durée de vie de *C. elegans* (revue par Antebi en 2013). Par exemple, Hsin et Kenyon (1999) ont montré qu'une ablation des cellules précurseuses de la lignée germinale au laser induit une augmentation de la durée de vie de 60%. Cependant, l'élimination des précurseurs gonadiques somatiques (tissu de soutien entourant les cellules germinales) annule cette augmentation de la durée de vie. Comme nous l'avons vu précédemment, la lignée germinale est quasi inexistante chez les mutants *adsl-1*(Δ) et *ppat-1*(Δ) ; *adsl-1*(Δ) et leur développement post-embryonnaire est fortement ralenti. De plus, ces mutations affectent le métabolisme des purines. Ainsi, je me suis demandée si la longévité (durée de vie) de ces mutants était affectée. Je me suis également posée la question concernant les mutants de la voie *de novo* puisque ces mutants ont aussi une perturbation du métabolisme des purines. De plus, le mutant *atic-1*(Δ) accumule du ZMP (substrat d'ATIC) qui est connu pour être capable de mimer l'AMP et donc d'activer l'AMPK. Cette enzyme joue un rôle essentiel sur le métabolisme en permettant un switch de l'anabolisme au catabolisme qui favoriserait une augmentation de la longévité (Marie *et al.* 2011). Le SZMP (substrat d'ADSL dans la voie *de novo*), quant à lui est

capable d'activer la pyruvate kinase 2 et d'augmenter la survie des cellules cancéreuses (Keller *et al.* 2012). Il sera donc également intéressant de voir quels sont les effets de ces métabolites et quels sont les effets d'une déficience de la voie *de novo* sur la longévité du *C. elegans*.

Grâce à la réalisation de courbes de survie (Figure 20), j'ai pu constater que la durée de vie des mutants de la voie *de novo* n'est ni rallongée, ni raccourcie par rapport à celle de la souche N2 de référence. En ce qui concerne le mutant *atic-1(Δ)*, nous aurions pu nous attendre à un rallongement de la durée de vie puisque le ZMP qu'il accumule est potentiellement capable d'activer l'AMPK. Il semble donc que l'accumulation de ZMP (*atic-1(Δ)*) ou l'absence de voie *de novo* (*ppat-1(Δ)* et *ppat-1(Δ) ; atic-1(Δ)*) n'ai pas d'effet sur la longévité du nématode.

Le mutant *adsl-1(Δ)* présente, quant à lui, une longévité significativement réduite par rapport à la souche sauvage. En revanche, la longévité du double mutant *ppat-1(Δ) ; adsl-1(Δ)* est similaire à celle de la souche sauvage. Ici, *ppat-1* est épistatique sur *adsl-1*, ce qui signifie que l'accumulation de SZMP serait être à l'origine de la baisse de longévité observée chez le mutant *adsl-1(Δ)*.

En conclusion, je n'ai pas pu mettre en évidence d'effet de l'accumulation de ZMP endogène sur la longévité du *C. elegans* ni même d'effet dû à l'absence de voie *de novo*. Par contre, pour la première fois dans cette étude, j'ai pu montrer, grâce à une analyse des relations d'épistasie, un effet (en l'occurrence, délétère) de l'accumulation de SZMP réduisant fortement la longévité du nématode.

## **E. La fonction neuronale**

Lorsqu'on observe à la loupe binoculaire le mutant *adsl-1(Δ)*, il est possible de voir aisément qu'il a un défaut de motricité bien qu'il soit tout de même mobile. Les patients atteints d'une déficience en ADSL souffrent de retard psychomoteur avec essentiellement une atteinte neurologique. Je me suis donc demandée si les défauts de motricité du mutant *adsl-1(Δ)* étaient liés à un défaut du système nerveux du nématode.

### 1. La jonction neuro-musculaire

J'ai dans un premier temps testé la jonction neuro-musculaire permettant de faire le lien entre un neurone et une fibre musculaire afin de faire partir le signal de contraction au muscle. La zone de contact entre l'axone du moto-neurone et le muscle forme des « synapses » (Figure 7B). Il y a une pré-synapse et une post-synapse, la fonction de chacune pouvant être testée spécifiquement à l'aide de drogues : l'Aldicarb pour la première et le Lévamisol pour la seconde. Ces deux drogues, lorsque la jonction est fonctionnelle, entraînent une paralysie des nématodes. En effet, il va y avoir une sur-activation des récepteurs cholinergiques de la synapse ce qui va

entraîner une contraction constante du muscle (Lewis *et al.* 1980). A l'inverse, si la jonction neuro-musculaire cholinergique est déficiente ou non fonctionnelle, alors les nématodes seront insensibles à au moins l'une des deux drogues (Fleming *et al.* 1997; Gendrel *et al.* 2009).

Ainsi, suite au traitement indépendant des mutants de la voie de biosynthèse des purines, je n'ai pas pu mettre en évidence de différence de sensibilité comparée à la souche sauvage. Chacun des mutants est paralysé comme la souche de référence par l'ajout d'Aldicarb ou de Lévamisolé dans le milieu de culture (Figure 21A et B).

La jonction neuro-musculaire cholinergique ne serait donc pas affectée par l'absence de voie *de novo* (*ppat-1*( $\Delta$ ) et *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *atic-1*( $\Delta$ )), l'accumulation de ZMP (*atic-1*( $\Delta$ )) ou de SZMP (*ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*( $\Delta$ )) ou par la déficience en ADSL (*adsl-1*( $\Delta$ )).

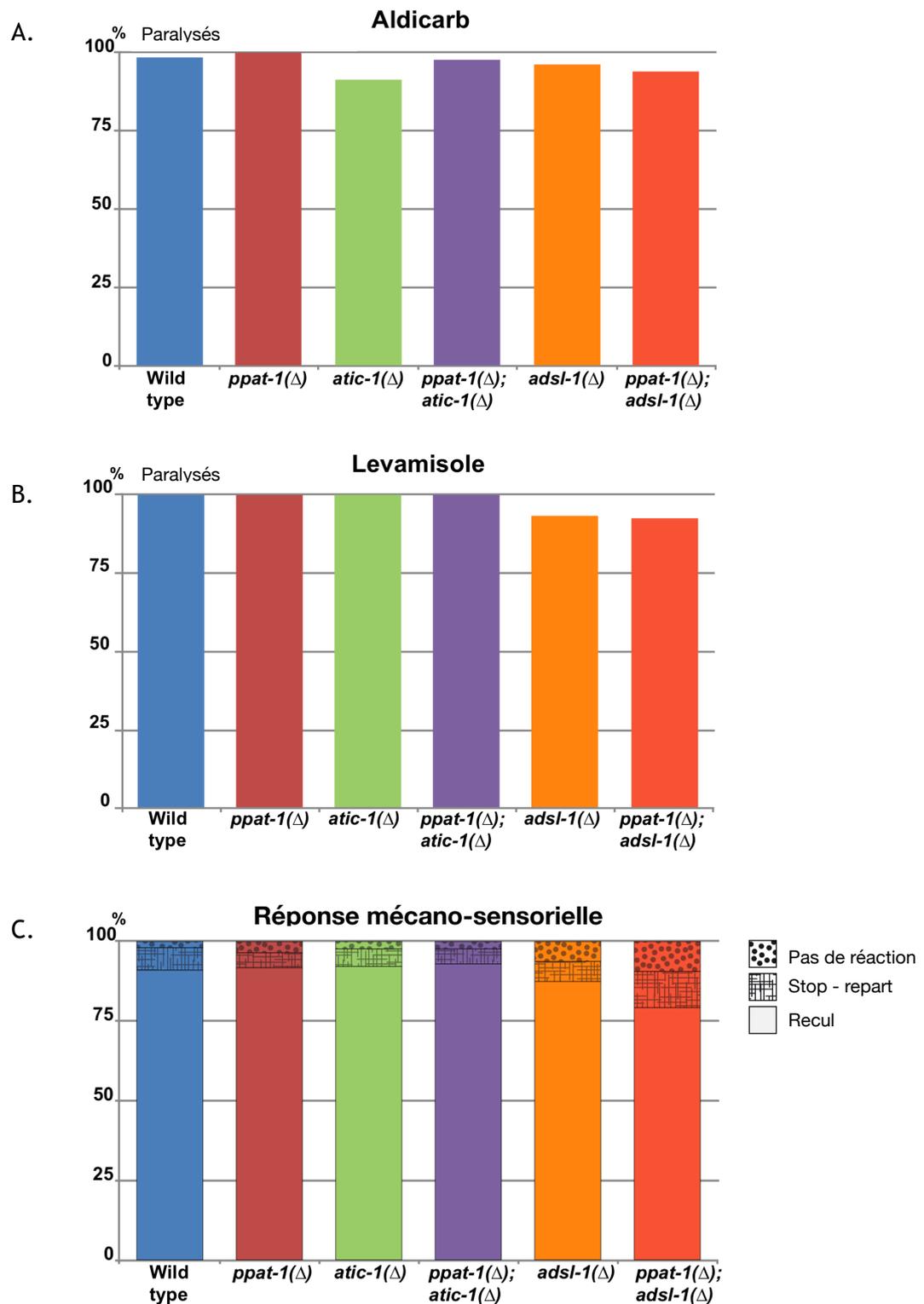
## 2. La réponse mécano-sensorielle

La jonction neuro-musculaire ne semblant pas affectée chez les mutants de la voie de biosynthèse des purines, je me suis intéressée à la fonction neuronale de façon plus globale en réalisant un test de réaction au toucher. Ce test fait intervenir un réseau complexe de neurones et permet de tester de façon plus générale le système nerveux du *C. elegans*. Lorsqu'on passe un cil au niveau de l'extrémité postérieure du pharynx, la réaction normale du nématode est de faire marche arrière puis de repartir dans une autre direction (Chalfie *et al.*, 2014). Plus rarement, il va juste s'arrêter puis repartir dans la même direction ou bien tout simplement continuer son chemin. Lorsque la fonction neuronale est affectée, le nématode pourra avoir un comportement différent, la plupart du temps il continuera d'avancer malgré le toucher du cil.

Suite à ce test, je n'ai pas pu mettre en évidence de différence significative entre la souche sauvage et les différents mutants de la voie des purines. Les nématodes reculent et repartent dans une autre direction dans plus de 90% des cas (Figure 21C).

Ici aussi, la fonction neuronale ne serait pas affectée par des perturbations de la voie de biosynthèse des purines.

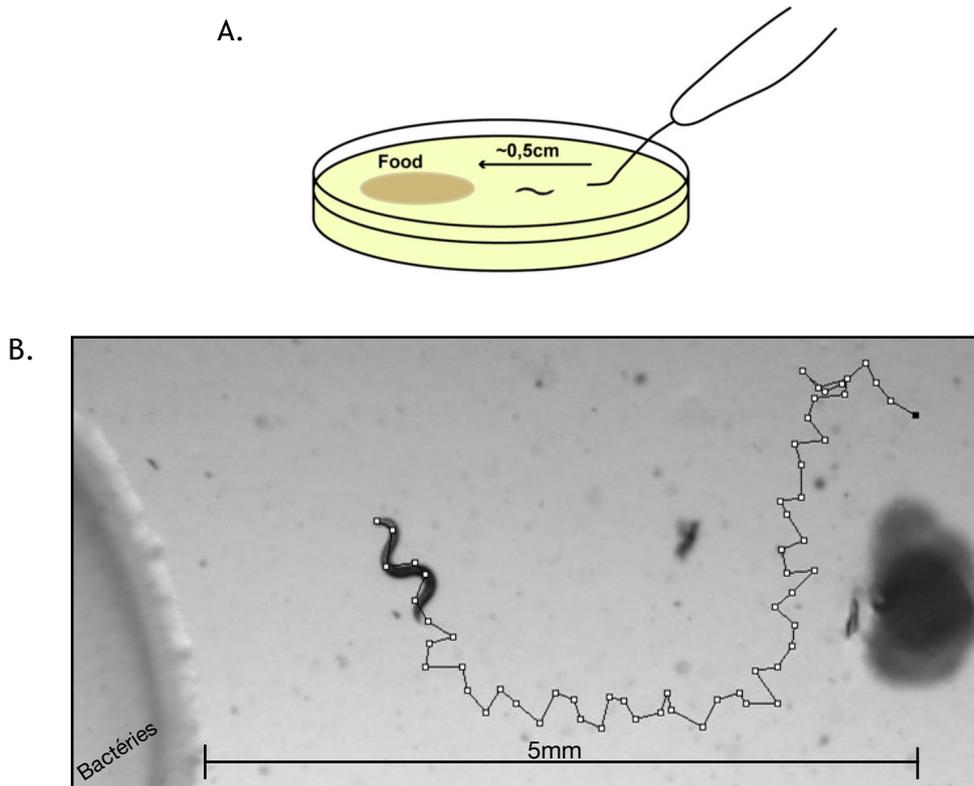
En conclusion, je n'ai pas pu mettre en évidence, à l'aide des tests que j'ai réalisés, de défauts neuronaux chez les mutants de la voie de biosynthèse des purines que nous étudions dans ce travail de thèse.



**Figure 21 : La fonction neuronale des mutants de la voie de biosynthèse des purines chez *C. elegans*.**  
 A. Pourcentage de vers paralysés après traitement à l'Aldicarb pour tous les génotypes étudiés (sauvage n = 136, *ppat-1(Δ)* n = 169, *atic-1(Δ)* n = 178, *ppat-1(Δ) ; atic-1(Δ)* n = 140, *adsl-1(Δ)* n = 54, *ppat-1(Δ) ; adsl-1(Δ)* n = 65). B. Pourcentage de vers paralysés après traitement au Lévamisole, dans tous les génotypes étudiés (sauvage n = 50, *ppat-1(Δ)* n = 49, *atic-1(Δ)* n = 51, *ppat-1(Δ) ; atic-1(Δ)* n = 50, *adsl-1(Δ)* n = 104, *ppat-1(Δ) ; adsl-1(Δ)* n = 54). C. Pourcentage de réponses observées à la stimulation mécano-sensorielle chez tous les génotypes étudiés (sauvage n = 30, *ppat-1(Δ)* n = 30, *atic-1(Δ)* n = 30, *ppat-1(Δ) ; atic-1(Δ)* n = 30, *adsl-1(Δ)* n = 30, *ppat-1(Δ) ; adsl-1(Δ)* n = 30).

## F. La motricité et le muscle

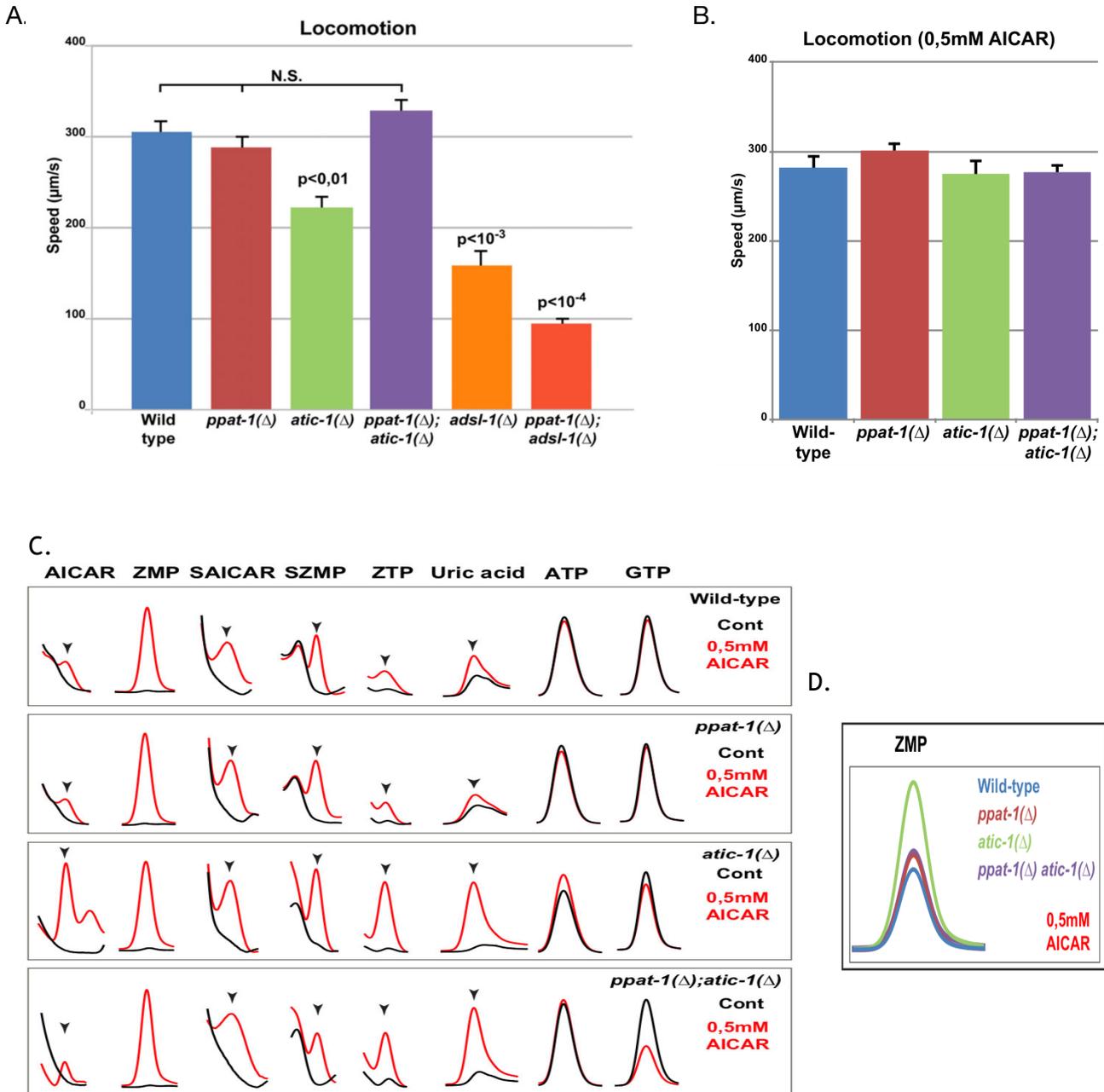
Comme annoncé précédemment, une simple observation à la loupe binoculaire suffit pour constater que le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) a un défaut de motricité. En outre, les patients déficients dans l'une des enzymes de la voie, telle que dans le cas de la déficience en ADSL, ont des symptômes psychomoteurs. J'ai donc souhaité quantifier la motricité de chacun des mutants de la voie de biosynthèse des purines en faisant un test de locomotion.



**Figure 22 : Test de motricité chez *C. elegans*.** A. Dessin schématique du test de locomotion. B. Illustration du « tracking » du pharynx d'un nématode. Chaque point correspond à la position du pharynx à un temps donné. La distance totale parcourue par le nématode correspond à la somme des distances entre chaque point.

### 1. La motricité et l'accumulation de ZMP

Je me suis dans un premier temps intéressée à la motricité du mutant *atic-1*( $\Delta$ ). En effet, ce mutant accumule du ZMP (Figure 13). Or cet intermédiaire est connu pour activer l'AMPK en mimant l'AMP (Jin *et al.* 2007) et pourrait ainsi avoir un effet positif sur le muscle strié suite à l'entraînement physique (Jørgensen *et al.* 2006). Il a également été montré qu'un traitement à l'AICAR (forme riboside du ZMP) avait un impact positif sur la motricité de souris en augmentant leur endurance (Narkar *et al.* 2008). J'ai donc voulu savoir si cela serait aussi le cas chez le mutant *atic-1*( $\Delta$ ).



**Figure 23 : Motricité et traitement à l'AICAR chez *C. elegans*.** A. Graphique illustrant la vitesse moyenne de locomotion chez tous les mutants de la voie de biosynthèse des purines (barre d'erreur, SEM ;  $n = 30$  dans tous les génotypes sauf le sauvage et *ppat-1(Δ)* ; *atic-1(Δ)*  $n = 40$  ; Les valeurs de P indiquées signifient que la comparaison la souche sauvage est statistiquement significative - ANOVA unilatérale, T test, comparaison multiple de Bonferroni - sauvage, *ppat-1(Δ)* et *ppat-1(Δ)* ; *adsl-1(Δ)* ne sont pas statistiquement différents les uns des autres). B. Graphique illustrant la vitesse moyenne de locomotion chez les mutants de la voie *de novo* traités avec AICAR (barre d'erreur - erreur standard de la moyenne ;  $n = 30$  dans *ppat-1(Δ)* et *atic-1(Δ)*,  $n = 40$  dans les types sauvage et *ppat-1(Δ)* ; *atic-1(Δ)* ; \* - différence statistiquement significative par rapport à la souche sauvage - test t de Student). C. Zoom sur les pics de chromatogrammes obtenus par HPLC de métabolites spécifiques AICAR, ZMP, SAICAR, SZMP, ZTP, acide urique, ATP et GTP, après traitement à 0,5 mM d'AICAR. D. Zoom sur les pics de chromatographie HPLC du ZMP lors du traitement avec 0,5 mM d'AICAR, les quatre génotypes analysés étant représentés sur la même échelle.

Afin de quantifier la motricité des nématodes, j'ai mesuré leur vitesse de déplacement. Pour cela, des vers synchronisés ayant atteint le stade adulte sont utilisés. En bref, après être passé pendant une minute sur une boîte avec du milieu de culture sans bactéries, le nématode est déposé à environ 5mm d'une goutte de bactéries, pharynx orienté dans la direction de la *E. coli*. Le déplacement du nématode est alors filmé pendant un maximum de 1 minute. S'il atteint la goutte de bactéries avant la fin de la minute, le film est arrêté. En effet, il est connu que la vitesse de déplacement des nématodes est différente dedans et en dehors de la bactérie. Grâce à ces films, un « tracking » du côté antérieur du pharynx est réalisé à raison d'un point effectué par seconde. Nous obtenons la distance parcouru par le ver pendant le temps du film. A partir de ces données, nous pouvons déduire à la fois la vitesse moyenne de déplacement mais aussi la vitesse maximum (à noter que je ne parlerais que de vitesse moyenne par la suite puisque la vitesse maximum donne les mêmes résultats statistiques systématiquement) (Figure 22).

De cette manière, alors que je n'ai pas pu voir de différence de vitesse moyenne de déplacement entre la souche sauvage (305  $\mu\text{m/s}$ ) et le simple mutant *ppat-1(\Delta)* (288  $\mu\text{m/s}$  - mutant abolissant la voie *de novo*), il apparaît que le mutant *atic-1(\Delta)* présente une baisse de motricité d'environ 32% (221  $\mu\text{m/s}$ ). L'analyse des relations d'épistasie grâce au double mutant *ppat-1(\Delta)* ; *atic-1(\Delta)* (328  $\mu\text{m/s}$ ) tend à montrer que c'est l'accumulation de ZMP qui serait responsable du défaut de motricité observé chez le mutant *atic-1(\Delta)* puisque le double mutant a une vitesse similaire à celle de la souche sauvage (Figure 23A).

Dans l'objectif de valider l'hypothèse de l'effet de l'accumulation du ZMP sur la motricité, j'ai complété le milieu de culture des nématodes avec de l'AICAR (forme riboside du ZMP) sur le même principe que pour la fertilité (cf. Matériels et Méthodes). Dans ce cas, j'ai ajouté 0,5mM d'AICAR pour 4 souches (sauvage, *atic-1(\Delta)*, *ppat-1(\Delta)* et *ppat-1(\Delta)* ; *atic-1(\Delta)*). Les analyses métaboliques réalisées dans ces conditions montrent effectivement une accumulation d'AICAR mais aussi de ZMP avec une plus grande accumulation de ZMP chez le mutant *atic-1(\Delta)* comme attendu puisque l'enzyme catabolisant ce substrat - qui continu d'être produit par la voie *de novo* - est déficiente (Figure 23C et D). Dans ces conditions, je n'ai pas pu voir de différence significative de vitesse de déplacement entre les différentes souches en présence d'AICAR (Figure 23B).

En conclusion, j'ai montré que le mutant *atic-1(\Delta)* a un défaut de motricité au stade adulte. Cependant, je n'ai pas pu valider l'hypothèse que ce défaut était dû à l'accumulation de ZMP puisque l'ajout d'AICAR dans le milieu de culture de nématodes n'a pas d'effet sur la locomotion.

## 2. La motricité du mutant *adsl-1*( $\Delta$ )

Pour la suite, je me suis focalisée sur le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) afin de quantifier son défaut de motricité observable à la loupe binoculaire.

Grâce à l'analyse de la vitesse de déplacement, nous pouvons voir que le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) a un important défaut de motricité puisque celle-ci est diminuée d'environ 50% (305  $\mu\text{m/s}$  pour la souche sauvage vs. 154  $\mu\text{m/s}$  pour *adsl-1*( $\Delta$ )). Afin de tester si ce défaut est dû à l'accumulation de SZMP, j'ai également mesuré la vitesse de déplacement du double mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*( $\Delta$ ) (93  $\mu\text{m/s}$ ). Ce dernier montre aussi une forte diminution de sa vitesse moyenne (70% par rapport à la souche sauvage et 40% par rapport au simple mutant *adsl-1*( $\Delta$ )) (Figure 23A).

En conclusion, j'ai confirmé et quantifié l'important défaut de motricité lié à la déficience en ADSL chez *C. elegans*. En outre, j'ai pu montrer que l'accumulation de SZMP (substrat d'ADSL dans la voie *de novo*) ne semblait pas être liée à ce défaut mais pourrait, au contraire, avoir un effet protecteur pour la motricité. En effet, le double mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*( $\Delta$ ) (n'accumulant pas de SZMP mais uniquement du SAMP) a un défaut de motricité plus important que le simple mutant *adsl-1*( $\Delta$ ). Ainsi, la déficience en ADSL dans la voie de recyclage ou l'accumulation de SAMP pourrait être à l'origine du défaut de motricité du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ).

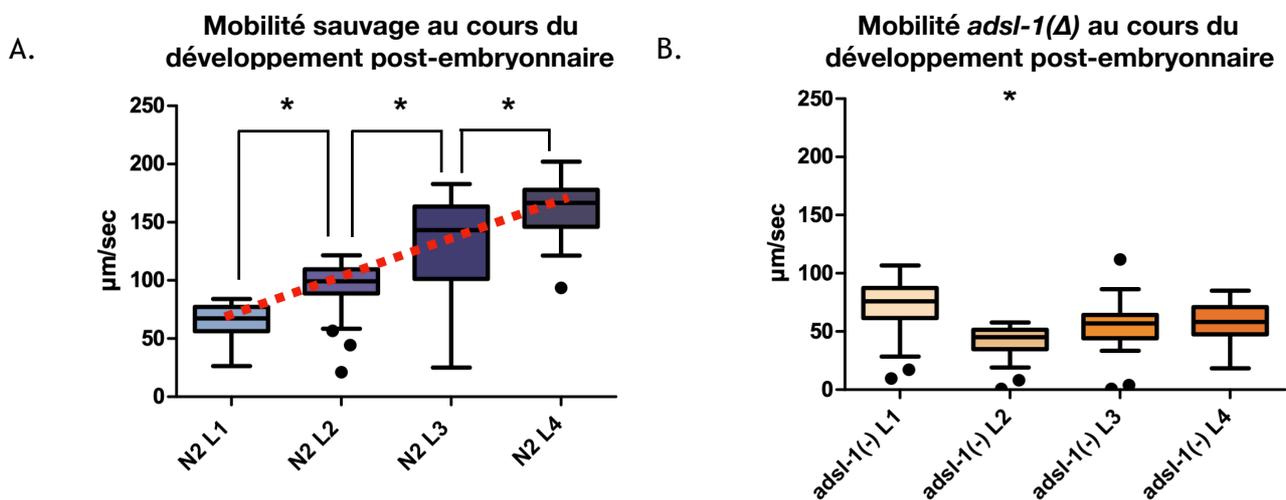


Figure 24 : Motricité au cours du développement post-embryonnaire chez *C. elegans*. A. Boîte à moustache illustrant la vitesse de déplacement de la souche sauvage au cours des quatre stades larvaires (\* : moyenne statistiquement significative - ANOVA unidirectionnelle - comparaison entre les stades larvaires avec le Test t ; n = 30 pour chaque stade ; en rouge pointillé : courbe de tendance linéaire,  $R^2=1$ ). B. Boîte à moustache illustrant la vitesse de déplacement du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) au cours des quatre stades larvaires (\* : moyenne statistiquement significative - ANOVA unidirectionnelle - comparaison entre les stades larvaires avec le Test t ; n = 30 pour chaque stade).

### 3. La motricité du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) au cours développement post-embryonnaire

Comme nous l'avons vu, le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) a un important retard de développement post-embryonnaire ainsi qu'un défaut dans le développement de sa taille. Je me suis donc demandée si le défaut de motricité apparaissait lui aussi pendant le développement post-embryonnaire et si oui, s'il apparaissait à un stade larvaire en particulier. Pour cela, j'ai mesuré la vitesse de déplacement de la souche sauvage et du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) à chaque stade larvaire en corrigeant par rapport au retard de développement à partir des données obtenues par luminométrie (cf. II. C. 2).

Pour la souche N2, nous pouvons voir une augmentation de la vitesse de déplacement au cours des stades larvaires. Cette augmentation est même linéaire ( $R^2=1$ ) (Figure 24A). En revanche, en ce qui concerne le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) nous ne pouvons pas voir d'augmentation constante de la vitesse de déplacement au cours du développement post-embryonnaire. Au stade L2, il y a une baisse significative de la vitesse par rapport au stade L1 et la vitesse n'est, par la suite, jamais restaurée au niveau de celle de la souche sauvage. Il n'y a qu'à partir du stade L4 que la motricité du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) est de nouveau similaire à celle observée au stade L1. Le défaut de motricité du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) est donc de plus en plus important au cours du développement post-embryonnaire par rapport à la souche sauvage. Un autre point à noter est que la vitesse du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) au stade L1 est similaire à celle de la souche de référence à ce même stade (Figure 24B). Ceci laisse donc penser que le défaut de motricité du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) apparaît entre les stades L1 et L2.

En conclusion, j'ai pu montrer que la vitesse de déplacement du nématode augmente de façon constante au cours du développement post-embryonnaire chez la souche sauvage en condition standard de culture. A l'opposé, le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) a un important défaut de motricité au stade adulte qui apparaît dès le second larvaire alors qu'au premier stade sa motricité est normale. Ainsi, les événements primaires concernant le défaut de motricité du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) ont lieu entre les stades L1 et L2.

### 4. Le muscle au stade adulte

Comme nous venons de le voir, les mutants *adsl-1*( $\Delta$ ) et *atic-1*( $\Delta$ ) ont un défaut de motricité. Les défauts de motricité peuvent avoir une origine neuronale, musculaire ou bien neuromusculaire. Précédemment, j'ai testé certaines fonctions neuronales des mutants de la voie de biosynthèse des purines et ceux-ci ne présentaient pas de défaut d'après les tests que j'ai réalisés. Les défauts de motricité des mutants *adsl-1*( $\Delta$ ) et *atic-1*( $\Delta$ ) auraient donc une origine musculaire. Désormais, j'ai souhaité savoir si la structure du muscle strié (permettant le

mouvement du corps) est affectée chez ces mutants. Pour cela, un marquage immuno-histo-chimique a été réalisé sur les fibres de myosine (structure jouant un rôle fondamental dans les mécanismes de la contraction du muscle) de *C. elegans*.

Chez la souche sauvage tout comme chez le mutant *ppat-1*( $\Delta$ ), nous pouvons voir que les fibres de myosine sont parfaitement alignées et organisées et sont présentes en quantité importante. La même observation peut être faite concernant les mutants *atic-1*( $\Delta$ ) et *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *atic-1*( $\Delta$ ) qui possèdent tous deux un grand nombre de fibres de myosine parfaitement alignées et organisées. A l'inverse, les fibres de myosine du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) semblent totalement désorganisées et non alignées. Ces fibres sont également présentes en plus faible quantité laissant apparaître un marquage diffus. Il en est de même pour le double mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*( $\Delta$ ) qui a peu de fibres de myosine qui sont désorganisées et non alignées (Figure 25).

En conclusion, le défaut de motricité des mutants *adsl-1*( $\Delta$ ) et *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*( $\Delta$ ) serait lié à un important défaut de structure du muscle permettant le mouvement d'ondulation caractéristique du nématode. De plus, *adsl-1* est épistatique sur *ppat-1* donc ce n'est pas l'accumulation de SZMP (intermédiaire de la voie *de novo*) qui est à l'origine de ce défaut. Il semblerait que ce défaut soit lié à l'accumulation de SAMP ou à la déficience en ADSL dans la voie de recyclage. Il faut également noter que les mutants de la voie *de novo* sont similaires à la souche sauvage, ainsi une coupure de cette partie de la voie ne semble pas avoir d'effet sur la structure du BWM tout comme l'accumulation de ZMP (substrat d'ATIC).

### Myosine musculaire

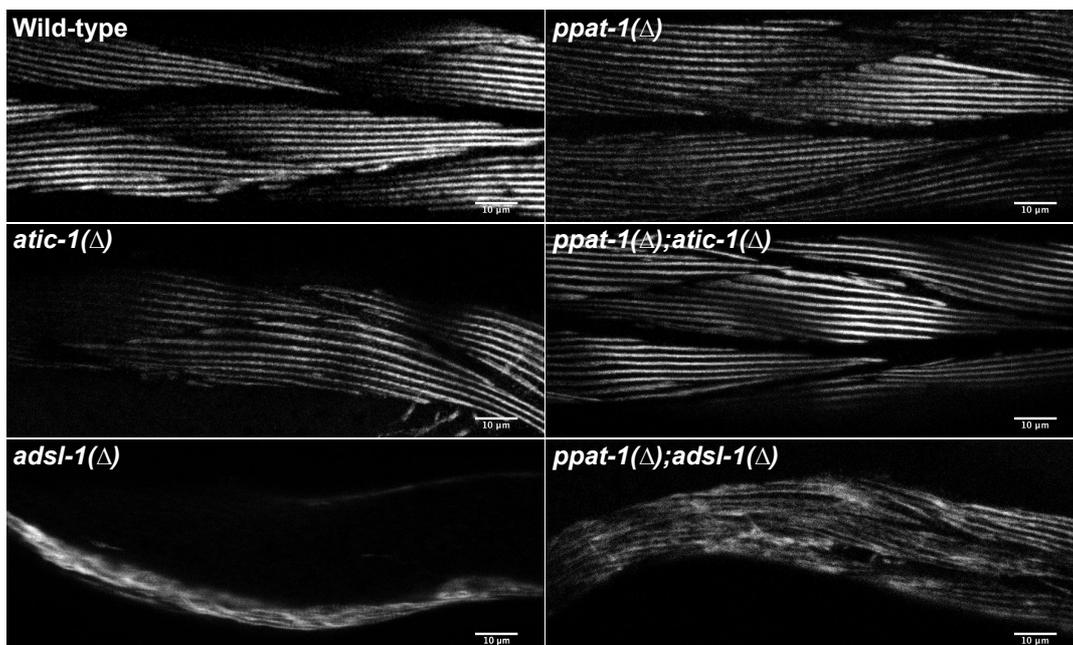


Figure 25 : Structure des fibres de myosine au stade adulte des mutants de la voie de biosynthèse des purines chez *C. elegans*. Images confocales de l'immuno-marquage des fibres de myosine musculaires de la paroi du corps chez des nématodes jeunes adultes (barre : 10  $\mu$ m).

## 5. Structure du muscle au cours du développement post-embryonnaire

Le défaut de motricité du mutant *adsl-1(Δ)* au stade adulte est lié à un important défaut d'organisation des fibres de myosine du BWM. De plus, l'événement primaire concernant la vitesse de déplacement a lieu au stade L2. Je me suis donc demandé s'il existait une corrélation entre l'apparition du défaut de motricité et l'apparition d'un défaut de structure du muscle. J'ai ainsi étudié la structure du muscle au cours du développement post-embryonnaire en réalisant des images du BWM à chaque stade larvaire.

### 1. Structure générale du BWM au cours du développement post-embryonnaire

Dans un premier temps, j'ai voulu savoir s'il était possible de voir des défauts du BWM à l'aide d'une souche transgénique exprimant un rapporteur fluorescent RFP sous le contrôle du promoteur de la troponine. Ce rapporteur permet d'observer indirectement la structure du muscle puisqu'il s'agit d'un rapporteur transcriptionnel. La troponine est un complexe de protéines sensibilisant les cellules musculaires au calcium. Il va donc y avoir un marquage de l'ensemble du muscle strié nous indiquant la morphologie de ce tissu.

Grâce à ces images, nous pouvons voir que le mutant *adsl-1(Δ)* ne semble pas présenter de défaut majeur dans la structure de ses muscles striés tant au stade adulte qu'au cours du développement post-embryonnaire comparativement à la souche sauvage. En effet, le muscle est présent sur toute la paroi du corps des nématodes et est épais. Il n'y a qu'au stade adulte, dans la région postérieure, que le mutant *adsl-1(Δ)* présente parfois une discontinuité du BWM (Figure 26A à J).

Ainsi, les défauts de structures du muscle strié chez le mutant *adsl-1(Δ)*, s'ils existent, ne sont pas des défauts impliquant la morphologie de ce tissu.

### 2. Les fibres de myosine au cours du développement post-embryonnaire

Dans un second temps, j'ai voulu voir si le défaut d'organisation des fibres de myosine du mutant *adsl-1(Δ)* apparaît au cours du développement post-embryonnaire ou bien si ces fibres ne sont en fait pas maintenues correctement au stade adulte comme nous avons pu le voir à l'aide de l'immuno-marquage (cf. II. F. 4.). Je souhaite également savoir s'il existe une corrélation entre le défaut de motricité qui apparaît au stade L2 et la mise en place du tissu musculaire.

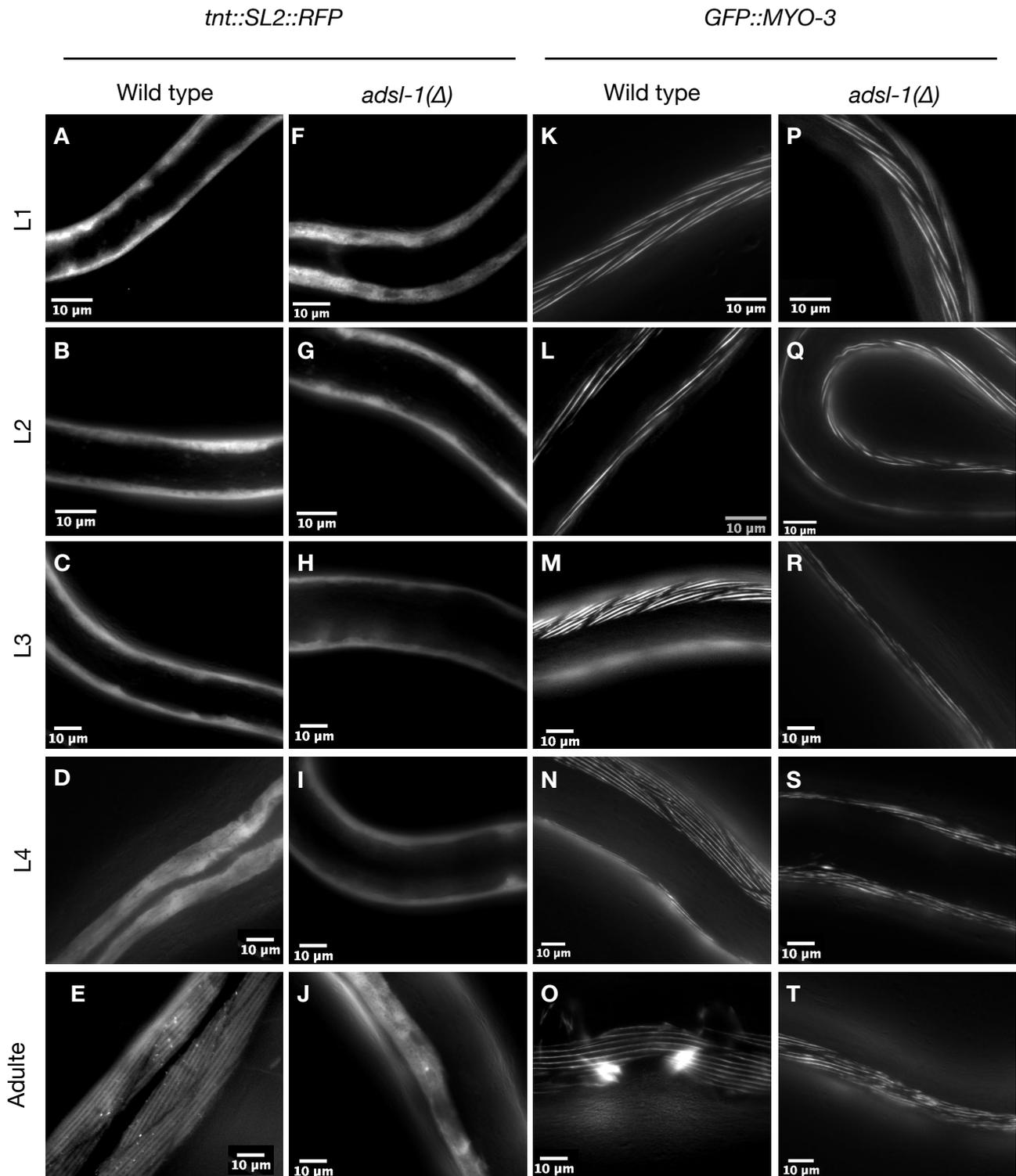


Figure 26 : Structure des muscles striés du *C. elegans* au cours du développement post-embryonnaire. Micrographies optiques du muscle strié portant un rapporteur fluorescent exprimé spécifiquement dans ce tissu. A à J. Souches exprimant le transgène *tnt::SL2::RFP*. K à T : Souches exprimant le transgène *GFP::MYO-3*. A à E et K à O : Souche sauvage. F à J et P à T : mutant *adsl-1(Δ)*. A, F, K et P : stade L1. B, G, L et Q : stade L2. C, H, M et R : stade L3. D, I, N et S : stade L4. E, J, O et T : stade adulte. Les barres d'échelle représentent 10  $\mu\text{m}$ . Pour chaque conditions, n=30 nématodes.

Pour tester cette hypothèse, j'ai utilisé une souche transgénique portant un rapporteur fluorescent GFP marquant les fibres de myosine musculaires. Nous pouvons voir que pendant tout le développement post-embryonnaire de la souche sauvage et au stade adulte les fibres de myosine sont alignées, organisées et nombreuses. Nous pouvons faire la même observation chez le mutant *adsl-1(Δ)* jusqu'au stade L2. A partir du stade L3, les fibres de myosine se désorganisent et deviennent moins nombreuses comparées à la souche de référence. Ce défaut d'alignement et de nombre de fibres persiste jusqu'au stade adulte (comme vu par immunomarquage) (Figure 26K à T).

Finalement, à l'aide de ces images, nous avons pu voir qu'il y a un défaut de structure du muscle strié chez le mutant *adsl-1(Δ)* qui est détectable à partir du stade L3 alors que son défaut de motricité l'est dès le stade L2. Plus précisément, nous avons pu voir un défaut dans l'organisation des fibres de myosine ainsi qu'un nombre plus faible de celles-ci pouvant participer au défaut de motricité observé chez ce mutant.

En conclusion, j'ai pu montrer qu'une perturbation de la voie de biosynthèse des purines est à l'origine d'un défaut de motricité mais aussi de structure du muscle et notamment d'organisation des fibres de myosine. Une coupure de la voie *de novo* au niveau de *atic-1* induit un défaut de motricité qui semble lié à la fonction du muscle strié. Une coupure de la voie de recyclage au niveau d'ADSL induit un défaut de motricité qui apparaît entre les stades L1 et L2. La mutation d'*adsl-1* entraîne également un défaut de la structure du muscle de la paroi du corps entre les stades L2 et L3. Ainsi, le défaut de motricité est la première manifestation visible des effets de la déficience en ADSL. Mes résultats suggèrent que la perte de motricité est due à un défaut de la fonction musculaire pendant les deux premiers stades larvaires. Puis, pour la suite du développement post-embryonnaire et au stade adulte, cette perte de motricité pourrait être aggravée par un défaut de la structure du muscle.

## **G. La déficience en ADSL : Voie *de novo* vs. voie de recyclage**

La plupart des phénotypes observés chez le mutant *adsl-1(Δ)* ne le sont pas chez les mutants *ppat-1(Δ)* et *atic-1(Δ)* (vulve, lignée germinale, taille, développement post-embryonnaire, structure du muscle). Ceci suggère que la fonction d'ADSL dans la voie de recyclage plutôt que dans la voie *de novo* cause ces différents phénotypes. En outre, la conversion du SAMP en AMP est requise à la fois pour la synthèse *de novo* de l'AMP et par la voie de recyclage (Figure 2A). On peut donc se poser la question de la contribution relative de ces deux voies. En effet, les

phénotypes cités précédemment peuvent être liés uniquement au défaut d'ADSL dans la voie de recyclage ou à la redondance d'ADSL dans la voie *de novo* et dans la voie de recyclage.

Dans ces conditions, si la première hypothèse est vraie, supprimer la voie *de novo* n'aurait aucun impact sur les phénotypes de perte de fonction partielle de *adsl-1* ou de *adss-1* (ADSS : enzyme convertissant l'IMP en SAMP, en amont d'ADSL dans la voie de recyclage). À l'inverse, si la seconde hypothèse est vraie, la gravité de ces phénotypes devrait augmenter lorsque la perte de fonction partielle de *adsl-1* ou *adss-1* est combinée à *ppat-1*( $\Delta$ ).

J'ai effectué deux expériences d'ARN interférence : *adsl-1*(RNAi) et *adss-1*(RNAi). Ceci a entraîné une perte de fonction partielle chez la souche sauvage et chez le mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) pour lesquelles j'ai analysé les défauts de lignée germinale et de vulve. Je n'observe aucune aggravation de l'un ou l'autre de ces phénotypes lorsque je compare la souche sauvage et le mutant *ppat-1*( $\Delta$ ), à la fois dans *adsl-1*(RNAi) et *adss-1*(RNAi) (Tableau 3). De même, comme décrit ci-dessus, *adsl-1*(RNAi) présente la même létalité embryonnaire dans les fonds génétiques sauvage et *ppat-1*( $\Delta$ ) (Figure 17A).

En conclusion, les défauts du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) (développement de la lignée germinale, de la vulve et du muscle) sont liés à la voie de recyclage de la voie de biosynthèse des purines, tandis que la voie *de novo* n'apporte pas de contribution détectable.

## **H. Sauvetage du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) par *adsl-1*(WT)**

L'allèle du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) que nous utilisons dans notre étude a été généré par mutagenèse aléatoire par un consortium au Japon (NBRP : National BioResource Project). Je me suis demandée si l'ensemble des phénotypes que nous observons chez ce mutant était effectivement causés par la déficience en ADSL ou bien s'ils étaient causés par une ou plusieurs autres mutations dans le fond génétique. En effet, les mutants sont générés de façon aléatoire et sont criblés par PCR (Polymerase Chain Reaction). Lorsqu'un clone est positif pour un gène recherché, le consortium stock la souche sans vérifier s'il existe d'autres mutations présentes dans le fond génétique et pouvant causer certains phénotypes mutants. J'ai donc voulu vérifier que les phénotypes que nous observons chez le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) sont dûs à la perte de fonction de *adsl-1* et non à une mutation autre dans le fond génétique.

Pour cela, la première étape a été de réaliser des outcross. Cette technique consiste à croiser la souche mutante avec la souche sauvage à plusieurs reprises. A chaque nouveau croisement, le pourcentage des mutations autres que celle désirée est divisé par deux si les deux mutations ne sont pas liées génétiquement. Le pourcentage est donc inversement proportionnel à la liaison génétique entre la mutation voulue et la/les mutation(s) indésirable(s). Ceci étant l'étape la plus simple et la plus évidente, j'ai réalisé quatre outcross pour notre mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) et

lorsque celui-ci porte un transgène en plus (pour les images de lignée germinale par exemple), le nombre d'outcross se porte à six. Le risque d'avoir une mutation restante dans le fond génétique après outcross est donc de 6,25% dans le premier cas et 1,6% dans le second cas. Il faut noter que lorsque j'ai des souches avec six outcross, les phénotypes observés sont les mêmes qu'avec la souche n'ayant que quatre outcross.

Ceci signifie donc qu'il existe un risque inférieur à 1,6% d'avoir une mutation (non liée génétiquement) autre que la perte de fonction de *adsl-1*( $\Delta$ ) qui soit responsable d'un ou plusieurs phénotypes observés (d'autant que j'ai réalisé plusieurs outcross indépendants). Grâce à ces outcross, j'ai grandement nettoyé le fond génétique de notre souche. Le risque qu'il y ait une autre mutation causant les phénotypes du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) n'est, cependant, pas nul.

Génotype ; <i>pie-1p::GFP::H2B</i>	N2	<i>ppat-1</i> ( $\Delta$ )	<i>adsl-1</i> (RNAi)	<i>ppat-1</i> ( $\Delta$ ) ; <i>adsl-1</i> (RNAi)	<i>adss-1</i> (RNAi)	<i>ppat-1</i> ( $\Delta$ ) ; <i>adss-1</i> (RNAi)
Stérile sans lignée germinale (%)	0,0	0,0	8,1	3,4	1,7	0,0
Stérile avec <10 cellules germinales (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	0,0
Stérile avec >10 cellules germinales (%)	2,3	0,0	51,4	27,6	57,9	7,7
Lignée germinale de type sauvage (%)	97,7	100,0	40,5	69,0	38,8	92,3
N = (lignée germinale)	43,0	57,0	37,0	29,0	121,0	52,0
Vulve protubérante (%)	0,0	0,0	26,1	0,0	8,0	0,0
Vulve de type sauvage (%)	100,0	100,0	73,9	100,0	92,2	100,0
N = (vulve)	35,0	57,0	23,0	28,0	50,0	39,0

Tableau 3 : Phénotype de lignée germinale et de vulve chez *adsl-1*(RNAi) et *adss-1*(RNAi). Toutes les souches portent le rapporteur spécifique de la lignée germinale *pie-1p::GFP::H2B*. Trois classes de phénotypes « stériles » sont définis sur la base du nombre de noyaux GFP positif dans la lignée germinale. Le phénotype de vulve est mesuré par microscopie DIC de type Nomarski.

Une autre façon de s'assurer que les phénotypes qu'on observe sont causés par la perte de fonction de *adsl-1* est de réaliser une ARN interférence sur le gène en question. La séquence d'environ 300 pb (paire de base) du gène porté par un plasmide est transcrite en ARN messager par la bactérie servant de nourriture aux nématodes. Cet ARN messager se retrouve disponible dans l'intestin du nématode et va pouvoir alors spécifiquement s'hybrider avec les ARN messager, de *adsl-1* en l'occurrence. Ce complexe d'ARN double brin va être dégradé, ce qui entraîne une baisse de la production de l'enzyme ADSL et donc une perte de fonction partielle.

Mes expériences de *adsl-1(RNAi)* montrent l'apparition d'une stérilité et parfois de défaut de vulve (vulve protubérante). Ces deux phénotypes sont partagés avec la souche mutante *adsl-1(Δ)*. Ainsi, la ARN interférant de *adsl-1* constitue une preuve de plus permettant d'attribuer les phénotypes du mutant *adsl-1(Δ)* à la perte de fonction de ce même gène.

Finalement, afin de m'assurer que les phénotypes observés chez le mutant *adsl-1(Δ)* sont causés par la perte de fonction de *adsl-1*, j'ai réalisé un sauvetage.

Pour cela, j'ai cloné la totalité du gène *adsl-1* entouré d'environ 1 kb (kilobase) en amont du codon START et environ 1 kb en aval du codon STOP d'*adsl-1* – provenant d'ADN génomique du *C. elegans* - dans un plasmide. Ce plasmide est micro-injecté dans la partie syncytiale de la gonade femelle de nématodes hermaphrodites au stade jeune adulte. Le plasmide se retrouve libre dans le cytoplasme du syncytium et va pouvoir aller dans les noyaux sous forme d'extra-chromosome. Le nématode injecté va ensuite pondre des embryons qui auront le plasmide contenant la forme sauvage de *adsl-1* (appelé *adsl-1(WT)*) qui pourra être transcrit et traduit. La présence du plasmide sera testée et vérifiée par PCR.

Après avoir testé différentes stratégies (concentrations différentes de plasmide contenant *adsl-1(WT)*), injection de nématodes sauvages puis croisement avec la souche hétérozygotes *adsl-1(Δ)/hT2::GFP* afin d'obtenir dans la descendance des homozygotes *adsl-1(Δ)* ayant le plasmide *adsl-1(WT)* et injection de nématodes hétérozygotes *adsl-1(WT)/adsl-1(Δ)*, j'ai obtenu sept clones indépendants - issus des différentes stratégies - homozygotes *adsl-1(Δ)* portant le transgène *adsl-1(WT)* et ayant un sauvetage. Ces clones ont effectivement produit quelques descendants viables, une dizaine environ. Ainsi, le transgène *adsl-1(WT)* a permis le sauvetage de la stérilité et le sauvetage partiel de la lignée germinale. De plus, les clones transgéniques *adsl-1(WT)* sauvés ont une morphologie similaire à celle de la souche sauvage et ne présentent pas de défaut de la vulve. Il y a donc aussi un sauvetage du phénotype de taille et de vulve. Cependant, les dizaines de descendants produits sont stériles. En effet, les ADN extra-chromosomaux sont très mal transmis à la descendance. Ainsi, malheureusement, je n'ai pas pu caractériser plus en détails ces différents clones.

En conclusion, j'ai réussi à sauver les phénotypes de stérilité, de vulve et de taille du mutant *adsl-1(Δ)* par micro-injection du transgène *adsl-1(WT)*. Il s'agit d'un sauvetage partiel concernant la lignée germinale puisque seule une dizaine de descendants viables a été produit. L'ARN interférence de *adsl-1* conduit à des phénotypes qui sont partagés avec la souche mutante *adsl-1(Δ)*. Ceci nous permet donc d'affirmer que les phénotypes observés chez le mutant *adsl-1(Δ)* sont effectivement causés par la perte de fonction de ADSL et non pas par une mutation autre dans le fond génétique que je n'aurais pas réussi à exclure par outcross.

### III. Discussion

L'objectif de ce travail de thèse était d'établir le nématode *Caenorhabditis elegans* comme modèle animal pour étudier les liens entre la déficience enzymatique en ADSL et les symptômes observés chez les patients déficients dans cette même enzyme.

Pour cela, nous avons dans un premier temps identifié les gènes de la voie de biosynthèse des purines chez *C. elegans* par des homologues de séquence avec 2 espèces différentes : la levure *S. cerevisiae* et l'Homme. Contrairement à la levure, nous n'avons pu trouver qu'un seul gène homologue pour chaque enzyme (sauf pour la Xanthine Oxydase qui est codée par 3 gènes chez *C. elegans*) et pas de voie de biosynthèse de l'Histidine (voie produisant du ZMP chez la levure) (Figure 2).

Une analyse fonctionnelle des gènes de la voie ainsi identifiés m'a permis de montrer que le mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) a un profil métabolique similaire à celui de la souche sauvage, que le mutant *atic-1*( $\Delta$ ) accumule du ZMP et le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) accumule du SZMP et du SAMP comme attendu. *ppat-1*, *atic-1* et *adsl-1* codent donc effectivement pour les enzymes GPPAT, ATIC et ADSL respectivement et ont une activité conservée (Figure 14).

Par la suite, grâce à une analyse phénotypique des mutants de la voie de biosynthèse des purines et grâce à des analyses des relations d'épistasie, j'ai pu séparer les causes de certains des phénotypes observés au cours de cette étude. En effet, j'ai pu montrer que l'accumulation de SZMP (substrat d'ADSL dans la voie *de novo*) semblait réduire la longévité des nématodes et que l'accumulation de ZMP (substrat d'ATIC) entraîne une baisse de fertilité et est probablement à l'origine d'un défaut de motricité. En revanche, les phénotypes les plus sévères tels que la stérilité, l'absence de lignée germinale, la vulve protubérante, la motricité, le défaut de structure du muscle et le développement post-embryonnaire sont tous liés à la déficience en ADSL au niveau de la voie de recyclage et ne sont pas partagés avec *ppat-1*( $\Delta$ ) et *atic-1*( $\Delta$ ).

Ceci suggère donc que la conversion du SAMP en AMP est une étape cruciale de la voie de biosynthèse des purines.

Cette étude servira de base de référence lors de l'étude des mécanismes sous-jacents à la déficience en ADSL et des phénotypes qui lui sont liés. Il faudra cependant faire attention lorsque des comparaisons entre la pathologie humaine et les phénotypes observés chez le nématode seront faites puisque l'Homme et le *C. elegans* ont une importante distance évolutive.

Afin de faciliter la lecture, il sera possible de se référer à la Figure 32 afin de visualiser les génotypes étudiés avec les phénotypes qui leur sont associés ainsi que les causes connues ou à tester.

## A. Voie des purines et lignée germinale

### 1. La déficience en ATIC responsable d'une baisse de fertilité

J'ai pu mettre en évidence une baisse de fertilité suite à la déficience en ATIC. En outre, grâce à une analyse des relations d'épistasie et une supplémentation en AICAR (forme riboside du ZMP) dans le milieu de culture des nématodes, j'ai pu montrer que c'est plus exactement l'accumulation de ZMP qui est responsable de ce phénotype.

Dans la littérature, plusieurs auteurs ont montré que l'utilisation d'AICAR *in vitro* augmentait la mobilité des spermatozoïdes ainsi que leur intégrité membranaire chez divers vertébrés permettant donc d'augmenter l'efficacité de la fécondation (Zhu *et al.* 2018 ; Thuwanut *et al.* 2019 ; Nguyen *et al.* 2015). Il a aussi été montré que des ovocytes de mammifères traités *in vitro* avec de l'AICAR voient leur capacité d'activation augmenter *via* notamment une activité mitochondriale optimale (Itami *et al.* 2018 ; Calder *et al.* 2017). Ces données montrent qu'un traitement à l'AICAR a un effet positif sur la fécondation *in vitro* chez les mammifères permettant potentiellement d'obtenir un plus grand nombre de descendants.

Chez *C. elegans*, l'accumulation de ZMP induit une diminution du nombre de descendants produits. Ainsi, les effets de l'adjonction d'AICAR *in vitro* sur des cellules germinales de mammifères et l'accumulation de ZMP chez *C. elegans* ne semblent pas impliquer les mêmes mécanismes.

Avec mes résultats actuels, nous ne connaissons pas l'origine de la baisse de fertilité du mutant *atic-1(Δ)*. Les ovocytes sont produits en excès chez *C. elegans* et la lignée germinale femelle est le seul tissu continuant de proliférer au stade adulte. J'ai observé, par comptage du nombre total d'embryons pondus, que le mutant *atic-1(Δ)* pond aussi longtemps que la souche sauvage et il en est de même pour les souches supplémentées avec de l'AICAR. Le mutant *atic-1(Δ)* et la souche sauvage pondent tous deux pendant environ 4 jours. La vitesse de prolifération des noyaux de la lignée germinale ne serait donc pas affectée. Cependant, le mutant *atic-1(Δ)* a une baisse de fertilité par rapport à la souche de référence. Nous n'avons pas de données concernant le nombre de spermatozoïdes. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que s'il y a une plus faible quantité de spermatozoïdes dans la spermathèque par rapport à la souche sauvage, les ovocytes la traversant seront moins facilement fécondés. Alors, des ovocytes seront expulsés par la mère et non pas des embryons. Il serait donc intéressant de réaliser un comptage du nombre de spermatozoïdes chez le mutant *atic-1(Δ)*.

Dans le cas où ce serait le nombre de spermatozoïdes qui est affecté, il serait intéressant de voir s'il existe un lien entre la déficience en ATIC, et notamment l'accumulation de ZMP, et les gènes impliqués dans la différenciation de la lignée germinale masculine. Chez le nématode, au cours du développement post-embryonnaire, la lignée germinale initie la spermatogenèse au stade L4 puis

commute vers l'ovogenèse au stade adulte. Pour la spermatogenèse, la protéine TRA-1A doit être dégradée pour permettre la production de spermatozoïdes. Pour cela, les FEMs vont servir d'adaptateur au système ubiquitine-protéasome qui va ainsi induire l'ubiquitylation et la dégradation de TRA-1A. Les FEMs peuvent jouer leurs rôles d'adaptateurs car TRA-2A est inhibée par la protéine HER-1 (HERmaphrodization) (Zarkower, 2006 ; Gilder *et al.* 2013 ; Starostina *et al.* 2007) (Figure 9). Ainsi, tester l'effet de l'accumulation de ZMP sur l'expression de ces gènes nous permettrait de mieux comprendre l'origine de la baisse de fertilité du mutant *atic-1(Δ)*.

Une autre hypothèse pouvant expliquer la baisse de fertilité du mutant *atic-1(Δ)* est qu'il pourrait y avoir un excès d'apoptose dans la lignée germinale de ce mutant. Il existe une apoptose « physiologique » étant à l'origine de l'élimination d'environ la moitié des noyaux de ce tissu. Il a été avancé que cette apoptose permettrait d'apporter les constituants cytoplasmiques nécessaires pour le développement des ovocytes restants (Gumienny *et al.* 1999). Il existe également une apoptose « non physiologique » chez le nématode. Nous pouvons donc nous demander si la baisse de fertilité du mutant *atic-1(Δ)* est due à une apoptose « non physiologique ».

La maintenance et la duplication correcte des informations génétiques sont constamment mises à l'épreuve par le stress génotoxique, qui peut résulter d'erreurs dans la réplication de l'ADN, d'incorporation erronée de nucléotides, de dommages oxydatifs, d'irradiation ou d'exposition à des produits chimiques génotoxiques. En réponse au stress génotoxique, les cellules activent les voies conservées de contrôle des dommages de l'ADN qui conduisent à la réparation de l'ADN, à un arrêt transitoire du cycle cellulaire ou à l'apoptose et à la disparition de cellules génétiquement endommagées. Comme dans le cas de l'apoptose « physiologique », seules les cellules germinales du stade pachytène subissent une apoptose en cas de stress et aucune apoptose induite par le stress n'a été observée dans la lignée germinale mâle (Gartner *et al.* 2000). L'accumulation de ZMP pourrait être génotoxique et ainsi induire une apoptose anormale dans la lignée germinale femelle. Des études ont montré que l'ajout d'AICAR (forme riboside du ZMP) induit des phénomènes d'apoptose, *via* l'AMPK en ce qui concerne des cultures de cellules de foie (Meisse *et al.* 2002) ou indépendamment de l'AMPK en ce qui concerne les MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts) (Gonzalez-Gironès *et al.* 2013). Il serait donc intéressant de savoir si le ZMP est aussi capable d'induire de l'apoptose dans la lignée germinale du nématode. Les cellules apoptotiques peuvent facilement être marquées *in vivo* à l'acridine orange qui va y détecter les acides nucléiques. Lorsque des cellules sont en apoptose, le marqueur devient alors diffus dans toute la cellule alors que des cellules « normales » vont avoir un marquage en « spot ». Dans le cas où l'hypothèse d'un excès d'apoptose dans la lignée germinale du mutant *atic-1(Δ)* serait validée, il sera ensuite possible d'élucider la voie apoptotique mise en place dans ce phénomène. En effet, les mécanismes de l'apoptose dans la lignée germinale du *C. elegans* sont très largement décrits dans la littérature (pour revue, Gartner *et al.* 2008).

Ces données peuvent représenter un enjeu pour les sportifs utilisant de l'AICAR à hautes doses afin d'améliorer leur performance physique ([https://www.lemonde.fr/sport/article/2015/03/09/dopage-ferrari-et-fuentes-toujours-actifs-dans-le-peloton\\_4589607\\_3242.html](https://www.lemonde.fr/sport/article/2015/03/09/dopage-ferrari-et-fuentes-toujours-actifs-dans-le-peloton_4589607_3242.html)). Bien que l'AICAR augmente l'endurance des souris (Narkar *et al.* 2008), j'ai montré que ce métabolite entraîne une baisse de fertilité chez le nématode *C. elegans*. Nous pouvons donc nous demander s'il en est de même chez les mammifères et notamment chez l'Homme. Nous pourrions également découvrir de nouvelles cibles du ZMP qui soient AMPK indépendantes.

## 2. Le recyclage des purines et le maintien des GSCs

Un phénotype important lié à la déficience en ADSL dans la voie de recyclage est la stérilité du mutant *adsl-1(Δ)* qui a une absence quasi totale de lignée germinale.

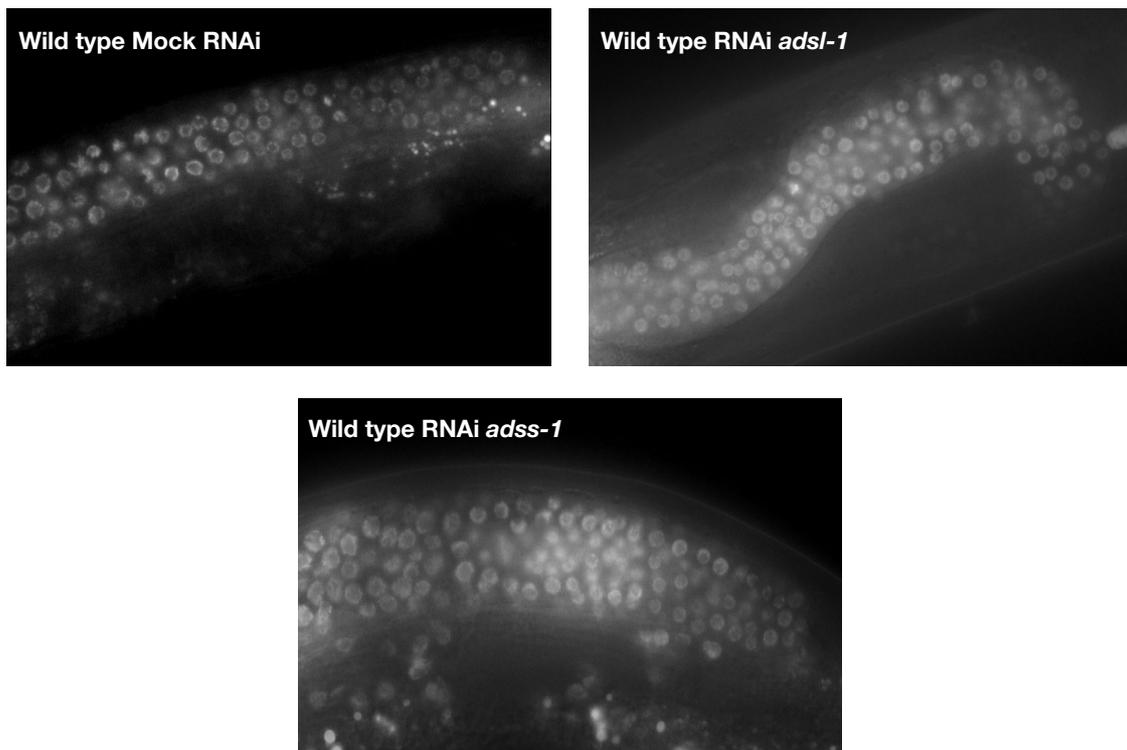
Comme nous l'avons vu plus haut, une déficience en pyrimidines (Chi *et al.* 2016) mais aussi une déficience en pyridines (Vrablik *et al.* 2009), dans la voie de recyclage dans les deux cas, entraîne un défaut de lignée germinale chez le nématode *C. elegans*. Ceci laisse donc penser que le métabolisme des nucléotides joue un rôle crucial dans le maintien du réservoir de GSCs. Cependant, la déficience en ADSL entraîne un phénotype plus sévère que dans le cas des déficiences en pyridines et pyrimidines. En effet, dans le cas de la déficience en pyridines, le mutant *pnc-1(-)* (mutant de la voie de recyclage) a un défaut de lignée germinale mais est malgré tout fertile. Quant au mutant *cdd-1/2(-)*, mutant de la voie des pyrimidines, celui-ci est stérile. De plus, il est possible de sauver ce phénotype en restaurant la prolifération des GSCs en ajoutant des pyrimidines dans le milieu de culture de ces nématodes. Dans notre cas, la supplémentation en purines (Adénine, Adénosine, Inosine et Hypoxanthine) dans le milieu de culture n'a pas eu d'effet sur la lignée germinale, ni chez le mutant *adsl-1(Δ)*, ni chez *adsl-1(RNAi)*. Le « manque » de produit final (AMP, ADP ou ATP) ne serait pas responsable de cette stérilité. Pour autant, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les défauts de lignées germinales observés chez ces trois mutants, *cdd-1/2(-)*, *pnc-1(-)* et *adsl-1(Δ)* ne soient pas liés. En effet, les trois voies métaboliques dans lesquelles ces gènes interviennent sont interconnectées. Ainsi, ces trois mutants pourraient partager un ou plusieurs mécanismes communs reliant ces trois voies. Si tel est le cas, alors la sévérité du phénotype du mutant *adsl-1(Δ)* pourrait s'expliquer par le fait que le principal défaut métabolique est dans la voie de biosynthèse des purines et que le défaut métabolique des deux autres voies a un retentissement indirect sur le métabolisme des purines.

Il est aussi possible que dans le cas de la déficience en ADSL (où la voie *de novo* et la voie de recyclage sont coupées), les noyaux de la lignée germinale entrent en méiose (qui est une forme de différenciation en ce qui concerne la lignée germinale du nématode) au dépend de la prolifération induisant un déficit du réservoir de GSCs et donc une absence quasi totale de lignée germinale femelle. Nos résultats laissent penser que la voie de recyclage des purines servirait de senseur du métabolisme afin de connaître l'état général des voies de synthèse des nucléotides et

d'envoyer un signal métabolique régulant la prolifération des GSCs. De plus, il est connu que la prolifération des GSCs est dépendante de facteurs environnementaux telle que la disponibilité en nutriments et que cette prolifération est certainement régulée par des signaux métaboliques (Hubbard *et al.* 2013). Il a aussi été montré que la voie de biosynthèse des purines joue un rôle dans la balance entre prolifération et différenciation chez les cellules souches et les cellules cancéreuses. En effet, une baisse de la synthèse des purines entraîne une différenciation plutôt d'une prolifération de ces cellules (Oburoglu *et al.* 2014 ; Tardito *et al.* 2015). Cette hypothèse de la dérégulation de la balance prolifération/différenciation concorderait avec les résultats montrant que le mutant *adsl-1(Δ)* a moins d'une dizaine de noyaux (par rapport aux 700 présents chez le sauvage) dans sa lignée germinale au stade adulte. Il serait donc intéressant de tester cette hypothèse en réalisant un immuno-marquage des cellules de la lignée germinale chez le mutant *adsl-1(Δ)* ou chez *adsl-1(RNAi)* (ce dernier ayant une lignée germinale plus abondante que le mutant nous permettrait d'avoir un plus grand nombre de noyaux marqués dans un même individu) avec les marqueurs spécifiques REC-8 (marqueur des noyaux mitotiques en prolifération ; Hansen *et al.* 2004) et HIM-3 (marqueur des noyaux méiotiques en différenciation ; Zetka *et al.* 1999).

La lignée germinale est le seul tissu à proliférer chez le nématode *C. elegans* au stade adulte. Nous pouvons donc imaginer qu'un bas niveau de purines induit une baisse d'expression de *glp-1* dans la région distale de la gonade et est à l'origine de la quasi absence de noyaux dans la lignée germinale du mutant *adsl-1(Δ)*. Effectivement, la prolifération de ce tissu est dépendante d'un signal GLP-1/Notch provenant de cellules somatiques au niveau de la partie distale de la gonade. Ce signal joue un rôle critique dans la prolifération mitotique de la lignée germinale (Austin et Kimble, 1987). Un bas niveau d'activité de cette voie est à l'origine d'une faible quantité de GSCs chez *C. elegans*. Il a également été montré qu'un bas niveau de pyrimidines et notamment d'Uridine/Thymidine entraîne une répression de l'expression de *glp-1* dans la région distale de la gonade (Chi *et al.* 2016). Or, comme nous l'avons vu plus haut, la voie des pyrimidines et la voie des purines sont interconnectées. Ainsi, pour tester l'hypothèse de l'influence d'un bas niveau de purines sur l'expression de *glp-1*, nous pourrions utiliser un mutant gain de fonction *glp-1(ar202)* (aussi noté *glp-1(gf)*). Ce mutant a été montré pour avoir une voie GLP-1/Notch constitutivement active à 25°C et induire une lignée germinale hyper-proliférative (Pepper *et al.* 2003). Ainsi, une analyse des relations d'épistasie entre *adsl-1* et *glp-1(gf)*, avec la création d'un double mutant *adsl-1(Δ) ; glp-1(gf)*, nous permettrait de savoir si la voie GLP-1/Notch joue un rôle majeur dans le sensing des purines. Si tel est le cas, alors nous devrions observer une restauration totale ou partielle du nombre de noyaux dans la lignée germinale. Cette hypothèse est corroborée par l'ARN interférent de *adss-1* qui, grâce au transgène *pie-1p::GFP::H2B*, a un plus faible nombre de noyaux GFP positifs que la souche sauvage pour la moitié des nématodes analysés (Figure 27). Or, ADSS est l'enzyme en amont d'ADSL permettant la conversion de l'IMP en SAMP et est donc nécessaire dans la voie dite « en aval » qui est

commune à la voie *de novo* et à la voie de recyclage des purines (Figure 2). La déficience en ADSS pourrait avoir des effets similaires à la déficience en ADSL avec notamment une baisse de la production de purines. Nous pouvons aussi penser que ce sensing du niveau de purines par GLP-1/Notch permet d'éviter la prolifération de cellules germinales aberrantes puisque les purines, tout comme les pyrimidines, sont essentielles pour la constitution de l'ADN et de l'ARN. Effectivement, ces deux types de molécules sont produites et requises en grande quantité lors de la prolifération cellulaire comme dans la lignée germinale.



**Figure 27 : Lignée germinale dans un contexte d'ARN interférent.** Images en fluorescence de nématodes exprimant *H2B::GFP* dans la lignée germinale sous le contrôle du promoteur *pie-1*.

Une étude récente a montré que LIN-42 (homologue de Period) est exprimée dans presque toutes les cellules somatiques y compris dans les cellules somatiques à l'extrémité distale de la gonade (autrement appelée DTC : Distal Tip Cell) (Berardi *et al.* 2018). Ces DTCs entourent la fin de la gonade distale et sont essentielles pour le maintien de la zone mitotique de la lignée germinale. Nous pouvons donc penser que LIN-42 est impliquée dans le phénotype de stérilité du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ). Effectivement, dans l'article de Berardi *et al.* (2018), les auteurs ont montré que des mutants de *lin-42* avaient une réduction de 25% de la zone proliférative dans la gonade *via* la régulation de l'expression du ligand LAG-2 de GLP-1/Notch. Les auteurs ont donc

montré un rôle nouveau de LIN-42 régulant le développement de la lignée germinale. Leurs résultats suggèrent aussi qu'en plus de réguler les rythmes comportementaux, l'horloge circadienne, notamment LIN-42, joue un rôle important dans la communication des signaux environnementaux aux voies essentielles pour la reproduction. Il serait donc intéressant d'étudier le lien, s'il existe, entre *lin-42* et *adsl-1*.

La balance prolifération/différenciation joue un rôle capital dans le développement et le maintien de la lignée germinale qui est le seul tissu à proliférer au stade adulte chez *C. elegans*. Ainsi, la lignée germinale de *C. elegans* peut être utilisée comme modèle pour étudier la balance prolifération/différenciation dans le contexte du cancer où ce mécanisme est largement affecté.

## **B. Métabolisme des purines et développement post-embryonnaire**

Comme nous l'avons vu, les métazoaires - dont le *C. elegans* - contrôlent leur développement en fonction des conditions environnementales et notamment de la disponibilité en nutriments (Cassada et Russell, 1975). Par exemple, chez le nématode, lorsque la quantité de nourriture est insuffisante, s'il y a sur-population ou même en cas de température trop importante, il existe un stade alternatif : le stade Dauer (Hu, 2007). Dans cet état, le nématode va stopper son développement et n'aura qu'une très petite lignée germinale (une dizaine de noyaux environ). Il aura une cuticule plus résistante aux agressions de l'environnement. Il est également connu que l'activation de la voie insulín/insulín-like entraîne une entrée constitutive en Dauer. Cet état alternatif est l'exemple le plus marquant du contrôle du développement *via* des régulations métaboliques.

### 1. Les purines et la taille

En 2016, Samuel *et al.* ont montré que la source de bactéries utilisée pour nourrir les vers pouvait avoir un effet sur le stress des animaux, les arrêts larvaires mais aussi sur le développement de la taille des nématodes. Ceci suggère donc que la taille est un phénotype pouvant être régulé métaboliquement.

Cette régulation de la taille peut se faire *via* une régulation du nombre des cellules ou bien par une régulation de la taille des cellules qui va dépendre de leur métabolisme. La taille réduite du mutant *adsl-1(Δ)* pourrait ainsi être liée à un défaut tissu spécifique.

D'après nos résultats, la lignée germinale et, parfois, la vulve sont affectées chez le mutant *adsl-1(Δ)*. Or, ces deux tissus n'ont pas d'effet sur la taille des nématodes puisque le mutant *glp-1(e2141)* n'a ni vulve protubérante ni lignée germinale au stade adulte et a pourtant une taille similaire à celle de la souche sauvage. Ceci suggère que le défaut de taille du mutant *adsl-1(Δ)* ne

serait pas lié au nombre de cellules qui le composent. Le tissu musculaire est également affecté chez le mutant *adsl-1(Δ)*. Nous avons pu voir que ce mutant avait une désorganisation de ses fibres de myosine et que celles-ci semblent moins abondantes à partir du stade L3. Le défaut de taille apparaît 48H après l'éclosion, ce qui correspond au stade L3 lorsque nous prenons les données obtenues par luminométrie. Dans la littérature, le mutant *hlh-1(cc450)* montre lui aussi un défaut d'organisation des fibres de myosine dans le muscle strié et un défaut de taille au stade adulte (Chen *et al.* 1994). Dans le tissu musculaire du mutant *adsl-1(Δ)*, les fibres de myosine étant moins nombreuses, nous pouvons donc nous demander si, finalement, le défaut de taille ce mutant est lié au nombre de cellules musculaires.

Un autre aspect concernant le défaut de taille lié à la déficience en ADSL est que ce défaut n'apparaît que 48 heures après l'éclosion des embryons. Ceci laisse penser que, pendant le développement embryonnaire, la déficience en ADSL n'a pas d'effet sur le développement de la taille. Ainsi, il est possible que l'apport maternel en enzyme ADSL soit suffisant pour subvenir au besoin du zygote tout au long de l'embryogenèse puis pendant les stades L1 et L2. Une autre hypothèse est qu'il existe un changement métabolique important au cours des premiers stades larvaires nécessitant une activité ADSL plus importante que pendant le développement embryonnaire. Il serait donc intéressant de connaître l'expression spatio-temporelle d'*adsl-1* et d'étudier le statut métabolique du mutant *adsl-1(Δ)* au cours du développement embryonnaire et post-embryonnaire.

## 2. La voie de recyclage et la vitesse de développement post-embryonnaire

En plus du défaut de taille, le mutant *adsl-1(Δ)* a un important retard de développement post-embryonnaire. Il est possible qu'ici aussi la voie de biosynthèse des purines, et notamment la disponibilité en intermédiaires et/ou produits finaux de cette voie, serve de senseur de l'environnement. En effet, dans la littérature, il a été montré que tant la qualité de la nourriture que sa quantité pouvait avoir un effet sur la durée du développement post-embryonnaire (Houthoofd *et al.* 2002 ; MacNeil *et al.* 2013). Face au défaut métabolique du mutant *adsl-1(Δ)*, il peut donc y avoir une régulation négative de la durée du développement post-embryonnaire chez *adsl-1(Δ)*. Tester la vitesse du développement post-embryonnaire d'autres mutants de la voie de recyclage des purines ayant un important défaut métabolique serait donc informatif pour tester cette hypothèse.

Une autre hypothèse pour expliquer ce retard de développement post-embryonnaire concerne LIN-42. LIN-42 est l'orthologue de la protéine circadienne PERIOD et est impliquée dans la voie des gènes dit « hétérochroniques » qui régulent notamment la durée relative des événements du développement post-embryonnaire, les stades larvaires et la mue (Monsalve *et al.* 2011). Lors de mon analyse de luminométrie, une grande partie (non quantifiée, données non montrées) des homozygotes *adsl-1(Δ)* ne semble pas atteindre le stade adulte mais plutôt

s'arrêter dans un stade larvaire en amont, en devenant de plus en plus asynchrones. Edelman *et al.* (2016) ont montré que *lin-42* n'était pas essentiel pendant le développement embryonnaire mais que 75% des animaux mutants nuls pour ce gène ne parvenaient pas à atteindre le stade adulte. Le retard de développement post-embryonnaire du mutant nul *lin-42(0)* est similaire à celui du mutant *adsl-1(Δ)* puisque plus on progresse dans le développement post-embryonnaire, plus le retard de développement de ce mutant est prononcé. En outre, *lin-42(0)* met plus de 24H avant de commencer la quatrième et dernière mue. Il en est de même pour le mutant *adsl-1(Δ)*. A la vue des caractéristiques partagées concernant le phénotype de développement post-embryonnaire par les mutants *adsl-1(Δ)* et *lin-42(0)*, nous pouvons nous demander si la déficience en ADSL, au niveau de la voie de recyclage, entraîne une perturbation de la régulation de la durée du développement post-embryonnaire *via* le gène hétérochronique *lin-42*.

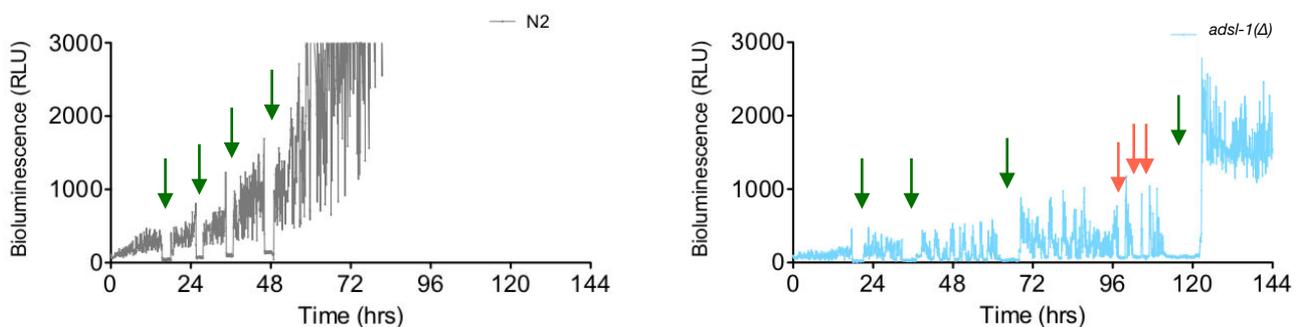
Le mutant *adsl-1(Δ)* met environ 5 jours pour atteindre le stade adulte. Précédemment, nous avons évoqué le rôle potentiel de *hlh-1* dans le défaut de taille du mutant *adsl-1(Δ)*. Il faut aussi noter que lors que la caractérisation du mutant *hlh-1(cc450)*, il a été observé un développement post-embryonnaire ralenti avec une croissance à travers les stades larvaires très lente puisque les nématodes mettent entre 4 et 6 jours pour atteindre le stade adulte (Chen *et al.* 1994). *hlh-1* pourrait donc être lui aussi impliqué dans la régulation de la vitesse du développement post-embryonnaire.

### 3. La transition stade L4 vers le stade adulte : la phase de léthargie

Comme nous l'avons vu, le mutant *adsl-1(Δ)* a un important retard de développement puisque chacun des stades larvaires mais aussi chaque phases de léthargie durent plus longtemps que ce qu'on observe dans la souche sauvage. Un autre aspect que nous n'avons pas évoqué précédemment est que, lors de nos expériences de luminométrie, j'ai pu voir qu'avant la quatrième phase de léthargie il y avait des « pseudo-léthargies ». Ces « pseudo-léthargies » sont de courte durée et peuvent avoir lieu plusieurs fois avant la « vraie » phase de léthargie (Figure 28). J'ai pu observer ces phénomènes uniquement chez les mutants *adsl-1(Δ)* et *ppat-1(Δ)* ; *adsl-1(Δ)*.

Chez *C. elegans*, les phases de léthargies sont considérées comme des phases de quiescence pendant lesquelles les nématodes cessent de se nourrir et cessent toutes activités de locomotion. Ces phases sont aussi assimilées au sommeil. Tout comme le sommeil, la tranquillité est un comportement complexe qui dépend de plusieurs processus, notamment du seuil d'éveil et de la cessation d'activité. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la quiescence est régulée par la voie des purines. Le modèle de Singh *et al.* (2011) propose que les niveaux de signalisation Notch sont directement corrélés aux niveaux d'excitation au cours de la transition quatrième mue/stade adulte puisque l'augmentation des seuils d'excitation entraîne une quiescence inappropriée accrue. Les auteurs suggèrent qu'une augmentation de l'activité basale et/ou une diminution des

seuils d'éveil ont entraîné un phénomène de compensation au cours duquel les animaux ont augmenté la quiescence pour compenser la qualité médiocre du sommeil. Des études précédentes avaient identifié deux voies de signalisation régulant la quiescence chez *C. elegans* : les voies EGF et PKG (Raizen *et al.* 2008 ; Van Buskirk *et al.* 2007). *egl-4*, de la voie PKG, fonctionne en aval de la signalisation EGF puisque la perte de *egl-4* prévient une quiescence inappropriée provoquée par la suppression de *lin-3*, de la voie EGF. Avec l'ensemble de leurs données, les auteurs suggèrent qu'il pourrait y avoir une diapason/rétro-action entre les voies de signalisation Notch et EGF (Singh *et al.* 2011). Ainsi, nous pouvons imaginer qu'il existe une régulation de ces deux voies de signalisation par la voie de biosynthèse des purines qui pourrait servir de senseur métabolique.



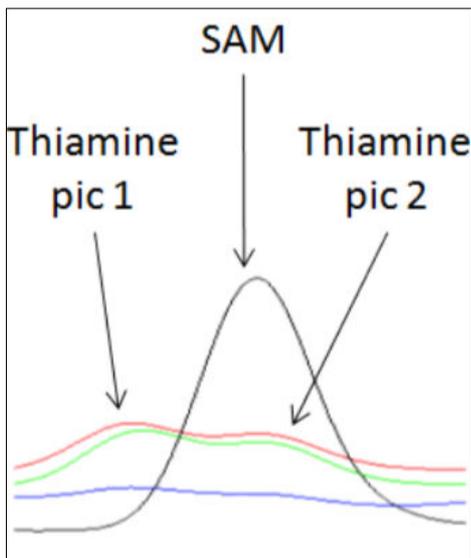
**Figure 28 : La bioluminescence au cours des phases de développement post-embryonnaire.** Profils de bioluminescence d'un seul individu de type sauvage (à gauche, en noir) et d'un mutant *adsl-1(Δ)* (à droite, en bleu). Les flèches vertes pointent les phases de léthargie « normales », les flèches rouge pointent les phases de « pseudo-léthargie ».

#### 4. ADSL pendant le développement embryonnaire

Au cours de cette étude, je me suis également demandée si ADSL pouvait avoir un rôle pendant le développement embryonnaire. Si tel était le cas, nous aurions eu une plus importante létalité embryonnaire dans le contexte d'une ARN interférence de *adsl-1* qui soit plus efficace que ce que vous avons obtenu dans cette étude. Cependant, si cette RNAi était trop pénétrante, nous risquions alors de nous retrouver dans le cas des homozygotes *adsl-1(Δ)* qui sont stériles et ne produisent pas d'embryons.

Puisque la plupart des individus homozygotes *adsl-1(Δ)* sont viables et puisque l'ARN interférant induit une létalité embryonnaire, il est donc possible que la fonction de *adsl-1* soit requise pendant le développement embryonnaire à proprement parler, probablement grâce à une

contribution maternelle notamment. En effet, les individus homozygotes *adsl-1*( $\Delta$ ) proviennent tous d'individus hétérozygotes portant une copie sauvage d'*adsl-1*. Les parents peuvent donc fournir des ARNm sauvage à leurs descendants. Dans le cas de l'ARN interférant, il y a une baisse du produit maternel et donc une baisse de la contribution maternelle. Ce résultat est donc surprenant puisqu'il n'y a pas d'augmentation de la létalité embryonnaire dans le cas de l'ARN interférant.



**Figure 29 : Profil métabolomique obtenu par HPLC de la souche sauvage au cours du développement.** Zoom sur la partie du chromatogramme présentant une variation métabolique au cours du développement. En noir, stade embryonnaire. En bleu, stade L1/L2. En vert, stade L3/L4. En rouge, stade adulte.

Dans le cas d'une contribution maternelle de ADSL au cours du développement embryonnaire, une modification du profil métabolique lors du passage vers le développement post-embryonnaire pourrait être attendue. Effectivement, ADSL a un rôle à la fois dans la voie *de novo* et dans la voie de recyclage des purines et sa déficience est à l'origine de plusieurs phénotypes, que nous avons décrits plus haut (récapitulés en figure 32), n'apparaissant qu'après le stade L1. Il pourrait être intéressant de regarder les profils métaboliques de la souche sauvage et du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) au stade embryonnaire puis pendant le développement post-embryonnaire afin de voir s'il existe des variations de métabolites entre les différents stades et entre ces deux souches de nématodes. Un travail préliminaire réalisé sur la souche sauvage a montré une forte concentration de SAM (S-adénosylméthionine) chez les embryons uniquement (Figure 29). La SAM est un métabolite qui est principalement impliqué dans les réactions de transfert de méthyle. Elle est synthétisée à partir de l'ATP (produit de la voie de biosynthèse des purines) et de la méthionine. La SAM est utilisée comme substrat par les ADN méthyltransférases ou les histones méthyltransférases. Ainsi, elle est essentielle dans la régulation de l'expression génique. Etant donné le besoin en ATP pour produire cette molécule, nous pouvons penser qu'une perturbation de la voie de biosynthèse des purines pendant le développement embryonnaire puisse être à l'origine de perturbations importantes dans l'expression de gènes impliqués dans le développement post-embryonnaire, la lignée germinale ou le muscle.

Cependant, à l'éclosion, le mutant *adsl-1(Δ)* semble similaire à la souche sauvage pour les phénotypes que nous avons étudiés. Nous pouvons donc imaginer qu'il existe un ou plusieurs autres métabolites qui varient différemment au cours de développement post-embryonnaire entre la souche sauvage et le mutant *adsl-1(Δ)* et étant à l'origine des défauts de ce mutant.

## 5. Développement et disponibilité en ATP

Enfin, une possibilité pouvant expliquer les différents phénotypes de développement observés chez le mutant *adsl-1(Δ)* est la quantité limitante d'ATP.

Suite à une collaboration et à un séjour dans le laboratoire de Marta Artal Sanz à Séville, Rodriguez-Palero *et al.* en 2018 ont montré que chez le mutant *adsl-1(Δ)* la quantité de nourriture « avalée » était inférieure à celle de la souche sauvage. Dans ce cas, c'est l'ensemble des nutriments qui est affecté et non pas uniquement la quantité d'ATP disponible. Or, il est connu que ces deux facteurs peuvent avoir des effets tant sur la taille que sur la vitesse de développement des nématodes. Cependant, les mutants *eat*, ayant un défaut au niveau du pharynx les empêchant de se nourrir correctement, n'ont pas systématiquement de défaut de développement (données non publiées de Maria Olmedo et Marta Artal Sanz) alors qu'ils ont effectivement un défaut de consommation de la nourriture. De plus, nos analyses par HPLC montrent une baisse modeste de la quantité d'ATP chez *adsl-1(RNAi)* comparée à la souche sauvage. Effectivement, l'ATP peut être produit à partir d'Adénine ou d'Adénosine présentes en grande quantité chez les bactéries servant de source alimentaire et pourront être converties directement en AMP par les enzymes APRT et ADK respectivement (Figure 11B).

L'ensemble de ces données laisse penser que les phénotypes de développement post-embryonnaire ne sont pas liés à la production des produits finaux mais plutôt à la fonction de senseur de l'environnement des métabolites intermédiaires et finaux.

Nous avons vu que la voie de biosynthèse des purines pourrait avoir un effet sur la voie des gènes hétérochroniques avec *lin-42* pendant le développement post-embryonnaire, sur la voie GLP-1/Notch pour le développement de la lignée germinale et la vitesse de développement, sur *hh-1* pour le développement de la taille et le muscle ou encore sur la voie de détermination sexuelle. L'ATP, quant à lui, fournit l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme, pour la locomotion, les divisions cellulaires, etc... Il est le précurseur de co-facteurs enzymatiques comme le NAD<sup>+</sup> (Nicotinamide adénine dinucléotide) ou le Co-enzyme A. Il est aussi essentiel pour les kinases lors des réactions de phosphorylation intervenant dans de nombreuses voies de signalisations cellulaires, entre autres. L'ATP joue un rôle central dans la vie de la cellule. Ainsi, une baisse de sa concentration, même modeste, combinée à la fonction de senseur des métabolites de la voie dont il est produit, pourrait avoir un effet cumulatif à l'origine des phénotypes sévères observés dans la déficience en ADSL.

## C. ZMP et SZMP et longévité

J'ai pu montrer, dans cette étude, que l'accumulation de ZMP (substrat d'ATIC) ne semblait pas induire d'augmentation de longévité contrairement à ce qui aurait pu être attendu. En effet, Mair *et al.* (2011) ont montré que la sur-activation de l'AMPK chez *C. elegans* induit une augmentation de la durée de vie des nématodes. Or, il est connu que le ZMP est capable d'activer l'AMPK (Corton *et al.* 1995). J'ai également montré que l'accumulation de SZMP (substrat d'ADSL dans la voie *de novo*), quant à elle, réduit fortement la longévité du mutant *adsl-1(Δ)*.

### 1. L'accumulation de ZMP et la longévité

Le mutant *atic-1(Δ)* accumule du ZMP (résultats obtenus par analyse HPLC, figure 14). Ainsi, la longévité du mutant *atic-1(Δ)*, qui est similaire à celle de la souche sauvage, est surprenante. En effet, à la vue de l'accumulation de ZMP, nous aurions pu nous attendre à une augmentation de la durée de vie de ce mutant grâce à une sur-activation de l'AMPK. Ce métabolite est connu pour être capable de mimer l'AMP et donc d'activer l'AMPK (il est d'ailleurs couramment utilisé en laboratoire dans ce but). A l'inverse, l'AMPK peut être inhibée par l'ATP par compétition avec l'AMP (ou le ZMP) pour un même site de fixation sur la sous-unité  $\gamma$  (sous-unité régulatrice) de l'AMPK. Lorsque l'AMPK est activée, les réactions métaboliques productrices d'ATP sont ainsi favorisées alors que les réactions anaboliques consommant de l'ATP sont inhibées. Ceci permet donc de réajuster la balance énergétique de la cellule. Chez le nématode *C. elegans*, des mutants pour une des deux sous-unités catalytiques de l'AMPK ont une longévité diminuée (Lee *et al.* 2012). L'AMPK joue un rôle clé dans la longévité du nématode.

Il est donc possible que le ZMP du mutant *atic-1(Δ)* ne s'accumule pas dans les mêmes cellules et/ou pas au même moment que l'AMPK. De plus, comme nous l'avons vu dans la partie I. A. 3., le ZMP a aussi des effets AMPK indépendant qui sont potentiellement en jeu dans ce phénotype de longévité.

Par ailleurs, Gao *et al.* (2018) ont réalisé des analyses transcriptomiques et métabolomiques sur les mutants *daf-2* et *eat-2* de nématodes afin de mettre en évidence les voies clés et les empreintes métaboliques impliquées dans la durée de vie chez *C. elegans*. Le mutant *eat-2* est utilisé comme modèle de restriction calorique puisque ce mutant a un défaut au niveau de son pharynx l'empêchant de se nourrir correctement et a une longévité augmentée (Houtkooper *et al.* 2010). *daf-2*, homologue de insulín/insulín like growth factor (IGF) des mammifères, et ses mécanismes de régulations sont impliqués dans la longévité et sont très conservés dans de nombreuses espèces, incluant la levure, la drosophile, la souris ou encore l'Homme (Kenyon *et al.* 2011). Un mutant *daf-2* de *C. elegans* a aussi une longévité augmentée par rapport à la souche sauvage N2. Dans l'étude de Gao *et al.* en 2018, les mutants *daf-2* et

*eat-2* présentent une augmentation de l'expression de tous les gènes de la voie de biosynthèse *de novo* des purines y compris *atic-1*. Nous pouvons penser, qu'à l'inverse, une baisse de la longévité serait associée avec une baisse de l'expression de ces gènes, ce qui est le cas chez le mutant *atic-1(Δ)*, KO pour ce gène de la voie *de novo* des purines.

Face à ces données, nous pouvons imaginer que la longévité du mutant *atic-1(Δ)*, qui est similaire à celle de la souche sauvage, soit due à des effets antagonistes avec le ZMP qui suractive l'AMPK et promouvant la longévité alors que l'absence d'expression de *atic-1* pourrait la réduire.

## 2. L'accumulation de SZMP et la longévité

En ce qui concerne le mutant *adsl-1(Δ)*, j'ai pu montrer que l'accumulation de SZMP dans la voie *de novo* semblait être à l'origine de la baisse de durée de vie de ce mutant. Ce résultat est en corrélation avec les données de Rébora *et al.* (2005) qui montraient que l'accumulation de cet intermédiaire chez la levure *S. cerevisiae* est toxique.

Afin de vérifier que l'accumulation de SZMP cause la baisse de longévité du mutant *adsl-1(Δ)*, il a été envisagé une supplémentation en SAICAR (forme riboside du SZMP) dans le milieu de culture des nématodes. Ce métabolite n'est malheureusement pas disponible commercialement. En outre, il s'agit d'un composé peu soluble sous sa forme riboside. Afin de contourner ce problème, j'ai tenté de nourrir les nématodes avec une souche de bactérie mutante pour *PurB*, orthologue d'*adsl-1*, accumulant du SZMP. Lors de mes expériences, je me suis alors rendue compte que le mutant *adsl-1(Δ)* ne présentait plus de défaut de longévité par rapport à la souche sauvage (Figure 30). La souche de bactérie utilisée n'est pas une *E. coli* OP50, utilisée classiquement, mais une MG1655 qui n'a pas le même profil métabolique obtenu par HPLC (données non montrées). La comparaison des profils métaboliques entre ces deux souches de bactéries montre, par exemple, que OP50 a des pics de GMP, GDP, GTP et CDP qui sont absents chez MG1655. Or, il est connu, dans la littérature, que la source alimentaire des nématodes peut changer leurs phénotypes (Watson *et al.* 2014), phénomène que nous observons entre OP50 et MG1655. Ainsi, je n'ai pas pu pousser plus loin mes tests concernant l'effet du SZMP sur la durée de vie des nématodes.

Le double mutant *ppat-1(Δ)* ; *adsl-1(Δ)* - n'accumulant pas de SZMP - est stérile. Il a également été montré que des nématodes ayant subi une ablation de la lignée germinale au laser - animaux rendus stériles - ont une longévité supérieure à celle de la souche sauvage (Hsin et Kenyon, 1999). Ainsi, ce double mutant aurait pu avoir une longévité supérieure à celle de la souche de référence. Or, dans notre étude, ce double mutant a une longévité similaire à celle de la souche sauvage. Ainsi, il nous faut envisager que l'accumulation de SAMP (substrat d'ADSL dans la voie de recyclage) observée dans ce double mutant puisse avoir un effet sur la longévité des

nématodes. Une analyse des relations d'épistasie avec un mutant de *adss-1* dans la voie de recyclage est donc à envisager afin de tester cette hypothèse. Effectivement, un tel mutant n'accumule ni SZMP, ni SAMP, tout en coupant la voie de recyclage des purines (Figure 2A). Une analyse de la longévité de ce mutant et d'un double mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adss-1*( $\Delta$ ) nous donnerait de précieuses informations concernant le SAMP et ces effets lorsqu'il s'accumule.

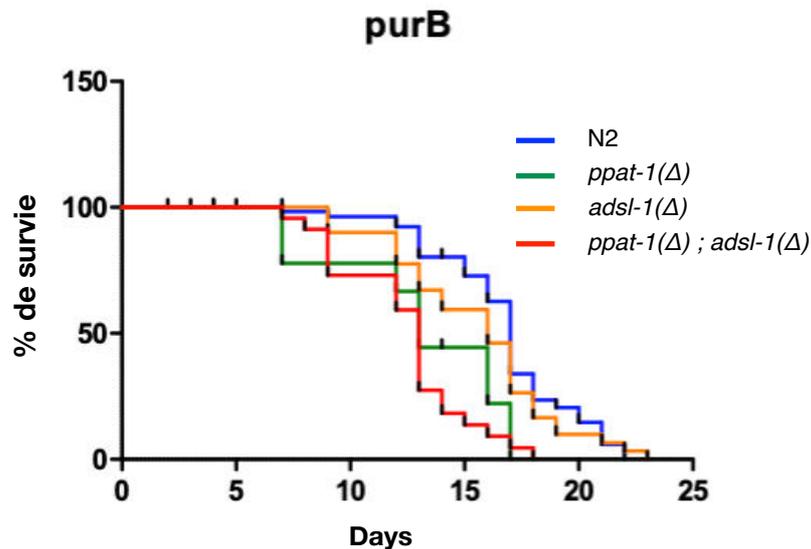


Figure 30 : La longévité du *C. elegans* nourri avec une *E. coli* MG1655. Graphique illustrant la fraction de vers vivants au cours du temps nourris avec une bactérie *E. coli* MG1655 (type sauvage n = 310, *ppat-1*( $\Delta$ ) n = 298, *adsl-1*( $\Delta$ ) n = 186, *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *adsl-1*( $\Delta$ ) n = 151).

## D. Métabolisme des purines et fonction neuro-musculaire

Chez les patients atteints de déficience en ADSL, mais aussi de façon plus large, chez les patients ayant des pathologies liées à des perturbations de la voie de biosynthèse des purines, les principaux symptômes sont neuro-psychomoteurs (Tableau 1). En effet, ils présentent la plupart du temps des hypotonies, des retards mentaux, une ataxie, des troubles comportementaux, etc... Ceci suggère donc que le système nerveux et le muscle sont deux tissus particulièrement sensibles aux variations, et notamment aux déficiences enzymatiques, de la voie de biosynthèse des purines. C'est pourquoi j'ai porté un intérêt particulier sur ces deux tissus.

### 1. La fonction neuronale et les déficiences en ATIC et ADSL

Dans cette étude, j'ai voulu savoir si la fonction neuronale des nématodes ayant une perturbation de la voie de biosynthèse des purines présentait des défauts.

Pour cela, j'ai dans un premier temps utilisé deux drogues afin de tester la jonction neuro-musculaire. De façon surprenante, mes résultats montrent qu'avec chacune des deux drogues, Aldicarb et Lévamisole, les mutants de la voie de biosynthèse des purines y sont tous sensibles de la même façon que la souche sauvage. Ceci signifie donc que la jonction neuro-musculaire est fonctionnelle chez les mutants que nous avons étudiés.

Par la suite, j'ai testé la fonction neuronale globale à l'aide d'un test du toucher faisant intervenir des schémas complexes puisqu'il s'agit de mécano-sensation et de réponses comportementales. De façon inattendue, je n'ai pas vu de défauts de réactions au toucher chez les mutants que nous étudions comparés à la souche sauvage.

Ainsi, la fonction neuronale ne semble simplement pas affectée - avec les tests que j'ai réalisés - lorsqu'il y a une perturbation de la voie de biosynthèse des purines chez *C. elegans*.

Ces résultats sont surprenants à la vue du défaut de motricité observé chez les mutants *adsl-1(Δ)* et *ppat-1(Δ)* ; *adsl-1(Δ)*. Cependant, le premier test permet d'évaluer la fonction des jonctions synaptiques cholinergiques uniquement puisque l'Aldicarb et le Lévamisole leurs sont spécifiques. En effet, il existe un autre type de synapses au niveau de la JNM chez le nématode, les synapses GABAergiques, qui n'ont pas été testées dans notre étude.

En outre, je n'ai pas évalué l'intégrité neuronale directement. Il est donc possible que les mutants que nous étudions aient, malgré tout, des défauts neuronaux que je n'ai pas pu détecter à l'aide des tests que j'ai réalisés dans cette étude.

Un préprint de Lakhina *et al.* (2019) tend à montrer qu'un traitement à l'acide folique pourrait augmenter la régénération axonale. De plus, il est connu que pour certaines étapes de la voie *de novo* de biosynthèse des purines, il y a utilisation d'intermédiaires de la voie des folates comme donneur de formyl. Dans ce préprint, les auteurs montrent que lorsqu'on réalise une RNAi d'*adsl-1* cela entraînerait une baisse de la régénération axonale. Ces données suggèrent que les folates sont limitants dans la synthèse des intermédiaires de la voie *de novo* des purines, voie qui serait elle-même impliquée dans la régénération des neurones. Ainsi, nous pouvons envisager que le mutant *adsl-1(Δ)* présente des défauts dans la régénération de ses neurones, défauts que je n'ai pas pu évaluer avec les tests que j'ai réalisés.

## 2. La fonction musculaire et les déficiences en ATIC et ADSL au stade adulte

La fonction neuronale ne semblant pas affectée chez les mutants, que nous étudions, de la voie de biosynthèse des purines, je me suis intéressée à la fonction motrice de ces nématodes. Pour cela, j'ai dans un premier temps mesuré la vitesse de déplacement puis analysé la structure du muscle strié de la paroi du corps.

## 1. La déficience en ATIC et la motricité

Dans le cas de la déficience en ATIC, j'ai observé un défaut de motricité du mutant *atic-1(Δ)* de *C. elegans*. Or, ce défaut était restauré chez le double mutant *ppat-1(Δ) ; atic-1(Δ)*. Ceci laisse penser que le défaut de motricité est causé par l'accumulation de ZMP qui a lieu chez le mutant *atic-1(Δ)* (Figure 13).

Dans le cas du mutant *atic-1(Δ)*, j'ai un résultat à l'inverse de ce que nous aurions pu attendre puisque la motricité de ce mutant est diminuée par rapport à celle de la souche sauvage. Ce résultat est surprenant puisqu'il a été montré que des souris traitées par une prise quotidienne d'AICAR (forme riboside du ZMP capable d'être internalisée et phosphorylée en ZMP) augmente de 44% l'endurance des rongeurs (Narkar *et al.* 2008). De plus, des nématodes cultivés avec de l'AICAR montrent une diminution du stockage des lipides (Moreno-Arriola *et al.* 2016) alors que des drosophiles vont montrer une meilleure résistance à l'anoxie (Vigne *et al.* 2009). L'AICAR a aussi été montré pour réduire les ischémies du myocarde dans plusieurs modèles mammifères (Lemieux *et al.* 2011 ; Mullane *et al.* 1993). Ceci a fait de l'AICAR « la pilule de l'exercice ». Par ailleurs, l'AICAR est utilisé comme agent dopant par certains sportifs et est interdit par l'Agence Mondiale Antidopage lors des compétitions.

C'est pourquoi, j'ai supplémenté le milieu des nématodes avec de l'AICAR puis mesuré leur vitesse de déplacement. Mes résultats ont montré que, suite à ce traitement, il n'y a pas de différence significative entre des nématodes traités avec ou sans AICAR alors que ce métabolite est bien internalisé et phosphorylé en ZMP. Ces résultats suggèrent que l'ajout d'AICAR dans le milieu de culture n'a pas les mêmes effets que l'accumulation du ZMP endogène. Il est possible que le ZMP endogène du mutant *atic-1(Δ)* affecte le muscle et donc la motricité alors que l'AICAR exogène, qui est certes internalisé et phosphorylé en ZMP, n'arrive pas jusqu'au tissu musculaire. Mon analyse par HPLC se fait sur le corps entier du nématode. Ainsi, je peux effectivement détecter une accumulation de ZMP lorsqu'il y a une supplémentation en AICAR mais je ne pas savoir si cette accumulation a lieu de la même façon dans tous les types tissulaires et/ou cellulaires.

Nous pouvons aussi imaginer que le ZMP a des effets AMPK indépendants, dans le tissu musculaire, qui ne sont pas encore connus.

Il faut aussi noter que le traitement à l'AICAR ne semble pas avoir d'effet sur la quantité d'ATP dans les différents génotypes. Cependant, ce traitement entraîne une augmentation de l'acide urique, notamment chez les mutants *atic-1(Δ)* et *ppat-1(Δ) ; atic-1(Δ)*. Dans la littérature, il a été montré qu'un taux élevé d'acide urique entraîne une sarcopénie et donc une baisse des capacités musculaires chez l'Homme (Beavers *et al.* 2009). L'accumulation de ce métabolite chez le nématode ne semble pas être à l'origine d'un défaut de motricité puisque, lorsqu'il s'accumule chez le double mutant *ppat-1(Δ) ; atic-1(Δ)*, celui-ci a une motricité de type sauvage.

Un autre point est que lors de mes analyses par HPLC, j'ai pu voir que le traitement à l'AICAR induit une accumulation de SZMP (le substrat d'ADSL) et de sa forme riboside, le SAICAR. Ainsi, le traitement à l'AICAR entraîne bien une accumulation de ZMP comme attendu mais aussi des autres intermédiaires cités plus haut. Cette accumulation de SAICAR et de SZMP implique que la conversion de SZMP en ZMP par ADSL est inhibée lors d'un traitement à l'AICAR mais aussi que cette réaction peut être inversée puisque le SZMP est aussi détecté chez les mutants *ppat-1(Δ)* et *ppat-1(Δ) ; atic-1(Δ)* (Figure 2A). Ce même mécanisme a été montré chez la levure *S. cerevisiae*. Le ZMP est converti en SZMP par ADSL lorsqu'il est présent en excès (Rébora *et al.* 2005), ce qui est consistant avec nos observations.

Ensuite, j'ai étudié la structure du muscle chez le mutant *atic-1(Δ)*. Par immuno-marquage, nous n'avons pas pu voir de défaut dans l'organisation des fibres de myosine. De plus, leur nombre semble similaire à celui de la souche sauvage. L'intégrité du tissu musculaire ne serait donc pas à l'origine du défaut de motricité observé chez le mutant *atic-1(Δ)*. Il sera donc intéressant d'étudier la fonction musculaire de ce mutant.

## 2. La déficience en ADSL et le muscle

Outre la déficience en ATIC, je me suis intéressée à la motricité dans le cas d'une déficience en ADSL, notamment parce que le mutant de nématode pour cette enzyme semblait présenter un important défaut de motricité par une simple observation à la loupe binoculaire.

Mes résultats ont effectivement montré un important défaut de motricité chez le mutant *adsl-1(Δ)*. Afin de savoir si ce défaut était lié à l'accumulation de SZMP (substrat d'ADSL dans la voie *de novo*), j'ai mesuré la vitesse de déplacement du double mutant *ppat-1(Δ) ; adsl-1(Δ)*. Celui-ci a un défaut de motricité plus important que le simple mutant *adsl-1(Δ)*. Ainsi, le SZMP pourrait avoir un effet protecteur concernant la motricité. En effet, le mutant *adsl-1(Δ)* a un défaut de motricité moins important que le double mutant *ppat-1(Δ) ; adsl-1(Δ)* n'accumulant pas cet intermédiaire. Ce résultat est surprenant puisque les analyses de la durée de vie des nématodes ont montré que l'accumulation de SZMP entraîne une réduction de celle-ci, impliquant un effet toxique de ce métabolite. Ainsi, les défauts de motricité de ces deux mutants pourraient être causés par l'accumulation de SAMP dans la voie de recyclage. Cette hypothèse devra être testée en analysant les relations d'épistasie entre *adsl-1* et *adss-1* (gène codant pour l'enzyme en amont d'ADSL dans la voie de recyclage, n'accumulant pas de SAMP) (Figure 2A).

Comme pour le mutant *atic-1(Δ)*, j'ai voulu savoir si ce défaut de motricité était causé par un défaut de structure du muscle. Notre première analyse par immuno-marquage du muscle strié au stade adulte a effectivement montré que les mutants *adsl-1(Δ)* et *ppat-1(Δ) ; adsl-1(Δ)* ont des fibres de myosine peu abondantes, non alignées et désorganisées contrairement à la souche de référence. Ce défaut très important semble expliquer la faible motricité de ces mutants puisque la

myosine est un élément essentiel dans la composition et mais aussi dans la fonction musculaire. Effectivement, la contraction musculaire correspond à un raccourcissement des sarcomères dû au glissement relatif des filaments d'actine et de myosine.

Il est aussi envisageable qu'il existe un lien entre la voie de biosynthèse des purines, notamment ADSL, et HLH-1 (facteur myogénique) d'autant que ce mutant a également un retard de développement (voir ci-après). En effet, Chen *et al.* (1994) ont montré que le mutant perte de fonction *hlh-1(cc450)* avait lui aussi des fibres de myosine totalement désorganisées et moins abondantes au stade adulte. Ce mutant a également un déplacement non sinusoïdal et non coordonné comme le mutant *adsl-1(Δ)*.

Une étude complémentaire concernant la fonction du muscle pourra être réalisée par la suite afin de compléter notre compréhension des défauts de motricité du mutant *adsl-1(Δ)*.

## **E. Les défauts musculaires au cours du développement post-embryonnaire**

A la vue des résultats concernant le défaut de motricité, les défauts de structure du muscle et du ralentissement du développement post-embryonnaire du mutant *adsl-1(Δ)*, je me suis demandée si les défauts musculaires étaient présents uniquement au stade adulte ou s'ils apparaissaient pendant le développement post-embryonnaire.

Contrairement à ce que nous avons pu voir pour la souche sauvage, il n'y a pas d'augmentation constante de la vitesse de déplacement chez le mutant *adsl-1(Δ)*. J'ai même pu montrer qu'au stade L2 il y avait une baisse de motricité et que la vitesse de déplacement n'était par la suite jamais restaurée au niveau de celle de la souche sauvage. En outre, j'ai pu montrer qu'au stade L1, le mutant *adsl-1(Δ)* et la souche sauvage ont la même vitesse de déplacement. Ceci suggère donc que l'évènement primaire concernant ce défaut de motricité a lieu entre les stades L1 et L2 et que le défaut de motricité du mutant *adsl-1(Δ)* est de plus en plus important plus on progresse dans le développement post-embryonnaire. Nous pouvons ainsi supposer que pendant la phase de développement embryonnaire le muscle est correctement mis en place. Nous pouvons également supposer que pendant le premier stade larvaire la déficience en ADSL n'a pas d'effet détectable sur la motricité. Ceci pourrait s'expliquer par un besoin en ADSL différent à partir du stade L2 comparée au stade L1 ou au stade embryonnaire. Il serait alors intéressant de voir l'expression spatio-temporelle de *adsl-1* à l'aide d'un rapporteur fluorescent (ce point sera développé dans la partie IV. A.).

Une autre hypothèse pour expliquer l'apparition du défaut de motricité du mutant *adsl-1(Δ)* entre les stades L1 et L2 est qu'il existe une contribution maternelle suffisante apportée par la copie sauvage du gène *adsl-1* de la mère alors hétérozygote pour ce gène. En effet, pour maintenir la souche viable, nous avons besoin d'un balancer *hT2::GFP* apportant une copie

sauvage de *adsl-1*. Cette contribution maternelle d'*adsl-1* permettrait aux nématodes de se déplacer normalement au stade L1 avant l'intervention de la contribution zygotique qui, par la suite, ne permettrait plus de subvenir au besoin en ADSL.

Lors de mon étude de la structure du muscle au cours du développement post-embryonnaire, j'ai montré qu'à partir du stade L3 le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) avait des fibres de myosine moins abondantes et désorganisées. Nous aurions pu nous attendre à ce que ce défaut de structure apparaisse dès le stade L2 chez ce mutant puisque c'est à ce stade qu'apparaît le défaut de motricité. Or, le défaut d'alignement des fibres de myosine est détectable un stade plus tard.

Comme nous l'avons vu plus haut, le mutant *hlh-1(cc450)* a une désorganisation des fibres de myosine au stade adulte en plus d'avoir un mouvement asynchrone (Chen *et al.* 1994). Une analyse de ce mutant au cours du développement post-embryonnaire combinée à une analyse des relations d'épistasie entre *hlh-1* et *adsl-1* pourraient également nous permettre de savoir s'il existe un lien entre le facteur myogénique HLH-1 et la voie de biosynthèse des purines.

Au cours de ce travail, je n'ai pas étudié la fonction musculaire. Or, dans la souche *adsl-1(RNAi)*, il y a une baisse de la quantité d'ATP au stade adulte. L'ATP est un métabolite essentiel pour la fonction musculaire. Effectivement, au cours de la contraction musculaire, les filaments fins et épais s'attachent temporairement l'un à l'autre. Cet attachement, qui va permettre le raccourcissement des sarcomères, requiert la présence d'ATP qui sera hydrolysé en ADP juste avant que les filaments ne bougent l'un par rapport à l'autre. Nous pouvons donc penser que chez le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) il y a aussi une baisse de la quantité d'ATP par rapport à la souche sauvage, y compris au cours du développement post-embryonnaire à partir du stade L2, stade auquel apparaît le défaut de motricité. Cette baisse d'ATP pourrait être à l'origine du défaut de motricité observé au stade L2 alors que les fibres de myosine semblent intactes. Par la suite, le défaut structurel observé à partir du stade L3 combiné à la baisse de la quantité d'ATP expliquerait que le défaut de motricité du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) soit encore plus important lors de la progression dans le développement post-embryonnaire.

Ce défaut structural peut être une conséquence directe de la déficience en ADSL, *via* HLH-1 par exemple, ou bien une conséquence indirecte. En effet, un défaut de la fonction musculaire peut être à l'origine d'une atrophie des fibres musculaires qui apparaîtrait progressivement au cours du temps, en l'occurrence au cours du développement post-embryonnaire et induire une diminution de la motricité.

Nous devons tout de même envisager une étude plus poussée de la structure du muscle. Ceci nous permettrait de nous assurer du stade auquel ce défaut de structure apparaît, surtout si ce défaut est subtil mais suffisant pour causer le défaut de motricité observé. En effet, dans

cette étude je n'ai regardé que les fibres de myosine alors que l'actine, la paramyosine ou encore la vinculine sont des constituants essentiels du muscle de la paroi du corps.

A la vue de l'ensemble de ces données, nous pouvons dire que le mutant *ads1-1*( $\Delta$ ) présente un défaut dans la mise en place et le maintien du muscle strié lié à la déficience en ADSL au niveau de la voie de recyclage. Des analyses complémentaires seront nécessaires afin d'élucider plus encore les mécanismes impliqués dans cette déficience.

## **IV. Perspectives**

Grâce à l'ensemble de cette étude nous avons pu établir le nématode *Caenorhabditis elegans* comme modèle métazoaire afin d'étudier la déficience en ADSL et plus largement la voie de biosynthèse des purines. Cependant, des recherches supplémentaires sont à réaliser. Nous allons discuter des expériences qui pourraient être réalisées lors d'un prochain travail.

### **A. Expression spatio-temporelle de ADSL-1 et ATIC-1**

Les mutations dans *adsl-1* et *atic-1* ne semblent pas affecter de la même façon tous les tissus chez *C. elegans*. En effet, l'intestin ou encore l'hypoderme ne présentent pas de défauts phénotypiques visibles alors que la lignée germinale, la vulve et le muscle sont affectés. Il serait donc intéressant de connaître l'expression spatiale de ces gènes.

En outre, à la vue des résultats concernant le développement post-embryonnaire (vitesse de ce développement, apparition du défaut de motricité et de la structure du muscle), il serait tout aussi intéressant de savoir quand ces deux gènes sont exprimés chez la souche sauvage afin de voir s'il existe un défaut d'expression temporelle chez ces mutants.

Pour cela, un rapporteur fluorescent sous la dépendance de chacun des promoteurs de nos deux gènes d'intérêts pourrait être utilisé afin de suivre l'expression spatio-temporelle de ADSL-1 et ATIC-1 par microscopie *in vivo*.

Ainsi, nous pourrions connaître l'expression spatio-temporelle de *adsl-1* et *atic-1*. Nous pourrions voir s'il existe une corrélation entre l'expression de ces gènes et les tissus semblant nécessiter leurs expressions à des stades larvaires donnés (le muscle au stade L3 par exemple).

### **B. Analyse fonctionnelle tissus spécifiques de ADSL-1**

Une analyse complémentaire de la fonction de ADSL pourrait également être réalisée au niveau tissulaire.

Une première technique consisterait à réaliser des expériences de ARN interférant d'*adsl-1* de façon tissus spécifiques. En effet, il existe des nématodes mutants pour lesquels seul un tissu en particulier va réaliser l'ARN interférant. Nous pourrions donc obtenir des nématodes ayant une perte de fonction partielle d'*adsl-1* dans un seul tissu tels que le muscle ou la lignée germinale.

La seconde technique consisterait, quant à elle, à réaliser un sauvetage tissu spécifique d'*adsl-1*. En effet, comme nous l'avons vu plus haut, il est difficile d'obtenir un sauvetage en utilisant le promoteur endogène de *adsl-1*. De plus, j'ai couramment constaté lors de mes

expériences de sauvetage l'apparition d'un phénotype de type *mov* - plusieurs vulves (Figure 28) - notamment lorsque je réalisais des injections du plasmide contenant *adsl-1(WT)* dans la souche sauvage. Ceci suggère que la sur-expression de *adsl-1* est phénotoxique chez *C. elegans*. Ainsi, à l'aide d'un sauvetage tissu spécifique, nous pourrions, peut être, nous départir de cet effet de toxicité dans le cas d'une sur-expression de *adsl-1*.

Grâce à ces deux approches complémentaires nous pourrions savoir si l'expression de *adsl-1* peut avoir un effet tissu autonome (un gène exprimé dans un tissu en particulier pour une fonction spécifique dans ce même tissu) ou tissu non autonome (un gène exprimé dans un tissu pour une fonction dans un autre tissu).



Figure 31 : Le phénotype *mov* obtenu suite au sauvetage du mutant *adsl-1(Δ)* par *adsl-1(WT)*. Micrographies montrant le phénotype de multivulve (*mov*) après injection du plasmide contenant *adsl-1(WT)* dans des vers hétérozygotes *adsl-1(Δ)/hT2::GFP*. Les flèches pointent les vulves.

## C. Analyse de relations d'épistasie

Comme nous l'avons vu, les phénotypes de développement post-embryonnaire, de lignée germinale et musculaire sont tous liés à la fonction d'ADSL dans la voie « en aval ». Cependant, je n'ai pas pu clairement attribuer une cause à chacun de ces phénotypes. Pour cela, il serait intéressant de réaliser des analyses de relations d'épistasie avec d'autres mutants de la voie de biosynthèse des purines.

### 1. Les effets de l'accumulation de SAMP

Grâce au double mutant *ppat-1(Δ)* ; *adsl-1(Δ)*, j'ai montré que seul le phénotype de longévité du mutant *adsl-1(Δ)* était lié à l'accumulation de SZMP. En revanche, le défaut de développement post-embryonnaire, de lignée germinale et de muscle pourraient être liés à l'accumulation de SAMP puisqu'il s'agit de phénotypes partagés par les mutants *adsl-1(Δ)* et *ppat-1(Δ)* ; *adsl-1(Δ)* qui accumulent tous les deux cet intermédiaire. L'hypothèse d'un effet délétère de l'accumulation de SAMP concernant ces phénotypes reste donc à tester.

Pour cela, il s'agirait d'utiliser un mutant *adss-1(Δ)*. ADSS est l'enzyme juste en amont d'ADSL dans la voie « en aval » (Figure 2A). Ainsi, en croisant le mutant *adss-1(Δ)* avec le mutant *adsl-1(Δ)* et le double mutant *ppat-1(Δ)* ; *adsl-1(Δ)*, nous pourrions voir les effets du SAMP puisque cette combinaison de mutants empêcherait son accumulation tout en ayant toujours la déficience en ADSL.

Ceci nous permettrait donc de savoir si l'accumulation de SAMP est responsable de certains des phénotypes observés chez le mutant *adsl-1(Δ)*.

### 2. La carence en AMP

Une hypothèse pouvant expliquer les phénotypes liés à la fonction d'ADSL dans la voie « en aval » est la déficience en produit final, l'AMP. En effet, ADSL a une fonction à la fois dans la voie *de novo* et dans la voie de recyclage. Ainsi, il est possible que les cellules ne puissent pas subvenir à leur besoin en AMP, ADP et ATP. Effectivement, mes analyses métaboliques par HPLC du mutant *adsl-1(Δ)* montrent une baisse substantielle d'environ 20% de la quantité d'ATP par rapport à la souche sauvage. Nous avons pu voir qu'une supplémentation en Adénine ou en Adénosine n'avait pas d'effet sur les phénotypes cités précédemment. Il serait donc intéressant de voir si, par génétique, nous pouvons augmenter l'AMP et l'ATP chez *adsl-1(Δ)*.

Dans cet objectif, nous pourrions réaliser un double mutant *adsl-1(Δ)* ; *apmd-1(Δ)*. AMPD est l'enzyme qui permet la rétro-conversion de l'AMP en IMP dans la voie de recyclage (Figure

2A). En mutant cette enzyme, théoriquement, nous bloquerions cette réaction et augmenterions donc la quantité d'AMP disponible pour la cellule dans le contexte de la déficience en ADSL.

Nous pourrions également étudier les phénotypes d'un mutant *adk-1*( $\Delta$ ). ADK est l'enzyme permettant la conversion de l'Adénosine en AMP dans la voie de recyclage (Figure 2A). En effet, ce mutant devrait avoir moins d'AMP que la souche sauvage (à confirmer par une analyse par HPLC) et pourrait partager des phénotypes avec le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ).

Suite à une analyse phénotypique de ce mutant, nous pourrions donc savoir si la quantité d'AMP, et d'ATP, est limitante dans le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) et est à l'origine de certains des phénotypes de ce mutant.

### 3. La balance entre les purines A et les purines G

Une autre hypothèse est que la balance entre les purines de type A (AMP, SAMP, ADP, ATP...) et les purines de type G (GDP, GTP, GMP...) est affectée et entraîne certains des phénotypes du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) (Figure 13).

Il pourrait donc être intéressant de travailler avec des mutants coupant la voie de recyclage et permettant la synthèse des purines G comme *imd-1*( $\Delta$ ) (Inosine-5'-Monophosphate Déshydrogénase - conversion de l'IMP en XMP - Xanthosine Monophosphate) ou *gmps-1*( $\Delta$ ) (GMP synthase - conversion du XMP en GMP) (Figure 2A). Une autre façon d'affecter cette balance est de couper la voie au niveau de HPRT. L'enzyme HPRT intervient dans le recyclage de plusieurs purines extra-cellulaires (Hypoxanthine et Guanine) en purines de type G (Figure 2A).

Grâce à une analyse comparative des ces différents mutants, nous pourrions savoir si la balance entre la synthèse des purines A et des purines G est impliquée dans certains des phénotypes observés chez le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ).

Les analyses de relations d'épistasie décrites ci-dessus nous permettraient d'attribuer les causes possibles aux phénotypes de développement post-embryonnaire, de muscle, de lignée germinale et de vulve du mutant *adsl-1*( $\Delta$ ). Il s'agit d'un outil puissant facilement utilisable chez le nématode *C. elegans*. En effet, cet organisme a un grand nombre de mutants déjà disponibles grâce à l'existence de différentes banques. De plus, il permet de réaliser des croisements entre mutants en quelques semaines seulement afin de réaliser des analyses phénotypiques.

## D. Approches gènes candidats

### 1. Le gène hétérochronique *lin-42*

Comme nous l'avons vu plus haut, le mutant *adsl-1(Δ)* a un ralentissement de la vitesse de son développement post-embryonnaire. De plus, ce ralentissement est d'autant plus important plus on progresse à travers les stades larvaires. Nous avons également vu que le mutant *lin-42* présentait un phénotype similaire concernant le développement post-embryonnaire (Edelman *et al.* 2016). En outre, il a récemment été montré que *lin-42* était exprimé dans la DTC et participait à la prolifération mitotique (*via* LAG-2, ligand de GLP-1/Notch) dans la lignée germinale (Berardi *et al.* 2018). Ainsi, étudier ce gène hétérochronique dans le contexte de la déficience en ADSL est une piste à explorer.

Pour cela, il serait intéressant de regarder l'expression spatio-temporelle de ce gène au cours du développement post-embryonnaire à l'aide d'un rapporteur fluorescent. Nous pourrions voir si son expression est similaire à celle de la souche sauvage chez le mutant *adsl-1(Δ)*. Il serait également possible d'étudier les relations d'épistasie entre ces deux gènes.

Ces analyses nous permettraient de savoir s'il existe un lien, direct ou indirect, entre la voie de biosynthèse des purines, notamment avec ADSL, et le gène hétérochronique *lin-42*. Ces analyses apporteraient des éléments supplémentaires sur la compréhension des mécanismes et des régulations impliqués pendant le développement post-embryonnaire du nématode *C. elegans*.

### 2. La voie GLP-1/Notch

Il est connu que la voie GLP-1/Notch induit un signal de prolifération mitotique au niveau de la lignée germinale de *C. elegans* (Austin et Kimble, 1987). En outre, en 2011, Singh *et al.* ont montré que cette même voie pouvait agir sur les phases de léthargies au cours du développement post-embryonnaire en induisant des « pseudo-léthargies ». Le mutant *adsl-1(Δ)* que nous étudions présente à la fois des « pseudo-léthargies » lors de la transition entre la phase larvaire L4 et le stade adulte et une absence quasi totale de lignée germinale. La voie GLP-1/Notch pourrait donc jouer un rôle essentiel dans ces deux phénotypes dans le contexte de la déficience en ADSL.

Il pourrait être envisagé de regarder dans un premier temps l'expression de *glp-1* au niveau de la lignée germinale mais aussi pendant le développement post-embryonnaire au

moment de la quatrième mue. Le mutant *glp-1(gf)* pourrait aussi être utilisé afin de tenter un sauvetage de la lignée germinale du mutant *adsl-1(Δ)*.

Plus largement, une analyse des relations d'épistasie entre la voie des purines et la voie GLP-1/Notch nous permettrait de mettre en évidence l'existence ou l'absence de lien entre ces deux voies.

### 3. Le facteur myogénique HLH-1

A plusieurs reprises, nous avons pu voir que le facteur myogénique HLH-1 pourrait être impliqué dans plusieurs des phénotypes du mutant *adsl-1(Δ)*. C'est le cas pour le développement de la taille, la vitesse de développement post-embryonnaire et le muscle. Effectivement, il s'agit de phénotypes partagés entre le mutant *adsl-1(Δ)* et *hlh-1(cc450)* (Chen *et al.* 1994).

Afin de voir s'il existe un lien entre ces deux gènes, il serait intéressant ici aussi d'analyser l'expression spatio-temporelle de *hlh-1* à la fois pendant le développement post-embryonnaire mais aussi au stade jeune adulte. Une analyse phénotypique pendant le développement post-embryonnaire du mutant *hlh-1(cc450)* serait aussi intéressante pour savoir si ce mutant partage des phénotypes avec le mutant *adsl-1(Δ)*. Effectivement, l'analyse phénotypique du mutant *hlh-1(cc450)* décrit par Chen *et al.* (1994) n'a été réalisée qu'au stade adulte. Par la suite, une analyse des relations d'épistasie entre *hlh-1* et *adsl-1* pourra être réalisée.

Comme précédemment, ces analyses nous permettraient de savoir s'il existe un lien entre la régulation de la voie de biosynthèse des purines et ce facteur myogénique. Ces analyses permettraient de mettre en lumière le rôle du tissu musculaire pendant le développement post-embryonnaire et au stade adulte.

## VI. Conclusions

Au cours de cette étude, nous avons pu montrer la conservation fonctionnelle de la voie *de novo* mais aussi de la voie de recyclage à la fois par une analyse HPLC de différents mutants et par complémentation hétérologue chez la levure *S. cerevisiae*. Par la suite, j'ai réalisé une analyse phénotypique de mutants de la voie en ayant un intérêt particulier pour le mutant *adsl-1(Δ)*. J'ai pu décrire un certain nombre de phénotypes liés à la déficience en ADSL mais aussi à la déficience en ATIC. Grâce à des analyses de relations d'épistasie et des supplémentations en métabolites dans le milieu de culture des nématodes, j'ai pu montrer que ces phénotypes ont, en partie, des causes différentes.

Ainsi, j'ai montré que l'accumulation de SZMP induit une diminution de la durée de vie des nématodes. J'ai montré que l'accumulation de ZMP induit une baisse fertilité et est potentiellement liée à un défaut de motricité. Enfin, les phénotypes les plus importants sont, quant à eux, tous liés à la déficience en ADSL au niveau de la voie de recyclage. En effet, j'ai montré que la lignée germinale, le développement post-embryonnaire (comprenant la vitesse de développement et la taille) et le muscle (motricité et structure du muscle) présentent des défauts majeurs lorsque l'activité d'ADSL consistant à convertir le SAMP en AMP est déficiente (Figure 32).

Lors de mon étude, je n'ai pas pu montrer de défaut phénotypique chez le mutant *ppat-1(Δ)* bien que j'ai démontré le rôle de *ppat-1* dans la voie *de novo*. En outre, les phénotypes du mutant *atic-1(Δ)* sont subtiles et sont plutôt associés à l'accumulation de ZMP qu'à un défaut de synthèse de la voie *de novo*. Ceci nous fait donc penser que cette partie de la voie n'est pas nécessaire à la vie du *C. elegans* en condition standard de culture. Il semble pourtant curieux qu'au cours de l'évolution cette partie de la voie n'est pas été perdue alors qu'elle n'aurait pas de rôle indispensable. En effet, avec l'évolution, les métazoaires ont perdus un certains nombre de voies métaboliques (voie de synthèse de certains acides aminés, Histidine par exemple (Payne et Loomis, 2006)) de part l'abondance du produit final et/ou des intermédiaires disponibles dans les sources alimentaires. Cependant, il est possible que les conditions de culture du laboratoire soient bien différentes des conditions de vie du nématode dans la nature. Alors, dans cet environnement naturel, la voie *de novo* peut avoir un rôle essentiel puisque la disponibilité en nutriment y serait différente. On sait par exemple que dans la nature les nématodes se nourrissent essentiellement de levures alors qu'en laboratoire ils sont généralement nourris avec une bactérie *E. coli*. Ces deux micro-organismes n'apportent certainement pas les mêmes nutriments et peuvent donc avoir des effets différents sur le métabolisme de *C. elegans*.

# **1. Le nématode *C. elegans* comme modèle animal de la déficience en ADSL**

L'objectif de ce travail de thèse était d'établir le nématode *Caenorhabditis elegans* comme modèle animal afin d'étudier la déficience en ADSL et plus largement les perturbations de la voie de biosynthèse des purines.

De nombreuses recherches ont été réalisées chez la levure ou chez la bactérie. Ces études ont permis d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des purines. Elles ont également permis de montrer que certains intermédiaires de la voie pouvaient avoir des effets sur des facteurs de transcriptions (Bas1p-Pho2p et Pho4-Pho2 chez la levure, Pinson *et al.* 2009), servir de co-facteurs pour des réactions enzymatiques (Theodoulou *et al.* 2014), etc... Cependant, ces organismes unicellulaires ne permettent pas d'étudier des tissus particuliers ni même le développement. Il était donc nécessaire d'avoir un modèle métazoaire pour l'étude de cette voie biosynthèse.

Des recherches chez la drosophile, le poisson zèbre, le xénope ou encore la souris ont été faites afin d'aborder la complexité d'un modèle métazoaire. Cependant, seuls quelques KO des gènes de la voie des purines existent et ont été étudiés. Le KO d'*adsl-1* chez un modèle métazoaire n'a jamais été décrit dans la littérature. Ces différents modèles ont tout de même permis de modéliser certaines pathologies liées à la voie de biosynthèse des purines (notamment les déficiences liées à la voie *de novo*) ou plus spécifiquement des symptômes particuliers. Bien qu'imparfaits, ces modèles métazoaires ont permis d'améliorer la compréhension de mécanismes impliqués dans ces pathologies humaines.

Pour la première fois, j'ai pu réaliser une analyse d'un individu KO pour *adsl-1* chez le nématode. Grâce à ce modèle, la composante développementale envisagée dans la pathologie humaine de la déficience en ADSL a été mise en évidence. En effet, j'ai montré que le développement post-embryonnaire est fortement ralenti et que la structure du muscle est affectée à partir du stade larvaire L3 alors que la motricité est affectée à partir du stade L2. Ces études ont pu facilement être réalisées puisque ce nématode est très largement décrit dans la littérature et qu'il existe un grand nombre d'outils pour étudier facilement des tissus comme le muscle, les neurones ou encore la lignée germinale.

## **2. L'effet pléiotrope d'*adsl-1***

Un autre aspect de cette étude montre que la déficience en ADSL a un effet pléiotrope. En effet, nous avons pu voir que cette déficience affecte plusieurs types tissulaires ainsi que plusieurs fonctions.

Des analyses des relations d'épistasie qui existent entre plusieurs gènes de la voie de biosynthèse des purines ont pu être réalisées facilement. Le nématode *C. elegans* est un organisme hermaphrodite auto-fécondant. Cette particularité permet d'obtenir une population clonale aisément mais il existe également des mâles pour réaliser des croisements. Compte tenu de sa vitesse de développement (3 jours depuis l'éclosion jusqu'au stade adulte à 20°C), la construction de doubles mutants est relativement rapide comparée aux mammifères par exemple. Les analyses d'épistasie sont donc des outils qui nous ont permis d'assigner certains des phénotypes du mutant *adsl-1(Δ)* à l'accumulation de métabolites (ZMP responsable d'une baisse de fertilité, SZMP responsable d'une baisse de fertilité par exemple) et sont très facilement et rapidement réalisable chez *C. elegans*.

Grâce à cela, nous sommes désormais capable de savoir plus exactement qu'elles sont les causes de certains des phénotypes observés lors d'une perturbation de la voie de biosynthèse des purines.

## **3. Vers une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la déficience en ADSL**

Finalement, cette étude servira de base afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacent à la déficience en ADSL mais aussi plus largement lors d'une perturbation de la voie de biosynthèse des purines.

Malgré la distance évolutive entre les nématodes et les humains, ces deux métazoaires partagent un grand nombre de caractéristiques communes. En effet, le nématode est très utilisé comme modèle animal afin d'étudier le développement embryonnaire et post-embryonnaire, la longévité, le muscle, les neurones ou encore la relation hôte-pathogènes puisqu'un grand nombre de mécanismes impliqués dans ces phénomènes sont conservés au cours de l'évolution. Dans notre cas, nous avons vu par exemple que la voie de biosynthèse des purines était conservée et que les régulations de cette voie ou ses effets métaboliques le sont également.

Il faut aussi noter que les mutations causant un déficit en ADSL chez l'Homme sont associées à une activité enzymatique résiduelle contrastant avec notre analyse de mutant nul présumé. L'utilisation de mutation nulle permet d'établir avec soin les phénotypes associés au déficit en ADSL dans le modèle de nématode et nous permettra d'établir plus avant les contributions spécifiques des tissus. Cela permet aussi d'effectuer une analyse des relations d'épistasie afin d'attribuer les phénotypes aux différentes étapes de la voie. Ce n'est que lorsque cette caractérisation sera réalisée complètement que des mutations comparables au déficit en ADSL humain pourront être modélisées chez *C. elegans* afin de fournir des informations supplémentaires.

En résumé, bien qu'un complément d'investigation soit nécessaire, *C. elegans*, en tant qu'organisme modèle métazoaire, permet d'étudier la régulation métabolique impliquée dans la progression du développement post-embryonnaire, les défauts musculaires ou la prolifération cellulaire dans le contexte du déficit en ADSL, ou plus largement lors d'une perturbation de la voie de biosynthèse des purines.

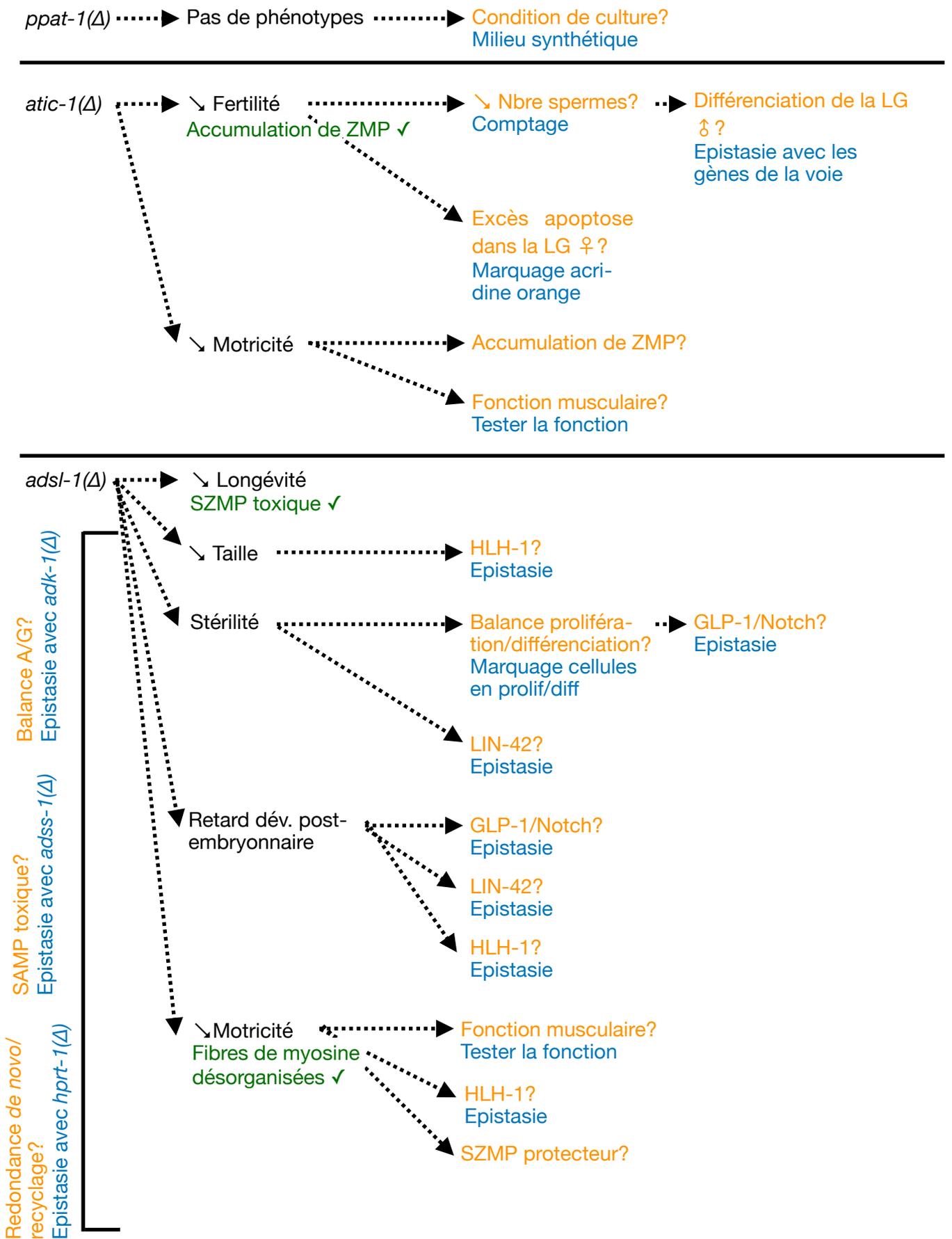


Figure 32 : Schéma récapitulant génotypes, phénotypes, causes connues, conséquences possibles et expériences proposées. En italique : génotype. En simple : phénotype. En vert : hypothèse validée. En orange : hypothèse à tester. En bleu : expérience proposée pour tester l'hypothèse orange correspondante.

## V. Matériel et Méthodes

### A. Souches de *C. elegans* et culture

Les nématodes sont maintenues dans les conditions standards de culture (Brenner, 1974 ; Stiernagle, 2006) sur du Nematode Growth Medium (NGM), sont nourris avec de l'*Escherichia coli* (souche OP50) et gardés à 20°C (sauf les souches portant le transgène *ruls32 [pie-1p::GFP::H2B + unc-119(+)]* qui sont gardées à 25°C)

Les souches suivantes ont été utilisées :

- N2 (Bristol, souche sauvage de référence), obtenue auprès du *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC)
- WBX138 AZ212 *ruls32 [pie-1p:: GFP::H2B + unc-119(+)]* III
- WBX3 CF1903 *glp-1(e2141)* III
- WBX108 PE254 *fels4 [sur-5p::luciferase::GFP + rol-6(su1006)]* V
- WBX90 VC2999 R151.2(*gk3067*) III/hT2 [*bli-4(e937) let-?(q782) qIs48*] (I,III) - souche parentale pour le balancer hT2
- WBX52 *adsl-1(tm3328)* I/hT2 [*bli-4(e937) let-?(q782) qIs48*] (I,III) (4X outcross)
- WBX53 *adsl-1(tm3328)* I; *ppat-1(tm6344)* III/hT2 [*bli- 4(e937) let-?(q782) qIs48*] (de WBX50 and WBX51),
- WBX50 *ppat-1(tm6344)* III (4X outcross)
- WBX119 *ppat-1(tm6344)* III (6X outcross)
- WBX49 *atic-1(tm6374)* IV (4X outcross)
- WBX117 *atic-1(tm6374)* IV (6X outcross)
- WBX116 *ppat-1(tm6344)* III, *atic-1(tm6374)* IV (de WBX49 et WBX50 - 6X outcross)
- WBX124 *atic-1(tm6374)* IV; *fels4 [sur-5p::luciferase::GFP + rol- 6(su1006)]* V (de WBX108 et WBX108)
- WBX127 *ppat- 1(tm6344)* I; *adsl-1(tm3328)* III/hT2 [*bli-4(e937) let-? (q782) qIs48*]; *fels4 [sur-5p:: luciferase::GFP + rol-6(su1006)]* V (de WBX108, WBX50 et WBX52)
- WBX125 *ppat-1(tm6344)* III; *atic-1(tm6374)* IV; *fels4 [sur-5p::luciferase::GFP + rol-6(su1006)]* V (de WBX108 et WBX116)
- WBX130 *adsl-1(tm3328)* I/hT2 [*bli- 4(e937) let-?(q782) qIs48*] (I,III); *fels4 [sur-5p::luciferase:: GFP + rol-6(su1006)]* V (de WBX108 et WBX53)
- WBX131 *ppat-1(tm6344)* III; *fels4 [sur-5p::luciferase::GFP + rol-6(su1006)]* V (de WBX108 et WBX116)
- WBX147 *ppat-1(tm6344) ruls32 [pie-1p::GFP::H2B + unc-119(+)]* III (de WBX138 et WBX119)

- WBX149 *adsl-1(tm3328)* I; *ruls32* [*pie-1p::GFP::H2B* + *unc-119(+)*] III/hT2 [*bli-4(e937)* *let-?* (*q782*) *qls48*] (I,III) (de WBX138 et WBX52)
- WBX152 *adsl-1(tm3328)* I; *ppat-1(tm6344)* *ruls32* [*pie-1p::GFP::H2B* + *unc-119(+)*] III/hT2 [*bli-4(e937)* *let-?(q782)* *qls48*] (I,III) (de WBX147 et WBX149).
- WBX 155 KAG420 *GFP::MYO-3* V (souche obtenue de Bessereau)
- WBX 200 *adsl-1(tm3328)* I; *GFP::MYO-3* V (de WBX52 et WBX155)
- WBX 201 KAG420 *GFP::MYO-3* V (2X outcross)
- WBX 154 FS410 *tnt::SL2::RFP* X (souche obtenue de Gieseler)
- WBX 202 *adsl-1(tm3328)* I; *tnt::SL2::RFP* X (de WBX52 et WBX154)
- WBX 203 FS410 *tnt::SL2::RFP* X (2X outcross)

Les allèles délétés *adsl-1(tm3328)*, *ppat-1(tm6344)*, et *atic-1(tm6374)* - référencés comme *adsl-1(Δ)*, *ppat-1(Δ)* et *atic-1(Δ)* tout le long du manuscrit - ont été générés par le laboratoire de Shohei Mitani, National Bioresource Project (NBRP), Japon. Chaque souches portant ces allèles dans cette étude ont été outcrossés 4 fois minimum.

## B. Synchronisation des nématodes

Des nématodes adultes sont collectés avec du tampon 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 jusqu'à 1 litre) dans un tube conique de 15 ml, centrifugés 1 minutes à 1000 rpm, le surnageant est jeté. La Worm Bleach Solution (WBS - 1 M NaOH, 0,25 M NaOCl) est ajoutée jusqu'à ce que les carcasses soient dissoutes et les embryons libérés (~ 8 minutes). Les embryons sont ensuite lavés trois fois avec du tampon M9 puis transférés sur des boites NGM ensemencées.

## C. RNAi

Le fragment PCR *adsl-1* est amplifié avec les oligomères 5'-CTTCTTCCGGCAGAATCATCCAGTG-3' et 5'-TGA CTGTCCGGACG TACTCATTACC-3'. Le fragment PCR *adss-1* est amplifié avec les oligomères 5'-GACGTCTTCCAACAAGACTGTGTCC-3' et 5'-ACGAGACGGCGATACTTCTCCGAG-3'. Chaque fragment est inséré dans le plasmide L4440 (site EcoRV) (Timmons et Fire, 1998). Pour les expérience de RNAi, HT115 (DE3), souche de bactérie transformée avec les vecteurs contenant *adsl-1(RNAi)* ou *adss-1(RNAi)* ou le plasmide L4440 (contrôle), sont cultivés sur la nuit à 37°C dans du LB + 150 mg/litre Ampicilline + 15 ml/litre Tétracycline et sont induites avec 2 mM d'IPTG pendant 1 heure avant d'être étalées sur boite NGM + 2 mM IPTG + 150 mg/litre Ampicilline. Des populations de nématodes synchronisées y sont cultivées de l'éclosion jusqu'au stade adulte (sauf si spécifié).

Létalité embryonnaire dans les descendants *adsl-1(tm3328)/+* : les hermaphrodites *adsl-1(tm338)/hT2* [*bli-4(e937)* *let-?(q782)* *qls48*] (GFP exprimée dans le pharynx) sont croisés

avec des mâles N2. Les descendants non GPF exprimée dans le pharynx sont sélectionnés comme *adsl-1(tm3328)/+* et pondent des embryons à raison d'un adulte par boîte pendant ~24 heures. Après retrait des adultes, les boîtes sont maintenues en culture pendant 24 heures supplémentaires après quoi, les embryons non éclos sont considérés comme morts.

## D. Sauvetage d'*adsl-1*( $\Delta$ )

Un fragment génomique contenant l'allèle de référence *adsl-1* - ~1 kb en amont du codon START et ~1 kb en aval du codon STOP - est amplifié par PCR grâce aux oligonucléotides 5'-GCTCCCATGATATTCTACCG-3' et 5'-GAGGATTCAACGGTGCTTGCA-3' sur la base du Cosmid R06C7 obtenue du Sanger Center. Le fragment PCR amplifié est cloné dans pBluescript dans un site EcoRV. Le plasmide est appelé pRM001. La séquence insérée est vérifiée après clonage. Les souches transgéniques sont obtenues par microinjection standard (Mello *et al.* 1991). Les vers *adsl-1/+* sont co-transformés avec 1 ou 5 ng/ $\mu$ l de pRM001, 10 ng/ $\mu$ l de pDD004 comme marqueur de transformation — pDD004 exprime la GFP dans le pharynx sous le contrôle du promoteur *myo-2* (Giordano-Santini *et al.* 2010) - et pJM001 comme ADN cargo à 30-90 ng/ $\mu$ l (don provenant de Denis Dupuy, Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB), Bordeaux, France).

## E. Imagerie

Pour la morphologie des vers adultes, des images en contraste d'interférence différentielle (DIC) (aussi connu sous le nom de Nomarski) sont prises avec un microscope Diaplan de Leitz. Les vers adultes sont montés dans du tampon M9 sur un coussin de M9 avec 2% d'agarose. Les images sont prises avec une caméra VisiCam 5.0, analysées et traitées avec le logiciel Fiji.

Pour l'imagerie du rapporteur de la lignée germinale *pie-1p::GFP::H2B*, des vers synchronisés sont montés dans du tampon M9 avec 5 mM de levamisole sur un coussin de M9, 1 mM levamisole et 2% d'agarose. Les images sont acquises avec un microscope Olympus IX81 avec des objectifs à immersion d'huile et une caméra Hamamatsu Orca R2. Les images sont analysées avec le logiciel Fiji.

Pour les mesures de taille, des populations de nématodes synchronisées sont utilisées. Chaque ver est mesuré trois fois sur trois images différentes. Les images sont prises avec un stéréo microscope Nikon SMZ18 avec une caméra Visicam 5.0 et sont analysées et traitées avec le logiciel Fiji.

Pour l'imagerie des rapporteurs *tnt::SL2::RFG* et *GFP::MYO-3*, des vers synchronisés sont montés dans du tampon M9 avec 0,18% de microsphères de polystyrène de 10 microns de diamètres sur un coussin de M9, 2% d'agarose ayant séché sur la nuit. Les images sont acquises avec un microscope Olympus IX81 avec des objectifs à immersion d'huile et une caméra Hamamatsu Orca R2. Les images sont analysées avec le logiciel Fiji.

## **F. Profil métabolique par HPLC**

Pour une extraction, ~7500 nématodes jeunes adultes (72 heures après synchronisation) sont collectés avec de l'eau glacée dans des tubes coniques de 15 ml, puis sont centrifugés à 1000 rpm, 1 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté afin d'éliminer le plus de bactéries possible. Le culot de vers est lavé avec 10 ml de 10 mM Hépes froid et centrifugé. 1 ml de suspension de nématodes dans 10 mM Hépes est transféré dans 4 ml d'éthanol absolu à 80°C, incubé pendant 5 minutes puis refroidis pendant 10 minutes sur glace. Les échantillons sont séchés sur un appareil rotovapeur. Le résidu sec est resuspendu dans 350 µl d'eau Qualité Biologie Moléculaire HyClone (GE Healthcare) puis centrifugé à 21000Xg, 5 minutes à 4°C. Le surnageant est transféré et centrifugé à 21000Xg, 1 heure à 4°C. Le surnageant final est utilisé pour l'HPLC. Les métabolites sont séparés par chromatographie ionique sur une station de chromatographie ICS3000 (Dionex, Sunnyvale, CA) et mesurés par un réseau de diodes UV (Ultimate 3000 RS; Dionex). Les métabolites sont séparés sur une colonne carbopacPA1 (250x2 mm; Dionex) grâce à un gradient d'acétate de sodium (Ceballos-Picot *et al.* 2015). Les niveaux de métabolites sont normalisés par rapport au poids sec ; la même quantité de vers utilisée pour une extraction est collectée dans de l'eau glacée, 72 heures après synchronisation, centrifugée et lavée cinq fois à l'eau puis évaporée pendant 4 jours à 70°C et pesée.

## **G. Longévité**

Après synchronisation, les vers sont cultivés en condition standard jusqu'au stade adulte, après quoi ils sont transférés sur une nouvelle boîte toutes les 24 heures et comptés. Les vers immobiles ne répondant pas au toucher sont considérés mort. Trois différentes expériences sont réalisées sur différents jours, typiquement avec 3 boîtes différentes par génotype, par répliquât, avec 10 à 40 vers par boîte.

## **H. Locomotion et tests de comportement**

La mesure de vitesse de déplacement est adaptée de Zheng *et al.* (1999), Hart (2006). Les images sont acquises sur un microscope Leica Z16 APO et traitées avec le logiciel Fiji. Le déplacement des nématodes est mesuré en suivant la position du pharynx antérieur, une fois par seconde. Pour chaque enregistrement, un ver est placé sur une boîte intermédiaire sans bactérie pendant 1 minute puis est transféré sur une nouvelle boîte à 0,5 cm de la source de nourriture (bactérie), le pharynx orienté vers le dépôt de bactérie. Le déplacement est filmé pendant 1 minute maximum (si le ver atteint le dépôt de bactérie avant, le film est arrêté dès l'entrée du ver dans le dépôt bactérien).

Les tests de sensibilité/résistance au Lévamisol (Sigma) et Aldicarb (Sigma) sont réalisés comme décrit dans Gendrel *et al.* (2009). Des nématodes adultes synchronisés sont placés sur

des boîtes NGM avec 1 mM d'Aldicarb ou 0,4 mM de Lévamisole pendant 2 heures après quoi la boîte est tapée 10 fois et les vers mobiles sont comptés.

Le test de réponse mécano-sensorielle est réalisé comme décrit dans Hobert *et al.* (1999) ; Hart (2006). Des nématodes adultes synchronisés sont isolés sur des boîtes sans source alimentaire pendant 3 minutes puis sont stimulés avec un cil sur le pharynx postérieur. Le comportement de recul est compté à chaque stimulation. Chaque vers est stimulé 10 fois en laissant 3 minutes d'intervalle entre chaque stimulation.

## **I. Développement post-embryonnaire**

Le développement post-embryonnaire est mesuré comme décrit par Olmedo *et al.* (2015). En bref, après synchronisation, 20 embryons par microlitre sont incubés dans du tampon M9 sur la nuit avec agitation afin de permettre l'éclosion de larves L1. Une larve L1 est ajoutée dans chaque puit d'une plaque 96 puits avec du S-Basal (5,85 g NaCl, 1 g K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml cholestérol (5 mg/ml in ethanol), H<sub>2</sub>O jusqu'à 1 litre), 10 g/litre d'*E. Coli* OP50 (poids mouillé) et 100  $\mu$ M de D-Luciférine. La bioluminescence résultante est mesurée avec un Berthold Centro LB960 XS<sup>3</sup> pendant 1 seconde avec 5 minutes d'intervalle et à une température contrôlée de 20°C par un incubateur Panasonic MIR-154.

## **J. Fertilité**

Après synchronisation, des vers au stade L4 sont isolés un par boîte. Les vers sont transférés matin et soir tout le long de la vie reproductive du nématode afin de compter le nombre total d'embryons pondus par vers.

Pour le traitement à l'AICAR, les vers sont transférés et maintenus sur des boîtes avec 0,1 mM d'AICAR pour la souche *ppat-1*( $\Delta$ ) ; *atic-1*( $\Delta$ ) et 0,5 mM d'AICAR pour la souche contrôle dans le milieu de culture à partir du stade L4 uniquement.

## **K. Statistiques**

Les analyses statistiques sont réalisées avec les logiciels Graphpad, Excel, Numbers, et R. Un test statistique est considéré significatif à  $P < 0,01$ .

## VI. Bibliographie

- **Abbracchio MP**, Burnstock G. « Purinergic signalling: pathophysiological roles. » *Jpn J Pharmacol.* 1998 Oct;78(2):113-45.
- **Albertson DG**, Collins C, McCormick F, Gray JW. « Chromosome aberrations in solid tumors. » *Nat Genet.* 2003 Aug;34(4):369-76.
- **Amsterdam A, Hopkins N.** « Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. » *Trends Genet.* 2006 Sep;22(9):473-8. Epub 2006 Jul 17.
- **An S, Kumar R**, Sheets ED, Benkovic SJ. « Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells. » *Science.* 2008 Apr 4;320(5872):103-6. doi: 10.1126/science.1152241.
- **Antebi A.** « Regulation of longevity by the reproductive system. » *Exp Gerontol.* 2013 Jul;48(7):596-602. doi: 10.1016/j.exger.2012.09.009. Epub 2012 Oct 11.
- **Antebi A.** « Steroid regulation of *C. elegans* diapause, developmental timing, and longevity. » *Curr Top Dev Biol.* 2013;105:181-212. doi: 10.1016/B978-0-12-396968-2.00007-5.
- **Apasov SG**, Blackburn MR, Kellems RE, Smith PT, Sitkovsky MV. « Adenosine deaminase deficiency increases thymic apoptosis and causes defective T cell receptor signaling. » *J Clin Invest.* 2001 Jul;108(1):131-41.
- **Austin J**, Kimble J. « *glp-1* is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. » *Cell.* 1987 Nov 20;51(4):589-99.
- **Baresova V**, Skopova V, Sikora J, Patterson D, Sovova J, Zikanova M, Kmoch S. « Mutations of ATIC and ADSL affect purinosome assembly in cultured skin fibroblasts from patients with AICA-ribosiduria and ADSL deficiency. » *Hum Mol Genet.* 2012 Apr 1;21(7):1534-43. doi: 10.1093/hmg/ddr591. Epub 2011 Dec 16.
- **Barrière A**, Félix MA. « Natural variation and population genetics of *Caenorhabditis elegans*. » *WormBook.* 2005 Dec 26:1-19.
- **Barrière A**, Félix MA. « Temporal dynamics and linkage disequilibrium in natural *Caenorhabditis elegans* populations. » *Genetics.* 2007 Jun;176(2):999-1011. Epub 2007 Apr 3.
- **Bargmann CI.** « Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. » *Science.* 1998 Dec 11;282(5396):2028-33.
- **Baugh LR**, Hunter CP. « MyoD, modularity, and myogenesis: conservation of regulators and redundancy in *C. elegans*. » *Genes Dev.* 2006 Dec 15;20(24):3342-6.
- **Beavers KM**, Beavers DP, Serra MC, Bowden RG, Wilson RL. « Low relative skeletal muscle mass indicative of sarcopenia is associated with elevations in serum uric acid levels: findings from NHANES III. » *J Nutr Health Aging.* 2009 Mar;13(3):177-82.
- **Becker MA**, Puig JG, Mateos FA, Jimenez ML, Kim M, Simmonds HA. « Inherited superactivity of phosphoribosylpyrophosphate synthetase: association of uric acid overproduction and sensorineural deafness. » *Am J Med.* 1988 Sep;85(3):383-90.

- **Berg A**, Watson GM. « Rapid recovery of sensory function in blind cave fish treated with anemone repair proteins. » *Hear Res.* 2002 Dec;174(1-2):296-304.
- **Bentzinger CF**, Wang YX, Rudnicki MA. « Building muscle: molecular regulation of myogenesis. » *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Feb 1;4(2). pii: a008342. doi: 10.1101/cshperspect.a008342.
- **Bhagavan NV**, Ha C-E. «Essentials of Medical Biochemistry », 2011.
- **Bjursell MK**, Blom HJ, Cayuela JA, Engvall ML, Lesko N, Balasubramaniam S, Brandberg G, Halldin M, Falkenberg M, Jakobs C, Smith D, Struys E, von Döbeln U, Gustafsson CM, Lundeberg J, Wedell A. « Adenosine kinase deficiency disrupts the methionine cycle and causes hypermethioninemia, encephalopathy, and abnormal liver function. » *Am J Hum Genet.* 2011 Oct 7;89(4):507-15. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.09.004. Epub 2011 Sep 28.
- **Blackburn MR**, Datta SK, Kellems RE. « Adenosine deaminase-deficient mice generated using a two-stage genetic engineering strategy exhibit a combined immunodeficiency. » *J Biol Chem.* 1998 Feb 27;273(9):5093-100.
- **Bradford KL**, Moretti FA, Carbonaro-Sarracino DA, Gaspar HB, Kohn DB. « Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immune Deficiency (SCID): Molecular Pathogenesis and Clinical Manifestations. » *J Clin Immunol.* 2017 Oct;37(7):626-637. doi: 10.1007/s10875-017-0433-3. Epub 2017 Aug 25.
- **Brenner S**. « The genetics of *Caenorhabditis elegans*. » *Genetics.* 1974 May;77(1):71-94.
- **Burnstock G**, Krügel U, Abbracchio MP, Illes P. « Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. » *Prog Neurobiol.* 2011 Oct;95(2):229-74. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.08.006. Epub 2011 Sep 1.
- **Byerly L**, Cassada RC, Russell RL. « The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. » *Dev Biol.* 1976 Jul 1;51(1):23-33.
- **C. elegans Sequencing Consortium**. « Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. » *Science.* 1998 Dec 11;282(5396):2012-8.
- **Cassada RC**, Russell RL. « The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. » *Dev Biol.* 1975 Oct;46(2):326-42.
- **Ceballos-Picot I**, Le Dantec A, Brassier A, Jaïs JP, Ledroit M, Cahu J, Ea HK, Daignan-Fornier B, Pinson B. « New biomarkers for early diagnosis of Lesch-Nyhan disease revealed by metabolic analysis on a large cohort of patients. » *Orphanet J Rare Dis.* 2015 Jan 23;10:7. doi: 10.1186/s13023-014-0219-0.
- **Ceschin J**, Saint-Marc C, Laporte J, Labriet A, Philippe C, Moenner M, Daignan-Fornier B, Pinson B. « Identification of yeast and human 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -d-ribofuranoside (AICAr) transporters. » *J Biol Chem.* 2014 Jun 13;289(24):16844-54. doi: 10.1074/jbc.M114.551192. Epub 2014 Apr 28.
- **Chal J**, Pourquié O. « Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*. » *Development.* 2017 Jun 15;144(12):2104-2122. doi: 10.1242/dev.151035.

- **Chalfie M**, Hart AC, Rankin CH, Goodman MB. « Assaying mechanosensation. » *WormBook*. 2014 Jul 31. doi: 10.1895/wormbook.1.172.1.
- **Chen BL**, Hall DH, Chklovskii DB. « Wiring optimization can relate neuronal structure and function. » *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 21;103(12):4723-8. Epub 2006 Mar 14.
- **Chen L**, Krause M, Sepanski M, Fire A. « The *Caenorhabditis elegans* MYOD homologue HLH-1 is essential for proper muscle function and complete morphogenesis. » *Development*. 1994 Jun;120(6):1631-41.
- **Cheng J**, Morisaki H, Sugimoto N, Dohi A, Shintani T, Kimura E, Toyama K, Ikawa M, Okabe M, Higuchi I, Matsuo S, Kawai Y, Hisatome I, Sugama T, Holmes EW, Morisaki T. « Effect of isolated AMP deaminase deficiency on skeletal muscle function. » *Mol Genet Metab Rep*. 2014 Jan 16;1:51-59. eCollection 2014.
- **Chi C**, Ronai D, Than MT, Walker CJ, Sewell AK, Han M. « Nucleotide levels regulate germline proliferation through modulating GLP-1/Notch signaling in *C. elegans*. » *Genes Dev*. 2016 Feb 1;30(3):307-20. doi: 10.1101/gad.275107.115.
- **Clark DV**. « Molecular and genetic analyses of *Drosophila* Prat, which encodes the first enzyme of de novo purine biosynthesis. » *Genetics*. 1994 Feb;136(2):547-57.
- **Cristini S**, Navone S, Canzi L, Acerbi F, Ciusani E, Hladnik U, de Gemmis P, Alessandri G, Colombo A, Parati E, Invernici G. « Human neural stem cells: a model system for the study of Lesch-Nyhan disease neurological aspects. » *Hum Mol Genet*. 2010 May 15;19(10):1939-50. doi: 10.1093/hmg/ddq072. Epub 2010 Feb 16.
- **Corton JM**, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. « 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? » *Eur J Biochem*. 1995 Apr 15;229(2):558-65.
- **Cox EA**, Hardin J. « Sticky worms: adhesion complexes in *C. elegans*. » *J Cell Sci*. 2004 Apr 15;117(Pt 10):1885-97.
- **Daignan-Fornier B, Pinson B**. « 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranosyl 5'-Monophosphate (AICAR), a Highly Conserved Purine Intermediate with Multiple Effects. » *Metabolites*. 2012 Mar 23;2(2):292-302. doi: 10.3390/metabo2020292.
- **de Brouwer AP**, Williams KL, Duley JA, van Kuilenburg AB, Nabuurs SB, Egmont-Petersen M, Lugtenberg D, Zoetekouw L, Banning MJ, Roeffen M, Hamel BC, Weaving L, Ouvrier RA, Donald JA, Wevers RA, Christodoulou J, van Bokhoven H. « Arts syndrome is caused by loss-of-function mutations in PRPS1. » *Am J Hum Genet*. 2007 Sep;81(3):507-18. Epub 2007 Aug 3.
- **Dietrich S**, Abou-Rebyeh F, Brohmann H, Bladt F, Sonnenberg-Riethmacher E, Yamaai T, Lumsden A, Brand-Saber B, Birchmeier C. « The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. » *Development*. 1999 Apr;126(8):1621-9.
- **Dixon SJ**, Roy PJ. « Muscle arm development in *Caenorhabditis elegans*. » *Development*. 2005 Jul;132(13):3079-92. Epub 2005 Jun 1.

- **Dixon SJ**, Alexander M, Fernandes R, Ricker N, Roy PJ. « FGF negatively regulates muscle membrane extension in *Caenorhabditis elegans*. » *Development*. 2006 Apr;133(7):1263-75. Epub 2006 Feb 22.
- **Edelman TL**, McCulloch KA, Barr A, Frøkjær-Jensen C, Jorgensen EM, Rougvie AE. « Analysis of a *lin-42/period* Null Allele Implicates All Three Isoforms in Regulation of *Caenorhabditis elegans* Molting and Developmental Timing. » *G3 (Bethesda)*. 2016 Dec 7;6(12):4077-4086. doi: 10.1534/g3.116.034165.
- **Ellis HM, Horvitz HR**. « Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. » *Cell*. 1986 Mar 28;44(6):817-29.
- **Emmons SW**. « Male development. » *WormBook*. 2005 Nov 10:1-22.
- **Fleming JT**, Squire MD, Barnes TM, Tornoe C, Matsuda K, Ahnn J, Fire A, Sulston JE, Barnard EA, Sattelle DB, Lewis JA. « *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. » *J Neurosci*. 1997 Aug 1;17(15):5843-57.
- **Frézal L**, Félix MA. « *C. elegans* outside the Petri dish. » *Elife*. 2015 Mar 30;4. doi: 10.7554/eLife.05849.
- **Fu R**, Sutcliffe D, Zhao H, Huang X, Schretlen DJ, Benkovic S, Jinnah HA. « Clinical severity in Lesch-Nyhan disease: the role of residual enzyme and compensatory pathways. » *Mol Genet Metab*. 2015 Jan;114(1):55-61. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.11.001. Epub 2014 Nov 8.
- **Gao AW**, Smith RL, van Weeghel M, Kamble R, Janssens GE, Houtkooper RH. « Identification of key pathways and metabolic fingerprints of longevity in *C. elegans*. » *Exp Gerontol*. 2018 Nov;113:128-140. doi: 10.1016/j.exger.2018.10.003. Epub 2018 Oct 6.
- **Garrett et Grisham**, *Biochemistry, Second Edition*.
- **Gartner A**, Milstein S, Ahmed S, Hodgkin J, Hengartner MO. « A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage--induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*. » *Mol Cell*. 2000 Mar;5(3):435-43.
- **Gartner A**, Boag PR, Blackwell TK. « Germline survival and apoptosis. » *WormBook*. 2008 Sep 4:1-20. doi: 10.1895/wormbook.1.145.1.
- **Gendrel M**, Rapti G, Richmond JE, Bessereau JL. « A secreted complement-control-related protein ensures acetylcholine receptor clustering. » *Nature*. 2009 Oct 15;461(7266):992-6. doi: 10.1038/nature08430. Epub 2009 Sep 30.
- **Genetta T**, Morisaki H, Morisaki T, Holmes EW. « A novel bipartite intronic splicing enhancer promotes the inclusion of a mini-exon in the AMP deaminase 1 gene. » *J Biol Chem*. 2001 Jul 6;276(27):25589-97. Epub 2001 Apr 30.
- **Gilder AS**, Chen YB, Jackson RJ 3rd, Jiang J, Maher JF. « Fem1b promotes ubiquitylation and suppresses transcriptional activity of Gli1. » *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Oct 25;440(3):431-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.090. Epub 2013 Sep 25.

- **Giordano-Santini R**, Milstein S, Svrzikapa N, Tu D, Johnsen R, Baillie D, Vidal M, Dupuy D. « An antibiotic selection marker for nematode transgenesis. » *Nat Methods*. 2010 Sep;7(9):721-3. doi: 10.1038/nmeth.1494. Epub 2010 Aug 22.
- **Gitiaux C**, Ceballos-Picot I, Marie S, Valayannopoulos V, Rio M, Verrieres S, Benoist JF, Vincent MF, Desguerre I, Bahi-Buisson N. « Misleading behavioural phenotype with adenylosuccinate lyase deficiency. » *Eur J Hum Genet*. 2009 Jan;17(1):133-6. doi: 10.1038/ejhg.2008.174. Epub 2008 Oct 1.
- **González-Gironès DM**, Moncunill-Massaguer C, Iglesias-Serret D, Cosialls AM, Pérez-Perarnau A, Palmeri CM, Rubio-Patiño C, Villunger A, Pons G, Gil J. « AICAR induces Bax/Bak-dependent apoptosis through upregulation of the BH3-only proteins Bim and Noxa in mouse embryonic fibroblasts. » *Apoptosis*. 2013 Aug;18(8):1008-16. doi: 10.1007/s10495-013-0850-6.
- **Gooding JR**, Jensen MV, Dai X, Wenner BR, Lu D, Arumugam R, Ferdaoussi M, MacDonald PE3, Newgard CB. « Adenylosuccinate Is an Insulin Secretagogue Derived from Glucose-Induced Purine Metabolism. » *Cell Rep*. 2015 Oct 6;13(1):157-167. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.072. Epub 2015 Sep 24.
- **Gumienny TL**, Lambie E, Hartwig E, Horvitz HR, Hengartner MO. « Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. » *Development*. 1999 Feb;126(5):1011-22.
- **Hansen D**, Wilson-Berry L, Dang T, Schedl T. « Control of the proliferation versus meiotic development decision in the *C. elegans* germline through regulation of GLD-1 protein accumulation. » *Development*. 2004 Jan;131(1):93-104. Epub 2003 Dec 3.
- **Hardie DG**. « The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. » *J Cell Sci*. 2004 Nov 1;117(Pt 23):5479-87.
- **Hart AC**, Chao MY. « From Odors to Behaviors in *Caenorhabditis elegans*. » Menini A, editor. *The Neurobiology of Olfaction*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2010. Chapter 1. *Frontiers in Neuroscience*.
- **Herman MA**. « Hermaphrodite cell-fate specification. » *WormBook*. 2006 Jan 9:1-16.
- **Hobert O**. « The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans*. » *WormBook*. 2013 Aug 13:1-106. doi: 10.1895/wormbook.1.161.1.
- **Hobert O**, Moerman DG, Clark KA, Beckerle MC, Ruvkun G. « A conserved LIM protein that affects muscular adherens junction integrity and mechanosensory function in *Caenorhabditis elegans*. » *J Cell Biol*. 1999 Jan 11;144(1):45-57.
- **Holder-Espinasse M**, Marie S, Bourrouillou G, Ceballos-Picot I, Nassogne MC, Faivre L, Amiel J, Munnich A, Vincent MF, Cormier-Daire V. « Towards a suggestive facial dysmorphism in adenylosuccinate lyase deficiency? » *J Med Genet*. 2002 Jun;39(6):440-2.
- **Hooper M**, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Monk M. « HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. » *Nature*. 1987 Mar 19-25;326(6110):292-5.

- **Houthoofd K**, Braeckman BP, Lenaerts I, Brys K, De Vreese A, Van Eygen S, Vanfleteren JR. « Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans*. » *Exp Gerontol*. 2002 Dec;37(12):1371-8.
- **Houtkooper RH**, Williams RW, Auwerx J. « Metabolic networks of longevity. » *Cell*. 2010 Jul 9;142(1):9-14. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.029.
- **Hresko MC**, Williams BD, Waterston RH. « Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in *Caenorhabditis elegans*. » *J Cell Biol*. 1994 Feb;124(4):491-506.
- **Hsin H**, Kenyon C. « Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. » *Nature*. 1999 May 27;399(6734):362-6.
- **Hu PJ**. « Dauer. » *WormBook*. 2007 Aug 8:1-19.
- **Hubbard EJ**, Korta DZ, Dalfó D. « Physiological control of germline development. » *Adv Exp Med Biol*. 2013;757:101-31. doi: 10.1007/978-1-4614-4015-4\_5.
- **Hubbard EJ**, Greenstein D. « Introduction to the germ line. » *WormBook*. 2005 Sep 1:1-4.
- **Itami N**, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. « Palmitic acid induces ceramide accumulation, mitochondrial protein hyperacetylation, and mitochondrial dysfunction in porcine oocytes. » *Biol Reprod*. 2018 May 1;98(5):644-653. doi: 10.1093/biolre/ioy023.
- **Jaeken J**, Van den Berghe G. « An infantile autistic syndrome characterised by the presence of succinylpurines in body fluids. » *Lancet*. 1984 Nov 10;2(8411):1058-61.
- **Jin X**, Townley R, Shapiro L. « Structural insight into AMPK regulation: ADP comes into play. » *Structure*. 2007 Oct;15(10):1285-95.
- **Johnstone ME**, Nash D, Naguib FN. « Three purine auxotrophic loci on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. » *Biochem Genet*. 1985 Aug;23(7-8):539-55.
- **Jørgensen S**, Richter E, and Wojtaszewski J. « Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise » *J Physiol*. 2006 Jul 1; 574(Pt 1): 17–31. doi: 10.1113/jphysiol.2006.109942
- **Jurecka A**, Zikanova M, Tylki-Szymanska A, Krijt J, Bogdanska A, Gradowska W, Mullerova K, Sykut-Cegielska J, Kmoch S, Pronicka E. « Clinical, biochemical and molecular findings in seven Polish patients with adenylosuccinate lyase deficiency. » *Mol Genet Metab*. 2008 Aug;94(4):435-42. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.04.013. Epub 2008 Jun 3.
- **Kahane N**, Cinnamon Y, Kalcheim C. « The roles of cell migration and myofiber intercalation in patterning formation of the postmitotic myotome. » *Development*. 2002 Jun;129(11):2675-87.
- **Kassar-Duchossoy L**, Gayraud-Morel B, Gomès D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, Tajbakhsh S. « Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. » *Nature*. 2004 Sep 23;431(7007):466-71.
- **Keller KE**, Tan IS, Lee YS. « SAICAR stimulates pyruvate kinase isoform M2 and promotes cancer cell survival in glucose-limited conditions. » *Science*. 2012 Nov 23;338(6110):1069-72. doi: 10.1126/science.1224409. Epub 2012 Oct 18.
- **Kimble J**, Crittenden SL. « Controls of germline stem cells, entry into meiosis, and the sperm/oocyte decision in *Caenorhabditis elegans*. » *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:405-33.

- **Kmoch S**, Hartmannová H, Stibůrková B, Krijt J, Zikánová M, Sebesta I. « Human adenylosuccinate lyase (ADSL), cloning and characterization of full-length cDNA and its isoform, gene structure and molecular basis for ADSL deficiency in six patients. » *Hum Mol Genet.* 2000 Jun 12;9(10):1501-13.
- **Köhler M**, Assmann B, Bräutigam C, Storm W, Marie S, Vincent MF, Van den Berghe G, Simmonds HA, Hoffmann GF. « Adenylosuccinase deficiency: possibly underdiagnosed encephalopathy with variable clinical features. » *Eur J Paediatr Neurol.* 1999;3(1):3-6.
- **Krause M**. « MyoD and myogenesis in *C. elegans*. » *Bioessays.* 1995 Mar;17(3):219-28.
- **Kuehn MR**, Bradley A, Robertson EJ, Evans MJ. « A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. » *Nature.* 1987 Mar 19-25;326(6110):295-8.
- **Lakhina V**, McReynolds M, T. Grimes D, Joshua D. Rabinowitz J, D. Burdine R, T. Murphy C. « ZIP-5/bZIP transcription factor regulation of folate metabolism is critical for aging axon regeneration. » Preprint bioRxiv. doi: <https://doi.org/10.1101/727719>
- **LaMunyon CW**, Ward S. « Larger sperm outcompete smaller sperm in the nematode *Caenorhabditis elegans*. » *Proc Biol Sci.* 1998 Oct 22;265(1409):1997-2002.
- **Lee I**, Hendrix A, Kim J, Yoshimoto J, You YJ. « Metabolic rate regulates L1 longevity in *C. elegans*. » *PLoS One.* 2012;7(9):e44720. doi: 10.1371/journal.pone.0044720. Epub 2012 Sep 6.
- **Lemieux H**, Semsroth S, Antretter H, Höfer D, Gnaiger E. « Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. » *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Dec;43(12):1729-38. doi: 10.1016/j.biocel.2011.08.008. Epub 2011 Aug 16.
- **Lesch M, Nyhan WL**. « A FAMILIAL DISORDER OF URIC ACID METABOLISM AND CENTRAL NERVOUS SYSTEM FUNCTION. » *Am J Med.* 1964 Apr;36:561-70.
- **Lewis JA**, Wu CH, Levine JH, Berg H. « Levamisole-resistant mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* appear to lack pharmacological acetylcholine receptors. » *Neuroscience.* 1980;5(6):967-89.
- **Lister JA**. « Development of pigment cells in the zebrafish embryo. » *Microsc Res Tech.* 2002 Sep 15;58(6):435-41.
- **Ljungdahl PO, Daignan-Fornier B**. « Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. » *Genetics.* 2012 Mar;190(3):885-929. doi: 10.1534/genetics.111.133306.
- **Long H**, Cameron S, Yu L, Rao Y. « *De novo* GMP synthesis is required for axon guidance in *Drosophila*. » *Genetics.* 2006 Mar;172(3):1633-42. Epub 2005 Dec 1.
- **Mackinnon AC**, Qadota H, Norman KR, Moerman DG, Williams BD. « *C. elegans* PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. » *Curr Biol.* 2002 May 14;12(10):787-97.
- **MacNeil LT**, Watson E, Arda HE, Zhu LJ, Walhout AJ. « Diet-induced developmental acceleration independent of TOR and insulin in *C. elegans*. » *Cell.* 2013 Mar 28;153(1):240-52. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.049.

- **Mair W**, Morantte I, Rodrigues AP, Manning G, Montminy M, Shaw RJ, Dillin A. « Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTC-1 and CREB. » *Nature*. 2011 Feb 17;470(7334):404-8. doi: 10.1038/nature09706.
- **Mango SE**. « The *C. elegans* pharynx: a model for organogenesis. » *WormBook*. 2007 Jan 22:1-26.
- **Marie S**, Race V, Nassogne MC, Vincent MF, Van den Berghe G. « Mutation of a nuclear respiratory factor 2 binding site in the 5' untranslated region of the ADSL gene in three patients with adenylosuccinate lyase deficiency. » *Am J Hum Genet*. 2002 Jul;71(1):14-21. Epub 2002 May 9.
- **Marie S**, Heron B, Bitoun P, Timmerman T, Van Den Berghe G, Vincent MF. « AICA-ribosiduria: a novel, neurologically devastating inborn error of purine biosynthesis caused by mutation of ATIC. » *Am J Hum Genet*. 2004 Jun;74(6):1276-81. Epub 2004 Apr 26.
- **Meisse D**, Van de Castele M, Beauloye C, Hainault I, Kefas BA, Rider MH, Fougère F, Hue L. « Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. » *FEBS Lett*. 2002 Aug 28;526(1-3):38-42.
- **Mello CC**, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V. « Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. » *EMBO J*. 1991 Dec;10(12):3959-70.
- **Moerman DG, Fire A**. « Muscle: Structure, Function, and Development. » *C. elegans* II. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. Chapter 16.
- **Moerman DG**, Williams BD. « Sarcomere assembly in *C. elegans* muscle. » *WormBook*. 2006 Jan 16:1-16.
- **Monsalve GC**, Van Buskirk C, Frand AR. « LIN-42/PERIOD controls cyclical and developmental progression of *C. elegans* molts. » *Curr Biol*. 2011 Dec 20;21(24):2033-45. doi: 10.1016/j.cub.2011.10.054. Epub 2011 Dec 1.
- **Moreno-Arriola E**, El Hafidi M, Ortega-Cuellar D, Carvajal K. « AMP-Activated Protein Kinase Regulates Oxidative Metabolism in *Caenorhabditis elegans* through the NHR-49 and MDT-15 Transcriptional Regulators. » *PLoS One*. 2016 Jan 29;11(1):e0148089. doi: 10.1371/journal.pone.0148089. eCollection 2016.
- **Mullane K**, Bullough D, Shapiro D. « From academic vision to clinical reality A case study of acadesine. » *Trends Cardiovasc Med*. 1993 Nov-Dec;3(6):227-34. doi: 10.1016/1050-1738(93)90044-7.
- **Narkar VA**, Downes M, Yu RT, Embler E, Wang YX, Banayo E, Mihaylova MM, Nelson MC, Zou Y, Juguilon H, Kang H, Shaw RJ, Evans RM. « AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. » *Cell*. 2008 Aug 8;134(3):405-15. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.051. Epub 2008 Jul 31.
- **Nguyen TM**, Seigneurin F, Froment P, Combarrous Y, Blesbois E. « The 5'-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Involved in the Augmentation of Antioxidant Defenses in Cryopreserved Chicken Sperm. » *PLoS One*. 2015 Jul 29;10(7):e0134420. doi: 10.1371/journal.pone.0134420. eCollection 2015.

- **O'Donnell AF**, Tiong S, Nash D, Clark DV. « The *Drosophila melanogaster* *ade5* gene encodes a bifunctional enzyme for two steps in the *de novo* purine synthesis pathway. » *Genetics*. 2000 Mar;154(3):1239-53.
- **Oburoglu L**, Tardito S, Fritz V, de Barros SC, Merida P, Craveiro M, Mamede J, Cretenet G, Mongellaz C, An X, Klysz D, Touhami J, Boyer-Clavel M, Battini JL, Dardalhon V, Zimmermann VS, Mohandas N, Gottlieb E, Sitbon M, Kinet S, Taylor N. « Glucose and glutamine metabolism regulate human hematopoietic stem cell lineage specification. » *Cell Stem Cell*. 2014 Aug 7;15(2):169-84. doi: 10.1016/j.stem.2014.06.002. Epub 2014 Jun 19.
- **Olmedo M**, Geibel M, Artal-Sanz M, Merrow M. « A High-Throughput Method for the Analysis of Larval Developmental Phenotypes in *Caenorhabditis elegans*. » *Genetics*. 2015 Oct;201(2):443-8. doi: 10.1534/genetics.115.179242. Epub 2015 Aug 20.
- **Park HJ**, Hong YB, Choi YC, Lee J, Kim EJ, Lee JS, Mo WM, Ki SM, Kim HI, Kim HJ, Hyun YS, Hong HD, Nam K, Jung SC, Kim SB, Kim SH, Kim DH, Oh KW, Kim SH, Yoo JH, Lee JE, Chung KW, Choi BO. « ADSSL1 mutation relevant to autosomal recessive adolescent onset distal myopathy. » *Ann Neurol*. 2016 Feb;79(2):231-43. doi: 10.1002/ana.24550. Epub 2015 Dec 15.
- **Parker MH**, Seale P, Rudnicki MA. « Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. » *Nat Rev Genet*. 2003 Jul;4(7):497-507.
- **Payne SH**, Loomis WF. « Retention and loss of amino acid biosynthetic pathways based on analysis of whole-genome sequences. » *Eukaryot Cell*. 2006 Feb;5(2):272-6.
- **Pedley AM**, **Benkovic SJ**. « A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. » *Trends Biochem Sci*. 2017 Feb;42(2):141-154. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.009. Epub 2016 Oct 28.
- **Pepper AS**, Killian DJ, Hubbard EJ. « Genetic analysis of *Caenorhabditis elegans glp-1* mutants suggests receptor interaction or competition. » *Genetics*. 2003 Jan;163(1):115-32.
- **Pinson B**, Vaur S, Sagot I, Couplier F, Lemoine S, Daignan-Fornier B. « Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways. » *Genes Dev*. 2009 Jun 15;23(12):1399-407. doi: 10.1101/gad.521809.
- **Praitis V**, Casey E, Collar D, Austin J. « Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*. » *Genetics*. 2001 Mar;157(3):1217-26.
- **Priess JR**, Schnabel H, Schnabel R. « The *glp-1* locus and cellular interactions in early *C. elegans* embryos. » *Cell*. 1987 Nov 20;51(4):601-11.
- **Raizen DM**, Zimmerman JE, Maycock MH, Ta UD, You YJ, Sundaram MV, Pack AI. « Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. » *Nature*. 2008 Jan 31;451(7178):569-72. doi: 10.1038/nature06535. Epub 2008 Jan 9.
- **Rattan R**, Giri S, Singh AK, Singh I. « 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase. » *J Biol Chem*. 2005 Nov 25;280(47):39582-93. Epub 2005 Sep 21.

- **Rébora K**, Desmoucelles C, Borne F, Pinson B, Daignan-Fornier B. « Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. » *Mol Cell Biol*. 2001 Dec;21(23):7901-12.
- **Rébora K**, Laloo B, Daignan-Fornier B. « Revisiting purine-histidine cross-pathway regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: a central role for a small molecule. » *Genetics*. 2005 May;170(1):61-70. Epub 2005 Mar 2.
- **Redhead NJ**, Selfridge J, Wu CL, Melton DW. « Mice with adenine phosphoribosyltransferase deficiency develop fatal 2,8-dihydroxyadenine lithiasis. » *Hum Gene Ther*. 1996 Aug 20;7(13):1491-502.
- **Rodríguez-Palero MJ**, López-Díaz A, Marsac R, Gomes JE, Olmedo M, Artal-Sanz M. « An automated method for the analysis of food intake behaviour in *Caenorhabditis elegans*. » *Sci Rep*. 2018 Feb 26;8(1):3633. doi: 10.1038/s41598-018-21964-z.
- **Roessler BJ**, Nosal JM, Smith PR, Heidler SA, Palella TD, Switzer RL, Becker MA. « Human X-linked phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity is associated with distinct point mutations in the PRPS1 gene. » *J Biol Chem*. 1993 Dec 15;268(35):26476-81.
- **Rogalski TM**, Mullen GP, Bush JA, Gilchrist EJ, Moerman DG. « UNC-52/perlecan isoform diversity and function in *Caenorhabditis elegans*. » *Biochem Soc Trans*. 2001 May;29(Pt 2):171-6.
- **Sahota A**, Chen J, Boyadjiev SA, Gault MH, Tischfield JA. « Missense mutation in the adenine phosphoribosyltransferase gene causing 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis. » *Hum Mol Genet*. 1994 May;3(5):817-8.
- **Samuel BS**, Rowedder H, Braendle C, Félix MA, Ruvkun G. « *Caenorhabditis elegans* responses to bacteria from its natural habitats. » *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jul 5;113(27):E3941-9. doi: 10.1073/pnas.1607183113. Epub 2016 Jun 17.
- **Schedl T**. « Developmental Genetics of the Germ Line. » *C. elegans II*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. Chapter 10.
- **Schulenburg H**, Félix MA. « The Natural Biotic Environment of *Caenorhabditis elegans*. » *Genetics*. 2017 May;206(1):55-86. doi: 10.1534/genetics.116.195511.
- **Sengupta TK**, Leclerc GM, Hsieh-Kinser TT, Leclerc GJ, Singh I, Barredo JC. « Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: implication for targeted therapy. » *Mol Cancer*. 2007 Jul 10;6:46.
- **Singh K**, Chao MY, Somers GA, Komatsu H, Corkins ME, Larkins-Ford J, Tucey T, Dionne HM, Walsh MB, Beaumont EK, Hart DP, Lockery SR, Hart AC. « *C. elegans* Notch signaling regulates adult chemosensory response and larval molting quiescence. » *Curr Biol*. 2011 May 24;21(10):825-34. doi: 10.1016/j.cub.2011.04.010. Epub 2011 May 5.
- **Singson A**, Hill KL, L'Hernault SW. « Sperm competition in the absence of fertilization in *Caenorhabditis elegans*. » *Genetics*. 1999 May;152(1):201-8.

- **Smith DA.** « A strain-dependent ratchet model for [phosphate]- and [ATP]-dependent muscle contraction. » *J Muscle Res Cell Motil.* 1998 Feb;19(2):189-211.
- **Somech R,** Lev A, Grisaru-Soen G, Shiran SI, Simon AJ, Grunebaum E. « Purine nucleoside phosphorylase deficiency presenting as severe combined immune deficiency. » *Immunol Res.* 2013 May;56(1):150-4. doi: 10.1007/s12026-012-8380-9.
- **Starostina NG,** Lim JM, Schvarzstein M, Wells L, Spence AM, Kipreos ET. « A CUL-2 ubiquitin ligase containing three FEM proteins degrades TRA-1 to regulate *C. elegans* sex determination. » *Dev Cell.* 2007 Jul;13(1):127-39.
- **Sternberg PW.** « Vulval development. » *WormBook.* 2005 Jun 25:1-28.
- **Stiernagle T.** « Maintenance of *C. elegans*. » *WormBook.* 2006 Feb 11:1-11.
- **Stone RL,** Aimi J, Barshop BA, Jaeken J, Van den Berghe G, Zalkin H, Dixon JE. « A mutation in adenylosuccinate lyase associated with mental retardation and autistic features. » *Nat Genet.* 1992 Apr;1(1):59-63.
- **Stoop JW,** Zegers BJ, Hendrickx GF, van Heukelom LH, Staal GE, de Bree PK, Wadman SK, Ballieux RE. « Purine nucleoside phosphorylase deficiency associated with selective cellular immunodeficiency. » *N Engl J Med.* 1977 Mar 24;296(12):651-5.
- **Stretton AO.** « Anatomy and development of the somatic musculature of the nematode *Ascaris*. » *J Exp Biol.* 1976 Jun;64(3):773-88.
- **Sullivan JE,** Carey F, Carling D, Beri RK. « Characterisation of 5'-AMP-activated protein kinase in human liver using specific peptide substrates and the effects of 5'-AMP analogues on enzyme activity. » *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 May 16;200(3):1551-6.
- **Sulston JE,** Schierenberg E, White JG, Thomson JN. « The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. » *Dev Biol.* 1983 Nov;100(1):64-119.
- **Sulston JE, Horvitz HR.** « Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. » *Dev Biol.* 1977 Mar;56(1):110-56.
- **Sultani G,** Samsudeen AF, Osborne B, Turner N. « NAD<sup>+</sup> : A key metabolic regulator with great therapeutic potential. » *J Neuroendocrinol.* 2017 Oct;29(10). doi: 10.1111/jne.12508.
- **Tajbakhsh S, Buckingham M.** « The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. » *Curr Top Dev Biol.* 2000;48:225-68.
- **Tang GJ,** Wang HY, Wang JY, Lee CC, Tseng HW, Wu YL, Shyue SK, Lee TS, Kou YR. « Novel role of AMP-activated protein kinase signaling in cigarette smoke induction of IL-8 in human lung epithelial cells and lung inflammation in mice. » *Free Radic Biol Med.* 2011 Jun 1;50(11):1492-502. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.030. Epub 2011 Mar 2.
- **Tardito S,** Oudin A, Ahmed SU, Fack F, Keunen O, Zheng L, Miletic H, Sakariassen PØ, Weinstock A, Wagner A, Lindsay SL, Hock AK, Barnett SC, Ruppin E, Mørkve SH, Lund-Johansen M, Chalmers AJ, Bjerkvig R, Niclou SP, Gottlieb E. « Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. » *Nat Cell Biol.* 2015 Dec;17(12):1556-68. doi: 10.1038/ncb3272. Epub 2015 Nov 23.

- **Theodoulou FL**, Sibon OC, Jackowski S, Gout I. « Coenzyme A and its derivatives: renaissance of a textbook classic. » *Biochem Soc Trans.* 2014 Aug;42(4):1025-32. doi: 10.1042/BST20140176.
- **Thuwanut P**, Comizzoli P, Pruksananonda K, Chatdarong K, Songsasen N. « Activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) enhances energy metabolism, motility, and fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa in domestic cat model. » *J Assist Reprod Genet.* 2019 Jul;36(7):1401-1412. doi: 10.1007/s10815-019-01470-5. Epub 2019 May 11.
- **Timmons L, Fire A.** « Specific interference by ingested dsRNA. » *Nature.* 1998 Oct 29;395(6705):854.
- **Tiong SY**, Nash D. « Genetic analysis of the adenosine<sup>3</sup> (*Gart*) region of the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. » *Genetics.* 1990 Apr;124(4):889-97.
- **Tiong SY**, Keizer C, Nash D, Bleskan J, Patterson D. « *Drosophila* purine auxotrophy: new alleles of adenosine 2 exhibiting a complex visible phenotype. » *Biochem Genet.* 1989 Jun;27(5-6):333-48.
- **Van Buskirk C**, Sternberg PW. « Epidermal growth factor signaling induces behavioral quiescence in *Caenorhabditis elegans*. » *Nat Neurosci.* 2007 Oct;10(10):1300-7. Epub 2007 Sep 23.
- **Van den Berghe G, Jaeken J.** « Adenylosuccinase deficiency. » *Adv Exp Med Biol.* 1986;195 Pt A:27-33.
- **Van den Berghe G**, Vincent MF, Jaeken J. « Inborn errors of the purine nucleotide cycle: adenylosuccinase deficiency. » *J Inher Metab Dis.* 1997 Jun;20(2):193-202.
- **van Werkhoven MA**, Duley JA, McGown I, Munce T, Freeman JL, Pitt JJ. « Early diagnosis of adenylosuccinate lyase deficiency using a high-throughput screening method and a trial of oral S-adenosyl-L-methionine as a treatment method. » *Dev Med Child Neurol.* 2013 Nov;55(11):1060-4. doi: 10.1111/dmcn.12244. Epub 2013 Aug 13.
- **Verzijl HT**, van Engelen BG, Luyten JA, Steenbergen GC, van den Heuvel LP, ter Laak HJ, Padberg GW, Wevers RA. « Genetic characteristics of myoadenylate deaminase deficiency. » *Ann Neurol.* 1998 Jul;44(1):140-3.
- **Vigne P**, Tauc M, Frelin C. « Strong dietary restrictions protect *Drosophila* against anoxia/reoxygenation injuries. » *PLoS One.* 2009;4(5):e5422. doi: 10.1371/journal.pone.0005422. Epub 2009 May 1.
- **Vrablik TL**, Huang L, Lange SE, Hanna-Rose W. « Nicotinamidase modulation of NAD<sup>+</sup> biosynthesis and nicotinamide levels separately affect reproductive development and cell survival in *C. elegans*. » *Development.* 2009 Nov;136(21):3637-46. doi: 10.1242/dev.028431.
- **Waterston R.H.** « Muscle. In "The nematode *C. elegans*" » (W. B. Wood ed.) pp281-335. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1988.
- **Watson E**, MacNeil LT, Ritter AD, Yilmaz LS, Rosebrock AP, Caudy AA, Walhout AJM. « Interspecies Systems Biology Uncovers Metabolites Affecting *C. elegans* Gene Expression

- and Life History Traits. » *Cell*. 2014 Mar 13;156(6):1336-1337. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.036. Epub 2014 Mar 13.
- **White JG**, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. « The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. » *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1986 Nov 12;314(1165):1-340.
  - **Wolff JR, Zarkower D**. « Somatic sexual differentiation in *Caenorhabditis elegans*. » *Curr Top Dev Biol*. 2008;83:1-39. doi: 10.1016/S0070-2153(08)00401-8.
  - **Zarkower D**. « Somatic sex determination. » *WormBook*. 2006 Feb 10:1-12.
  - **Zetka MC**, Kawasaki I, Strome S, Müller F. « Synapsis and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* require HIM-3, a meiotic chromosome core component that functions in chromosome segregation. » *Genes Dev*. 1999 Sep 1;13(17):2258-70.
  - **Zheng Y**, Brockie PJ, Mellem JE, Madsen DM, Maricq AV. « Neuronal control of locomotion in *C. elegans* is modified by a dominant mutation in the GLR-1 ionotropic glutamate receptor. » *Neuron*. 1999 Oct;24(2):347-61.
  - **Zhu Z**, Li R, Ma G, Bai W, Fan X, Lv Y, Luo J, Zeng W. « 5'-AMP-Activated Protein Kinase Regulates Goat Sperm Functions via Energy Metabolism *In Vitro*. » *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(6):2420-2431. doi: 10.1159/000491616. Epub 2018 Jul 10.
  - **Zikanova M**, Skopova V, Hnizda A, Krijt J, Kmoch S. « Biochemical and structural analysis of 14 mutant adsl enzyme complexes and correlation to phenotypic heterogeneity of adenylosuccinate lyase deficiency. » *Hum Mutat*. 2010 Apr;31(4):445-55. doi: 10.1002/humu.21212.
  - **Zoref-Shani E**, Feinstein S, Frishberg Y, Bromberg Y, Sperling O. « Kelley-Seegmiller syndrome due to a unique variant of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: reduced affinity for 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate manifested only at low, physiological substrate concentrations. » *Biochim Biophys Acta*. 2000 Feb 21;1500(2):197-203.



## **VII. Annexes**

### **A. Article 1**

# **Purine Homeostasis Is Necessary for Developmental Timing, Germline Maintenance and Muscle Integrity in *Caenorhabditis elegans***

**Roxane Marsac, Benoît Pinson, Christelle Saint-Marc, María Olmedo, Marta  
Artal-Sanz, Bertrand Daignan-Fornier, and José-Eduardo Gomes**



# Purine Homeostasis Is Necessary for Developmental Timing, Germline Maintenance and Muscle Integrity in *Caenorhabditis elegans*

Roxane Marsac,\* Benoît Pinson,\* Christelle Saint-Marc,\* María Olmedo,<sup>†,1</sup> Marta Artal-Sanz,<sup>†</sup> Bertrand Daignan-Fornier,\* and José-Eduardo Gomes<sup>\*,2</sup>

\*Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, Université de Bordeaux and CNRS UMR5095, 33077 Bordeaux cedex, France and

<sup>†</sup>Andalusian Center for Developmental Biology, Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Junta de Andalucía/Universidad Pablo de Olavide, Department of Molecular Biology and Biochemical Engineering, 41013 Seville, Spain

ORCID IDs: 0000-0003-2800-9288 (R.M.); 0000-0003-2936-9058 (B.P.); 0000-0002-5701-2665 (M.O.); 0000-0003-1126-0492 (M.A.-S.); 0000-0003-2352-9700 (B.D.-F.); 0000-0001-7264-9448 (J.-E.G.)

**ABSTRACT** Purine homeostasis is ensured through a metabolic network widely conserved from prokaryotes to humans. Purines can either be synthesized *de novo*, reused, or produced by interconversion of extant metabolites using the so-called recycling pathway. Although thoroughly characterized in microorganisms, such as yeast or bacteria, little is known about regulation of the purine biosynthesis network in metazoans. In humans, several diseases are linked to purine metabolism through as yet poorly understood etiologies. Particularly, the deficiency in adenylosuccinate lyase (ADSL)—an enzyme involved both in the purine *de novo* and recycling pathways—causes severe muscular and neuronal symptoms. In order to address the mechanisms underlying this deficiency, we established *Caenorhabditis elegans* as a metazoan model organism to study purine metabolism, while focusing on ADSL. We show that the purine biosynthesis network is functionally conserved in *C. elegans*. Moreover, *adsl-1* (the gene encoding ADSL in *C. elegans*) is required for developmental timing, germline stem cell maintenance and muscle integrity. Importantly, these traits are not affected when solely the *de novo* pathway is abolished, and we present evidence that germline maintenance is linked specifically to ADSL activity in the recycling pathway. Hence, our results allow developmental and tissue specific phenotypes to be ascribed to separable steps of the purine metabolic network in an animal model.

**KEYWORDS** ADSL deficiency; AICAR; metabolism; purine salvage pathway; SAICAR; SZMP; ZMP

**P**URINE biosynthesis pathways ensure the production and homeostasis of AMP and GMP in the cell, and are widely conserved throughout evolution. The *de novo* pathway leads to the synthesis of inosine monophosphate (IMP) using 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) as a precursor. The recycling (salvage) pathway can then transform extant purines, including IMP, synthesized through the *de novo* pathway, to produce AMP and GMP (Figure 1A; reviewed

in Ljungdahl and Daignan-Fornier 2012). Importantly, if available in the extracellular environment, purines can be recovered by specific transporters and subsequently metabolized through the recycling pathway, which requires much less energy expenditure. Indeed, purine synthesis through the *de novo* pathway requires the hydrolysis of six more molecules of ATP than purine synthesis through the recycling pathway.

Imbalance in purine metabolism is involved in several diseases that have been extensively characterized, most of them associated with mutations in genes encoding enzymes involved in purine biosynthesis (reviewed in Nyhan 2005; Kelley and Andersson 2014). The genetics and biochemistry of purine biosynthesis are well established in unicellular organisms like bacteria or yeast, and are highly conserved. Nonetheless, how the disease-causing enzymatic deficiencies lead to the symptoms observed in patients remains elusive. It

Copyright © 2019 by the Genetics Society of America

doi: <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301062>

Manuscript received April 23, 2018; accepted for publication January 24, 2019; published Early Online January 30, 2019.

Supplemental material available at Figshare: <https://doi.org/10.25386/genetics.7642871>.

<sup>1</sup>Present address: Department of Genetics, University of Seville, 41012 Seville, Spain.

<sup>2</sup>Corresponding author: Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, C.N.R.S. UMR5095 and Université de Bordeaux, CS 61390, Bordeaux, 33077 Bordeaux cedex, France. E-mail: jose-eduardo.gomes@u-bordeaux.fr

is particularly challenging to untangle the contribution of shortage in the final products—AMP and GMP—from mutation-caused accumulation of intermediate metabolites in the pathway. For instance, ZMP (5-amino-4-imidazole carboxamide ribonucleotide monophosphate; Bochner and Ames 1982) and SZMP (succinyl-ZMP)—two intermediates of the purine *de novo* pathway (Figure 1)—are known to act as signal metabolites regulating gene expression transcriptionally in yeast (Pinson *et al.* 2009). Moreover, ZMP is known to activate AMPK (AMP activated kinase) by mimicking AMP (Jin *et al.* 2007), and SZMP has been shown to directly bind and interfere with pyruvate kinase activity in cancer cells (Keller *et al.* 2012). In addition, SAMP (succinyl-AMP)—an intermediate metabolite in the recycling pathway—has been shown to stimulate insulin secretion in pancreatic cells (Gooding *et al.* 2015). Hence SZMP, ZMP, or SAMP buildup could potentially disrupt homeostasis upon deficiencies in the enzymes using them as substrates, *i.e.*, ADSL (SZMP and SAMP) and ATIC (ZMP, Figure 1A). Accordingly, mutations in the human genes encoding for these two enzymes are associated with ADSL deficiency and ATIC deficiency (*a.k.a.* AICArribosiduria), syndromes whose etiology remains unknown (Race *et al.* 2000; Marie *et al.* 2004; Spiegel *et al.* 2006; Jurecka *et al.* 2008, 2015; Zikanova *et al.* 2010). Adding to the complexity of the issue, ADSL catalyzes two different reactions, conversion of SZMP in ZMP in the *de novo* pathway, and conversion of SAMP in AMP—a step required for AMP synthesis whether coming from the *de novo* or from the recycling pathway (Figure 1A). This raises the question of which of the two steps is associated with ADSL deficiency phenotypes.

In comparison with microorganisms, the study of purine metabolic deficiencies in patients faces yet other challenges. One such challenge is tissue specificity, as different tissues may require different levels of purines depending on their specialized function. For instance, in ADSL-deficiency patients, the most severe symptoms affect the muscles and the nervous system, suggesting these tissues have a larger requirement for purine metabolism, either for their function or during development. Another challenge is purine transport across tissues; the tissue affected by the deficiency not being necessarily the tissue where the enzyme is active. Moreover, purines can be available exogenously from the food source; therefore, the consequences of purine metabolism deficiencies are not necessarily caused by limiting amounts of purines. Finally, purine metabolism might be subject to different regulations throughout development, in which case the impairments observed could be the consequence of a requirement for purine regulation at a specific developmental stage.

In order to address these issues, we sought to take advantage of *C. elegans* as a model organism. Through a genetic approach, we characterized deficiencies in the purine biosynthesis pathways, focusing our analysis on an ADSL-deficient mutant. Our goal was to establish the phenotypes associated with this enzymatic deficiency in order to uncover what functions, tissues, and developmental stages are affected.

Given ADSL is required both in the *de novo* and recycling pathways, we performed a comparative analysis with ATIC and GPPAT deficiencies to dissect the contribution of the *de novo* vs. recycling pathways to the phenotypes observed. We established that ADSL deficiency strongly disrupts muscle integrity, postembryonic developmental timing and germline stem cell (GSC) maintenance. Importantly, neither abolishing the *de novo* purine synthesis pathway *per se*, nor the accumulation of *de novo* pathway intermediate metabolites ZMP and SZMP, has an impact on these traits. Furthermore, we found no essential requirement for the *de novo* pathway in *C. elegans* under standard laboratory conditions.

## Materials and Methods

### *C. elegans* strains and culture

Nematodes were maintained under standard culture conditions (Brenner 1974; Stiernagle 2006), on nematode growth medium (NGM), with *Escherichia coli* (strain OP50) as food source, kept at 20° (except strains carrying the transgene *ruIs32* [*pie-1p::GFP::H2B* + *unc-119(+)*], which were kept at 25°).

The following *C. elegans* strains were used in the study: N2 (Bristol, wild-type reference strain) obtained from the Caenorhabditis Genetics Center (CGC), AZ212 *ruIs32* [*pie-1p::GFP::H2B* + *unc-119(+)*] III, CF1903 *glp-1(e2141)* III, PE254 *fels4* [*sur-5p::luciferase::GFP* + *rol-6(su1006)*] V, VC2999 R151.2(gk3067) III/hT2 [*bli-4(e937)* *let-(q782) qIs48*] (I,III) - parental strain for the hT2 balancer, WBX52 *adsl-1(tm3328)* I/hT2 [*bli-4(e937)* *let-(q782) qIs48*] (I,III), WBX53 *adsl-1(tm3328)* I; *ppat-1(tm6344)* III/hT2 [*bli-4(e937)* *let-(q782) qIs48*] *ppat-1(tm6344)* (I,III) (from WBX119 and WBX52), WBX119 *ppat-1(tm6344)* III, WBX117 *atic-1(tm6374)* IV, WBX116 *ppat-1(tm6344)* III, *atic-1(tm6374)* IV (from WBX119 and WBX117); WBX124 *atic-1(tm6374)* IV; *fels4* [*sur-5p::luciferase::GFP* + *rol-6(su1006)*] V (from PE254 and WBX116), WBX127 *ppat-1(tm6344)* I; *adsl-1(tm3328)* III/hT2 [*bli-4(e937)* *let-(q782) qIs48*] *ppat-1(tm6344)* (I,III); *fels4* [*sur-5p::luciferase::GFP* + *rol-6(su1006)*] V (from PE254 and WBX53), WBX125 *ppat-1(tm6344)* III; *atic-1(tm6374)* IV; *fels4* [*sur-5p::luciferase::GFP* + *rol-6(su1006)*] V (from PE254 and WBX116), WBX130 *adsl-1(tm3328)* I/hT2 [*bli-4(e937)* *let-(q782) qIs48*] (I,III); *fels4* [*sur-5p::luciferase::GFP* + *rol-6(su1006)*] V (PE254 and WBX53), WBX131 *ppat-1(tm6344)* III; *fels4* [*sur-5p::luciferase::GFP* + *rol-6(su1006)*] V (from PE254 and WBX116), WBX147 *ppat-1(tm6344)* *ruIs32* [*pie-1p::GFP::H2B* + *unc-119(+)*] III (from AZ212 and WBX119), WBX149 *adsl-1(tm3328)* I; *ruIs32* [*pie-1p::GFP::H2B* + *unc-119(+)*] III/hT2 [*bli-4(e937)* *let-(q782) qIs48*] (I,III) (from AZ212 and WBX52) and WBX152 *adsl-1(tm3328)* I; *ppat-1(tm6344)* *ruIs32* [*pie-1p::GFP::H2B* + *unc-119(+)*] III/hT2 [*bli-4(e937)* *let-(q782) qIs48*] (I,III) (from WBX147 and WBX149). The *adsl-1(tm3328)*, *ppat-1(tm6344)*, and

*atic-1(tm6374)* deletion alleles—referred to as *adsl-1(Δ)*, *ppat-1(Δ)*, and *atic-1(Δ)* throughout the manuscript—were generated by the laboratory of Shohei Mitani, National Bioresource Project (NBRP), Japan; all strains carrying these alleles used in this study were outcrossed a minimum of four times.

**Nematode synchronization:** Adult worms were collected with M9 buffer in 15 ml conical tubes, centrifuged 1 min at 1000 rpm, and the supernatant was discarded. Worm bleach solution (1 M NaOH, 0.25 M NaOCl) was added until the carcasses dissolved and eggs were released (~8 min). Eggs were washed three times with M9 buffer then transferred onto NGM seeded plates.

**RNAi:** *adsl-1* PCR fragment was amplified with oligomers 5'-CTTCTCCGGCAGAATCATCCAGTG-3' and 5'-TGA CTGTGC GACGTACTCATTACC-3', and *adss-1* PCR fragment was amplified with oligomers 5'-GACGTCTTCCAACAAGACTGTGTCC-3' and 5'-ACGAGACGGCGATACTTCTCCGAG-3'. Both fragments were inserted onto L4440 plasmid (*EcoRV* site) (Timmons and Fire 1998). For RNAi experiments, HT115 (DE3), bacteria transformed with either the *adsl-1(RNAi)* or *adss-1(RNAi)* feeding vectors, or L4440 plasmid (Control), were cultured overnight at 37° in LB 150 mg/liter Ampicillin and induced with 2 mM IPTG 1–2 hr prior seeding onto NGM 2 mM IPTG 150 mg/liter Ampicillin, in which synchronous populations of worms were cultured from hatching to adulthood (unless specified).

Embryonic lethality in *adsl-1(tm3328)/+* progeny: *adsl-1(tm338)/hT2 [bli-4(e937) let-?(q782) qIs48]* hermaphrodites—expressing pharyngeal GFP—were crossed to N2 males. Non-GFP hermaphrodites in the progeny were selected as *adsl-1(tm338)/+* and allowed to lay eggs, one worm per plate, for ~24 hr. Upon removal of the adults plates were kept in culture for another 24 hr, upon which unhatched eggs were scored as dead embryos.

### Yeast heterologous rescue assay

Yeast expression vectors were constructed by inserting full-length cDNAs of *ppat-1* (amplified using oligomers 5'-CAC TAAATTACCGGATCAATTCGGGGGATCCATGTGTGGTATA TTTGGGATTG-3' and 5'-CATAACTAATTACATGATGCGGCC CTCCTGCAGTTATAAATCGATAGCAACTGG-3'), *adsl-1* (5'-CGGGATCCGTATCATGGCCTCCGAAGACAAGT-3' and 5'-CCAATGCATGAATCAAACATCCAGCTGAACATTTCC-3'), and *atic-1b* (5'-GAAGATCTCGACGAATTGTGTGAAATGACCGAC -3' and 5'-ATAAGAATGCGGCCGCATCTAATGGTGGAAGAGA CGAAGTC-3') onto pCM189 plasmid (Gari *et al.* 1997). *ade4Δ* yeast strain, genotype *ade4::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0*, was used to test heterologous rescue by *ppat-1*, *ade13Δ* yeast strain, genotype *ade13::kanMX4; his3Δ; leu2Δ; ura3Δ*, was used to test heterologous rescue by *adsl-1* and *ade16Δ ade17Δ* double mutant, genotype *ade16::KanMX4; ade17::KanMX4; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0* was used to test heterologous rescue with *atic-1b*.

### *adsl-1(Δ)* rescue

A genomic fragment containing the *adsl-1* reference allele, ~1 kb upstream of the start codon and ~1 kb downstream of the stop codon, was amplified by PCR using oligonucleotides 5'-GCTCCCATGATATTCTACCG-3' and 5'-GAGGATT CAACGGTGCTTGCA-3', and as template the cosmid R06C7 (obtained from the Sanger Center). The PCR-amplified fragment was cloned onto pBluescript on the *EcoRV* site, we named this plasmid pRM01. The insert sequence was verified upon cloning. Transgenic lines were obtained by standard microinjection (Mello *et al.* 1991), *adsl-1/+* animals were cotransformed with pRM01 at 1 or 5 ng/μl, pDD04 at 10 ng/μl as transformation marker—pDD04 expresses GFP in the pharynx, under the control of the *myo-2* promoter (Giordano-Santini *et al.* 2010)—and pJM001 as carrier DNA at 30–90 ng/μl [a kind gift from Denis Dupuy, Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB), Bordeaux, France].

### Imaging

For adult morphology, differential interference contrast (DIC) (also known as Nomarski) images were taken with a Leitz Diaplan microscope. Adult worms were mounted in M9 buffer, on a 2% agarose cushion. Images were acquired with a VisiCam 5.0 camera, analyzed, and processed with Fiji software. For imaging of the *pie-1p::GFP::H2B* germline reporter, synchronized adult worms were mounted in M9 Buffer 5 mM Levamisole onto a 2% agarose cushion. Images were acquired with an Olympus IX81 microscope under a 40× oil-immersion objective, with a Hamamatsu Orca R2 camera. Images were analyzed with Fiji software. For size measurements, synchronized populations of young adult worms were used; each worm was measured three times on three different pictures. Images were acquired on a Nikon SMZ18 stereo microscope with VisiCam 5.0 camera, and analyzed and processed with Fiji software.

### Immunostaining

Immunostaining was performed on synchronized populations of worms. N2 and *de novo* pathway mutants were fixed 72 hr after synchronization; *adsl-1(Δ)* and *ppat-1(Δ)*; *adsl-1(Δ)* were fixed 96 hr after synchronization. The fixation protocol was adapted from Benian *et al.* (1996). Worms were collected in ice-cold PBS buffer in 1.5-ml tubes and centrifuged. The supernatant was discarded, and fixation solution was added (made fresh, 1 ml of MRBW buffer, 320 mM KCl, 80 mM NaCl, 40 mM EGTA, 20 mM spermidine, 60 mM Pipes was added to 2.8 ml of methanol and 200 μl of formaldehyde 20%), followed by five cycles of freezing in liquid N<sub>2</sub> and thawing, followed by 1 hr incubation at 4° with gentle agitation, fixation solution was replaced by a permeabilization solution (PBS, Triton X-100 2%, β-mercaptoethanol 1%) and incubated 1 hr at room temperature, permeabilization solution was renewed and incubated 1 hr at room temperature, followed by three washes in PBSt (PBS, 0.5% Triton X-100), after which worms were incubated with primary

antibody (diluted 1:1000 in PBSt 5% fetal calf serum) overnight at 4° with gentle agitation, washed three times in PBSt and incubated with secondary antibody (diluted 1:500 in PBSt 5%FCS). Monoclonal antibody 5–6 (Developmental Studies Hybridoma Bank) directed against muscle myosin was used as primary antibody, anti-mouse Alexa<sup>555</sup> (Molecular Probes) was used as secondary antibody, worms were mounted on Fluoroshield (Sigma). Images were acquired with a Leica DM6000 TCS SP5 confocal microscope using LAS AF (Leica) software.

### **Metabolic profiling by HPLC**

For an extraction, ~7500 young adult worms, 72 hr after synchronization, were collected with ice-cold water into 15 ml conical tubes, and centrifuged at 1000 rpm for 1 min at 4°; the supernatant was discarded, eliminating most bacteria. The nematode pellet was washed with 10 ml of cold 10 mM Hepes and centrifuged. The worm pellet was resuspended in 10 mM Hepes, 1 ml of worm suspension was transferred into 4 ml of absolute ethanol at 80°, incubated for 5 min and cooled on ice for 10 min. Samples were desiccated on a rotovapor apparatus; dry residue was resuspended in 350 µl of HyClone Molecular Biology-Grade Water (GE Healthcare) and centrifuged at 21,000 × g, 5 min at 4°. The supernatant was transferred and centrifuged again at 21,000 × g, 1 hr at 4°; this final supernatant was used for HPLC. Metabolites were separated by ionic chromatography on an ICS3000 chromatography station (Dionex, Sunnyvale, CA), and measured by an UV diode array (Ultimate 3000 RS; Dionex). Metabolites were separated on a carbopacPA1 column (250 × 2 mm; Dionex) using a sodium acetate gradient (Ceballos-Picot *et al.* 2015). Metabolite levels were normalized relative to dry weight; the same amount of worms used in the extractions were collected in ice-cold water, 72 hr after synchronization, centrifuged, washed five times with water, allowed to evaporate for 4 days at 70° and weighed.

### **Lifespan**

Upon synchronization (see above), worms were grown on standard conditions until adulthood, whereupon they were transferred onto a new plate every 24 hr, and scored. Immobile worms unresponsive to touch were considered dead. Three replicate experiments were performed on different days, typically with three different plates per genotype, per replicate and 10–40 worms per plate.

### **Locomotion and behavioral assays**

Locomotion speed measurement was adapted from Zheng *et al.* (1999), Hart (2006); images were acquired on a Leica Z16 APO Macroscope and processed with Fiji software. Worm displacement was measured by tracking the anterior pharynx position, once per second. For each recording, one single worm was placed on one intermediate plate without food, and then transferred onto the recorded plate ~0.5 cm away from the bacterial food source, with the pharynx toward

the bacteria lawn. Locomotion was recorded for 1 min, or until the worm reached the bacteria if it did so in <1 min.

Aldicarb (Sigma) and levamisole (Sigma) assays were performed as described in Gendrel *et al.* (2009). Synchronized adult worms were placed on 1 mM Aldicarb or 0.4 mM Levamisole plates for 2 hr, after which plates were tapped 10 times and worm movement was scored.

Mechanosensory response assay was performed as described (Hobert *et al.* 1999; Hart 2006). Adult worms (~72 hr after synchronization) were isolated on plates without food for 3 min, and stimulated with an eyelash on the posterior pharynx, and scored for avoidance behavior; each worm was stimulated and scored 10 times 3 min apart.

### **Postembryonic development**

Postembryonic development was monitored as described by Olmedo *et al.* (2015). In brief, upon synchronization, 20 embryos per microliter were incubated in M9 buffer overnight with agitation, allowing L1 larvae to hatch. A single L1 larva was added per well to 96-well plates with S-Basal media, 10 g/liter *E. coli* OP50 (wet weight) and 100 µM D-Luciferin. The resulting luminescence was measured with a Berthold Centro LB960 XS<sup>3</sup> during 1 sec at 5-min intervals, within a temperature controlled Panasonic MIR-154 incubator.

### **Statistics**

Statistical analysis was performed using Graphpad, Excel, Numbers, and R softwares. We considered statistical tests to be significant at  $P < 0.01$ .

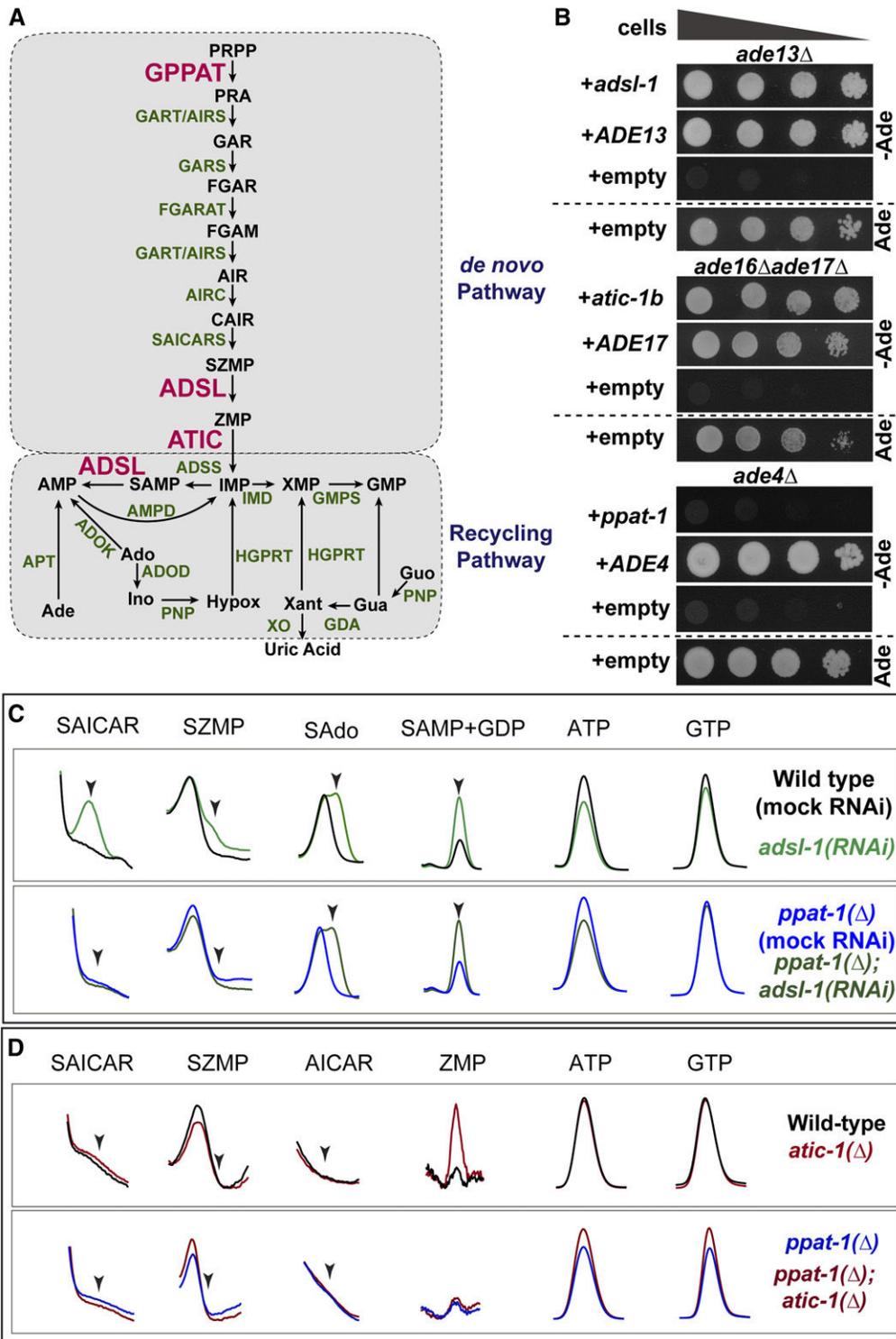
### **Data availability**

Strains and plasmids are available upon request. The authors affirm that all data necessary for confirming the conclusions of the article are present within the article, figures, and tables. Supplemental material available at Figshare: <https://doi.org/10.25386/genetics.7642871>.

## **Results**

### ***The purine biosynthesis pathway is functionally conserved in C. elegans***

In order to establish *C. elegans* as a model to study purine metabolism, we first sought to investigate conservation of the purine biosynthesis network. We identified, through sequence homology, genes encoding the putative nematode enzymes involved in purine biosynthesis (Supplemental Material, Figure S1A). We found that both *de novo* and recycling pathways are conserved in *C. elegans*, as judged by sequence similarity. Specifically, for each enzyme, we identified one single ortholog in all but one case (three genes putatively encoding xanthine oxidase). Notably, in *Saccharomyces cerevisiae*, the histidine pathway contributes to the purine *de novo* pathway, ZMP being a byproduct of histidine synthesis (reviewed in Ljungdahl and Daignan-Fornier 2012). Consistent with the histidine pathway loss in worms previously



**Figure 1** Purine metabolism in *C. elegans*. (A) Schematics of the purine biosynthesis pathways in *C. elegans* based on sequence homology. Enzymes subjected to functional analysis are represented in red, other enzymes in green, and metabolites in black. (B) Drop test to assess adenine auxotrophy in yeast *S. cerevisiae* mutants deficient for enzymes ADSL (*ade13Δ*), ATIC (*ade16Δ ade17Δ*), or GPPAT (*ade4Δ*) expressing *C. elegans* genes *adsl-1*, *atic-1b* and *ppat-1*, respectively. Expression of *S. cerevisiae* genes *ADE13*, *ADE17*, and *ADE4* was used as positive control, and expression vector without insert as negative control. A culture with adenine is shown as auxotrophy control. In all drop tests presented, four drops are shown per condition, corresponding to serial dilutions (1:10) of cellular suspensions, with decreasing cell concentrations from left to right. (C) Zoom in on HPLC chromatogram peaks of specific metabolites SAICAR (SZMP riboside form), SZMP, sAdo (succinyl-adenosine, SAMP riboside form), SAMP, ATP, and GTP, upon *adsl-1(RNAi)* and *ppat-1(Δ)*; *adsl-1(RNAi)*. (D) Zoom in on HPLC chromatogram peaks of specific metabolites SAICAR (SZMP riboside form), SZMP, AICAR (ZMP riboside form), ZMP, ATP, and GTP, in *atic-1(Δ)* and *ppat-1(Δ)*; *atic-1(Δ)*. Ade, adenine; Ado, adenosine; SAdo, succinyl-adenosine; Ino, Inosine; Hypox, hypoxanthine; Xant, Xantine; Gua, guanine; Guo, guanosine. In (C) and (D), scales are adjusted differently among metabolites, in order to highlight differences between genotypes.

reported (Payne and Loomis 2006), we found no *C. elegans* orthologs for yeast HIS1, HIS4, HIS6, and HIS7—required for ZMP synthesis through the histidine pathway; thus, ZMP is most likely synthesized exclusively through the purine *de novo* pathway.

Given the sequence conservation, we undertook a functional analysis focusing on the ADSL enzyme, including ATIC and GPPAT for comparison (see below). Importantly, sequence

alignment showed that ADSL, ATIC, and GPPAT are highly conserved (Figure S2). The genes encoding ADSL, ATIC, and GPPAT in *C. elegans* were named *adsl-1*, *atic-1*, and *ppat-1* (wormbase.org), respectively. We first tested whether those three *C. elegans* genes were functionally conserved using an heterologous rescue assay. We transformed yeast *S. cerevisiae* *ade13Δ*, *ade16Δ ade17Δ*, and *ade4Δ* mutants with plasmids containing the wild-type sequences of the

predicted *C. elegans* homologous genes *adsl-1*, *atic-1*, and *ppat-1*, respectively. Expression of *adsl-1* restored adenine prototrophy of *ade13Δ* yeast (Figure 1B); likewise, expression of splicing isoform *atic-1b* restored adenine prototrophy of the *ade16Δade17Δ* double mutant (Figure 1B). These results confirm that *adsl-1* encodes the ADSL enzyme and that *atic-1* encodes the ATIC enzyme. By contrast, expression of *ppat-1* alone was not sufficient to restore adenine prototrophy of yeast *ade4Δ* (Figure 1B). Thus, in our heterologous rescue assay, we could neither confirm nor rule out whether *ppat-1* encodes the GPPAT enzyme.

We next tested functional conservation of ADSL, ATIC, and GPPAT activities *in vivo*. For our functional analysis, we used deletion mutant alleles, putative genetic nulls, henceforth referred to as *adsl-1(Δ)*, *atic-1(Δ)*, and *ppat-1(Δ)* (see *Materials and Methods*). One would predict accumulation of ADSL substrates SZMP and SAMP upon *adsl-1* loss-of-function as well as ZMP buildup in *atic-1(Δ)*, and no detectable *de novo* pathway intermediate metabolites in *ppat-1(Δ)* (Figure S1B). To test these hypotheses, we performed worm metabolic profiling by HPLC (Figure S1C). We observed a consistent accumulation of SZMP and its riboside form SAICAR upon *adsl-1(RNAi)*, as well as a robust accumulation of SAMP, and its riboside form SAdo (Figure 1C), while neither metabolite was detected in the wild-type (N2) reference strain. Hence, both *de novo* and recycling pathways are functionally conserved in *C. elegans*, and *adsl-1* is required for ADSL activity *in vivo*. Furthermore, we observe a modest but consistent accumulation of ZMP both in *atic-1(Δ)* mutants (Figure 1D), as well as *atic-1(RNAi)* animals (not shown), demonstrating that *atic-1* encodes ATIC enzyme. The accumulation of SZMP and ZMP in *adsl-1(RNAi)* and *atic-1(Δ)* was rather modest. By contrast, we observed a robust accumulation of SAMP in *adsl-1(RNAi)*. These results suggest that *C. elegans* purine biosynthesis relies mostly on the recycling pathway, at least in standard culture conditions. Notably, ATP levels are slightly lower in *adsl-1(RNAi)* compared to wild-type (Figure 1C). Otherwise the abundance of ATP and GTP were not severely affected in the deficiencies analyzed.

As to the conservation of GPPAT, the HPLC analysis provided crucial functional evidence: SZMP was not detected in *ppat-1(Δ)*; *adsl-1(RNAi)* (Figure 1C), nor was ZMP detected in *ppat-1(Δ)*; *atic-1(Δ)* (Figure 1D), or *ppat-1(Δ)*; *atic-1(RNAi)* (not shown). This demonstrates that the *ppat-1* gene is indeed required for purine synthesis through the *de novo* pathway. Noteworthy, SAMP accumulation in *ppat-1(Δ)*; *adsl-1(RNAi)* is similar to *adsl-1(RNAi)* alone, providing an internal control for RNAi efficiency and further confirming that SZMP accumulation in *adsl-1(RNAi)* is dependent on *ppat-1*. In summary, our metabolic profiling validates functional conservation of ADSL and ATIC, and demonstrates that *ppat-1* is required for the *de novo* pathway, consistent with the prediction that it encodes the GPPAT enzyme in *C. elegans*.

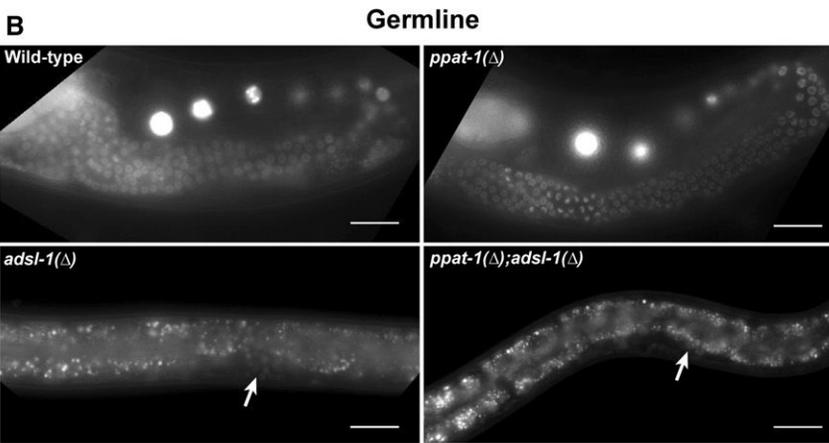
### Functional analysis of *adsl-1*

Because SZMP and SAMP are known to function as regulatory metabolites in other organisms (Rebora *et al.* 2001; Pinson *et al.* 2009; Keller *et al.* 2014; Gooding *et al.* 2015), and because they may play an important role in the etiology of the ADSL deficiency, we focused our functional analysis on *adsl-1*. In order to distinguish the effects of SZMP buildup from those due to the loss of *de novo* purine synthesis, we further include *ppat-1* in our analysis. Moreover, in order to distinguish the effect of ADSL activity strictly in the *de novo* pathway, converting SZMP to ZMP, from the activity in converting SAMP to AMP, for comparison we used ATIC-deficient worms. ATIC participates only in the *de novo* pathway accumulating ZMP, which shares some targets with SZMP, at least in yeast (Rebora *et al.* 2001; Pinson *et al.* 2009). Finally, in order to test whether phenotypes observed in *adsl-1(Δ)* were due to SZMP buildup, we performed a systematic epistasis analysis of the *ppat-1(Δ)*; *adsl-1(Δ)* double mutant. Similarly, to test whether phenotypes in the *atic-1(Δ)* mutant were caused by ZMP accumulation, we performed epistasis in the *ppat-1(Δ)*; *atic-1(Δ)* double mutant. Throughout the manuscript, we refer collectively to all three single mutant animals plus the *ppat-1(Δ)*; *adsl-1(Δ)* and *ppat-1(Δ)*; *atic-1(Δ)* double mutants as “purine mutants”, and to *ppat-1(Δ)*, *atic-1(Δ)* single mutants and *ppat-1(Δ)*; *atic-1(Δ)* double mutant animals as “*de novo*” pathway mutants.

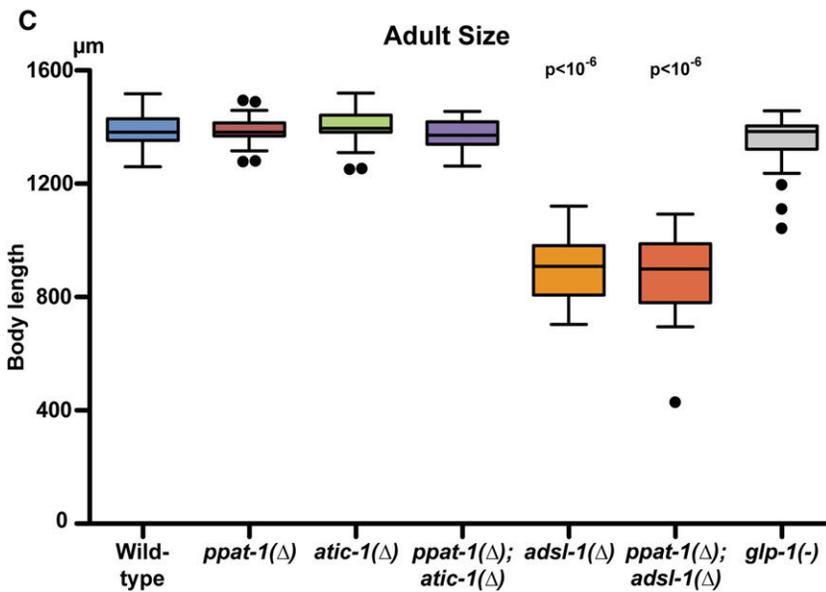
### *adsl-1* is required for the maintenance of GSCs

The *adsl-1(Δ)* homozygous animals display striking morphological defects. They are noticeably smaller than wild type, sterile, and often present a protruding vulva (Figure 2A). We observe a complete absence of oocytes and sperm cells in *adsl-1(Δ)* and *ppat-1(Δ)*; *adsl-1(Δ)* worms. Only a reduced number of nuclei morphologically resembling GSCs are detectable near the vulva, where the germline distal tip cell is found in wild-type animals (Figure S3A). By contrast, *de novo* pathway mutants are viable and fertile, and the overall morphology is similar to wild-type worms. To better characterize the GSCs phenotype, we used a germline-specific reporter transgene expressing H2B::GFP fusion in the GSCs, under the control of the *pie-1* promoter (Praitis *et al.* 2001). While in *ppat-1(Δ)* single mutants, the germline is indistinguishable from wild type, in *adsl-1(Δ)* and *ppat-1(Δ)*; *adsl-1(Δ)* animals, sterility is fully penetrant and the germline is barely detectable, if at all (Figure 2B). Indeed we observed that 52.2% of *adsl-1(Δ)* ( $n = 23$ ) and 52% of *ppat-1(Δ)*; *adsl-1(Δ)* animals ( $n = 25$ ) had no detectable H2B::GFP, 43.5% of *adsl-1(Δ)* and 44% of *ppat-1(Δ)*; *adsl-1(Δ)* had  $\leq 10$  H2B::GFP positive nuclei, and 4.3% of *adsl-1(Δ)* and 4% of *ppat-1(Δ)*; *adsl-1(Δ)* had barely  $> 10$  H2B::GFP positive nuclei. Hence, *adsl-1* is required for proliferation and/or maintenance of GSCs independently of *ppat-1*.

It has been shown that sterility associated with a deficiency in the pyrimidine recycling pathway could be rescued by supplementation of the culture medium with pyrimidine



**Figure 2** Developmental defects in purine mutants. (A) DIC whole body images of representative young adults for each of the genotypes studied (Bar, 200  $\mu\text{m}$ ). (B) Fluorescence micrographs of worms expressing H2B::GFP in the germline under the control of the *pie-1* promoter. Arrows point at rare germ nuclei expressing H2B::GFP; spotty pattern throughout *adsl-1*( $\Delta$ ) and *ppat-1*( $\Delta$ ); *adsl-1*( $\Delta$ ) corresponds to intestinal auto-fluorescence (Bar, 25  $\mu\text{m}$ ). (C) Tukey box plot depicting body length of all purine mutants and *glp-1*(-) for comparison (means statistically different—one-way ANOVA—indicated *P* values refer to comparison with wild-type—Bonferroni multiple comparison *t*-test—otherwise comparison to wild type bears no significant difference; *n* = 30 for all genotypes).



nucleosides (Chi *et al.* 2016). Thus, we tested whether supplementation with purine nucleosides could rescue *adsl-1*( $\Delta$ ) sterility. When cultured with 20 mM adenosine (Ado in Figure 1A) in the medium from hatching until adulthood, both *adsl-1*( $\Delta$ ) ( $n = 55$ ) and *ppat-1*( $\Delta$ ); *adsl-1*( $\Delta$ ) ( $n = 54$ ) were sterile, much like the nonsupplemented controls ( $n = 80$  and  $n = 88$ , respectively). As expected, 100 mM inosine (Ino in Figure 1A) supplementation had no effect on *adsl-1*( $\Delta$ ) ( $n = 28$ ) or *ppat-1*; *adsl-1*( $\Delta$ ) ( $n = 64$ ) sterility. Under the same conditions, wild-type (20 mM adenosine  $n = 86$ ; 100 mM inosine  $n = 99$ ) and *ppat-1*( $\Delta$ ) (20 mM adenosine  $n = 76$ ; 100 mM inosine  $n = 100$ ) worms were fertile, to the same extent as nontreated controls [wild type  $n = 116$ ; *ppat-1*( $\Delta$ )  $n = 114$ ]. We further tested whether adenosine supplementation could rescue *adsl-1* partial loss of function. When we performed *adsl-1*(RNAi) with 20 mM adenosine in the culture medium, we observed 30.8% sterility ( $n = 182$ ) compared to 17.0% in absence of adenosine supplementation ( $n = 141$ ), while mock RNAi produced 0% sterility, in both 20 mM adenosine or no adenosine supplementation ( $n = 101$  and  $n = 103$  respectively). In summary, we found no evidence that purine supplementation in the culture medium allows to recover the GSCs defects of *adsl-1*( $\Delta$ ).

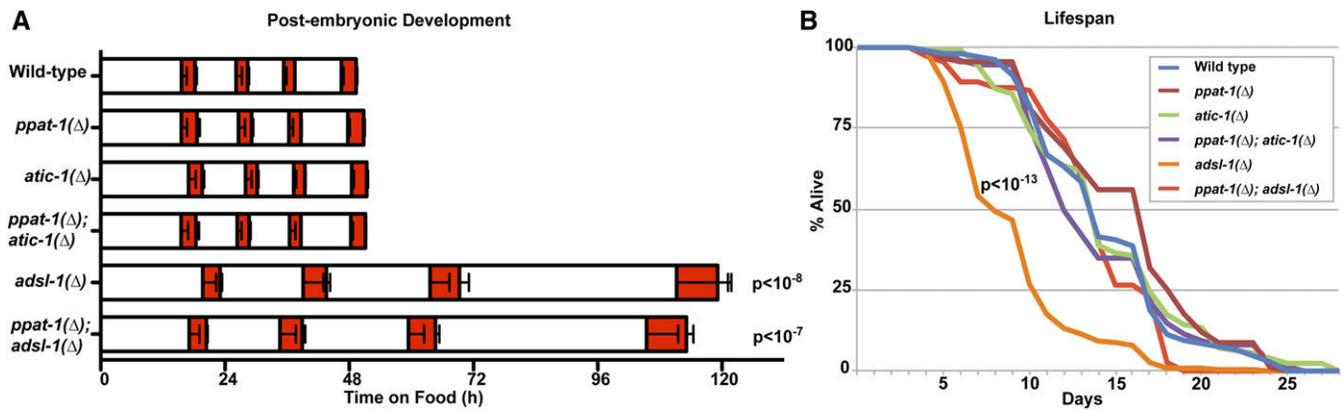
As mentioned above, the *de novo* pathway mutants present a germline undistinguishable from wild type, in contrast to the complete sterility of *adsl-1*( $\Delta$ ). In *C. elegans*, adult hermaphrodites reproduce through self-fertilization, with the number of progeny being modulated by food source and metabolic status (Houthoofd *et al.* 2002; Watson *et al.* 2014). In order to investigate whether the *de novo* pathway could impact the level of fertility, we measured total number of eggs laid by *ppat-1*( $\Delta$ ), *atic-1*( $\Delta$ ), and *ppat-1*( $\Delta$ ); *atic-1*( $\Delta$ ) hermaphrodites throughout their reproductive life. We observed that *ppat-1*( $\Delta$ ) fertility is in the wild-type range, while *atic-1*( $\Delta$ ) fertility is significantly lower (Figure S3B). Importantly, *ppat-1*( $\Delta$ ) is epistatic to *atic-1*( $\Delta$ ) regarding fertility, suggesting that ZMP accumulation, rather than *de novo* pathway impairment, might reduce fertility. To test this hypothesis, we cultured *ppat-1*( $\Delta$ ); *atic-1*( $\Delta$ ) in the presence of ZMP precursor AICAR (0.1 mM); under these conditions internal ZMP builds up (see below). Consistent with our hypothesis, we observed reduced fertility in *ppat-1*( $\Delta$ ); *atic-1*( $\Delta$ ) treated with AICAR compared to the control (Figure S3B). Furthermore, wild-type worms cultured with 0.5 mM AICAR also displayed reduced fertility. We conclude that ZMP buildup in *atic-1*( $\Delta$ ) causes reduced fertility, while the *de novo* pathway *per se* has no impact on this phenotype, as *ppat-1*( $\Delta$ ) is similar to wild type. Taken together, these data show that *adsl-1* is essential for germline integrity, while *de novo* pathway genes *ppat-1* and *atic-1* are dispensable.

The strong germline defects in *adsl-1*( $\Delta$ ) prompted us to investigate whether *adsl-1* is required during early embryonic development. We therefore examined the viability of ADSL deficient embryos. *adsl-1*( $\Delta$ ) sterility precludes the analysis

of homozygous embryos devoid of maternal contribution. We first analyzed zygotic requirement by examining the progeny of *adsl-1*( $\Delta$ )/+ heterozygotes (see *Materials and Methods*); if *adsl-1* zygotic expression were strictly essential in the embryo, one would expect no *adsl-1*( $\Delta$ ) homozygous progeny, and a Mendelian  $\sim 25\%$  proportion of embryonic lethality; instead, we observed only 7.7% of dead embryos. Therefore, either *adsl-1* is not essential for embryo development or maternal contribution is, at least in part, sufficient. To further investigate *adsl-1* function in the early embryo, we used RNAi, which depletes maternally expressed mRNAs. Because *adsl-1* full penetrant loss-of-function leads to sterility, we performed *adsl-1*(RNAi) knockdown, starting at the L4 stage—resulting in a partial loss-of-function. Under these conditions, we observed 32.2% embryonic lethality in *adsl-1*(RNAi) (Figure S3C), suggesting that *adsl-1* is required for embryonic development, and that maternal expression contributes to *adsl-1* function at this stage. To test whether the *de novo* pathway is necessary for embryo development, we performed *adsl-1*(RNAi) in the *ppat-1*( $\Delta$ ), resulting in 31.5% embryonic lethality. The observation that *ppat-1*( $\Delta$ ) does not enhance the *adsl-1*(RNAi) hypomorphic phenotype suggests that the *de novo* pathway does not contribute to embryonic development (see below). Consistent with this hypothesis, *de novo* pathway mutants display an embryonic development indistinguishable from that of wild type; just as in wild-type controls,  $\sim 100\%$  of the eggs laid hatched in all *de novo* pathway mutants. Thus, *adsl-1* function in the recycling pathway is required for proper embryonic development.

### ***adsl-1*( $\Delta$ ) leads to small body size phenotype**

The overall morphology observed in *adsl-1*( $\Delta$ ) and *ppat-1*( $\Delta$ ); *adsl-1*( $\Delta$ ) [morphologically indistinguishable from *adsl-1*( $\Delta$ ) single mutants] suggests that cell lineage specification and morphogenesis are not affected. No defects were observed in somatic tissues of *adsl-1*( $\Delta$ ) other than the vulva, including pharynx, intestine, or hypodermis, and animals were viable and mobile. Hence, the smaller size does not seem to result from defects in fate specification. To better characterize this phenotype, we measured body length in adult worms. *adsl-1*( $\Delta$ ) are significantly smaller than wild type and similar to *ppat-1*( $\Delta$ ); *adsl-1*( $\Delta$ ), while *de novo* mutants are indistinguishable from wild type (Figure 2C). Given the volume occupied by the germline in adult *C. elegans*, we wondered whether sterility could account for the small size in *adsl-1*( $\Delta$ ). We therefore compared *adsl-1*( $\Delta$ ) to *glp-1*(*e2141*) mutants, which are known to lack a germline when cultured at 25° (Priess *et al.* 1987). Given that adult *glp-1*(*e2141*) length is in the wild-type range (Figure 2C), sterility cannot account for the small size of *adsl-1*( $\Delta$ ). Notably, newly hatched *adsl-1*( $\Delta$ ) animals are the same size as wild-type, and morphologically indistinguishable (not shown); hence, size defects are likely to manifest during postembryonic development. We conclude that *adsl-1* is required for adult body size independently of the sterility phenotype. By contrast, deficiencies in GPPAT or ATIC in the *de novo* pathway do not affect this trait.



**Figure 3** Life traits in purine mutants. (A) Graph depicting duration of postembryonic developmental stages, white bars represent larval stages, from L1 to L4 (left to right), orange bars represent lethargus phases consecutive to each larval stage (mean durations of larval development, from t0 until exit from fourth lethargus phase, are statistically different—one-way ANOVA—indicated  $P$  values refer to comparison with wild type—Bonferroni multiple comparison  $t$ -test—otherwise comparison to wild type bears no significant difference; see detailed representation of the data in Figure S4). (B) Graph depicting fraction of live worms over time for all genotypes studied ( $P$  value indicated for the *adsl-1*( $\Delta$ ) vs. wild type comparison, all other genotypes are not significantly different from wild type are significantly different from *adsl-1*( $\Delta$ )—log rank test with Bonferroni correction; total combined of three independent experiments for each genotype [wild type  $n = 106$ , *ppat-1*( $\Delta$ )  $n = 91$ , *atic-1*( $\Delta$ )  $n = 126$ , *ppat-1*( $\Delta$ ); *atic-1*( $\Delta$ )  $n = 149$ , *adsl-1*( $\Delta$ )  $n = 227$ , *ppat-1*( $\Delta$ ); *adsl-1*( $\Delta$ )  $n = 113$ ].

### ***adsl-1* is required for normal developmental timing and lifespan**

The small size of *adsl-1*( $\Delta$ ) prompted us to investigate whether postembryonic development was impaired. Given that newly hatched *adsl-1*( $\Delta$ ) are indistinguishable from wild type, we hypothesized the growth defects were linked to abnormal larval development. Upon hatching, and before adulthood, *C. elegans* goes through four larval stages, each followed by an inactive state known as lethargus during which a molt takes place (Cassada and Russell 1975). Importantly, this sequence follows a highly reproducible timing under standard culture conditions (Byerly *et al.* 1976). We therefore measured timing of postembryonic development in purine mutants, using the method described by Olmedo *et al.* (2015). Briefly, newly hatched L1 larvae carrying a transgenic luciferase are cultured in the presence of luciferin, emitting luminescence when active (Lagido *et al.* 2008). Since larvae cease feeding during lethargus, they stop taking the substrate and a drastic drop in luminescence is observed. Therefore, monitoring the luminescence of individual larvae allows to precisely time the occurrence of each larval (high luminescence) and lethargus (low luminescence) phase (Figure S4A; Olmedo *et al.* 2015). We observed that both *adsl-1*( $\Delta$ ) and *ppat-1*( $\Delta$ ); *adsl-1*( $\Delta$ ) present strongly delayed postembryonic development (Figure 3A and Figure S4B). Although all larval and lethargus phases are affected in *adsl-1*( $\Delta$ ) mutants, the delay is more pronounced as postembryonic development progresses. By contrast, the overall timing of postembryonic development is not affected in *de novo* pathway mutants. We therefore conclude that *adsl-1* is required for normal postembryonic developmental timing, whereas *de novo* pathway genes *ppat-1* and *atic-1* are not.

Postembryonic development, metabolism, and the germline are all known to impact lifespan in *C. elegans* (reviewed in

Antebi 2013). Because of *adsl-1*( $\Delta$ ) sterility and developmental delay we measured the lifespan of the purine mutants. *adsl-1*( $\Delta$ ) mutant has a shorter lifespan than wild type (Figure 3B). By contrast, the *de novo* pathway mutants' lifespan is indistinguishable from wild type (Figure 3B). Importantly, *ppat-1*( $\Delta$ ) suppresses the *adsl-1*( $\Delta$ ) short-lifespan phenotype as *ppat-1*( $\Delta$ ); *adsl-1*( $\Delta$ ) double mutant survival profile is in the wild-type range (Figure 3B). These results strongly suggest that SZMP buildup in *adsl-1*( $\Delta$ ), rather than ADSL activity *per se*, is responsible for the reduced lifespan. Moreover, we conclude that the developmental delay and sterility of *adsl-1*( $\Delta$ ) are not linked to lifespan.

### **Ascribing *adsl-1*( $\Delta$ ) phenotypes to the *de novo* vs. recycling pathway**

Most of defects we observed in *adsl-1*( $\Delta$ )—germline, vulva, adult size, embryonic and postembryonic development—are not observed in *ppat-1*( $\Delta$ ) or *atic-1*( $\Delta$ ) mutants, suggesting that the ADSL activity of converting SAMP to AMP is the cause of these phenotypes. However, the question of the relative contributions of the *de novo* and recycling pathways remains open as SAMP to AMP conversion by ADSL has the peculiarity of being required for the synthesis of AMP both through the *de novo* and recycling pathways (as is the IMP to SAMP conversion by ADSS, Figure 1). Thus, two hypotheses can explain the *adsl-1*( $\Delta$ ) defects regarding SAMP to AMP conversion: either these defects are linked to the recycling but not the *de novo* pathway, or both the recycling and the *de novo* pathways contribute redundantly to the phenotypes, such that, in *ppat-1*( $\Delta$ ) mutants, the recycling pathway can compensate for the absence of the *de novo* pathway. Given that ADSL functions both in the *de novo* and recycling pathways, the putative null *adsl-1*( $\Delta$ ) does not allow us to discriminate between *de novo* and recycling pathway

**Table 1 Germline and vulval phenotypes in *adsl-1(RNAi)* and *adss-1(RNAi)***

Genotype (+ <i>pie-1p::H2B::GFP</i> )	Sterile no germline (%)	Sterile <10 germ cells (%)	Sterile >10 germ cells (%)	WT-like germline (%)	<i>N</i> = (germline)	Protruding vulva (%)	WT-like vulva (%)	<i>N</i> = (vulva)
WT	0	0	2.3	97.7	43	0	100	35
<i>ppat-1(Δ)</i>	0	0	0	100	57%	0	100	57
<i>adsl-1(RNAi)</i>	8.1	0	51.4	40.5	37	26.1	73.9	23
<i>ppat-1(Δ); adsl-1(RNAi)</i>	3.4	0	27.6	69.0	29	0	100	28
<i>adss-1(RNAi)</i>	1.7	1.7	57.9	38.8	121	8.0	92.0	50
<i>ppat-1(Δ); adss-1(RNAi)</i>	0	0	7.7	92.3	52	0	100	39

All strains carry the germline specific *pie-1p::H2B::GFP*. Three classes of sterile phenotypes were defined based on the number of GFP positive germline nuclei. Vulval phenotypes were scored on DIC (Nomarski) microscopy.

contributions; however, analysis of *adsl-1* or *adss-1* partial loss-of-function does. In such conditions, if the first hypothesis were true, abolishing the *de novo* pathway would have no impact on *adsl-1* or *adss-1* partial loss-of-function phenotypes, while, if the second hypothesis were true, the penetrance of the phenotypes should increase when *adsl-1* or *adss-1* partial loss-of-function is combined with *ppat-1(Δ)*.

We performed *adsl-1(RNAi)* and *adss-1(RNAi)* treatment—producing a partial loss-of-function—in wild-type and *ppat-1(Δ)* worms, and analyzed the germline and vulval defects. We observe no increase in penetrance of either phenotype when comparing wild type and *ppat-1(Δ)*, in both *adsl-1(RNAi)* and *adss-1(RNAi)* (Table 1). Similarly, as described above, *adsl-1(RNAi)* displays the same penetrance of embryonic lethality in wild-type and *ppat-1(Δ)* backgrounds (Figure S3C). We conclude that *adsl-1(-)* defects, at least in the germline, vulva, and embryonic development, are linked to the purine recycling pathway, while the *de novo* pathway makes no detectable contribution.

#### ***adsl-1(WT)* transgene rescues *adsl-1(Δ)* phenotypes**

Given that the *adsl-1(Δ)* allele was generated by random mutagenesis, it is possible that the phenotypes observed are caused by other mutations in the genetic background. In order to verify whether *adsl-1* loss-of-function was indeed the cause of the observed phenotypes, we performed a transgene rescue assay. We generated a plasmid containing an *adsl-1(WT)* allele genomic fragment including ~1 kb upstream of the start codon and ~1 kb downstream of the stop codon (see *Materials and methods*) and transformed *adsl-1(Δ)/+* animals through microinjection. We obtained transgenic animals carrying the *adsl-1(Δ)* allele (either heterozygous or homozygous) and the *adsl-1(WT)* transgene. In seven independent transgenic clones, we were able to observe rescue of *adsl-1* function in *adsl-1(Δ)* homozygous animals. Rescued *adsl-1(Δ)* homozygous laid broods bearing viable embryos; hence, transgenic *adsl-1(WT)* rescued the germline phenotype. Furthermore, rescued *adsl-1(Δ)* homozygotes presented an overall wild-type-like adult morphology, including wild-type-like vulva; therefore, transgenic *adsl-1(WT)* rescued body size and vulval defects as well. Given that the extrachromosomal arrays carrying the *adsl-1(WT)* transgene were poorly transmitted to the progeny, we could not characterize these lines further. We conclude that *adsl-1(Δ)*

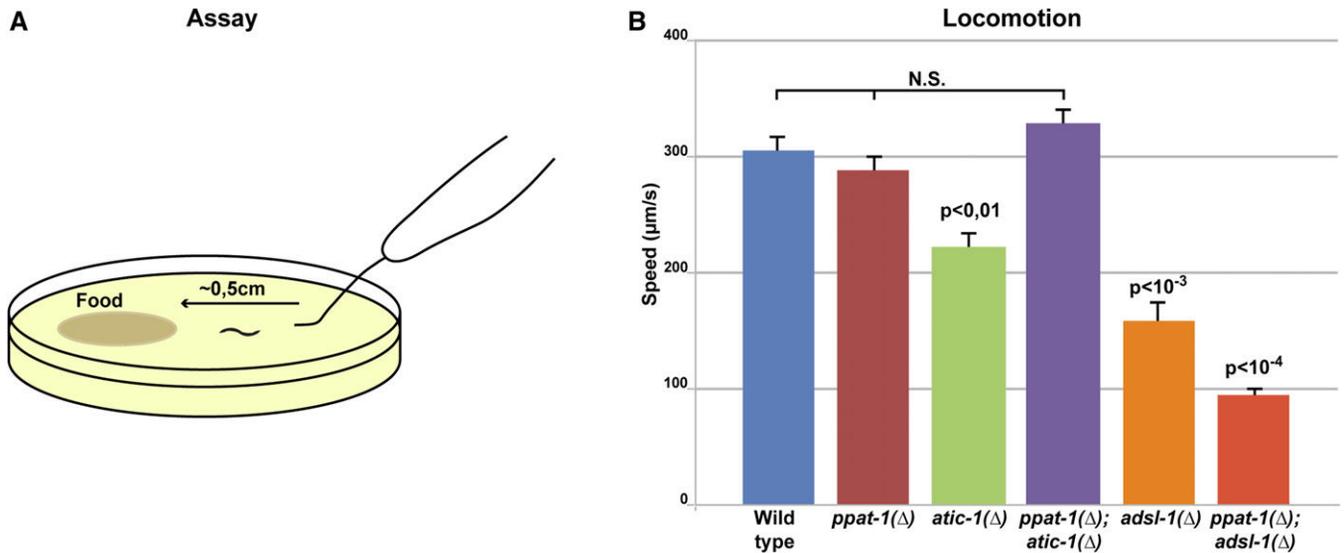
phenotypes—at least sterility, vulval defects, and body size—are caused by *adsl-1* loss-of-function. Further supporting this conclusion, *adsl-1(RNAi)* leads to sterility and vulval defects (see above, Table 1), matching what would be expected for a partial loss-of-function compared to *adsl-1(Δ)*, and *adss-1(RNAi)*, depleting ADSS—the enzyme immediately upstream of ADSL in the recycling pathway—phenocopies *adsl-1(RNAi)*, as would be expected.

#### **Imbalance in purine metabolism impacts locomotion**

Given the severe muscular and neuronal symptoms of ADSL deficiency patients (Jaeken *et al.* 1988; Spiegel *et al.* 2006; Jurecka *et al.* 2015), we sought to investigate muscle and neural defects in *adsl-1(Δ)* worms. In order to address muscle function, we performed a locomotion assay (Figure 4A; Zheng *et al.* 1999; Hart 2006), and observed that *adsl-1(Δ)* mutants were slower than wild type (Figure 4B). *atic-1(Δ)* mutants were also slower than wild type, albeit to a lesser extent (Figure 4B), suggesting that the *de novo* pathway could play a role in locomotion. However, *ppat-1(Δ)* animals were indistinguishable from wild type; thus, the *de novo* pathway *per se* does not affect locomotion. Moreover, the locomotion defect in *adsl-1(Δ)* was not suppressed by *ppat-1(Δ)*; *ppat-1(Δ); adsl-1(Δ)* was actually slower than the *adsl-1(Δ)* single mutant. Thus, ADSL activity, independently of SZMP buildup, accounts for the *adsl-1(Δ)* locomotion defect. By contrast, the *atic-1(Δ)* locomotion defect was suppressed by *ppat-1(Δ)* as *ppat-1(Δ); atic-1(Δ)* speed was in the wild type range. Hence, slower locomotion in *atic-1(Δ)* is linked to ZMP build up, rather than the *de novo* pathway *per se*.

#### **AICAR treatment**

The ADSL product ZMP is known to activate AMPK by mimicking AMP (Jin *et al.* 2007), and AICAR treatment is known to impact muscle function in mice, presumably through ZMP induced AMPK activation (Narkar *et al.* 2008). To test whether ZMP is responsible for the locomotion defects in *atic-1(Δ)*, we tested whether providing the worms with external AICAR would impact locomotion. We treated late L4 stage wild-type and *de novo* pathway mutants with AICAR for 24 hr. Somewhat surprisingly, AICAR treatment did not significantly affect locomotion in any genotype tested (Figure S5A). Given this surprising result, we performed metabolic profile analysis of AICAR-treated worms. As expected, we



**Figure 4** Locomotion of purine mutants. (A) Cartoon schematics of the locomotion behavior assay. (B) Graph depicting the average locomotion speed in all purine mutants [error bar, SEM;  $n = 30$  in all genotypes except wild type and *ppat-1*(Δ); *atic-1*(Δ)  $n = 40$ ; means statistically different—one-way ANOVA—indicated  $P$  values refer to comparison with wild-type—Bonferroni multiple comparison  $t$ -test—wild type, *ppat-1*(Δ), and *ppat-1*(Δ) *adsl-1*(Δ) are not statistically different from one another].

observed higher levels of AICAR upon treatment, and, noticeably, a significant buildup of both ZMP and ZTP in all treated genotypes (Figure S5B), showing that AICAR was efficiently internalized and phosphorylated. As expected, ZMP levels were higher in *atic-1*(Δ) than in other genotypes due to the cumulative buildup of ZMP from the *de novo* pathway and from AICAR treatment (Figure S5C). Therefore, buildup of ZMP in adult worms *per se* does not explain the reduced locomotion observed in *atic-1*(Δ). Importantly, while AICAR treatment did not significantly affect ATP levels across genotypes, it led to an increase in uric acid, particularly in *atic-1*(Δ) and *ppat-1*(Δ); *atic-1*(Δ). Moreover, we also observed, in all treated genotypes, accumulation of the ADSL substrate SZMP and its riboside form SAICAR. Therefore, AICAR treatment leads to increased levels of ZMP as expected, but also of uric acid, ZTP, and SZMP (Figure S5B). Accumulation of SAICAR and SZMP indicates not only that SZMP to ZMP conversion by ADSL is inhibited by AICAR treatment, but also that this reaction can be reversed, given that SZMP was detected in *ppat-1*(Δ) and *ppat-1*(Δ); *atic-1*(Δ) mutants (Figure S5B, see Figure S1B). Accordingly, in yeast, ADSL enzyme has been shown to convert ZMP in SZMP when ZMP is in excess (Rebora *et al.* 2005), which seems also to be the case for *C. elegans* ADSL.

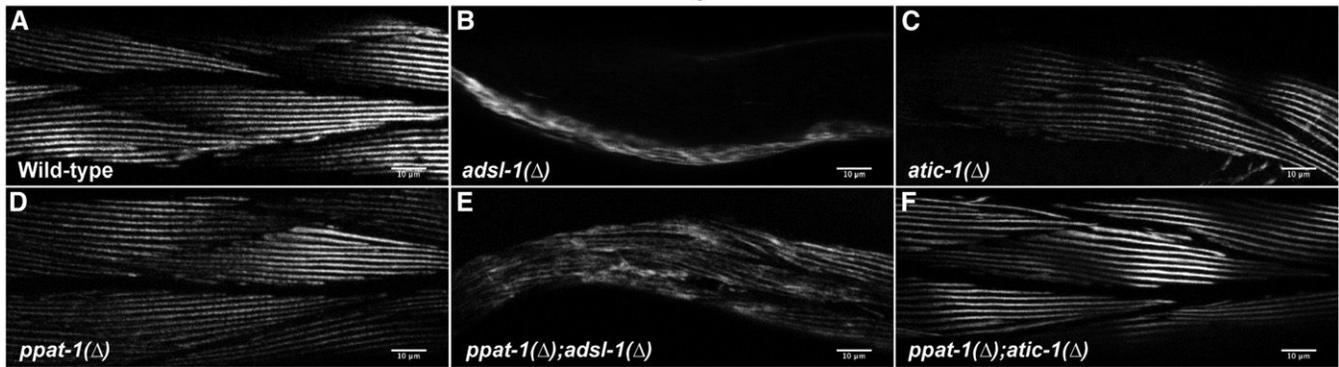
#### **Muscle structure, but not the neuromuscular junction, is disrupted in *adsl-1*(Δ)**

One possible explanation for the locomotion defects observed in *atic-1*(Δ) and *adsl-1*(Δ) is that the neuromuscular junction is compromised. We therefore tested whether purine mutants were sensitive to Levamisole and Aldicarb. Both drugs activate acetylcholine receptors at the neuromuscular junction in *C. elegans*, at either the presynapse (Aldicarb) or postsynapse

(Levamisole) leading to paralysis of wild-type worms (Lewis *et al.* 1980), while mutants with defective cholinergic neuromuscular junction are not affected (Fleming *et al.* 1997; Gendrel *et al.* 2009). We found no significant differences among purine mutants and wild-type animals (Figure S6, A and B), demonstrating that the neuromuscular junction remains functional upon purine metabolism deficiencies. We therefore tested whether other neuronal functions might be impaired in purine mutants. We performed a standard touch assay (Hobert *et al.* 1999; Hart 2006). We observed a similar response to touch in all purine mutants as in the wild type; thus, in our experiments, the mechanosensory function as well as the behavioral response are intact in purine mutants (Figure S6C). In summary, we found no evidence of neuronal dysfunction in the purine metabolism mutants tested.

Given these results, we hypothesized that the locomotion defects we observed could be explained by muscle malfunction. We performed an analysis of muscle cell structure through immunohistochemistry and confocal microscopy. As expected, we observed a regular parallel arrangement of myosin fibers in the wild type (Figure 5A), while in *adsl-1*(Δ) mutants ( $n = 13$ ), muscle myosin fibers formed an irregular meshwork and muscle mass seemed reduced (Figure 5B). In *atic-1*(Δ) ( $n = 14$ ), by contrast, the structure of muscle myosin fibers was indistinguishable from wild-type controls (Figure 5C,  $n = 10$ ), as was also the case in *ppat-1*(Δ) (Figure 5D,  $n = 13$ ). Furthermore *ppat-1*(Δ); *adsl-1*(Δ) (Figure 5E,  $n = 10$ ) displayed the same muscle fiber defects as *adsl-1*(Δ), while muscle fibers in *ppat-1*(Δ); *atic-1*(Δ) were indistinguishable from those in *ppat-1*(Δ) and *atic-1*(Δ) single mutants (Figure 5F,  $n = 15$ ), showing that *de novo* pathway deficiency does not affect muscle structure (Figure 5). These

## Muscle Myosin



**Figure 5** Muscle structure in purine mutants. Confocal micrographs of muscle myosin immunostaining in young adult body wall muscle cells of all studied purine mutants (Bar, 10  $\mu$ m). (A) Wild-type. (B) *adsl-1*( $\Delta$ ). (C) *atic-1*( $\Delta$ ). (D) *ppat-1*( $\Delta$ ). (E) *ppat-1*( $\Delta$ ); *adsl-1*( $\Delta$ ). (F) *ppat-1*( $\Delta$ ); *atic-1*( $\Delta$ ).

results show that ADSL is required for muscle integrity, while deficiencies in the *de novo* pathway have no discernible effect on this trait. Muscle structure defects could account for the locomotion defects of *adsl-1*( $\Delta$ ).

## Discussion

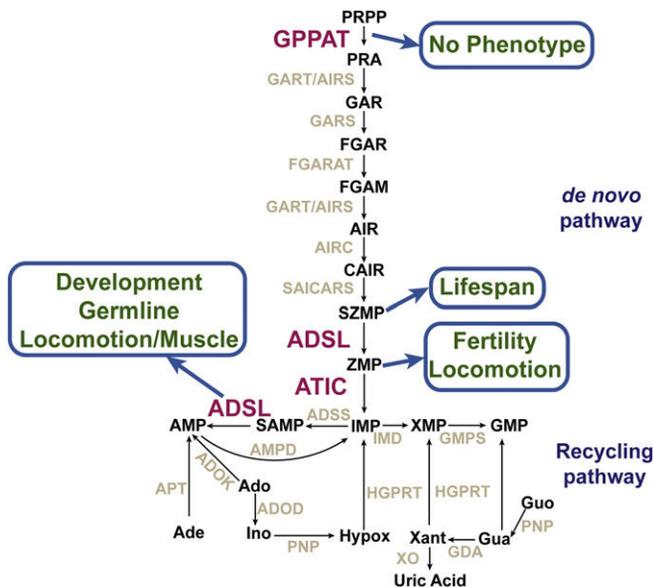
### **A nematode model to study ADSL deficiency and, more broadly, purine metabolism**

We describe here the phenotypes and metabolic profiles associated with three deficiencies in the purine biosynthesis pathway in the nematode *C. elegans*, focusing on ADSL deficiency. This study provides a reference for future investigation of the underlying molecular mechanisms. The phenotypes observed are, to some extent, genetically separable. In particular, the most severe defects in the *adsl-1*( $\Delta$ ) mutant—muscle, germline, and development—are not shared with *ppat-1*( $\Delta$ ) and *atic-1*( $\Delta$ ) mutants. The model we put forward links these defects to the ADSL activity in converting SAMP in AMP as the critical enzymatic step in ADSL deficiency (Figure 6). For instance, there is a long-standing debate concerning the etiology of the pathology associated with ADSL deficiency. It has been proposed that the SAICAR/S-Ado ratio correlated with specific symptoms (Jaeken *et al.* 1988; Race *et al.* 2000), while more recent studies found no evidence for such a correlation (Jurecka *et al.* 2008; Zikanova *et al.* 2010). Studies in human subjects are of limited reach, while a genetically amenable model organism will allow investigations of the mechanisms underlying specific phenotypes. In our model, SAMP to AMP conversion is crucial, hence SAMP buildup could play a significant role in the ADSL deficiency. Notwithstanding the evolutionary distance between nematodes and humans, testing this hypothesis may be informative in human pathology. However, at this point, caution is advised when comparing our results to human pathologies; more research will be required to address this issue. Importantly, the reported mutations causing ADSL deficiency in humans are associated with a residual enzymatic activity (reviewed in Nyhan 2005;

Kelley and Andersson 2014), contrasting with our analysis of putative null mutants. The use of null mutations allows us to carefully establish the phenotypes associated with ADSL deficiency in the nematode model, and will allow us to further establish tissue specific contributions and to perform epistasis analysis in order to ascribe phenotypes to different steps in the pathway. Only once this characterization is achieved can mutations comparable to human ADSL deficiency be modeled with *C. elegans* to provide further insight. In summary, although further investigation is required, *C. elegans*, as metazoan model organism, provides the means to investigate the metabolic regulation of developmental progression, muscle defects or cell proliferation in the context of ADSL deficiency, as well as in other deficiencies in the purine biosynthesis pathway.

### **Purine recycling and GSCs maintenance**

One striking phenotype of *adsl-1*( $\Delta$ ) is the severe reduction in GSCs, leading to sterility. In adult *C. elegans*, the germline is the sole proliferating tissue. More precisely, GSCs in the distal gonad proliferate under the control of Notch signaling from neighboring somatic cells, while, in the proximal region, germline nuclei enter meiotic differentiation (reviewed in Kimble and Crittenden 2005; Hansen and Schedl 2013). Interestingly, deficiencies in both pyrimidine (Chi *et al.* 2016) and pyridine nucleotides (also known as NAD<sup>+</sup>) recycling pathways (Vrablok *et al.* 2009) have also been linked to germline defects in *C. elegans*, suggesting that nucleotide metabolism plays a critical role in maintaining the GSCs pool. Importantly, however, the *adsl-1*( $\Delta$ ) phenotype is more severe than in either of the other cases. In *pnc-1*( $-$ ) mutants, affecting the pyridine salvage pathway, animals are fertile despite germline defects. In *cdd-1/2*( $-$ ) mutants, which are deficient in cytidine deaminase in the pyrimidine recycling pathway, GSC proliferation could be restored with pyrimidine supplementation. By contrast, purine supplementation had no effect on either *adsl-1*( $\Delta$ ) or *adsl-1*(RNAi)—partial loss-of-function—suggesting that it is not a shortage of the final products of the purine pathway that is the main factor



**Figure 6** Summary of the functional analysis of the purine biosynthesis pathway in *C. elegans* reported in this study.

causing the GSC defect. While one cannot exclude the possibility that the defects in *unc-119(-)*, *cdd-1/2(-)* and *adsl-1(Δ)* are unrelated, the three metabolic pathways are closely connected. It is therefore plausible that germline defects in these three mutants share a common mechanism through crosstalk among these metabolic pathways. In this context, the severity of the *adsl-1(Δ)* phenotype remains to be explained. One tempting explanation is that the primary metabolic defect lies on the purine pathway, and that imbalance in the other nucleotide biosynthetic pathways impacts purine metabolism as an indirect consequence. It is known that GSC proliferation is influenced by environmental factors, particularly nutrient availability, and that it is likely regulated by metabolic signals (reviewed in Hubbard *et al.* 2013). Our results are consistent with the purine recycling pathway serving as sensor integrating nucleotide pathway status, and providing a metabolic signal regulating GSC proliferation.

Interestingly, the purine biosynthetic pathway has been shown to play a role in the balance between proliferation and differentiation in both stem cells and cancer cells, with inhibition of purine synthesis leading to increased differentiation at the expense of proliferation (Oburoglu *et al.* 2014; Tardito *et al.* 2015). A similar mechanism could explain the *adsl-1(Δ)* GSCs defect; in that scenario, ADSL deficiency would lead to germline nuclei entering meiosis at the expense of proliferation.

### Purine metabolism and development

Metazoans often control their development in response to environmental conditions, namely nutrient availability. This control involves metabolic regulation, for instance through insulin/insulin-like or mTOR pathways (reviewed in Danielsen *et al.* 2013). In *C. elegans*, adult worm size varies depending on the bacterial food source (Samuel *et al.* 2016),

suggesting that size is one of the developmental phenotypes subjected to metabolic regulation. This regulation could, in theory, be due to metabolic regulation of cell fate decisions, or, alternatively, be a consequence of metabolic regulation of cell size. Based on our analysis, in *adsl-1(Δ)*, only GSCs and vulval cells, which have no impact in overall adult size, present cell fate abnormalities in the adult. Hence, the small size we observe is most likely due to an effect of purine metabolism on cell size. In addition to size, *adsl-1(Δ)* also displays a strong delay during postembryonic development. In *C. elegans*, progression through larval stage and molting cycles is highly regulated, involving oscillations of LIN-42—the ortholog the circadian protein PERIOD (Monsalve *et al.* 2011; Edelman *et al.* 2016; reviewed in Monsalve and Frand 2012). The developmental changes associated with this progression involve tight coordination of different cell lineages across the worm body, and are very well characterized, as are the genetic pathways involved (reviewed in Rougvie and Moss 2013). By contrast, the upstream mechanisms and signals triggering or modulating these developmental transitions are poorly understood. The quality and amount of food available certainly play a role, as they have been shown to impact the timing of postembryonic development (Houthoofd *et al.* 2002; MacNeil *et al.* 2013). The dramatic developmental delay in *adsl-1(Δ)* points at a metabolic regulation of these developmental transitions involving the purine recycling pathway.

Our results also suggest a role for ADSL in embryonic development. Presumably, a more penetrant *adsl-1* loss-of-function would lead to higher levels of embryonic lethality; however, the ensuing sterility precludes further study of early development. With the tools currently available, we cannot determine conclusively the extent of *adsl-1* requirement in embryonic development. Given most homozygous *adsl-1(Δ)* embryos—where only zygotic *adsl-1* expression is affected—are viable, and RNAi—depleting maternal mRNA—leads to embryonic lethality, it is plausible that proper embryo development requires *adsl-1* function, ensured, at least in part, by maternal contribution.

One possibility to explain the developmental phenotypes in *adsl-1(Δ)* could be limiting ATP causing slow development and smaller size. We have observed that, in *adsl-1(Δ)*, food uptake is reduced compared to wild type (Rodríguez-Palero *et al.* 2018); thus, not only ATP but also limiting overall bulk nutrients could account for the developmental defects observed. Although limiting nutrients and ATP levels are important factors, and certainly have a sizable impact, other elements suggest that this hypothesis is not sufficient to explain the *adsl-1(Δ)* defects. In *eat* mutants, known to have feeding impairment, food uptake defects do not always correlate with developmental delay (M.O. and M.A.S. unpublished results). As for ATP levels, our metabolic profiles show them to be reduced only slightly in *adsl-1(RNAi)* compared with wild type. This is not so surprising given that adenine or adenosine available from the bacterial food source could be used to produce ATP despite ADSL deficiency (see

Figure 1A). An alternative hypothesis is that postembryonic developmental and adult size are regulated by the wiring of the purine recycling pathway, rather than the synthesis of its final products. In this view, purine intermediate metabolites could function as metabolic sensors modulating developmental progression.

### **Purine metabolism and neuromuscular function**

Both neuronal and muscle tissues are severely affected in purine metabolism syndromes, suggesting that these two tissues are particularly susceptible upon purine metabolism impairment in patients. In our nematode model, we observed locomotion defects associated with both ATIC and ADSL deficiencies. Somewhat surprisingly, no discernible neuronal dysfunction was observed in any purine mutant. Like wild-type controls, all the genotypes tested displayed sensitivity to Levamisole and Aldicard, showing that the neuromuscular junction was still functional. Moreover, the mechanosensory response in purine mutants was also not affected. Hence, we could not identify any neuronal dysfunction that would account for locomotion defects. The results notwithstanding, given that we did not investigate neuron integrity directly, it remains possible that purine mutants present neuronal impairments that the functional assays reported here cannot detect.

We did, however, find evidence of muscle abnormalities that could explain the locomotion defects. Notably, the locomotion defects we observed in *atic-1*( $\Delta$ ) and *adsl-1*( $\Delta$ ) were linked to different mechanisms. Contrary to *adsl-1*( $\Delta$ ), the locomotion delay in *atic-1*( $\Delta$ ) was suppressed in the *ppat-1*( $\Delta$ ); *atic-1*( $\Delta$ ) double mutant, and hence linked to ZMP buildup. One possible explanation is that ZMP accumulation leads to metabolic changes that, in turn, impact muscle function, possibly through AMPK activation (Jin *et al.* 2007). Importantly, the structure of muscle myosin fibers in *atic-1*( $\Delta$ ) are undistinguishable from wild type; thus, muscle integrity seems not to be affected in *atic-1*( $\Delta$ ). The ZMP effect on locomotion, however, is not straightforward; upon AICAR treatment of L4 larvae/young adults, ZMP builds up as expected; nonetheless, locomotion is not affected. Although the underlying mechanism remains elusive, our results suggest either that the ZMP effect on locomotion is developmental and occurs prior to the L4 stage, or that ZMP accumulation from external AICAR does not affect the same tissues as endogenous ZMP build up in *atic-1*( $\Delta$ ).

On a side note, because ZMP is an AMPK agonist (Jin *et al.* 2007), its riboside form AICAR is often added to culture media of different model organisms, including *C. elegans* (Moreno-Arriola *et al.* 2016; Ahmad and Ebert 2017), to trigger AMPK activation upon intracellular conversion to ZMP. Our results show that increase of ZMP is not the only metabolic consequence of AICAR treatment; therefore, caution is recommended when attributing phenotypes to AMPK activation.

As to the locomotion defects in *adsl-1*( $\Delta$ ), our results point to ADSL activity in the purine recycling pathway, given that

*ppat-1*( $\Delta$ ) does not suppress the locomotion phenotype; indeed, quite the contrary. Furthermore, *adsl-1*( $\Delta$ ) is associated with significant damage to the structure of muscle myosin fibers, suggesting that locomotion defects are caused by muscle defects. While the underlying cause of these defects is yet to be determined, we hypothesize that the developmental delay in *adsl-1*( $\Delta$ ) may contribute to muscle defects.

### **Purine metabolic network in a metazoan model**

The results we present show the functional conservation of both the *de novo* and recycling purine biosynthesis pathways in *C. elegans*. Furthermore, we characterized phenotypes associated with deficiencies in the critical enzymes ADSL and ATIC. While several phenotypes are genetically separable (Figure 6), it stands out that the most severe phenotypes—lack of GSCs, developmental delay, and muscle integrity—are associated with ADSL activity, while deficiencies in the *de novo* pathway are viable and lead to rather subtle phenotypes such as reduced fertility and slower locomotion. Notably, deletion of *ppat-1*, which we show is required for the *de novo* pathway, produces no detectable phenotype in our culture conditions. The phenotypes observed in *atic-1*( $\Delta$ ), locomotion defects and reduced fertility, are associated with ZMP accumulation, rather than with shortage in purine synthesis through the *de novo* pathway, as though the *de novo* pathway *per se* is dispensable. It might seem paradoxical that the purine *de novo* pathway is conserved while having no essential function. Indeed, a number of biosynthetic pathways, namely those of some amino acids, have been lost during metazoan evolution (Payne and Loomis 2006), likely because amino acids are available from food sources, as are nucleotides. However, our culture conditions may not reflect the natural environment in which *C. elegans* evolved; it is plausible that the *de novo* pathway is essential in different environments where purines are scarce.

Contrasting with our results in *C. elegans*, *Drosophila* mutants in GPPAT-encoding genes are lethal prior to adulthood (Malmanche and Clark 2004; Ji and Clark 2006). These *Drosophila* mutants are purine auxotroph—lethality is higher in purine deprived food source—and lethality is observed during the pupal phase, *i.e.*, a closed developmental stage during which external nutrients are not available. These different consequences of GPPAT deficiency in *C. elegans* and *Drosophila* could be due to substantially different metabolic requirements in the two species for GPPAT, and the whole *de novo* pathway; they could also reflect different life cycles and different experimental conditions. Further highlighting the contrast between *Drosophila* and *C. elegans*, fly mutants deficient for ADSL and ADSS are also lethal, in this case at larval stages prior to pupation (Stenesen *et al.* 2013). Interestingly, the latter authors show that the lower levels of ADSS and ADSL in heterozygotes lead to increased lifespan through reduced AMP synthesis. Notably, purine pathway mutants in the yeast *S. cerevisiae* have been reported to increase chronological age (Matecic *et al.* 2010). In both cases, purine supplementation of the culture media restores the wild-type

phenotype, presumably through raising AMP levels to a wild-type range. If the same scenario occurs in *C. elegans*, our results on the lifespan of purine mutants could be explained by the abundance of purines in the bacterial food source. This possibility emphasizes the contribution of purine availability in the external medium to phenotypic outcomes. Further investigation of the purine pathway in worms will certainly involve controlled manipulation of purine supplementation, which requires a suitable defined culture medium (Flavel *et al.* 2018).

Actually, if one draws a parallel with yeast, it is the severity of the *adsl-1*( $\Delta$ ) phenotypes that seems surprising, considering that *Ade13* null mutants in *S. cerevisiae* are viable when cultured with adenine (Dorfman 1969). Given that purines are available from the food source, one would have expected the worm to synthesize AMP and GMP despite ADSL deficiency. Indeed, external adenine and adenosine can be converted to AMP by adenine phosphoribosyltransferase and adenosine kinase, respectively, both of which have orthologs in *C. elegans* (Figure S1A), and AMP can be converted to GMP (Figure 1A). The severity of *adsl-1*( $\Delta$ ) phenotypes suggests that ADSL became essential even when external purines are available. Importantly, in humans, purines are also available from the food source, and all but one disease affecting purine metabolism are linked to enzymes in the recycling pathway; with the notable exception being AICA-ribosiduria—a deficiency in ATIC—in which ZMP buildup may be a crucial disease factor (Marie *et al.* 2004; Nyhan 2005; Kelley and Andersson 2014). The emerging picture in metazoans is that the less energetically costly recycling pathway evolved to become the predominant form of purine metabolism, at least in favorable environmental conditions. Hence, specific functions evolved to rely strongly on the recycling pathway, independently of the abundance of external purine sources. The defects associated with ADSL deficiency, as with other recycling pathway deficiencies, could be the consequence of insufficient synthesis of the final products AMP and GMP as much as the unbalanced wiring of the pathway, namely deregulation caused by intermediate metabolites.

## Acknowledgments

We thank Yuji Kohara (N.I.G., Mishima, Japan) for providing cDNAs. We thank the members of the B.D.-F. laboratory for helpful discussions, and particularly M. Moenner for critically reading the manuscript. We thank D. Dupuy and Jonathan Millet (I.E.C.B., Bordeaux, France) for helpful feedback, and for sharing reagents and equipment. Deletion alleles *adsl-1*(*tm3328*), *ppat-1*(*tm6344*) and *atic-1*(*tm6374*) were generated by the National Bioresource Project, Japan, directed by Shohei Mitani. Confocal microscopy, and locomotion assay imaging were done in the Bordeaux Imaging Center—a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, and member of the national

infrastructure France BioImaging. Some *C. elegans* strains were provided by the Caenorhabditis Genetics Center (CGC; <https://cgc.umn.edu>), which is funded by the National Institutes of Health (NIH) Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). We thank Wormbase, which is supported by NIH grant U41 HG002223. This work was supported by an AFM-Téléthon Trampoline grant (ref. 18313). R.M. is supported by AFM-Téléthon Ph.D. scholarship (ref. 20450). R.M. stay in M.A.-S. laboratory was supported by a Short Term Scientific Mission financed by GENIE (COST Action BM1408). M.A.-S. and M.O. are supported by the Ramón y Cajal program of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, RYC-2010-06167 and RYC-2014-15551, respectively.

## Literature Cited

- Ahmad, W., and P. R. Ebert, 2017 Metformin attenuates A $\beta$  pathology mediated through levamisole sensitive nicotinic acetylcholine receptors in a *C. elegans* model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 54: 5427–5439. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0085-y>
- Antebi, A., 2013 Steroid regulation of *C. elegans* diapause, developmental timing, and longevity. *Curr. Top. Dev. Biol.* 105: 181–212. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396968-2.00007-5>
- Benian, G. M., T. L. Tinley, X. Tang, and M. Borodovsky, 1996 The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-89*, required for muscle M-line assembly, encodes a giant modular protein composed of Ig and signal transduction domains. *J. Cell Biol.* 132: 835–848. <https://doi.org/10.1083/jcb.132.5.835>
- Bochner, B. R., and B. N. Ames, 1982 ZTP (5-amino 4-imidazole carboxamide riboside 5'-triphosphate): a proposed alarmone for 10-formyl-tetrahydrofolate deficiency. *Cell* 29: 929–937. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90455-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90455-X)
- Brenner, S., 1974 The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71–94.
- Byerly, L., R. C. Cassada, and R. L. Russell, 1976 The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev. Biol.* 51: 23–33. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90119-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90119-6)
- Cassada, R. C., and R. L. Russell, 1975 The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 46: 326–342. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90109-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90109-8)
- Ceballos-Picot, I., A. Le Dantec, A. Brassier, J. P. Jaïs, M. Ledroit *et al.*, 2015 New biomarkers for early diagnosis of Lesch-Nyhan disease revealed by metabolic analysis on a large cohort of patients. *Orphanet J. Rare Dis.* 10: 7. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0219-0>
- Chi, C., D. Ronai, M. T. Than, C. J. Walker, A. K. Sewell *et al.*, 2016 Nucleotide levels regulate germline proliferation through modulating GLP-1/Notch signaling in *C. elegans*. *Genes Dev.* 30: 307–320. <https://doi.org/10.1101/gad.275107.115>
- Danielsen, E. T., M. E. Moeller, and K. F. Rewitz, 2013 Nutrient signaling and developmental timing of maturation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 105: 37–67. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396968-2.00002-6>
- Dorfman, B. Z., 1969 The isolation of adenylosuccinate synthetase mutants in yeast by selection for constitutive behavior in pigmented strains. *Genetics* 61: 377–389.
- Edelman, T. L., K. A. McCulloch, A. Barr, C. Frøkjær-Jensen, E. M. Jørgensen *et al.*, 2016 Analysis of a *lin-42/period* null allele implicates all three isoforms in regulation of *Caenorhabditis*

- C. elegans* molting and developmental timing. *G3* (Bethesda) 6: 4077–4086. <https://doi.org/10.1534/g3.116.034165>
- Flavel, M. R., A. Mechler, M. Shahmiri, E. R. Mathews, A. E. Franks *et al.*, 2018 Growth of *Caenorhabditis elegans* in defined media is dependent on presence of particulate matter. *G3* (Bethesda) 8: 567–575. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300325>
- Fleming, J. T., M. D. Squire, T. M. Barnes, C. Tornoe, K. Matsuda *et al.*, 1997 *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *J. Neurosci.* 17: 5843–5857. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05843.1997>
- Garí, E., L. Piedrafita, M. Aldea, and E. Herrero, 1997 A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 837–848. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199707\)13:9<837::AID-YEA145>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199707)13:9<837::AID-YEA145>3.0.CO;2-T)
- Gendrel, M., G. Rapti, J. E. Richmond, and J. L. Bessereau, 2009 A secreted complement-control-related protein ensures acetylcholine receptor clustering. *Nature* 461: 992–996. <https://doi.org/10.1038/nature08430>
- Giordano-Santini, R., S. Milstein, N. Svrzikapa, D. Tu, R. Johnsen *et al.*, 2010 An antibiotic selection marker for nematode transgenesis. *Nat. Methods* 7: 721–723. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1494>
- Gooding, J. R., M. V. Jensen, X. Dai, B. R. Wenner, D. Lu *et al.*, 2015 Adenylosuccinate is an insulin secretagogue derived from glucose-induced purine metabolism. *Cell Rep.* 13: 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.072>
- Hansen, D., and T. Schedl, 2013 Stem cell proliferation vs. meiotic fate decision in *Caenorhabditis elegans*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 757: 71–99. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4_4)
- Hart, A. C., 2006 *Behavior* (July 3, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.87.1, <http://www.wormbook.org>.
- Hobert, O., D. G. Moerman, K. A. Clark, M. C. Beckerle, and G. Ruvkun, 1999 A conserved LIM protein that affects muscular adherens junction integrity and mechanosensory function in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 144: 45–57. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.1.45>
- Houthoofd, K., B. P. Braeckman, I. Lenaerts, K. Brys, A. De Vreese *et al.*, 2002 Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* 37: 1371–1378. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00173-0](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00173-0)
- Hubbard, E. J., D. Z. Korta, and D. Dalfó, 2013 Physiological control of germline development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 757: 101–131. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4_5)
- Jaeken, J., S. K. Wadman, M. Duran, F. J. van Sprang, F. A. Beemer *et al.*, 1988 Adenylosuccinase deficiency: an inborn error of purine nucleotide synthesis. *Eur. J. Pediatr.* 148: 126–131. <https://doi.org/10.1007/BF00445919>
- Ji, Y., and D. V. Clark, 2006 The purine synthesis gene *Prat2* is required for *Drosophila* metamorphosis, as revealed by inverted-repeat-mediated RNA interference. *Genetics* 172: 1621–1631. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.045641>
- Jin, X., R. Townley, and L. Shapiro, 2007 Structural insight into AMPK regulation: ADP comes into play. *Structure* 15: 1285–1295. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.07.017>
- Jurecka, A., M. Zikanova, A. Tylki-Szymanska, J. Krijt, A. Bogdan-ska *et al.*, 2008 Clinical, biochemical and molecular findings in seven Polish patients with adenylosuccinate lyase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 94: 435–442. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2008.04.013>
- Jurecka, A., M. Zikanova, S. Kmoch, and A. Tylki-Szymańska, 2015 Adenylosuccinate lyase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* 38: 231–242. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9755-y>
- Keller, K. E., I. S. Tan, and Y.-S. Lee, 2012 SAICAR stimulates pyruvate kinase isoform M2 and promotes cancer cell survival in glucose-limited conditions. *Science* 338: 1069–1072. <https://doi.org/10.1126/science.1224409>
- Keller, K. E., Z. M. Doctor, Z. W. Dwyer, and Y.-S. Lee, 2014 SAICAR induces protein kinase activity of PKM2 that is necessary for sustained proliferative signaling of cancer cells. *Mol. Cell* 53: 700–709. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.015>
- Kelley, R. E., and H. C. Andersson, 2014 Disorders of purines and pyrimidines. *Handb. Clin. Neurol.* 120: 827–838. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4087-0.00055-3>
- Kimble, J., and S. L. Crittenden, 2005 Germline proliferation and its control (August 15, 2005), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.13.1, <http://www.wormbook.org>.
- Lagido, C., J. Pettitt, A. Flett, and L. A. Glover, 2008 Bridging the phenotypic gap: real-time assessment of mitochondrial function and metabolism of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *BMC Physiol.* 8: 7. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-8-7>
- Lewis, J. A., C. H. Wu, H. Berg, and J. H. Levine, 1980 The genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 95: 905–928.
- Ljungdahl, P. O., and B. Daignan-Fornier, 2012 Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190: 885–929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>
- MacNeil, L. T., E. Watson, H. E. Arda, L. J. Zhu, and A. J. Walhout, 2013 Diet-induced developmental acceleration independent of TOR and insulin in *C. elegans*. *Cell* 153: 240–252. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.049>
- Malmanche, N., and D. V. Clark, 2004 *Drosophila melanogaster* *Prat*, a purine de novo synthesis gene, has a pleiotropic maternal-effect phenotype. *Genetics* 168: 2011–2023. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.033134>
- Marie, S., B. Heron, P. Bitoun, T. Timmerman, G. Van den Berghe *et al.*, 2004 AICA-ribosiduria: a novel, neurologically devastating inborn error of purine biosynthesis caused by mutation of ATIC. *Am. J. Hum. Genet.* 74: 1276–1281. <https://doi.org/10.1086/421475>
- Matecic, M., D. L. Smith, X. Pan, N. Maqani, S. Bekiranov *et al.*, 2010 A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors. *PLoS Genet.* 6: e1000921. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000921>
- Mello, C. C., J. M. Kramer, D. Stinchcomb, and V. Ambros, 1991 Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* 10: 3959–3970. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04966.x>
- Monsalve, G. C., and A. R. Frand, 2012 Toward a unified model of developmental timing: a “molting” approach. *Worm* 1: 221–230. <https://doi.org/10.4161/worm.20874>
- Monsalve, G. C., C. Van Buskirk, and A. R. Frand, 2011 LIN-42/PERIOD controls cyclical and developmental progression of *C. elegans* molts. *Curr. Biol.* 21: 2033–2045. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.10.054>
- Moreno-Arriola, E., M. El Hafidi, D. Ortega-Cuellar, and K. Carvajal, 2016 AMP-activated protein kinase regulates oxidative metabolism in *Caenorhabditis elegans* through the NHR-49 and MDT-15 transcriptional regulators. *PLoS One* 11: e0148089. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148089>
- Narkar, V. A., M. Downes, R. T. Yu, E. Emblar, Y.-X. Wang *et al.*, 2008 AMPK and PPAR $\delta$  agonists are exercise mimetics. *Cell* 134: 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.051>
- Nyhan, W. L., 2005 Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Mol. Genet. Metab.* 86: 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.07.027>

- Oburoglu, L., S. Tardito, V. Fritz, S. C. de Barros, P. Merida *et al.*, 2014 Glucose and glutamine metabolism regulate human hematopoietic stem cell lineage specification. *Cell Stem Cell* 15: 169–184 (erratum: *Cell Stem Cell* 15: 666–668). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.002>
- Olmedo, M., M. Geibel, M. Artal-Sanz, and M. Merrow, 2015 A high-throughput method for the analysis of larval developmental phenotypes in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 201: 443–448. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.179242>
- Payne, S. H., and W. F. Loomis, 2006 Retention and loss of amino acid biosynthetic pathways based on analysis of whole-genome sequences. *Eukaryot. Cell* 5: 272–276. <https://doi.org/10.1128/EC.5.2.272-276.2006>
- Pinson, B., S. Vaur, I. Sagot, F. Couplier, S. Lemoine *et al.*, 2009 Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways. *Genes Dev.* 23: 1399–1407. <https://doi.org/10.1101/gad.521809>
- Praitis, V., E. Casey, D. Collar, and J. Austin, 2001 Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 157: 1217–1226.
- Priess, J. R., H. Schnabel, and R. Schnabel, 1987 The *glp-1* locus and cellular interactions in early *C. elegans* embryos. *Cell* 51: 601–611. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90129-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90129-2)
- Race, V., S. Marie, M. F. Vincent, and G. Van den Berghe, 2000 Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in adenylosuccinate lyase deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 9: 2159–2165. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.14.2159>
- Rebora, K., C. Desmoucelles, F. Borne, B. Pinson, and B. Daignan-Fornier, 2001 Yeast AMP pathway genes respond to adenine through regulated synthesis of a metabolic intermediate. *Mol. Cell. Biol.* 21: 7901–7912. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.23.7901-7912.2001>
- Rebora, K., B. Laloo, and B. Daignan-Fornier, 2005 Revisiting purine-histidine cross-pathway regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: a central role for a small molecule. *Genetics* 170: 61–70. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.039396>
- Rodríguez-Palero, M. J., A. López-Díaz, R. Marsac, J. E. Gomes, M. Olmedo *et al.*, 2018 An automated method for the analysis of food intake behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Sci. Rep.* 8: 3633. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21964-z>
- Rougvie, A. E., and E. G. Moss, 2013 Developmental transitions in *C. elegans* larval stages. *Curr. Top. Dev. Biol.* 105: 153–180. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396968-2.00006-3>
- Samuel, B. S., H. Rowedder, C. Braendle, M. A. Félix, and G. Ruvkun, 2016 *Caenorhabditis elegans* responses to bacteria from its natural habitats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: E3941–E3949. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607183113>
- Spiegel, E. K., R. F. Colman, and D. Patterson, 2006 Adenylosuccinate lyase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 89: 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.04.018>
- Stenesen, D., J. M. Suh, J. Seo, K. Yu, K.-S. Lee *et al.*, 2013 Adenosine nucleotide biosynthesis and AMPK regulate adult life span and mediate the longevity benefit of caloric restriction in flies. *Cell Metab.* 17: 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.006>
- Stiernagle, T., 2006 Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>.
- Tardito, S., A. Oudin, S. U. Ahmed, F. Fack, O. Keunen *et al.*, 2015 Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nat. Cell Biol.* 17: 1556–1568. <https://doi.org/10.1038/ncb3272>
- Timmons, L., and A. Fire, 1998 Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395: 854. <https://doi.org/10.1038/27579>
- Vrablik, T. L., L. Huang, S. E. Lange, and W. Hanna-Rose, 2009 Nicotinamidase modulation of NAD<sup>+</sup> biosynthesis and nicotinamide levels separately affect reproductive development and cell survival in *C. elegans*. *Development* 136: 3637–3646. <https://doi.org/10.1242/dev.028431>
- Watson, E., L. T. MacNeil, A. D. Ritter, L. S. Yilmaz, A. P. Rosebrock *et al.*, 2014 Interspecies systems biology uncovers metabolites affecting *C. elegans* gene expression and life history traits. *Cell* 156: 759–770 (erratum: *Cell* 156: 1336–1337). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.047>
- Zheng, Y., P. J. Brockie, J. E. Mellem, D. M. Madsen, and A. V. Maricq, 1999 Neuronal control of locomotion in *C. elegans* is modified by a dominant mutation in the GLR-1 ionotropic glutamate receptor. *Neuron* 24: 347–361. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80849-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80849-1)
- Zikanova, M., V. Skopova, A. Hnizda, J. Krijt, and S. Kmoch, 2010 Biochemical and structural analysis of 14 mutant ADSL enzyme complexes and correlation to phenotypic heterogeneity of adenylosuccinate lyase deficiency. *Hum. Mutat.* 31: 445–455. <https://doi.org/10.1002/humu.21212>

Communicating editor: B. Grant

Copyright of Genetics is the property of Genetics Society of America and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

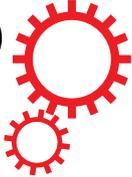
## **B. Article 2**

# **An automated method for the analysis of food intake behaviour in *Caenorhabditis elegans***

Ma Jesús Rodríguez-Palero, Ana López-Díaz, Roxane Marsac, José-Eduardo Gomes , María Olmedo and Marta Artal-Sanz



# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## An automated method for the analysis of food intake behaviour in *Caenorhabditis elegans*

M<sup>a</sup> Jesús Rodríguez-Palero <sup>1</sup>, Ana López-Díaz<sup>1</sup>, Roxane Marsac<sup>2</sup>, José-Eduardo Gomes <sup>2</sup>, María Olmedo <sup>1,3</sup> & Marta Artal-Sanz <sup>1</sup>

The study of mechanisms that govern feeding behaviour and its related disorders is a matter of global health interest. The roundworm *Caenorhabditis elegans* is becoming a model organism of choice to study these conserved pathways. *C. elegans* feeding depends on the contraction of the pharynx (pumping). Thanks to the worm transparency, pumping can be directly observed under a stereoscope. Therefore, *C. elegans* feeding has been historically investigated by counting pharyngeal pumping or by other indirect approaches. However, those methods are short-term, time-consuming and unsuitable for independent measurements of sizable numbers of individuals. Although some particular devices and long-term methods have been lately reported, they fail in the automated, scalable and/or continuous aspects. Here we present an automated bioluminescence-based method for the analysis and continuous monitoring of worm feeding in a multi-well format. We validate the method using genetic, environmental and pharmacological modulators of pharyngeal pumping. This flexible methodology allows studying food intake at specific time-points or during longer periods of time, in single worms or in populations at any developmental stage. Additionally, changes in feeding rates in response to differential metabolic status or external environmental cues can be monitored in real time, allowing accurate kinetic measurements.

The regulation of food intake is a critical mechanism with major physiological impacts. On the one hand, the rate of food intake determines the rate of growth, and anomalous feeding behaviours are associated with an assortment of chronic diseases such as obesity, type 2 diabetes, cardiovascular diseases and some cancers<sup>1–3</sup>. On the other hand, dietary restriction has implications and beneficial effects on health and longevity<sup>4–6</sup>. Hence the growing interest and the increasing efforts to understand the processes and mechanisms that control feeding actions and its anomalies.

Despite their evolutionary distance, metabolism and central signalling pathways are highly conserved between mammals and *Caenorhabditis elegans*, and the regulation of feeding is not an exception<sup>7</sup>. Human and *C. elegans* genomes show a relevant orthology degree<sup>8</sup>. At least 50% of *C. elegans* genes have a human ortholog, and approximately 70% of genes related with human diseases have homologs in *C. elegans*<sup>9</sup>. Therefore, *C. elegans* has emerged as a powerful model to study food-related behaviours, shedding light in the underlying factors and mechanisms involved in the genetic regulation of feeding<sup>10–15</sup>.

*C. elegans* feeding occurs as a consequence of two motions: the cyclic contraction of the pharynx (pumping) and the isthmus peristalsis, being the former the better comprehended of the two<sup>16</sup>. These feeding motions can be modulated by the internal state of the worm and by environmental cues. Feeding rate is proportional to the worm pharyngeal pumping where bacteria are sucked from the environment and grinded up. Thanks to the transparency of *C. elegans* the grinder movement can be directly observed under a stereoscope. This allows the routine study of food intake by means of direct quantification of pumps per minute<sup>17</sup>. Alternatively, it can be indirectly measured using bacteria expressing fluorescent proteins or BODIPY dye<sup>18</sup>. While these methods are easily implemented, they are short-term and unsuitable for independent measurements of high numbers of animals.

<sup>1</sup>Andalusian Center for Developmental Biology, Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Junta de Andalucía/ Universidad Pablo de Olavide, Department of Molecular Biology and Biochemical Engineering, Carretera de Utrera, km 1, 41013, Seville, Spain. <sup>2</sup>Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires – C.N.R.S. UMR 5095 and Université de Bordeaux, 1, rue Camille Saint-Saëns, 33077, Bordeaux Cedex, France. <sup>3</sup>Department of Genetics, University of Seville, Avenida Reina Mercedes s/n, 41012, Seville, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.O. (email: [mariaolmedo@us.es](mailto:mariaolmedo@us.es)) or M.A.-S. (email: [martsan@upo.es](mailto:martsan@upo.es))

Therefore, it is challenging to find automated methods that allow continuous and long-term measurements to study food intake behaviour in a sizable number of individuals. Some methods based on food clearance assays, time-lapse imaging or electrophysiological readouts have been reported<sup>19–21</sup>. All these approaches cover some of these aspects; but automatic and continuous methods, sensitive enough to study food intake behaviour in both individual animals and populations, are essential and still lacking.

Here we present a high-throughput method to continuously measure food intake behaviour in single worms and in worm populations. This new approach is based on a method, previously described by some of us, that uses bioluminescence for continuous monitoring of development in *C. elegans*<sup>22</sup>. We measured bioluminescence in strains that constitutively and ubiquitously express luciferase (LUC)<sup>23,24</sup>. LUC catalyzes the conversion of the substrate luciferin into oxyluciferin, in a reaction that emits light<sup>25</sup>. The luminescence signal increases throughout development, but is abruptly interrupted coinciding with the lethargy characteristic of the molt stages<sup>22</sup>. The decrease in the signal is due to the specific depletion of ingested luciferin during the quiescent periods, what led us to hypothesise that the bioluminescence signal could report for food intake behaviours. Here, we validate the method for analysis of food intake using mutants with defective pharyngeal pumping, changes in environmental conditions, as well as drugs that increase or decrease pumping rates. As proof of principle we were able to detect a food intake defect in a mutant previously unsuspected of presenting this phenotype. This method is automated, can be performed in multi-well plates, and allows continuous monitoring of food intake and accurate kinetic measurements. The method is suitable for measuring both individual animals and small populations, making thus feasible screening a relatively large number of animals.

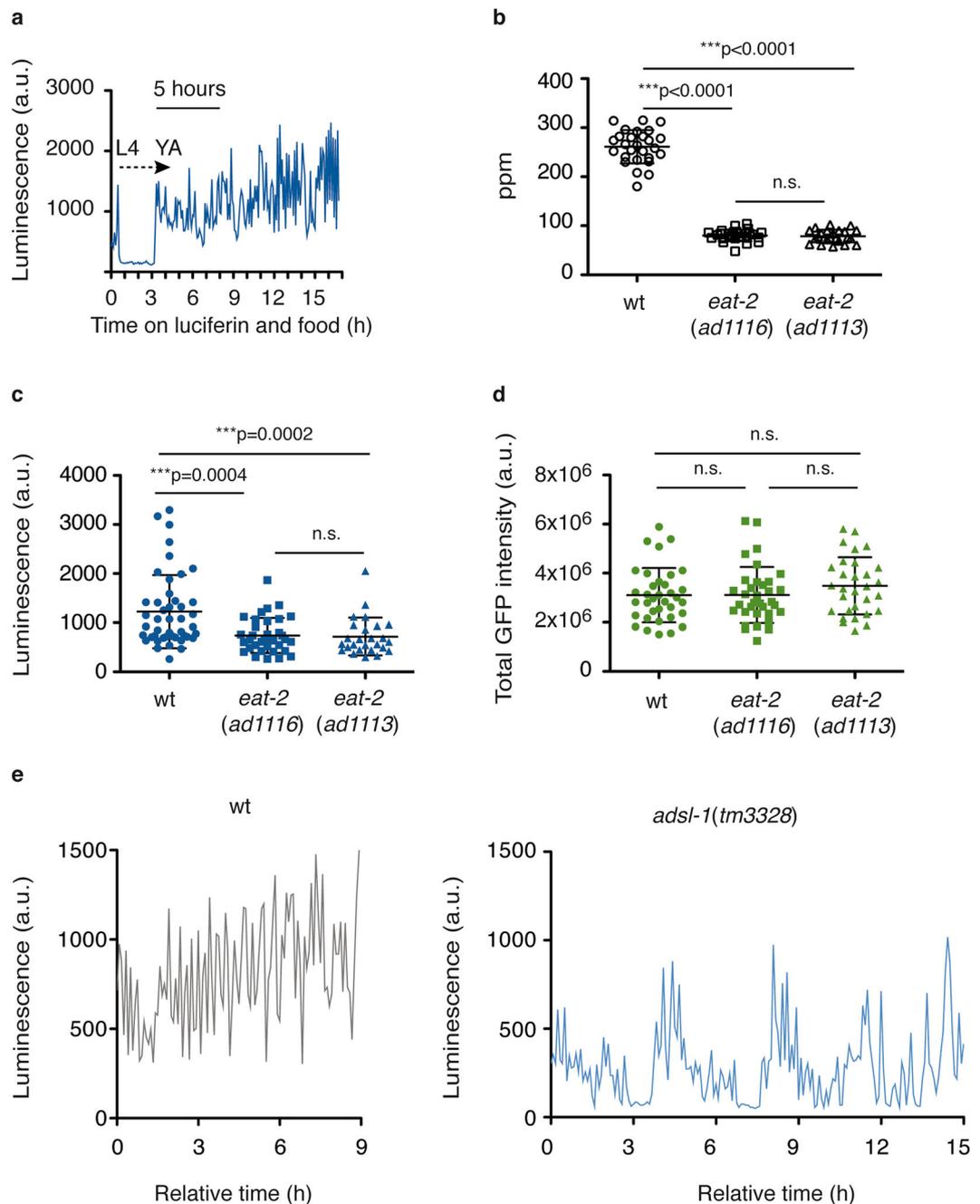
## Results and Discussion

**Luminescence assay for the analysis of food intake behaviour in *C. elegans*.** We measured luminescence from single animals that constitutively and ubiquitously express the luciferase protein fused to GFP (*Psur-5::luc<sup>+</sup>::gfp*)<sup>23,24</sup>, in 96-well plates. The expression of the LUC::GFP protein in this strain is driven by the regulatory region of the constitutively expressed *sur-5* gene and LUC::GFP fusion protein is expressed in most cells of *C. elegans* throughout development<sup>23</sup>. We transferred L4 larvae from NGM agar plates to a 96-well plate, one worm per well, containing S-basal, food (*E. coli*) and luciferin (100  $\mu$ M). We did not add compounds to increase the permeability of the cuticle, so that the luminescence signal comes primarily from the ingested luciferin. The L4 larvae ingest luciferin and emit light until they reach the fourth molt (L4 to adult). During molt stages, *C. elegans* forms a plug of extracellular material in the buccal cavity and they cease pharyngeal pumping<sup>26</sup> and luminescence signal drops (Fig. 1a). After the quiescent period of the molt, worms resume feeding and luciferin uptake, as the animal enters the young-adult stage, provoking an increase in the luminescence signal. We took as reference value the mean of the luminescence signal within the first 5 hours of adulthood. However, shorter measurement periods are possible.

If luciferin is limiting the reaction, differential feeding rates, and so differential luciferin uptake, will result in different luminescence signals reflecting the amount of ingested food. We tested different luciferin concentrations (from 100 to 12.5  $\mu$ M) and observed that decreasing luciferin resulted in a decrease of the luminescence signal (Supplementary Fig. S1). This indicated that luciferin was limiting the luminescence reaction, at least in the tested range. We established 100  $\mu$ M as the default luciferin concentration for the rest of the experiments. We also tested that luciferin can last for at least one week to ten days under our experimental conditions.

**Luminescence signal reports reduced feeding rates in mutants and detects alterations in feeding patterns.** *eat-2* encodes a nicotinic acetylcholine receptor subunit and functions post-synaptically in pharyngeal muscle regulating the rate of pharyngeal pumping<sup>27</sup>. Consequently, *eat-2* mutants show a slow pumping phenotype, have a reduced feeding rate and are food restricted<sup>28,29</sup>. We crossed two pharyngeal pumping mutants, *eat-2(ad1116)* and *eat-2(ad1113)*, with the LUC::GFP reporter strain. The resulting strains have reduced pharyngeal pumping rates, as expected (Fig. 1b). We therefore tested our method and measured luminescence from single animals (wild-type and *eat-2* mutants) within the first five hours of adulthood. Mean luminescence signal emitted from single *eat-2* mutants was reduced compared to wild-type animals (Fig. 1c), while no significant difference was detected between the two different *eat-2* alleles. As it was mentioned above, the reporter has the advantage of harbouring the GFP protein fused to LUC. Therefore, levels of fluorescent protein can be easily investigated, allowing the evaluation of luciferase protein levels in any strain tested and under any experimental condition. We have noticed that some metabolically compromised worms show alterations in fusion protein levels (Supplementary Table S1). To discard that the reduced luminescence observed in *eat-2* mutants could be a consequence of lower LUC::GFP fusion protein levels, we measure total GFP intensity under the same conditions of the luminescence assay. There were no significant differences in the fluorescence signals among the strains (Fig. 1d). Given that LUC catalyses the conversion of luciferin into oxyluciferin with ATP consumption<sup>25</sup>, it could be argued that reduction in the *eat-2* signal is a consequence of ATP depletion. However, Houthoofd *et al.* established that ATP levels for wild-type worms and *eat-2* mutants, raised on either agar plates or liquid cultures, were not affected at the young adult stage<sup>30</sup>. We hence concluded that the reduction in the luminescence signal emitted by *eat-2* mutants results from a specific reduction of the ingested luciferin and hence reflects reduced food intake.

We tested whether this method can be useful to monitor feeding behaviour in small populations of worms. We measured luminescence signals from 20 synchronized L1 larvae per well, in a 96-well plate, throughout larval development. Age-specific luminescence signal from *eat-2* mutant was reduced compared to the wild-type strain at all stages of development (Supplementary Fig. S2), validating the method to scrutinize feeding behaviour in populations of worms at any desired developmental stage, or through complete development. The mean luminescence signal emitted by *eat-2* mutants and wild-type animals at the L1 stage was calculated as an example (Supplementary Fig. S2).



**Figure 1.** Luminescence signal reports food intake of single animals. **(a)** Bioluminescence signal from a single LUC::GFP transgenic animal over 17 h from the end of the L4 larval stage ( $t=0$ ). The absence of substrate intake during the molt provokes a decrease in the bioluminescence signal that resumes when animals exit the fourth molt and enter the young-adult stage (YA). The first 5-hour period of adulthood, used as a reference to calculate the mean value of the luminescence signal, is shown. **(b)** Pharyngeal pumping per minute (ppm) of wild-type, *eat-2(ad1116)* and *eat-2(ad1113)* mutant animals transgenic for LUC::GFP, at the YA stage. The graph shows data from two experimental replicates. **(c)** Mean luminescence signal of wild-type, *eat-2(ad1116)* and *eat-2(ad1113)* mutant animals transgenic for LUC::GFP, at the YA stage. The graph shows data from four independent experimental replicates. **(d)** Total GFP fluorescence intensity from wild-type, *eat-2(ad1116)* and *eat-2(ad1113)* mutant animals transgenic for LUC::GFP, at the YA stage. The graph shows data from one representative experiment out of three biological replicates. **(e)** Bioluminescence signal of wild-type and *adsl-1(tm3328)* mutant animals transgenic for LUC::GFP. A time interval within the L4 stage is shown. *adsl-1(tm3328)* signal exhibits interruptions and reduction in the luminescence signal compared to wild-type. The graph shows data from a representative well out of 21 animals assayed in three experimental replicates. Error bars show s.d. All experiments were done using strains carrying the integrated transgene *feIs4*.

A method that continuously reports food intake, should be suitable to identify new mutants presenting anomalous food intake patterns. Indeed, in the course of our experiments we serendipitously detected a reduced and irregular luminescence pattern with interruptions of the bioluminescence signal in the *adsl-1(tm3328)* mutant (Fig. 1e), thus showing a food intake defect in this mutant. *adsl-1* encodes for the enzyme adenylysuccinate lyase, involved in the purine biosynthesis pathway<sup>31</sup>. We confirmed this aberrant feeding behaviour by means of direct observation under the stereoscope. *adsl-1(tm3328)* animals showed an anomalous dynamic of pharyngeal pumping on food, with irregular rhythm of pumps, frequent long pauses and alternation between regular and slow pumping rates (in a range from 0 to approximately 140 pumps/30 sec in L4 animals; data not shown). This phenotype is difficult to characterize and quantify using short-term observation techniques and automated longitudinal technics will help the identification of irregular feeding patterns. This method represents an alternative methodology to shed light in feeding dynamics during long and continuous periods of time. We had no previous indication suggesting food intake defects in *adsl-1(tm3328)* mutants, confirming that our method allows the identification of new genes affecting food intake.

### Luminescence signal reports the response to changes in food availability and quality.

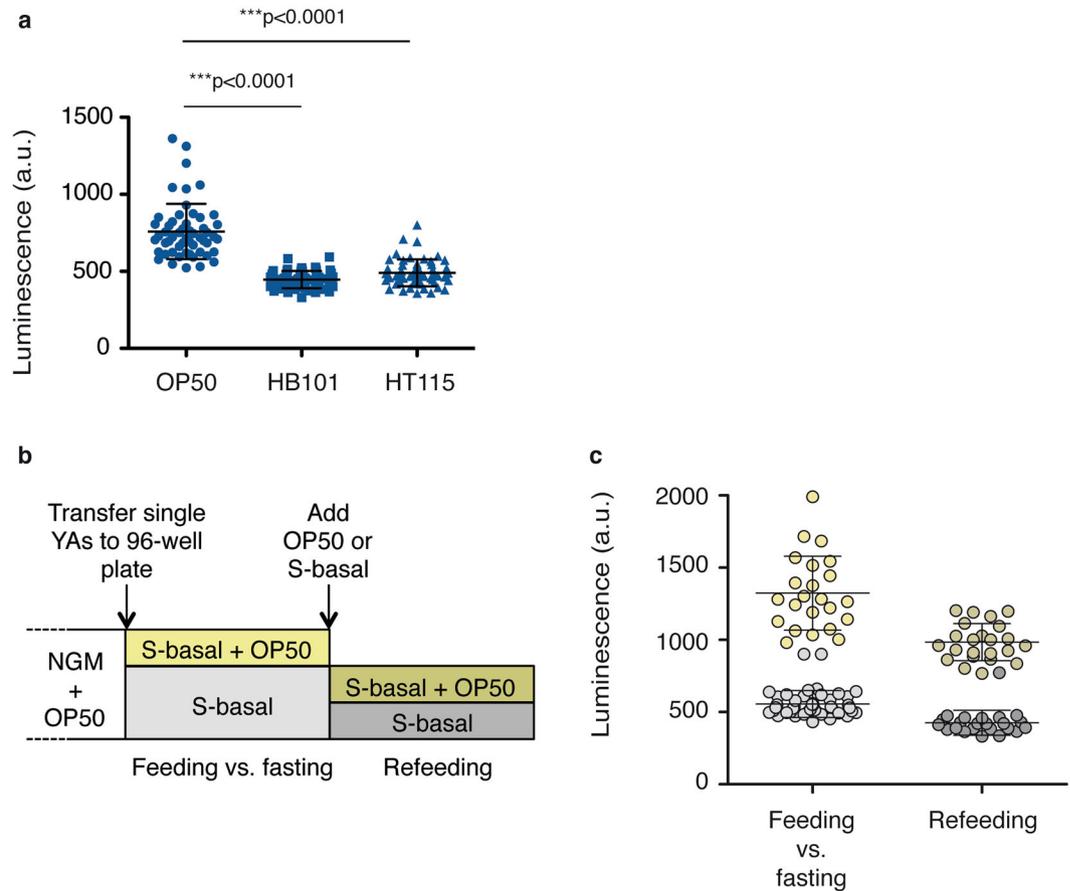
Environmental conditions, previous experience, food quality and the own energetic state of the animal, among others, modulate feeding behaviour in *C. elegans*<sup>32–35</sup>. Typically, in laboratory conditions, *C. elegans* is fed on *E. coli* strain OP50<sup>36</sup>. However, it is documented that other bacterial strains are nutrient-richer food and have superior ability to support *C. elegans* growth than OP50<sup>37–39</sup>. Different diets induce particular behavioural responses. HB101 strain is high quality food and considered easier for worms to eat than other *E. coli* strains. Worms fed on HB101 grow faster and decrease pumping rate<sup>38</sup>. This feeding response is also observed in HT115, the *E. coli* strain used for RNAi assays<sup>40</sup>. We measured this differential modulation of food intake by distinctive food quality diets on the luminometry assay. That is, we tested if our method was able to detect the lower feeding rates reported on animals fed on HT115 or HB101 compared to OP50. Single L4 larvae, from NGM agar plates seeded with OP50, were transferred to a 96-well plate, one worm per well. Single worms were then simultaneously exposed to OP50, HB101, or HT115. Animals completed L4 larva stage on the specific diets, molted, and luminescence signal within the first five hours of adulthood was measured (Fig. 2a). The luminescence signal emitted by worms feeding on HB101 or HT115 was significantly lower than the one on OP50, as expected for lower feeding rates. Therefore, we concluded that our methodology is sensitive to detect the decreased food consumption already reported on *C. elegans* fed on HB101 and HT115.

Animals also reduce their pumping rate when deprived of food and increase it again when they encounter food<sup>41–43</sup>. We measured the response of *C. elegans* to changes in food availability using luminometry. We transferred single YA worms from an NGM plate with OP50 to independent wells of a plate for luminometry (Fig. 2b). When there is only S-basal in the well, the animals show a reduced luminescence signal compared to the animals transferred to wells with 10 g/l OP50 in S-basal (Fig. 2c). Upon addition of food to the fasting animals, the signal increased again, unlike in the control situation when only S-basal is added to the fasted worms (Fig. 2c). The signal over the periods of fasting and refeeding can be followed if measurements are performed at short time intervals. During continuous feeding the signal increases slowly, probably due to the increase in size of the animal. When animals are fed after a period of fasting, the signal increases to reach a similar level to that of fed worms (Supplementary Fig. S3). This assay can therefore be used to study the modulation of food intake in response to changes in food quality or other environmental cues.

**Serotonin and naloxone respectively increase and decrease the luminescence signal.** To validate the suitability of the method for screening purposes or pharmacological tests, such as those on drugs that can potentially regulate feeding, we challenged our method with two compounds: serotonin and naloxone, that stimulate and inhibit feeding in wild-type worms, respectively.

Serotonin is a biogenic amine neurotransmitter that modulates locomotion, egg laying and pharyngeal pumping in *C. elegans*<sup>44</sup>. Addition of external serotonin increases pharyngeal pumping frequency and consequently food intake<sup>45,46</sup>. We tested the serotonin response in our LUC::GFP reporter strain. Most studies use serotonin concentrations between 10 and 20 mM<sup>47–49</sup>. We set up serotonin 20 mM for all our assay conditions. The drug treatment increased pharyngeal pumping frequency of young-adult animals as predicted (Fig. 3a). We hypothesized that, if we add serotonin to the media, an increase in pharyngeal pumping would be also accompanied by an increase in the luciferin ingested and so in luminescence signal. We conducted luminescence assays in our system on serotonin treated worms. The luminescence signal of young-adult stage animals was higher in the presence of serotonin as compared to the control condition. Mean luminescence value within a 45 min period was taken as reference value (Fig. 3b). We noticed that the luminescence signal was serotonin-dose dependent and we did find that saturation of the effect was reached by the range 10–20 mM (Supplementary Fig. S4). Other authors find that this saturation was reached by 5 mM<sup>50</sup>. Differential experimental conditions from one study to another could explain this discrepancy. To rule out the hypothesis that serotonin was affecting protein expression levels of the LUC::GFP fusion protein, we measured total GFP intensity of serotonin-treated worms. We did not find significant differences in GFP intensity upon serotonin treatment (Fig. 3c).

Naloxone is a morphine antagonist that inhibits food intake in starved worms<sup>51,52</sup>. We tested the naloxone response in LUC::GFP animals and confirmed that the drug treatment reduces pumping rate under our experimental conditions (Fig. 3d). We conducted luminescence assays on naloxone treated worms. The luminescence signal of young-adult animals was lower in the presence of naloxone. As above, mean value within a 45 min period was taken as reference value (Fig. 3e). We ruled out the possibility of naloxone affecting LUC::GFP fusion protein levels by measuring total GFP intensity of the worms under naloxone treatment and did not find significant differences (Fig. 3f). We conclude that the method presented here will be useful to unravel altered feeding

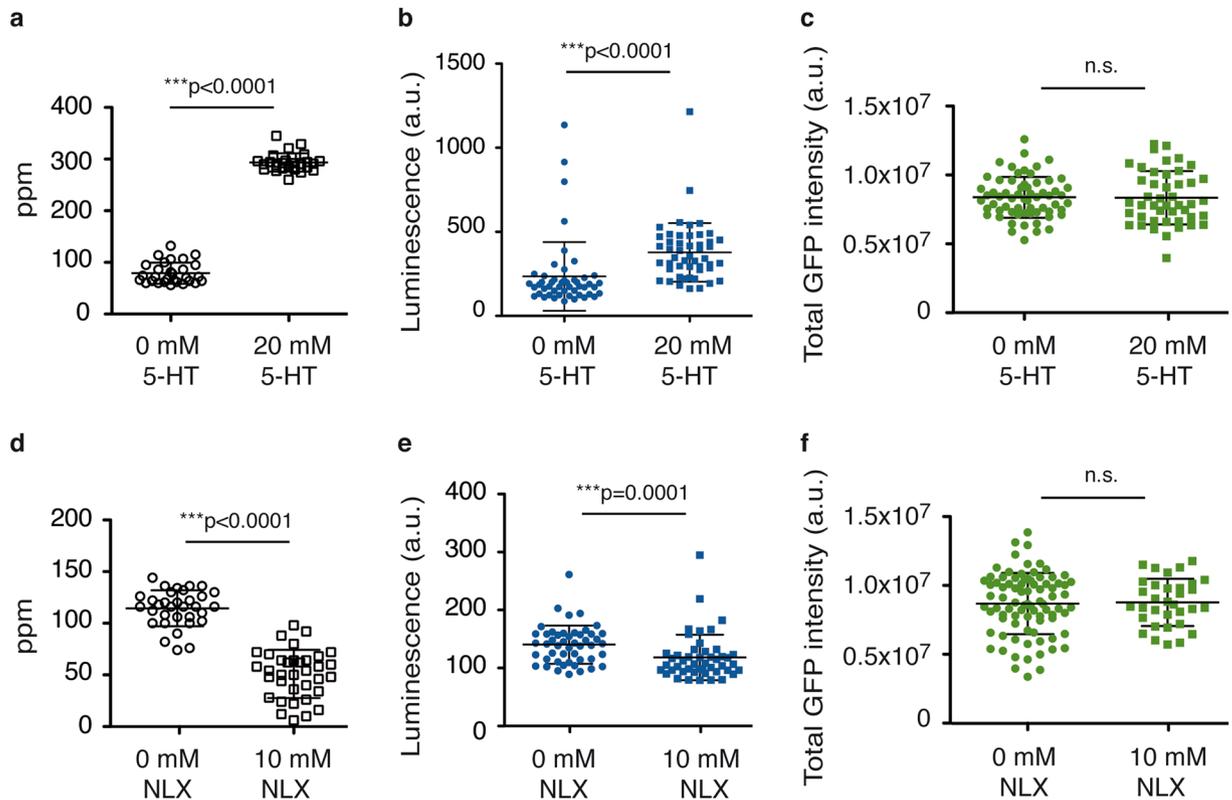


**Figure 2.** Luminescence signal reports responses to food availability and quality. **(a)** Mean bioluminescence signal from single LUC:GFP transgenic animals at young-adult stage (YA). Worms were fed on OP50, HB101, or HT115, as indicated. The graph shows data from two experimental replicates. **(b)** Description of the experiment of fasting and refeeding. YA animals are transferred from an NGM plate with OP50 to a well of a 96-well plate with 10 g/l OP50 in S-basal (Feeding). Alternatively, YA animals starved for 1 hour, are transferred to a well of a 96-well plate with S-basal (Fasting). After two hours of continuous measurement, the wells containing fasting animals are supplemented with either OP50 in S-basal (Refeeding) or S-basal alone, and are measured for another two hours. **(c)** Mean luminescence signal of two hours measurements for each condition. The graph shows data from one representative experiment of two independent replicates. The replicate is shown in Supplementary Fig. S3b. Error bars show s.d. All experiments were done using a strain carrying the integrated transgene *sev1s1*.

phenotypes under different conditions or upon different drug treatments, as it is able to detect both increases and decreases in feeding rates.

**Food intake behaviour can be detected in real time.** We have shown that this method allows the study of different feeding phenotypes, particularly during medium and long periods of time. Next, we determined whether this luminescence assay is sufficiently sensitive and precise to monitor changes in food intake behaviour in real time. With this purpose, we measured the luminescence emitted by single worms at the young-adult stage, in a 96-well plate, in a kinetic fashion as follows: Luminescence signal from individual worms was measured continuously for 5 min. Then, either serotonin dissolved in S-basal (20 mM final concentration) or S-basal alone were automatically injected into the well and measurements continued for another 5 min. The signal was constant within the very first 5 min, but the addition of the drug was accompanied by an immediate increase in the luminescence signal (Fig. 4a). Only two minutes after the addition of serotonin, the signal had increased by 83.43% ( $\pm 39.91$  s.d.) relative to the basal value before serotonin was added (Fig. 4b). Also, if required, the response rate to the treatment could be inferred from the slope of the kinetic curve. In addition, we verified that this method was also suitable to measure real time changes in food intake of small populations. We performed the same type of kinetic assay in a population of 20 worms per well. Once again, the effect of the addition of the drug was observed by a rapid increase in the luminescence signal (Fig. 4c). The increment in luminescence signal in the worm population was in the same range as in single worms ( $74.99\% \pm 20.37$  s.d.) (Fig. 4d).

In summary, the assay we describe here allows the automatic and continuous analysis of food intake in a multi-well format. This method permits the scrutiny of feeding behaviours at specific time-points, during long periods of time and in real time, being suitable for both, populations and single worms at any developmental

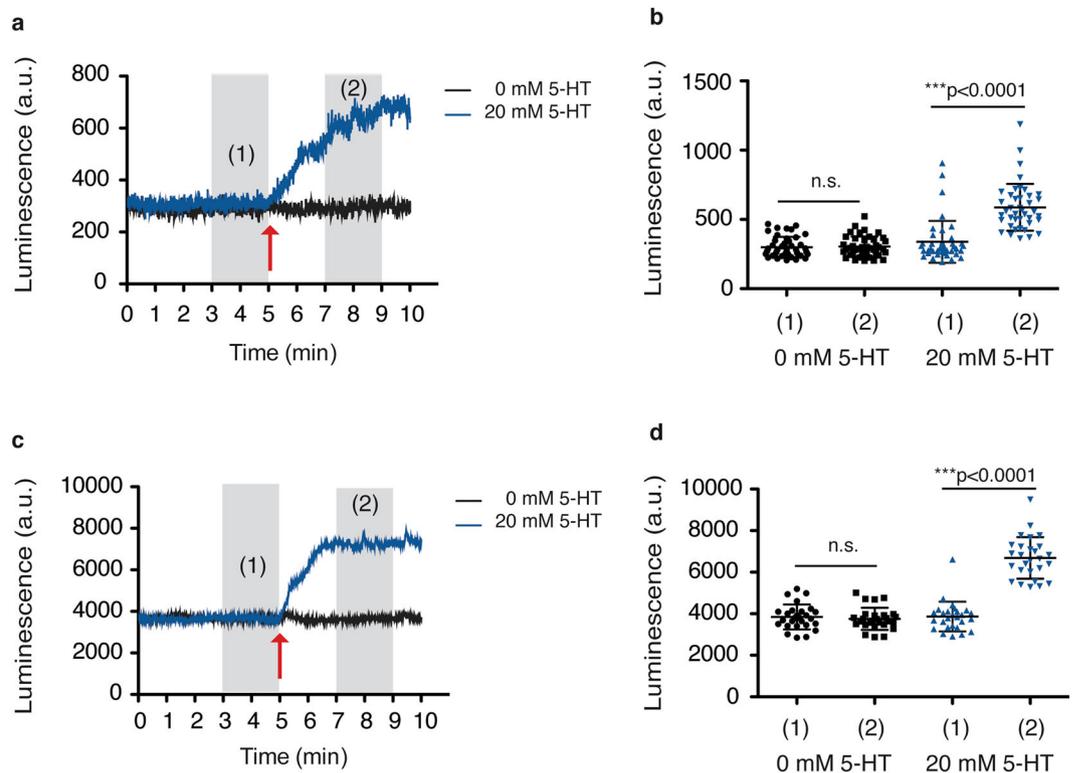


**Figure 3.** Luminescence signal respectively increases and decreases upon serotonin and naloxone treatment. (a) Mean pharyngeal pumping per minute (ppm) of single LUC::GFP transgenic animals, at the young-adult stage (YA), in the absence and presence of serotonin (5-HT). The graph shows data from two experimental replicates. (b) Mean luminescence signal from individual LUC::GFP transgenic animals, at the YA stage, in the absence and presence of serotonin (5-HT). The graph shows data from six experimental replicates. (c) Total fluorescence intensity from individual YA LUC::GFP transgenic animals in the absence and presence of serotonin (5-HT). The graph shows data from three experimental replicates. (d) Mean pharyngeal pumping per minute (ppm) of single LUC::GFP transgenic animals, in the absence and presence of naloxone (NLX), at the YA stage. The graph shows data from two independent biological replicates. (e) Mean luminescence signal from individual YA LUC::GFP transgenic animals in the absence or presence of naloxone (NLX). The graph shows data from six experimental replicates. (f) Total fluorescence intensity from individual LUC::GFP transgenic animals, in the absence or presence of naloxone (NLX), at the YA stage. The graph shows data from one representative experiment of two independent replicates. Error bars show s.d. All experiments were done using a strain carrying the integrated transgene *sevIs1*.

stage. This methodology is a versatile tool that might prove useful to address other feeding behaviours and patterns, such as burst feeding and pauses, food seeking and avoidance, or satiety quiescence. The method described here adds an invaluable tool to investigate how internal and external cues modulate feeding behaviours.

## Methods

**Strains and experimental conditions.** We used the reporter strains PE254 (*fels4[Psur-5::luc<sup>+</sup>::gfp]; rol-6(su1006)V*)<sup>23,24</sup>, MRS290 (*eat-2(ad1116)II; fels4[Psur-5::luc<sup>+</sup>::gfp]; rol-6(su1006)V*), MRS307 (*eat-2(ad1113)II; fels4[Psur-5::luc<sup>+</sup>::gfp]; rol-6(su1006)V*), WBX130 (*adsl-1(tm3328)/hT2[bli-4(e937)let-?(q782)qls48]; fels4[Psur-5::luc<sup>+</sup>::gfp]; rol-6(su1006)V*), MRS382 (*sgk-1(ok538)X; fels4[Psur-5::luc<sup>+</sup>::gfp]; rol-6(su1006)V*); MRS423 (*daf-16(mu86); sevIs1[Psur-5::luc<sup>+</sup>::gfp]X*); MRS433 (*daf-2(e1370)III; sevIs1[Psur-5::luc<sup>+</sup>::gfp]X*); MOL43 (*sgk-1(ft-15)X; sevIs2[Psur-5::luc<sup>+</sup>::gfp]*); MOL62 (*age-1(mg305)II; sevIs1[Psur-5::luc<sup>+</sup>::gfp]X*). To generate MRS387 (*sevIs1[Psur-5::luc<sup>+</sup>::gfp]X*), we X-irradiated the strain *sevEx1[Psur-5::luc<sup>+</sup>::gfp]* to integrate the reporter array. The strain was outcrossed 10 times to the N2 strain. To generate MRS389 (*sevIs2[Psur-5::luc<sup>+</sup>::gfp]*), we X-irradiated *sevEx1[Psur-5::luc<sup>+</sup>::gfp]* to integrate the reporter array. The strain was outcrossed 10 times to the N2 strain. For stock animals we cultured the worms according to standard methods<sup>36</sup>. We routinely maintained the strains at 20 °C on nematode growth media (NGM) plates with a lawn of *Escherichia coli* OP50-1. Other *Escherichia coli* strains used in this work are HB101 [*supE44, hsdS20(rB-mB-), recA13, ara-14, proA2, lacY1 galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1*] and HT115(DE3) [*F<sup>-</sup>, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14::Tn10(DE3 lysogen:lavUV5 promoter -T7 polymerase)*]. All *E. coli* strains were obtained from the Caenorhabditis Genetics Center (CGC). Synchronized worms were obtained placing 15–20 young adults laying eggs for 2–3 hours at 20 °C on NGM plates seeded with *E. coli*. Adults were removed and plates were incubated until animals reached the L4



**Figure 4.** Luminescence signal reports the response to drugs on real time. **(a)** Kinetics of the luminescence signal before and after serotonin (5-HT) addition. A single LUC::GFP transgenic animal at the young-adult (YA) stage was measured. Red arrow points out the time point of 5-HT addition. **(b)** Mean luminescence signal before (1) and after (2) 5-HT addition, in single LUC::GFP transgenic animals, at the YA stage. The graph shows mean values over a 2 minutes period (grey shadows (1) and (2) shown in a) from three experimental replicates. **(c)** Kinetics of the luminescence signal before and after 5-HT addition, in a population of 20 LUC::GFP transgenic animals, at YA, per well. Red arrow indicates the time point of 5-HT addition. **(d)** Mean luminescence signal before (1) and after (2) 5-HT addition in a population of 20 LUC::GFP transgenic animals, at YA, per well. The graph shows data from two experimental replicates. Error bars show s.d. All experiments were done using a strain carrying the integrated transgene *sevIs1*.

stage or young-adult stage, as desirable. To obtain synchronized L1 larvae, we collected eggs by hypochlorite treatment and allowed them to hatch and arrest by overnight incubation in M9.

**Pharyngeal pumping assay.** Mid-L4 larvae were transferred to fresh NGM plates seeded with *E. coli*, and incubated 5–6 hours until they reached the early young-adult stage. Young adults were then transferred to a new fresh NGM plate seeded with *E. coli* and allowed to crawl for 15 min. Pharyngeal pumping rate was determined by visual counting of the movement of the grinder under a dissecting microscope for 30 seconds.

**Luminometry of animals in the presence of food.** Luminometry assays were performed as previously described<sup>22</sup> with some modifications. Briefly, mid-L4 larvae were transferred into a well of a white, flat bottom, 96-well plate by manual picking. Plate contained 100  $\mu$ l of S-basal per well. Alternatively, arrested L1 larvae were transferred into a well by pipetting. Then animals were simultaneously exposed to food by adding 100  $\mu$ l of S-basal with 20 g/litre of *E. coli* OP50-1 (wet weight) and 200  $\mu$ M D-Luciferin per well. Each well finally contained 200  $\mu$ l S-basal with 100  $\mu$ M D-Luciferin and 10 g/litre of *E. coli* OP50-1. Plates were sealed with a gas-permeable cover (Breathe Easier, Diversified Biotech). We measured luminescence (Berthold Centro LB960 XS3 equipped with two injectors) for 1 s, typically at 5-min intervals. We performed all experiments at 20 °C inside temperature-controlled incubators (Panasonic MIR-154). The raw data from the luminometer were visualized using ChronoOSX<sup>33</sup>. MS-Excel 2011 and GraphPad Prism 5 were used for all calculations and plotting of the data.

For feeding assays in presence of HB101 or HT115(DE3), well-fed mid-L4 larvae were transferred from plates seeded with OP50-1 to a fresh NGM plate without *E. coli*. Animals were allowed to crawl while incubated at 20 °C for 30 min. Then animals were transferred into a well of a white, flat bottom, 96-well plate by manual picking. Luminometer assay was performed as described above, but animals were simultaneously exposed to HB101 or HT115(DE3) as indicated. OP50-1 strain was used for control conditions.

**Luminometry of animals in fasting/refeeding assay.** For fasting condition, well-fed young-adult animals were transferred to a fresh NGM plate without *E. coli* and allowed to crawl while incubated at 20 °C

for 1 hour. Single animals were then transferred into a well of a white, flat bottom, 96-well plate by manual picking. Each well contained 100  $\mu$ l of S-basal with 100  $\mu$ M D-Luciferin. Luminescence was read for 1 sec, at 5-min intervals, for a period of 2 hours. After this period, 100  $\mu$ l of S-basal with 20 g/litre of *E. coli* OP50-1 and 100  $\mu$ M D-Luciferin was added to the wells for the refeeding conditions. Each well finally contained 200  $\mu$ l S-basal with 100  $\mu$ M D-Luciferin and 10 g/litre of *E. coli* OP50-1. For control conditions 100  $\mu$ l of S-basal with 100  $\mu$ M D-Luciferin was added to the wells. Luminescence was read again for another period of 2 hours. Alternatively and in parallel, for feeding conditions, single well-fed young-adult animals were transferred into a well of a white, flat bottom, 96-well plate. Plate containing 100  $\mu$ l of S-basal with 100  $\mu$ M D-Luciferin and 10 g/litre of *E. coli* OP50-1 per well. Luminescence was read for 1 sec, at 5-min intervals, for a period of 4 hours.

**Total fluorescence signal analysis.** To measure total green fluorescence signal per worm, a young adult-stage population was washed from the plate and transferred to clear, flat bottom, 96-well plate. Worms were paralyzed with 10 mM levamisole (L9756, SIGMA-ALDRICH). Plates were sealed with a seal plate adhesive (SealMate System, Excel Scientific) and imaged in the automated microscope IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Science) using an objective Plan Apo 2X/0.1. Total GFP intensity was calculated with the Developer Toolbox (GE Healthcare Life Science) integrated software.

**Drug treatment assays.** Serotonin (5-HT) (H7752, SIGMA-ALDRICH) and Naloxone (PHR1802, SIGMA-ALDRICH) stocks were always freshly prepared in S-basal. To assess the effect of 5-HT, synchronized young adult-stage worms were washed out with S-basal from NGM plates seeded with OP50. Animals were transferred to fresh NGM plate, in the absence of food, and incubated at 20 °C for 1 hour. Starved worms were then transferred to NGM plates, without food, containing 5-HT (20 mM) and pharyngeal pumping was score after a 15-min acclimation period. For the luminescence assay, worms starved for 1 hour were transferred into a well of a 96-well plate containing 200  $\mu$ l of S-basal and luciferin (100  $\mu$ M), either with serotonin (20 mM) or without for control conditions. After a period of 15 min of acclimation, luminescence was read for 0.5 sec, typically at 20-sec intervals. To measure total green fluorescence signal, 1-hour starved worms were washed and transferred to 96-well plates, containing S-basal either with serotonin (20 mM) or without for control conditions. Fluorescence signal was analysed after 15 min of acclimation period. For Naloxone treatment (10 mM) we followed the same procedure but the acclimation period was 1 hour in all cases.

For real time assays, starved worms were transferred into a well of a 96-well plate containing 120  $\mu$ l of S-basal and luciferin (100  $\mu$ M). We measured luminescence for 0.5 sec, continuously, for a 5-min period. Then 80  $\mu$ l of 5-HT stock solution (dissolved in S-basal and luciferin 100  $\mu$ M) were automatically injected (final volume in the well: 200  $\mu$ l, luciferin 100  $\mu$ M, 5-HT 20 mM). For control conditions 80  $\mu$ l of S-basal solution with luciferin (100  $\mu$ M) was added. Luminescence measurement was resumed immediately after injection and continued for another 5 min.

**Statistical analysis.** Statistics were performed using GraphPad Prism 5 software. Before plotting the data, we removed the outliers detected using the Grubb's test. Variations in luminescence, fluorescence signals and pumping rates were analysed with the nonparametric Mann-Whitney U test, two-tailed.

## References

- Razzoli, M., Pearson, C., Crow, S. & Bartolomucci, A. Stress, overeating, and obesity: Insights from human studies and preclinical models. *Neurosci Biobehav Rev* **76**, 154–162, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.026> (2017).
- Blancas-Velazquez, A., Mendoza, J., Garcia, A. N. & la Fleur, S. E. Diet-Induced Obesity and Circadian Disruption of Feeding Behavior. *Front Neurosci* **11**, 23, <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00023> (2017).
- Gonzalez-Muniesa, P. *et al.* Obesity. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17034, <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34> (2017).
- Piper, M. D. & Bartke, A. Diet and aging. *Cell Metab* **8**, 99–104, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.012> (2008).
- Redman, L. M. & Ravussin, E. Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes. *Antioxid Redox Signal* **14**, 275–287, <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3253> (2011).
- Fontana, L. & Partridge, L. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell* **161**, 106–118, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.020> (2015).
- You, Y. J. & Avery, L. Appetite Control: worm's-eye-view. *Animal Cells Syst (Seoul)* **16**, 351–356, <https://doi.org/10.1080/19768354.2012.716791> (2012).
- Shay, D. D. & Greenwald, I. OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS One* **6**, e20085, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020085> (2011).
- Dexter, P. M., Caldwell, K. A. & Caldwell, G. A. A predictable worm: application of *Caenorhabditis elegans* for mechanistic investigation of movement disorders. *Neurotherapeutics* **9**, 393–404, <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0109-x> (2012).
- Houthoofd, K., Johnson, T. E. & Vanfleteren, J. R. Dietary restriction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **60**, 1125–1131 (2005).
- Lee, G. D. *et al.* Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **5**, 515–524, <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00241.x> (2006).
- Jones, K. T. & Ashrafi, K. *Caenorhabditis elegans* as an emerging model for studying the basic biology of obesity. *Dis Model Mech* **2**, 224–229, <https://doi.org/10.1242/dmm.001933> (2009).
- Lemieux, G. A. & Ashrafi, K. Neural Regulatory Pathways of Feeding and Fat in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Genet* **49**, 413–438, <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092244> (2015).
- Hyun, M. *et al.* Fat Metabolism Regulates Satiety Behavior in *C. elegans*. *Sci Rep* **6**, 24841, <https://doi.org/10.1038/srep24841> (2016).
- Davis, K., Cheong, M. C., Park, J. S. & You, Y. J. In *Appetite and Food Intake: Central Control* (eds nd & R. B. S. Harris) 1–16 (2017).
- Avery, L. & You, Y. In *C. elegans feeding. The C. elegans Research Community, WormBook* (ed WormBook) <https://doi.org/10.1895/wormbook.1891.1150.1891>, <http://www.wormbook.org> (May 21, 2012).
- Raizen, D., Song, B., Trojanowski, N. & You, Y. In *Methods for measuring pharyngeal behaviors. The C. elegans Research Community, WormBook* (ed WormBook) <https://doi.org/10.1895/wormbook.1891.1154.1891>, <http://www.wormbook.org> (December 18, 2012).
- You, Y. J., Kim, J., Raizen, D. M. & Avery, L. Insulin, cGMP, and TGF-beta signals regulate food intake and quiescence in *C. elegans*: a model for satiety. *Cell Metab* **7**, 249–257, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.01.005> (2008).

19. Lockery, S. R. *et al.* A microfluidic device for whole-animal drug screening using electrophysiological measures in the nematode *C. elegans*. *Lab Chip* **12**, 2211–2220, <https://doi.org/10.1039/c2lc00001f> (2012).
20. Gomez-Amaro, R. L. *et al.* Measuring Food Intake and Nutrient Absorption in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **200**, 443–454, <https://doi.org/10.1534/genetics.115.175851> (2015).
21. Scholz, M., Lynch, D. J., Lee, K. S., Levine, E. & Biron, D. A scalable method for automatically measuring pharyngeal pumping in *C. elegans*. *J Neurosci Methods* **274**, 172–178, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.07.016> (2016).
22. Olmedo, M., Geibel, M., Artal-Sanz, M. & Merrow, M. A High-Throughput Method for the Analysis of Larval Developmental Phenotypes in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **201**, 443–448, <https://doi.org/10.1534/genetics.115.179242> (2015).
23. Lagido, C., Pettitt, J., Flett, A. & Glover, L. A. Bridging the phenotypic gap: real-time assessment of mitochondrial function and metabolism of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *BMC Physiol* **8**, 7, <https://doi.org/10.1186/1472-6793-8-7> (2008).
24. Lagido, C., McLaggan, D., Flett, A., Pettitt, J. & Glover, L. A. Rapid sublethal toxicity assessment using bioluminescent *Caenorhabditis elegans*, a novel whole-animal metabolic biosensor. *Toxicol Sci* **109**, 88–95, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp058> (2009).
25. de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. & Subramani, S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **7**, 725–737 (1987).
26. George-Raizen, J. B., Shockley, K. R., Trojanowski, N. F., Lamb, A. L. & Raizen, D. M. Dynamically-expressed prion-like proteins form a cuticle in the pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Biol Open* **3**, 1139–1149, <https://doi.org/10.1242/bio.20147500> (2014).
27. McKay, J. P., Raizen, D. M., Gottschalk, A., Schafer, W. R. & Avery, L. eat-2 and eat-18 are required for nicotinic neurotransmission in the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *Genetics* **166**, 161–169 (2004).
28. Avery, L. The genetics of feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **133**, 897–917 (1993).
29. Raizen, D. M., Lee, R. Y. & Avery, L. Interacting genes required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **141**, 1365–1382 (1995).
30. Houthoofd, K. *et al.* No reduction of metabolic rate in food restricted *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* **37**, 1359–1369 (2002).
31. Kuwabara, P. E. & O'Neil, N. The use of functional genomics in *C. elegans* for studying human development and disease. *J Inher Metab Dis* **24**, 127–138 (2001).
32. Shtonda, B. B. & Avery, L. Dietary choice behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol* **209**, 89–102, <https://doi.org/10.1242/jeb.01955> (2006).
33. Yapici, N., Zimmer, M. & Domingos, A. I. Cellular and molecular basis of decision-making. *EMBO Rep* **15**, 1023–1035, <https://doi.org/10.15252/embr.201438993> (2014).
34. Lemieux, G. A. & Ashrafi, K. Investigating Connections between Metabolism, Longevity, and Behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Endocrinol Metab* **27**, 586–596, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.05.004> (2016).
35. Lee, K. S. *et al.* Serotonin-dependent kinetics of feeding bursts underlie a graded response to food availability in *C. elegans*. *Nat Commun* **8**, 14221, <https://doi.org/10.1038/ncomms14221> (2017).
36. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71–94 (1974).
37. Avery, L. & Shtonda, B. B. Food transport in the *C. elegans* pharynx. *J Exp Biol* **206**, 2441–2457 (2003).
38. Soukas, A. A., Kane, E. A., Carr, C. E., Melo, J. A. & Ruvkun, G. Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* **23**, 496–511, <https://doi.org/10.1101/gad.1775409> (2009).
39. So, S., Miyahara, K. & Ohshima, Y. Control of body size in *C. elegans* dependent on food and insulin/IGF-1 signal. *Genes Cells* **16**, 639–651, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01514.x> (2011).
40. Xiao, R. *et al.* RNAi Interrogation of Dietary Modulation of Development, Metabolism, Behavior, and Aging in *C. elegans*. *Cell Rep* **11**, 1123–1133, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.024> (2015).
41. Avery, L. & Horvitz, H. R. Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Zool* **253**, 263–270, <https://doi.org/10.1002/jez.1402530305> (1990).
42. Lemieux, G. A. *et al.* Kynurenic acid is a nutritional cue that enables behavioral plasticity. *Cell* **160**, 119–131, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.028> (2015).
43. Dalliere, N. *et al.* Multiple excitatory and inhibitory neural signals converge to fine-tune *Caenorhabditis elegans* feeding to food availability. *FASEB J* **30**, 836–848, <https://doi.org/10.1096/fj.15-279257> (2016).
44. Chase, D. L. & Koelle, M. R. In *Biogenic amine neurotransmitters in C. elegans*. *The C. elegans Research Community, WormBook* (ed WormBook) doi/10.1895/wormbook.1891.1132.1891, <http://www.wormbook.org> (February 20, 2007).
45. Horvitz, H. R., Chalfie, M., Trent, C., Sulston, J. E. & Evans, P. D. Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* **216**, 1012–1014 (1982).
46. Niacaris, T. & Avery, L. Serotonin regulates repolarization of the *C. elegans* pharyngeal muscle. *J Exp Biol* **206**, 223–231 (2003).
47. Song, B. M. & Avery, L. Serotonin activates overall feeding by activating two separate neural pathways in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **32**, 1920–1931, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2064-11.2012> (2012).
48. Hobson, R. J. *et al.* SER-7, a *Caenorhabditis elegans* 5-HT7-like receptor, is essential for the 5-HT stimulation of pharyngeal pumping and egg laying. *Genetics* **172**, 159–169, <https://doi.org/10.1534/genetics.105.044495> (2006).
49. Churgin, M. A., McCloskey, R. J., Peters, E. & Fang-Yen, C. Antagonistic serotonergic and octopaminergic neural circuits mediate food-dependent locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2636-16.2017> (2017).
50. Cunningham, K. A. *et al.* Loss of a neural AMP-activated kinase mimics the effects of elevated serotonin on fat, movement, and hormonal secretions. *PLoS Genet* **10**, e1004394, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004394> (2014).
51. Cheong, M. C., Artyukhin, A. B., You, Y. J. & Avery, L. An opioid-like system regulating feeding behavior in *C. elegans*. *Elife* **4** <https://doi.org/10.7554/eLife.06683> (2015).
52. Mills, H. *et al.* Opiates Modulate Noxious Chemical Nociception through a Complex Monoaminergic/Peptidergic Cascade. *J Neurosci* **36**, 5498–5508, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4520-15.2016> (2016).
53. Roenneberg, T. & Taylor, W. Automated recordings of bioluminescence with special reference to the analysis of circadian rhythms. *Methods Enzymol* **305**, 104–119 (2000).

## Acknowledgements

Strain PE254 was a gift from C. Lagido (University of Aberdeen). Strain *age-1(mg305)II* was kindly provided by Dr. Cathy Wolkow. We thank the help of Antonio Fernández-Yáñez, Alejandro Mata-Cabana and Fernando Rodríguez-Peris in the construction of reporter strains MRS382, MRS423, MRS433, and MOL62. We thank the *Caenorhabditis* Genetics Center for strains. Our work is supported by the European Research Council (ERC-2011-StG-281691), the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2012-35509), the AFM-Téléthon (Trampoline grant 18313) and a Marie-Curie Intra-European Fellowship (FP7-PEOPLE-2013-IEF/GA Nr: 627263). M.A-S and M.O are supported by the Ramón y Cajal program of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, RYC-2010-06167 and RYC-2014-15551, respectively. We thank the financial support of GENIE COST BM1408 for the visit of R.M. from J.-E. G to M. A-S. lab.

### Author Contributions

M.-J.R.-P., A.L.-D., R.M. and M.O. carried out the experiments; M.-J.R.-P., J.-E.G., M.O. and M.A.-S., designed the experiments; M.-J.R.-P., A.L.-D., R.M., J.-E.G., M.O. and M.A.-S. interpreted results; and M.-J.R.-P., J.-E.G., M.O. and M.A.-S. wrote the manuscript.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21964-z>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

### C. Séquences des mutants *adsl-1*( $\Delta$ ), *atic-1*( $\Delta$ ) et *ppat-1*( $\Delta$ )

Séquence ADN de *ppat-1* : L'alternance jaune et orange correspond aux différents exons. Ce qui est souligné et en gras et bleu correspond à la partie délétère dans le mutant *ppat-1*( $\Delta$ ) de l'étude.

```

ATGTGTGGTATATTTGGGATTGTTGCCGCTGGAAATTATGAGCATTGGAATGTTCTTGC
TGCAAATGGATTGGCTGCTCTTCAACACAGAGGAACTGAATCAACAGGACTCGTTGGTT
CAGATGGAATCACTCGAGACCACGTGGAAATTATCAAAGGTCATGGACTTGTCCGAGAT
GTGATTACTGAAGATAATATCTCAAGAATGAATGGGCAATCGATAATAATTGGTCATAA
TAGGTATTCAACTGCAGGAAAGAAGAAGTCTGGAATCAATTGTGTACAACCATTTGTGG
TATATACTGCAATGGGTACTGTAGCAATTGCTCATAATGGAGAATTGGTTGATGCGAAA
CAAAAAAGAAAGGAAGTACTTCATGAAGGTGTTGGTTTATCAACTGACACTGACTCAGA
GCTTATTGCTCAAATGATTGCAAAAGCGATTGCTCTGAATGTAAAATGCAAGTATGGAC
AAGAGATGGGTGATATTACAAGAGAGCTCGCAGTAACAATGTCTGCACTAACATGTCA
TATTCTCTACTAGTAATGACATTTGATAGACTATACGCAATTCGTGATCCATTTGGAAA
TCGTCCACTTTGTGTTGGTACTGTATATTCTAAAAATGGAAATCCAGAAGCATTCAATTG
CATCTTCTGAATCTTGTGCATTTCTGCAAATGCTAAATTAGATTTCTGAAGTGAGACCA
GGAGAAATTGTGGAATTATCGACAGGAGGAATCAAGTCGGTGTGGCAGATGAAACCGAA
TACTCCTCTGGCTATGTGCATATTCGAATATGTCTATTTTGCACGAAATGATTCAGAAA
TTGAAGGACAACAAGTACAACTGTTTCGTGAAGAATGTGGAAAAACGATGGCTCTTGAA
GATGATCTAGAAGCAGATATTGTTGGAAATGTTCCAGATTCTTCGCTGAGTGCAGCAAT
TGGATACGCTTCTCAGTCTGGAATCACATATGAACCTGTTTACACAGAAATTCATATG
TTGGAAGATCATTATAGAACCAAATGATGAGATGAGACAAAATGCGATTAAAATGAAA
TTTGGAGTATTGAAGAAAAAGATTTCATGGACAAAGGATTGTGTTAGTAGATGATTC AAT
TGTACGTGGAATACGATGAGAACTTTGGTAAAAATGTTAAGAGATGCTGGAGCAAAG
AGGTTTCATCTACGAATTGCTTCCCCGCCTGTAAAATCCCATGTTTTATGGGAATCAAC
ATTCCAACCACAAAGGAATTGATTGCTGCCGAAAAACAATTCCAGAAATCTGCCAATT
TGTTGGAGCCGATTCAGTACGGTATCTTTCGGTTGACGGTTTAGTTTTCGTCTGTTCAA
AAGGAATCGAACGAGCTGCCAATTCTCTCCAGGACATTGCACCGCATGTCTCACTGGA
AAATATCCAGTTGCTATCGATTTATAA

```

Séquence protéique sauvage vs. Séquence protéique mutée de *ppat-1* : Sur fond rouge rouge : Open Reading Frame ; En bleu : lieu de la mutation faux-sens ; - : STOP ; En gras : ce qui est différent du sauvage

#### Séquence sauvage

MCGIFGIVAAGNYEHLNVLAANGLAALQHRGTESTGLVGS DGITRDHVEI  
 IKGHGLVRDVITEDNISRMNGQSIIIGHNRYSTAGKKKSGINCVQPFVVY  
 TAMGTVAIAHNGELVDAKQKRKEVLHEGVGLSTDTDSELIAQMIAKAIAL  
 NVKCKYGQEMGDITRELAVTMSALNMSYSLLVMTFDRLYAIRDPFGNRPL  
 CVGTVYSKNGNPEAFIASSESCAFPANAKLDFEVRPGEIVELSTGGIKSV  
 WQMKPNTPLAMCIFEYVYFARNDSEIEGQQVQTVREECGKTMALEDDLEA  
 DIVGNVPDSSL SAAIGYASQSGITYEPVLHRNSYVGRSFIEPNDEMQRONA  
 IKMKFGVLKKKIHGQRIVLVDDSIVRGNTMRTL VKMLRDAGAKEVHLRIA  
 SPPVKFPCFMGINIPTTKELIAAEKTIPEICQFVGADSVRYLSVDGLVSS  
 VQGI ERAANFSPGHCTACLTGKYPVAIDL-

#### Séquence mutée

MCGIFGIVAAGNYEHLNVLAANGLAALQHRGTESTGLVGS DGITRDHVEI  
 IKGHGLVRDVITEDNISRMNGQSIIIGHNRYSTAGKKKSGINCVQPFVVY  
 TAMGTVAIAHNGELVDAKQKRKEVLHEGVGLSTDTDSELIAQMIAKAIAL  
 NVKCKYGQEMGDITRELAVTMSALNMSYSLLVMTFDRLYAIRDPFGNRPL  
 CVGTVYSKNGNPEAFIASSESCAFPANAKLDFEVRPGEIVELSTGGIKSV  
 WQMKPQKRFIYELLPRL-NSHVLWESTFQPQRN-LLPKKQFQKSANLLEP  
 IQYGIFRLTV-FRLFKKESNELPTS LQDIAPHVSLENIQLLSIY

Séquence ADN de *atic-1* : L'alternance jaune et orange correspond aux différents exons. Ce qui est souligné et en gras et bleu correspond à la partie délétère dans le mutant *atic-1*( $\Delta$ ) de l'étude.

ATGACCGACGGAAAATCACTTGCCATTATATCGGTCTCTGACAAGACAGGACTTATTCC  
 TCTTGCTCATGGACTTGTATCTGCTGGCTTAACACTTATTGCGTCCGGTGGAACAGCGA  
 AAGCGATCAGAGATCAAGGAATTGATGTTTCATGATGTGGCAGATGTAACAAAGTTTCCT  
 GAGATGCTTGGTGAAGAGTTAAACTCTGCATCCTGCCGTTTCATGGAGGAATCTTGGC  
 AAGAGATACGGAAAGTGATCGAAAGGATCTAGAGAAACACAACATTTTCATTTCGTCTCAG  
 TGGTGGTTTGCAACTTGTATCCATTCAAAAAAACTGTTCAATCCAAGGATTGCTCTGTA  
 GAAGAAGCTGTTGAGAACATTGACATTGGAGGAGTCACGCTTCTTCGAGCAGCTGCCAA  
 GAATCACGAACGTGTCAGTGTGATCTGTGATCCTGCTGACTACGATCATATCATTTCGG  
 AGTTAAAATCCGGAGGAACTACCCGCGAACGTCGCCAACTTCTAGCCTTAAAGGCTTTC  
 GAACACACGACGTCGTACGACGAATCAATCAGCGGATTTCATGCGCCGTCGGTTCGCTGG  
 AAACGGCGAACGGGCGCTGCCTCTTAGATACGGCACAAATCCGCATCAAAGGATGATG  
 CTGAATTGTACATAGTAGAGGACGAAATGCCAATCAAAGTGCTCAATGGTTCACCGGGA  
 TACATCAACATATTGGATGGTTTGAATGGATGGCAATTGGTCAAGGAACTCAGTGATGC  
 TACAAAAATGCCAGCAGCTGCTTCTTTAAGCATGTTTCACCGGCAGGAGCTGCTGTTG  
 GTCTTCTTTAAACGAAACTGAAGCTGCTTGCTGTATGGTTTCTGATCTTCCGATCGAT  
 ACAAAAAAACCTTCATTAGCTGCAGCATATGCTCGTGCAAGAGGTGCAGACAGAATGTC  
 ATCTTTTGGTGATTTTCATTGCCCTCTCCGAAAAATGTGATGAACTTACGGCTAAAATTA  
 TTAACAGAGAAGTATCTGATGGAGTTGTTGCTCCGGACTTTGATCCGGCTGCATTGTCT  
 CTTCTTGCAAAGAAGAAGAATGGTAATTACTGTGTTCTCAA**GATTAACCCAAATTATCT**  
**ACCATCTGAAACTGAAGAACGAACCGTATTCGGGTTGAGACTTCGACAGAAACGGAAACA**  
**ATGCAGTTATTAACGCGGAAACTTTTAACAATGTCGTCGGAAGTGCTAATGAATTGAAC**  
**AAGCAAGCAATTGATGATCTT**ATTGTTGCCACAATTGCTTTGAAATATGCACAATCAA  
 CAGTGTTTGCTTTGCTCATCGAGGACAGGTCATTGGAATGGGAGCAGGTCAACAATCTC  
 GAATCCATTGTACGAGACTTGCTGGAGACAAAGCAATGAATTGGTGGCTACGACAACAT  
 CCAACAGTACTCTCACTTCCATGGAAGAATGCAATTAACGATCAGAGAAATCAAATGC  
 TATTGATGTTTTATGCAGTGGAGTTCTTGGTTCAGAGATTGCCATCGACCAATGGCAGC  
 AATATTTCAATGAGCCAGTGGAGCCACTTGCTGAGGATGATCGAAACAATGGCTGAGC  
 CAGCAAACAGGAGTTGTGATGAGTTCAGATGCATTCTTCCATTCCGTGATAATGTTGA  
 TTGTGCTAAACAGTTCGGAGTGTCTTATGTTGCTCATCCAGGAGGCTCAGTTCGTGATG  
 ATGACATCAAAGAAGCTTGTGATGAACATGGAATAACTCTTATTCACTACTGGACTTCGT  
 CTCTTCCACCATTAG

Séquence protéique sauvage vs. Séquence protéique mutée de *atic-1* : Sur fond rouge rouge : Open Reading Frame ; En bleu : lieu de la mutation faux-sens ; - : STOP ; En gras : ce qui est différent du sauvage

### Séquence sauvage

**MTDGKSLAII**SVSDKTGLIPLAHGLVSAGLTLIASGGTAKAIRDQGIDVH  
 DVADVTKFPE**ML**GGRVKTLHPAVHGGILARDTESDRKDLEKHNISFVSVV  
 VCNLYPFKKT**VQ**SKDCSVEEAVENIDIGGVTLRRAAAKNHERVSVICDPA  
 DYDHIISELKSGGTTRERRQLLALKAFEHTTSYDESI**SGFM**RRRFAGNGE  
 RALPLRYGTNPHQKDDAELYIVEDE**MP**IKVLNGSPGYINILDGLNGWQLV  
 KELSDATK**MP**AAASFKHVSPAGAAVGLPLNETEAAC**CM**VSDLPIIDTKKPS  
 LAAAYARARGADR**MS**SFGDFIALSEKCELTAKIINREVSDGVVAPDFDP  
 AALSLLAKKNGNYCVLK**I**NPNYLPSETEERTVFGRLRQKRNNAVINAE  
 TFNNVVGSA**NEL**NKQAIDDLIVATIALKYAQNSVCFAHRGQVIG**MG**AGQ  
 QSRIHCTRLAGDKAM**N**WWLRQHPTVLSLPWKNAIKRSEKSNAIDVLCSGV  
 LGSEIAIDQWQQYFNEPVEPLAEDDRKQWLSQQTGV**VM**SSDAFLPFRDNV  
 DCAKQFGVSYVAHPGGSVRDDDIKEACDEHGITLIHTGLRLFHH-

### Séquence mutée

**MTDGKSLAII**SVSDKTGLIPLAHGLVSAGLTLIASGGTAKAIRDQGIDVH  
 DVADVTKFPE**ML**GGRVKTLHPAVHGGILARDTESDRKDLEKHNISFVSVV  
 VCNLYPFKKT**VQ**SKDCSVEEAVENIDIGGVTLRRAAAKNHERVSVICDPA  
 DYDHIISELKSGGTTRERRQLLALKAFEHTTSYDESI**SGFM**RRRFAGNGE  
 RALPLRYGTNPHQKDDAELYIVEDE**MP**IKVLNGSPGYINILDGLNGWQLV  
 KELSDATK**MP**AAASFKHVSPAGAAVGLPLNETEAAC**CM**VSDLPIIDTKKPS  
 LAAAYARARGADR**MS**SFGDFIALSEKCELTAKIINREVSDGVVAPDFDP  
 AALSLLAKKNGNYCVLK**LLPQLL-NMHNQTVFALLIEDRSLEWEQVNNL**  
**ESIVRDLLETKQ-IGGYDNIQQYSHFHGRMQLNDQRNQMLLMFYAVEFLV**  
**QRLPSTNGSNI SMSQWSHLLRMIANNG-ASKQEL-VQMHSFHSVIMLIVL**  
**NSSECLMLLIQEAQFVMMTSKKLVMNME-LLFILDVFSSTI**

Séquence ADN de *adsl-1* : L'alternance jaune et orange correspond aux différents exons. Ce qui est souligné et en gras et bleu correspond à la partie délétère dans le mutant *adsl-1*( $\Delta$ ) de l'étude.

```

ATGGCCTCCGAAGACAAGTTCGAGTCGGTTCATCAACTCGTTACTGTAAGAATAGTCC
ACTTGTTTCGATCCTCTCGGAGACTAATAAAGCGACTCTTTGGAGACAACATATGGATTT
GGCTCGCTGAAGCTGAAAAAGAGCTCGGTCTTAAACAAGTTACTCAGGATGCAATTGAT
GAGATGAAATCCAATAGAGATGTATTGATTGGCCTTTTATCCGATCCGAAGAGAGAAA
ATTGAAGCATGATGTGATGGCTCATAATCATGCTTTTGGTAAACTCTGCCAACGGCCG
CTGGAATCATTATCTCGGAGCTACTTCTTGCTTCGTTCAAGACAATGCTGATCTTATT
GCCTATCGAGATTCGATTGATCATATTCTTAAACGGTTCGCAACTGTCATTGATCGTCT
CGCCGCTTTTTTATTGAAGAACAAGGAAGTTGTGACTGTCGGACGTAATCATTACCAGA
CAGCCTCCCTTGTTACTGTAGGAAAACGTGGTGTACTTTGGGCTCAAGAGCTTCTCATG
GCCTTCCAATCATTGTCAGAGTTTCGAGACAAAATGAGATTCCGTGGAATCAAGGGTGC
TACTGGAACACAAGACTCGTTCCTTACTCTATTCGCTGGAGACGAGAGCAAAGTTGAAG
CTCTCGATGAATTGGTCACCAAAAAAGCCAATTTTTCTAACCGATTTTTGATAACTGGG
CAAACCTACTCAAGACAGCAAGACTCTCAGCTTGTATTCTCCCTCTCTCTTCTCGGAGC
TGCTGCTAAGAAAGTTTGCACGGATATTCGTGTTCTTCAGGCATTTGGAGAACTTCTTG
AGCCATTCGAGAAGGATCAGATTGGCTCATCTGCAATGCCATATAAGAAAAATCCAATG
AAGAGTGAAAGATGCTGTGCTTTATCGAGAAAGTTGATAAATGCCCCACAAGAAGCACT
TACGATTCTCGCCGATCAAGGCCTCGAGCGAACACTGGATGATTCTGCCGGAAGAAGAA
TGCTCATTCCAGATGTACTTCTTACCGCTGAAGCTCTGCTTACCACTCTTCAAACATC
TTCGAAGGACTTAGTGTACAAACAGACAATGTGAAGAAGATCGTTGAAGACGAAATTGC
ATTCCTTGGTTTGGAAAAGGCAATGATGATGCTGACGGAAGAAGGTGTCGATCGGCAAC
AAGCTCATGCTGTGATCAGAAAAACTGCGTTGGAAGCAAAACAACCTTCAAGCCACACAA
AAAGTTGATATTCGACAGACAATGGCCGATCCATTTTTCGATTTCAGTTCGCGACCGTGT
TGTTGGGCTTGTCAATAATCCGATAAACTTACGGGGCGGTGTGTTTCCAGACGGAGA
GCTTTATTGCCAAGGAATTGAAACCAACAATTGACAAGTACCTTGATAAATCAGCAGGA
AATGTTTCAGCTGGATGTTTGA

```

Ici, l'ATG n'existe plus et une partie de la région en amont est délétée chez le mutant. Il n'y aura pas de traduction.