



HAL
open science

Identification et validation de cibles thérapeutiques pour traiter le syndrome de Wolfram

Lucie Crouzier

► **To cite this version:**

Lucie Crouzier. Identification et validation de cibles thérapeutiques pour traiter le syndrome de Wolfram. Médecine humaine et pathologie. Université de Montpellier, 2022. Français. ⟨NNT : 2022UMONT039⟩. ⟨tel-04069021⟩

HAL Id: tel-04069021

<https://theses.hal.science/tel-04069021v1>

Submitted on 14 Apr 2023

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.



HAL Authorization

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé spécialité Neurosciences

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche : Mécanismes Moléculaires dans les Démences Neurodégénératives (MMDN - Inserm U1198)

Identification et validation de cibles thérapeutiques pour traiter le syndrome de Wolfram

Présentée par Lucie CROUZIER

Le 24 Octobre 2022

Sous la direction du Dr Benjamin DELPRAT

Devant le jury composé de

John DE VOS, PUPH, Institut de Médecine Régénérative & Biothérapie (Montpellier)

Patrick YU-WAI-MAN, PU, John van Geest Centre for Brain Repair (Cambridge)

Laurent COMBETTES, DR, Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée (Paris)

Adèle FAUCHERRE, DR, Institut de Génétique Fonctionnelle (Montpellier)

Laetitia AUBRY, MCU, Institut des cellules Souches pour le Traitement et l'Etude des maladies
Monogéniques (Corbeil-Essonnes)

Benjamin DELPRAT, CR, Laboratoire MMDN (Montpellier)

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

RÉSUMÉ

Le syndrome de Wolfram (SW) est une maladie neurodégénérative qui associe un diabète sucré, un diabète insipide, une atrophie optique, une perte auditive neurosensorielle et divers symptômes neurologiques. Les patients décèdent précocement le plus souvent d'une détresse respiratoire ou de fausse route et à ce jour aucun traitement efficace n'est disponible. Le SW est causé par des mutations du gène *WFS1* qui code une protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique (RE), la Wolframine. Les mutations réduisent généralement la stabilité de la protéine, modifiant son homéostasie, diminuant le transfert calcique, augmentant l'activation de la réponse aux protéines mal repliées (*Unfolded Protein Response*, UPR) et conduisant à un dysfonctionnement mitochondrial et à la mort cellulaire.

L'objectif de ma thèse a été d'explorer des voies thérapeutiques originales dans cette indication. Pour cela, plusieurs modèles d'étude ont été utilisés et caractérisés : des fibroblastes de patients *in vitro*, et *in vivo*, des lignées de poissons zèbres mutantes *wfs1a*^{C825X}, *wfs1b*^{W493X} et *wfs1ab*^{KO}, et des souris *Wfs1*^{ΔExon8}.

Nous avons montré que : (1) Ces différents modèles développent des altérations cellulaires, telles que des déficits mitochondriaux, l'altération du transfert calcique mitochondrial, l'activation des voies UPR et l'autophagie, associés à des déficits comportementaux, tels que des troubles visuels, locomoteurs, de l'anxiété et des altérations cognitives. (2) La surexpression de NCS1, partenaire de la wolframine, *in vivo* a permis de restaurer les déficits comportementaux et cellulaires développés par la lignée poisson zèbre *wfs1ab*^{KO} confirmant l'étude *in vitro* précédemment menée sur des fibroblastes de patients. (3) La protéine chaperonne sigma-1 (S1R) était une cible pertinente pour rétablir une communication RE-mitochondrie fonctionnelle dans le SW. Nos études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'activation de S1R par un agoniste ou par surexpression de son ARNm permettait de renverser les altérations comportementales et cellulaires. (4) À partir de la réponse motrice des larves de poisson zèbre *wfs1ab*^{KO}, nous avons mené un criblage phénotypique de 371 molécules potentiellement affines pour S1R qui a mené à identifier 8 hits permettant de restaurer totalement le déficit locomoteur des larves mutantes. Certaines seront valorisées par une démarche d'optimisation, mais parmi les molécules dites repositionnables, nous avons identifié le MED0092 qui agit comme un modulateur positif de S1R et dont les effets bénéfiques ont été montrés sur les déficits comportementaux de deux modèles murins de maladies neurodégénératives, le SW et la maladie d'Alzheimer.

Pour conclure, ce travail de thèse a permis non seulement de phénotyper de nouveaux modèles murins et poissons-zèbres du SW, mais également de valider deux cibles thérapeutiques permettant une récupération fonctionnelle des MAM : NCS1, qui peut être directement surexprimé par thérapie génique, et S1R, qui peut être ciblé par de petites molécules et pour lequel de nouvelles séries chimiques très prometteuses d'origine synthétique ou naturelle ont été mises en évidence.

Mots clés : Syndrome de Wolfram, MAM, S1R, NCS1, criblage

ABSTRACT

Wolfram Syndrome (WS) is a neurodegenerative disease that combines diabetes mellitus, diabetes insipidus, optic atrophy, sensorineural hearing loss and various neurological symptoms. Patients die early, most often from respiratory distress or miscarriage, and to date no effective treatment is available. WS is caused by mutations in the *WFS1* gene that encodes an endoplasmic reticulum (ER) transmembrane protein, Wolframine. Mutations generally reduce the stability of the protein, altering its homeostasis, decreasing calcium transfer, increasing the activation of the Unfolded Protein Response (UPR) and leading to mitochondrial dysfunction and cell death. The objective of my thesis was to explore original therapeutic approaches in this indication. For this purpose, several models were used and characterized: patient fibroblasts *in vitro*, and *in vivo*, *wfs1a*^{C825X}, *wfs1b*^{W493X} and *wfs1ab*^{KO} mutant zebrafish lines, and *Wfs1*^{ΔExon8} mice.

We showed that: (1) These different models develop cellular alterations, such as mitochondrial deficits, impaired mitochondrial calcium transfer, activation of UPR pathways, and autophagy, associated with behavioral deficits, such as visual, locomotor, anxiety, and cognitive impairments. (2) Overexpression of NCS1, a partner of wolframine, *in vivo* restored the behavioral and cellular deficits developed by the zebrafish line *wfs1ab*^{KO} confirming the *in vitro* study previously conducted on patient fibroblasts. (3) The chaperone protein sigma-1 (S1R) was a relevant target to restore functional ER-mitochondria communication in WS. Our *in vitro* and *in vivo* studies showed that activation of S1R by an agonist or by overexpression of its mRNA reversed behavioral and cellular alterations. (4) Based on the motor response of *wfs1ab*^{KO} zebrafish larvae, we conducted a phenotypic screening of 371 molecules potentially affine to S1R which led to the identification of 8 hits allowing to fully restore the locomotor deficit of mutant larvae. Some of them will be valorized by an optimization approach, but among the repositionable molecules, we have identified MED0092 which acts as a positive modulator of S1R and whose beneficial effects have been shown on behavioral deficits in two mouse models of neurodegenerative diseases, SW and Alzheimer's disease

To conclude, this thesis work has not only allowed the phenotyping of new mouse and zebrafish models of WS, but also the validation of two therapeutic targets allowing a functional recovery of MAM: NCS1, which can be directly overexpressed by gene therapy, and S1R, which can be targeted by small molecules and for which new very promising chemical series of synthetic or natural origin have been highlighted.

Key words : Wolfram syndrome, MAM, S1R, NCS1, screening

REMERCIEMENTS

Cette thèse n'aurait pas été la même si je n'avais pas eu le soutien, l'aide et les conseils de nombreuses personnes. Je tiens à remercier chacun d'entre eux.

Je tiens tout d'abord à remercier le **Pr John De Vos**, le **Dr Patrick Yu-Wai-Man**, le **Dr Laurent Combettes**, le **Dr Adèle Faucherre** et le **Dr Laetitia Aubry** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour le temps que vous avez consacré à évaluer mon travail.

Je remercie particulièrement le **Dr Adèle Faucherre** et le **Dr Alain Lacampagne**, d'avoir suivi ce projet depuis le début grâce aux différents comités de thèse, et pour leurs encouragements et conseils avisés.

Je remercie **Nolwen Le Floch**, présidente de l'association Syndrome de Wolfram, d'avoir cofinancé cette thèse avec la **région Occitanie**. La réunion des familles de 2019 restera une journée gravée en moi. J'ai fait de mon mieux pour mener le plus loin possible ce projet. Je continuerais longtemps de parler de vous et de vos actions.

Je remercie le **Pr Breandán Kennedy** et les financeurs de la bourse Européenne de Recherche sur S1R de m'avoir offert l'opportunité de consolider mes connaissances sur le modèle poisson zèbre et ses outils d'analyses comportementales durant 10 jours à l'Université de Dublin. C'est à ce moment-là également que mon amour pour la Guinness est né.

Je remercie également nos collaborateurs scientifiques hors unité qui ont apporté une réelle plus-value à nos différents travaux. Je pense en particulier à ma proche collaboration avec le **Dr Jo Sourbron** pour l'écriture de la revue Zebrafish et son expertise dans le domaine du syndrome de Dravet, le **Dr Alberto Danese**, le **Dr Simone Patergnani** et le **Dr Paolo Pinton** pour leur rapidité et leurs compétences concernant

les expériences menées sur les fibroblastes de patients, le **Dr Su Tsung-Ping** pour les travaux sur les cellules Neuro2a et les souris S1R KO, le **Dr Marc Thiry** pour les images de mitochondries au microscope électronique, le **Dr Tanya Whitfield** pour les hybridations *in situ* sur les larves de poissons, et enfin le **Dr Martine Schmitt**, le **Dr Jean Jacques Bourguignon** et le **Dr Carmen Abate** pour la chimiothèque et leur réactivité.

Un grand merci aux directeurs du laboratoire MMDN, le **Dr Tangui Maurice** et le **Dr Nadine Mestre-Frances** de m'avoir accueilli et fourni les meilleures conditions de travail durant ces 7 ans.

Je remercie profondément le **Dr Benjamin Delprat**, mon directeur de thèse, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet et pour sa confiance durant ces 4 années. Un grand merci également pour tous les efforts investis afin que cette thèse soit une réussite, notamment je pense à la présence de Camille durant 1 an et demi, mon binôme infallible ayant permis d'aller plus vite et plus loin dans cette thèse. Merci également pour tes encouragements et ton soutien notamment pour participer à des congrès ou des formations et d'avoir trouvé des solutions quand parfois cela devenait compliqué. Ta bonne humeur, ton optimisme et le partage de ton savoir scientifique m'ont été bénéfiques.

Je te remercie chaleureusement, **Elodie Richard**, pour ton soutien infallible, nos discussions scientifiques et personnelles mais aussi le partage de tes nombreuses compétences qui m'ont permis de valoriser mon travail. Ton arrivée au sein de l'équipe à mi-parcours de ma thèse en tant que mère poule, grande sœur ou encore amie, a été pour moi la cerise sur le gâteau (et dieu sait qu'on aime les gâteaux, les biscuits et les bonbons). Je te souhaite sincèrement le meilleur pour la suite au sein du laboratoire MMDN ou ailleurs et j'espère que nos chemins continueront de se croiser.

Tangui Maurice, ce titre de Docteur c'est en partie grâce à vous. Il y a 7 ans maintenant que nous avons commencé à travailler ensemble. Je me souviendrais toujours de mon premier entretien avec vous où vous aviez beaucoup beaucoup beaucoup parlé du récepteur sigma 1. J'ai compris ce jour-là que vous étiez passionné et passionnant. Au fil des mois, vous m'avez rapidement donné des responsabilités, et en appliquant vos méthodes de travail j'ai su être plus efficace et méthodique. Vous m'avez également transmis que ce métier était avant tout une passion et j'ai compris cela le jour où j'ai terminé mes manip à 20 h en prenant du plaisir. Parce que c'est ça finalement ce que j'ai ressenti pendant 7 ans, du plaisir. Je me suis toujours dit que mes réussites étaient dues à beaucoup de chance ou à la facilité de la tâche et que beaucoup de choses ne m'étaient pas accessibles. J'ai donc compris ici que la seule limite pour entreprendre quelconques projets, c'était moi. En franchissant cette limite par votre soutien et encouragements, j'ai accepté ce beau challenge qu'est la thèse, et j'ai adoré du début à la fin malgré les difficultés. Mon parcours au sein du MMDN a été pour moi une expérience professionnelle enrichissante mais surtout personnelle, comme un voyage à travers lequel j'ai appris à me faire confiance et grandit. D'ailleurs, comme dit si bien Alain Souchon et vous-même « On avance, on avance, c'est une évidence ». Je vous raconte tout cela parce qu'en réalité vous y êtes pour beaucoup. Je suis convaincue que dans la vie on évolue grâce à de belles rencontres, vous en faites partie. MERCI.

C'est à ton tour ma **Camillou** d'avoir tes quelques lignes de remerciements. Longtemps le souvenir de notre rencontre restera en moi, ainsi que la facilité avec laquelle nous sommes devenues collègues puis (très) rapidement amie. Je suis certaine que nous étions sœurs dans une autre vie. On a accompli ensemble un travail rapide, efficace et de qualité. J'avoue m'être dit plusieurs fois que tu étais mon double (moins

énervée et énervante que moi quand même). Je te remercie pour ta bonne humeur, ton empathie, ta sincère amitié et surtout pour ton amour du danse floor associé aux musiques des années 2000. Ta seule erreur durant ces années ensemble a été de me faire découvrir ce site <https://www.sezane.com/fr>, auquel maintenant je te dois des découverts bancaires mais une garde-robe de folie qui en vaut le coup je le reconnais. Ne me remercie pas pour tes hyperglycémies qui t'ont fait perdre la vue plus d'une fois même si je ne mettais pas trop de beurre et de sucre dans mes gâteaux Sissy Mua. J'avoue tu y étais aussi pour beaucoup avec ton Lucien Georgelin. Les journées à trier des œufs de poissons, tes scoops que j'arrivais à deviner juste en te regardant, tes bâillements de tchikis, les archives Sezane à 9h30, tes séances à la Jalade où je préférais le Ricard au tennis, les soirées jeux de société, les nombreuses négociations Vinted et les « t'en penses quoi ? », nos crises de rires et crises de nerfs, les multiples boutures à se prendre pour Stéphane Marie, tes conseils et ta bienveillance... tous ces moments ont fait ma force et mon engouement pour aller tous les jours au laboratoire. T'as un jour pris ton envol mais finalement tu n'es jamais partie. Toujours là avec moi et pour ça merci. T'es la Britney Spears de ma vie.

Joël, toi l'inqualifiable. Tu as écouté de nombreuses fois mes histoires en faisant semblant de ne pas les connaître, et de ne pas avoir déjà la solution (et pourtant qu'est-ce que tu aimes avoir raison). Merci de m'avoir préparé à manger quand je rentrais tard le soir ou quand j'en avais simplement la flemme, de me proposer de sortir « juste pour penser à autre chose », de m'accompagner à la plage même si tu préférais rester habillé sous 35°C, et de m'avoir encouragé quand je doutais. Merci de me rappeler (souvent) qu'on ne dit pas « avoir une araignée dans le tiroir » mais « avoir une araignée au plafond », un peu comme moi, ou encore « comme cul et chemise », beaucoup comme nous. Merci pour ton soutien, d'être si attentionné, de prévoir (toujours) à ma place les

choses que je vais oublier, ou encore de ne jamais me juger même si je tourne 150 fois le bouton du son de la voiture dans le mauvais sens. Je savais que je ne pouvais pas compter sur toi pour corriger les fautes d'orthographe de mon manuscrit mais tu étais là pour tellement d'autres moments. Tu as mis beaucoup de lumière dans ma vie et pour tout cela Merci.

Merci à tous mes ami(e)s/collègues que j'ai eu la chance de rencontrer au sein de ce laboratoire et qui ont fait que ses 7 années au MMDN soient passées à une vitesse folle. Je pense surtout à ma team noyau dur, le sang de la veine, le miel de la ruche, **Allison, Johann, Morgane, Maxime, Pauline, Cléa et Amandine**, sans vous mes journées au labo auraient été fades et beaucoup moins sucrées. J'espère un jour me défaire de cette addiction au sucre, au fromage et à la charcuterie, mais pas de vous.

Je remercie profondément tous les membres du MMDN pour tous les échanges scientifiques, les coups de pouce, les conseils, les sourires, les pauses déjeuners animées, les raclettes de Noël et j'en passe, qui ont permis de rendre cette expérience fantastique. **Mireille, Nicolas, Jean Charles, Sylvain, Christelle, Pascaline, Marie Christine, Françoise, Anne, Irene, Aline, Jérôme, Stacy, Catherine, Laurent, Charleine, Théo, Léa, Mathieu** (avec un seul T) et **Nathalie** vous resterez pour moi comme une famille avec des affinités, des histoires, des hauts et des bas, avec qui j'aurais toujours envi de lever un verre (champagne of course) ou de partager un de mes gâteaux phares, le moelleux au chocolat à la compote de pomme, pour rassembler tout le monde et discuter.

Je remercie également nos incroyables gestionnaires **Chantal et Nathalie**, pour leur gentillesse, leur bonne humeur et leur efficacité. Sans vous, le secrétariat ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui, un endroit agréable, convivial et où l'on peut trouver du soutien.

Et je n'oublie évidemment pas ma chère amie **Célia**, ma douce **Elizabeth**, ma **Marine** de Fr..Suisse, **Geoffrey**, **Pierre André**, **Simon**, **Nino** et **Mona Lisa** avec qui j'ai partagé de bons moments.

Je pense aussi à chacun des stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer. **Damien**, **Olivier**, **Anaïs**, **Morgane**, **Chloé**, **Coralie**, **Rislen**, **Maeva**, **Salem**, **Amarande**, **Michela**, **Hala**, **Margot** et **Malvina** je vous remercie pour votre précieuse aide. J'espère vous avoir transmis les valeurs essentielles de la vie en laboratoire qui sont pour moi l'organisation, la persévérance et la confiance en soi.

Mes deux petites douceurs du Sud, **Cyril** et **Agathe**. La faculté des Carmes, c'est là que tout à commencer. Mon Agathe, toi qui est juste et gentille plus que n'importe qui, tu m'as soutenu et épaulé pendant toutes ces années. Loin des yeux aujourd'hui mais indélébilement dans mon cœur. Et toi mon Cyril, ma puce du 13, il nous a fallu une seule soirée de fin d'année pour que l'on ait ce coup de foudre amical. Nos escapades à Marseille font parties de mes meilleurs souvenirs en passant par nos multiples soirées et voyages. Tu es cette petite main qui vient jeter de l'eau fraîche sur ma nuque avant le grand plongeon. Merci pour ton amitié et ton soutien infaillible.

Jonas, **Jeremy** et **Vanessa** merci pour ces joyeux moments passés ensemble depuis tant d'années, comme notamment les soirées où il y avait plus d'alcool que d'invités, les anniversaires, les raclettes, les afterworks à la plage et les moments sportifs avec le beach volley, le badminton, l'escalade, le canoé et le pingpong. J'espère vous garder longtemps auprès de moi.

Egalement un grand merci à toi **Clothilde** pour ces mois de colocation passés ensemble. Tu m'as épaulé quand j'étais triste, énervée, stressée, quelle que soit l'heure et tu étais toujours partante quand il s'agissait d'une petite Moresque. Tu as été d'un solide soutien quand j'en avais besoin et Sany y était pour beaucoup aussi.

Mon énergie de la semaine ne serait pas la même si je n'avais pas mes week-ends dadas et mes week-ends dadas ne seraient pas les mêmes si vous n'étiez pas là. Alors merci **Matthieu, Laura, Charlène, Laurine** et **Emilie** de m'aider (souvent) à prendre soin de ma Fidjou et parfois de moi. Je vous suis reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour elle, de la simple caresse à la balade en passant par la douche. Les apéros des samedis soirs se ressemblent et se répètent car on le sait pourquoi changer une équipe qui gagne ?

Quand à toi ma **Pascalou**, par où commencer... Je pense que je suis devenue la personne que je suis aujourd'hui notamment grâce à toi. Ton soutien dans tout ce que j'entreprends, ce que je vis et ce que je ressens m'est devenu, au fil des années, indispensable. Le courage, le respect, la ténacité, la rigueur sont les valeurs que tu as su me transmettre depuis petite et que j'applique aujourd'hui dans d'autres domaines. Merci infiniment pour tout ce que tu as fait pour ma jument, mes parents et moi depuis tant d'années. Tu es comme ma seconde mère. Je t'aime.

Roland et **Dominique**, Papa, Maman, évidemment je vous dois tout. Vous vous êtes pliés en milles pour me voir m'épanouir et réussir et je vous en serais éternellement reconnaissante. Vous avez toujours toujours toujours été là pour moi, quoi qu'il arrive, sans jamais faillir. « Lèves toi chaque matin en vivant la vie qui te ressemble et rappelle-toi combien le privilège de vivre, de respirer et d'être heureux est précieux », c'est ce que vous m'avez répété pendant des années et aujourd'hui je peux dire que c'est chose faite. Merci pour cet amour inconditionnel que vous me portez et pour avoir cru en moi depuis toujours. Vous êtes ma force. Je vous aime.

Je remercie également toute ma famille pour tout leur amour et leur soutien. On ne choisit pas sa famille, mais si j'avais eu ce choix là c'est vous que j'aurais choisi.

« Ne limite pas tes défis, défie tes limites »

TABLE DES MATIERES

TABLES DES FIGURES	15
ABREVIATIONS	19
INTRODUCTION	23
CHAPITRE 1. LE SYNDROME DE WOLFRAM	25
<i>I. Historique</i>	25
<i>II. Description clinique du syndrome de Wolfram de type 1</i>	28
1. Le diabète sucré	30
2. L'atrophie optique	31
3. La surdité neurosensorielle	33
4. Le diabète insipide.....	34
5. Les troubles neurologiques et psychiatriques	35
6. Les troubles urologiques	37
7. Les troubles des systèmes endocrinologiques et reproducteurs.....	39
8. Les anomalies additionnelles	39
<i>III. La génétique du syndrome de Wolfram</i>	40
1. La prévalence	40
2. Le syndrome de Wolfram de type 1, le gène <i>WFS1</i>	41
a) Structure de <i>WFS1</i> et de la wolframine	41
b) Mutations de <i>WFS1</i>	42
c) Localisation subcellulaire de la wolframine.....	43
d) Pattern d'expression de <i>WFS1</i> chez l'Homme	44
e) Régulation du stress du réticulum endoplasmique par <i>WFS1</i>	44
e.1. Le stress du réticulum endoplasmique.....	44
e.2. <i>WFS1</i> et le stress du RE	47
f) Régulation du transfert calcique mitochondrial	50
f.1. L'homéostasie calcique cellulaire	50
f.2. La communication RE-mitochondrie	53
f.3. <i>WFS1</i> et la régulation du transfert calcique mitochondrial	55
g) Synthèse et sécrétion protéique	56
3. Le syndrome de Wolfram de type 2, le gène <i>CISD2</i>	58
a) Structure de <i>CISD2</i> et de ERIS	58
b) Mutations de <i>CISD2</i>	59
c) Pattern d'expression de <i>CISD2</i>	60
d) Fonctions de <i>CISD2</i>	60
<i>V. Les stratégies thérapeutiques dans le SW1</i>	62
<i>VI. Les différents modèles de la pathologie</i>	68
1. Le modèle cellulaire.....	68
2. Les modèles souris.....	69
3. Le modèle rat.....	72
4. Le modèle drosophile	72
5. Les modèles poisson zèbre	73
Revue 1 : Use of Zebrafish Models to Boost Research in Rare Genetic Diseases	75
CHAPITRE 2. NEURONAL CALCIUM SENSOR-1 ET RECEPTEUR SIGMA-1	77
<i>I. Le Neuronal calcium sensor-1</i>	77
1. Structure de <i>NCS1</i>	77
2. Pattern d'expression de <i>NCS1</i>	79

3. Fonctions de NCS1	81
4. NCS1 et le SW	82
<i>II. Le récepteur sigma-1</i>	83
1. Structure de <i>sigmar1</i> et de sa protéine	84
2. Pattern d'expression de S1R.....	86
3. Implication de S1R dans les pathologies, notamment neurodégénératives.....	86
4. Oligomérisation de S1R.....	89
5. Les différentes interactions protéiques avec S1R	91
Revue 2 : At the Crossing of ER Stress and MAMs: A Key Role of Sigma-1 Receptor?	97
PROBLEMATIQUE ET DEMARCHE EXPERIMENTALE	99
RÉSULTATS	107
Partie I. Le modèle poisson zèbre est un modèle pertinent et prometteur pour étudier la physiopathologie du SW et identifier de nouvelles pistes thérapeutiques	109
Partie II. Caractérisation de la lignée poisson zèbre <i>wfs1ab^{KO}</i> et exploration du potentiel thérapeutique de NCS1 dans un contexte physiopathologique du SW	117
Partie III. Analyse de l'inactivation de S1R dans un modèle poisson zèbre sur différentes fonctions cellulaires associées aux MAM	125
Partie IV. L'importance pharmacologique de l'activité de S1R dans la restauration des symptômes du SW.....	135
Partie V. Criblage à moyen débit de molécules thérapeutiques sur la lignée poisson zèbre <i>wfs1ab^{KO}</i>	145
Partie VI. Identification d'un alcaloïde issu du crible, le MED0092, en tant que nouveau modulateur positif de S1R, avec des activités anti-amnésiques et neuroprotectrices dans la MA et le SW.	167
DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION	175
BIBLIOGRAPHIE	195

TABLES DES FIGURES

Figure 1. Schéma de l'œil humain et des différentes couches cellulaires composant la rétine	32
Figure 2. Schéma de l'oreille humaine allant de l'oreille interne à l'organe de Corti.	34
Figure 3. Imagerie et quantification du volume cérébral et des anomalies microstructurales du cerveau associées au SW	37
Figure 4. <i>WFS1</i> et la wolframine.	42
Figure 5. Les voies de signalisation de l'UPR.	46
Figure 6. La régulation négative des voies de l'UPR par <i>WFS1</i>	48
Figure 7. L'homéostasie calcique.	51
Figure 8. Altération mitochondriale induite par la perte de fonction de <i>WFS1</i>	57
Figure 9. <i>CISD2</i> et ERIS	59
Figure 10. Stratégies thérapeutiques pour traiter le SW	63
Figure 11. Structure de <i>NCS1</i> en absence de Ca^{2+}	78
Figure 12. Représentation du gène <i>sigmar1</i> et de sa protéine	85
Figure 13. Différents interacteurs démontrés de <i>S1R</i>	92
Figure 14. Pharmacophores spécifiques de <i>S1R</i> contribuant à une liaison optimale de ses ligands	147
Figure 15. Schéma du criblage chimique chez la lignée poisson zèbre <i>wfs1ab^{KO}</i> en utilisant le test VMR	149
Figure 16. Echelle d'efficacité d'une molécule testée selon les valeurs obtenues en test VMR.....	154
Figure 17. Régulation de l'association du complexe <i>S1R</i> - <i>BiP</i> par les molécules affines <i>S1R</i> du crible	164
Figure 18. Récapitulatif de la proportion des effets des molécules de la chimiothèque sur l'hyperlocomotion des larves <i>wfs1ab^{KO}</i> et la locomotion des larves <i>wfs1ab^{WT}</i>	165
Figure 19. Les symptômes du SW observés dans différents modèles d'étude et la restauration de ces déficits par modulation de <i>S1R</i> ou de <i>NCS1</i>	178
Figure 20. Modèle d'altération mitochondriale induite par la perte de fonction de <i>WFS1</i> , et restaurée par la surexpression de <i>NCS1</i>	186
Figure 21. Modèle de rétablissement fonctionnel des MAM par un agoniste de <i>S1R</i> induisant l'augmentation du transfert de Ca^{2+} médié par <i>IP3R</i> vers les mitochondries	189
Tableau 1. Caractéristiques cliniques des patients atteints du SW.....	29
Tableau 2. Effets des ligands <i>S1R</i> de référence sur l'hyperlocomotion des larves <i>wfs1ab^{KO}</i>	155
Tableau 3. Listes de molécules toxiques chez les larves <i>wfs1ab</i> traitées durant 24 h à une concentration de 3 μ M.....	158
Tableau 4. Listes des molécules non efficaces chez les larves <i>wfs1ab^{KO}</i>	159

Avant-propos

Le syndrome de Wolfram est une maladie neurodégénérative rare qui associe un diabète sucré, un diabète insipide, une atrophie optique, une perte auditive neurosensorielle et divers symptômes neurologiques. Les patients décèdent précocement le plus souvent d'une détresse respiratoire ou de fausse route et à ce jour aucun traitement efficace n'est disponible. Ce syndrome est dû à des mutations du gène *WFS1* qui code une protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique, la Wolframine. Les mutations altèrent la stabilité de la protéine, modifiant son homéostasie, diminuant le transfert calcique, augmentant le stress cellulaire, dégradant les fonctions mitochondriales et conduisant à la mort cellulaire. La Wolframine est impliquée dans le dialogue fonctionnel entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries, qui est crucial pour le contrôle de la signalisation cellulaire, la bioénergétique mitochondriale, la réponse inflammatoire et l'autophagie. Il est également altéré dans toutes les maladies neurodégénératives et au centre d'une thématique majeure du laboratoire. Le laboratoire « *Mécanismes Moléculaires dans les Démences Neurodégénératives* » étudie le vieillissement et les maladies neurodégénératives, de la cellule à l'Homme. À partir de modèles animaux (Drosophile, poisson zèbre, souris et lémuriers) et par des approches de biologie moléculaire, cellulaire et de pharmacologie, l'objectif du laboratoire est de mieux connaître les mécanismes moléculaires du vieillissement physiologique et de pathologies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington et la sclérose latérale amyotrophique, pour explorer *in fine* des pistes pour le diagnostic et le traitement thérapeutique. Mon projet de thèse, débutant en Mars 2019, s'est intégré dans cette thématique à travers des approches fonctionnelles et pharmacologiques ciblant le syndrome de Wolfram. Au cours de ce travail, nous avons caractérisé des modèles animaux, trois lignées de poisson zèbre et un modèle murin mutants pour *Wfs1*, afin de valider *in vivo* deux cibles thérapeutiques, le *neuronal calcium sensor-1*, et la protéine chaperonne sigma-1. Le modèle poisson zèbre a permis de définir un protocole de criblage phénotypique *in vivo* de petites molécules activant la protéine sigma-1 et nous avons pu identifier de nouvelles séries chimiques et découvrir un modulateur positif d'origine végétale. Ce manuscrit est présenté comme une thèse sur articles et inclut, dans la partie introductive qui décrit la pathologie, l'intérêt des modèles poisson zèbre dans l'étude des maladies rares et les cibles pharmacologiques, les deux articles de revue auxquels j'ai contribué.

ABREVIATIONS

AATF	<i>Apoptosis Antagonizing Transcription Factor</i>
AAV	Virus adéno-associé
AMPC	Adénosine Monophosphate cyclique
ASICs	<i>Acid-Sensing Ion Channels</i> , canaux ioniques à détection d'acide
ASR	<i>Acoustic Startle Response</i>
ATF4	<i>Activating Transcription Factor 4</i>
ATF6	<i>Activating Transcription Factor 6</i>
Bcl-2	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BiP	<i>Binding immunoglobulin Protein</i>
Ca ²⁺	Calcium
CB1R	<i>Cannabinoid Receptor 1</i>
CCE	<i>Capacity Calcium Entry</i>
CGR	Cellules Ganglionnaires de la Rétine
CHOP	<i>C/EBP Homologous Protein</i>
CISD2	<i>CDGSH (Cys-Asp-Gly-Ser-His) iron-sulfur domain-containing protein 2</i>
D	<i>Deafness</i> , surdité
DA	Dopamine
D1R	Récepteur dopaminergique de type 1
D2R	Récepteur dopaminergique de type 2
DAG	Diacylglycérol
DFNA6	<i>Autosomal Dominant Non syndromic hearing loss 6</i>
DI	<i>Diabetes Insipidus</i> , diabète insipide
DM	<i>Diabetes Mellitus</i> , diabète sucré
eIF2 α	<i>eukaryotic Initiation translation Factor 2α</i>
ELMOD	<i>Cell Engulfment and Motility Domain</i>
ENU	<i>N-ethyl-N-nitrosourea</i> , N-nitroso-N-éthylurée
ERAD	<i>ER-Associated Degradation</i>
ERSE	<i>ER Stress Response Element</i>
FRET	Transfert d'énergie par résonance de fluorescence
FTD	Démence frontotemporale
GADD34	<i>Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein</i>

GLP-1	<i>Glucagon-Like Peptide-1</i>
GRP75	<i>Glucose-Regulated Protein 75</i>
GTP	Guanosine triphosphate
H ⁺	Ion hydrogène
HCX	<i>H⁺/Ca²⁺ exchanger</i>
hERG	<i>human Ether-a-go-go Related Gene</i>
hpf	Heures post fertilisation
HRD1	<i>E3 HydroxyMethyl Glutaryl-Coenzyme A Reductase Degradation protein 1</i>
HSP70	<i>Heat Shock Protein 70</i>
ICV	Intracérébroventriculaire
IPr	Indice de Protection
IP	Intrapéritonéale
IP3R	Récepteur de l'Inositol 1,4,5 triphosphate
iPSC	<i>induced Pluripotent Stem Cell</i> , cellule souche pluripotente induite
IR	Infrarouge
IRE1	<i>Inositol-Requiring Kinase 1</i>
jpgf	Jours post fertilisation
K ⁺	Ion potassium
Kb	Kilo Base
KDa	Kilo Dalton
KO	<i>Knockout</i>
Kv	<i>Voltage-gated potassium channels</i>
LC3-I	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-I</i>
LTTA	Laboratoire des Technologies des Thérapies Avancées
MA	Maladie d'Alzheimer
MAM	<i>Mitochondria-Associated ER Membrane</i>
MANF	<i>Mesencephalic Astrocyte-derived Feurotrophic Factor</i>
MCU	<i>Mitochondrial Calcium Uniporter</i>
MH	Maladie de Huntington
MOR	Récepteur mu-opioïde
MP	Maladie de Parkinson
Na ⁺	Ion sodium
Nav	<i>Voltage-gated potassium channels</i>
NCS1	<i>Neuronal Calcium Sensor 1</i>

NCX	<i>Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i>
NEC	Nouvelles entités chimiques
OA	<i>Optic Atrophy</i> , atrophie optique
OCR	<i>Oxygen Consumption Rate</i> , niveau de consommation d'oxygène
OKR	<i>Optokinetic Response</i>
pb	Paire de bases
PBA	Acide 4-phénylbutyrique
PDE4	Phosphodiesterase 4
PDGFR	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PERK	<i>Protein kinase (PKR)-like Endoplasmic Reticular Kinase</i>
PiP ₂	Phosphatidylinositol 4,5 bisPhosphate
PKC	Protéine kinase C
PLA	<i>Proximity ligation assay</i> , test de ligature de proximité
PLC	Phospholipase C
PMCA	<i>Plasma Membrane Calcium ATPase</i>
PP1	<i>Protein Phosphatase 1</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i>
RanGAP	<i>Ran activating proteins</i>
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RIDD	<i>Regulated-IRE1 Dependent Decay</i>
RNMDA	Récepteur Acide N-méthyl-D-aspartique
ROC	<i>Receptor-Operated Channel</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RTK	Récepteur membranaire à activité Tyrosine Kinase
RyR	Récepteur de la Ryanodine
S1P	<i>Site Protease-1</i>
S1R	Récepteur sigma 1
SBDLI	<i>Sterol-Binding Domain Like-I</i>
SERCA	<i>Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
SMOC	<i>Second Messenger-Operated Channel</i>
SOD	<i>Superoxide dismutase 1</i>

SVF	Sérum de Veau Foetal
SW	Syndrome de Wolfram
SW1	Syndrome de Wolfram de type 1
SW2	Syndrome de Wolfram de type 2
TrkB	<i>Tropomyosin Receptor Kinase B</i>
TUDCA	Acide tauroursodésoxycholique
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VDAC	<i>Voltage Dependant Anion Channel</i>
VMR	<i>Visual Motor Response</i>
VOC	<i>Voltage-Operated Channel</i>
VOR	Réflexe Vestibulo-Oculaire
XBP1	<i>X-box Binding Protein 1</i>
XBP1s	<i>XBP1 spliced</i>

The background of the slide is an abstract watercolor painting. It features a complex network of thin, light-colored lines that resemble a neural network or a web. Interspersed among these lines are various colorful splashes and blotches in shades of blue, red, orange, yellow, and green. The overall effect is a vibrant, textured, and somewhat chaotic pattern.

INTRODUCTION

Chapitre 1. Le Syndrome de Wolfram

I. Historique

En 1938, les Dr Wolfram et Wagener décrivent pour la première fois les symptômes de 4 enfants atteints d'une pathologie, à laquelle le Dr Wolfram donnera son nom, le syndrome de Wolfram (SW). Travaillant à la clinique Mayo (Minnesota, États-Unis), ils étudient 8 frères et sœurs dont 4 souffraient de diabète sucré et d'atrophie optique (Wolfram and Wagener, 1938). L'ainée était une jeune fille de 18 ans qui souffrait de diabète sucré dès 8 ans, d'atrophie optique à 11 ans et, à 18 ans son acuité visuelle était inférieure à 1/100^e avec ses doigts comme seul moyen de mesure. Son frère de 15 ans a développé une mauvaise vision à 6 ans et un diabète sucré à 10 ans. Une atrophie bilatérale des nerfs optiques était présente à 15 ans, avec une altération acuité visuelle traduite par une visualisation réduite aux mouvements des mains et une incapacité à compter ses doigts. Le second jeune frère, aussi atteint, a développé un diabète sucré à 7 ans, et une atrophie optique et une acuité visuelle faible dans chaque œil à 8 ans. Des symptômes neurologiques ont été développés par l'enfant 12 ans plus tard, et ont été diagnostiqués à tort comme de l'ataxie de Friedrich (Cooper et al., 1950), une maladie neurodégénérative héréditaire également caractérisée par un diabète sucré, une cécité et un trouble de l'audition. Le quatrième enfant affecté était la sœur cadette qui a développé à 5 ans un diabète sucré et une atrophie optique à l'âge de 7 ans. Dix-huit ans plus tard, 2 de ces enfants ont été réexaminés et l'atrophie optique avait progressé jusqu'au stade de cécité presque complète, des troubles des voies urinaires d'ordre neuropathique ont été notés, et 3 d'entre eux avaient une perte auditive. Il a également été décrit que la mère de la fratrie se plaignait d'un déficit visuel sans aucune preuve d'atrophie optique et le

père, décédé d'une bronchite chronique et d'une insuffisance cardiaque, n'a rapporté aucune preuve de troubles visuels (Tunbridge and Paley, 1956). En 1949, De Lawter *et al.* ont décrit pour la première fois que le diabète sucré et l'atrophie optique étaient associés à un diabète insipide (De Lawter, 1949). Ces résultats ont été confirmés par la suite également dans de nombreux rapports (Bretz *et al.*, 1970; Fraccaro and Gastaldi; Ikkos *et al.*, 1970; Marquardt, 1974; Moore, 1971; Najjar and Mahmud, 1968; Raiti and News, 1963; Stoppoloni *et al.*, 1969; Sunder *et al.*, 1972; Van Ussel and Hoet, 1966).

En 1950, Cooper *et al.* ont souligné que ce syndrome pouvait être associé à un diabète insipide, une atonie et dilatation des voies urinaires efférentes et une surdité (Cooper *et al.*, 1950). La surdité associée au diabète sucré et à l'atrophie optique a été décrite pour la première fois par Shaw et Duncan en 1958 (Shaw and Duncan, 1958) et le syndrome complet incluant le diabète insipide par Ikkos *et al.* (Ikkos *et al.*, 1970), et appuyé par d'autres travaux (Fraser and Gunn, 1977; Sunder *et al.*, 1972).

Par ailleurs, une étude clinique menée sur 21 familles comportant plusieurs symptômes associés, a permis d'émettre l'hypothèse qu'un gène autosomique chez un individu homozygote provoquerait un diabète sucré juvénile, un diabète insipide, une atrophie optique et une surdité (Fraser and Gunn, 1977). Une autre étude a montré que les individus hétérozygotes semblaient avoir une probabilité accrue de développer un diabète sucré juvénile, suggérant *in fine* une transmission autosomique récessive héréditaire, avec comme preuve solide la présence de consanguinité parentale dans environ un quart des cas (Cremers *et al.*, 1977; Fraser and Gunn, 1977).

D'autres caractéristiques associées aux principaux symptômes ont été retrouvées telles que de l'ataxie, des troubles psychiatriques (Swift *et al.*, 1990), de l'hypogonadisme, une rétinopathie pigmentaire, une cardiomyopathie, de l'anémie

sidéroblastique et une thrombocytopénie (Borgna-Pignatti et al., 1989; Cremers et al., 1977).

C'est dans les années 90 que l'origine mitochondriale du SW a été proposée. En effet, ce syndrome remplit les critères d'un défaut génétique mitochondrial, en présentant une association inexplicée de symptômes, avec une apparition précoce, une évolution rapide, et une atteinte multi-organes sans rapport fonctionnel direct. En 1992, Bunday *et al.* réalise une biopsie musculaire sur un patient de 27 ans qui avait développé à 14 ans une atrophie optique et des troubles de la vision des couleurs. À 17 ans, un diagnostic du SW a été proposé. Les résultats révèlent que le patient avait des mitochondries morphologiquement et biochimiquement anormales, associées à une déficience héréditaire de la fonction du glutamate, pouvant être à l'origine d'une atrophie sélective du système nerveux (Bunday et al., 1992). Cependant, aucune anomalie de l'ADN mitochondrial n'a été détectée.

Les travaux de Rötig *et al.* ont rapporté une déficience généralisée de l'activité enzymatique de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le muscle squelettique et l'homogénat lymphocytaire d'une fille souffrant du SW, une délétion hétéroplasmique de 7.6 Kb de l'ADN mitochondrial dans les deux tissus. Ces résultats soutiennent l'idée qu'un défaut de la chaîne respiratoire pourrait induire un diabète sucré insulino-dépendant comme symptôme initial (Rötig et al., 1993).

En 1996, les travaux de Barrientos ont rapporté des mutations de l'ADN mitochondrial chez des patients atteints du SW, les menant à émettre l'hypothèse d'un facteur codé par le noyau prédisposant à de multiples mutations de l'ADN mitochondrial qui contribuait *in fine* à l'expression du phénotype (Barrientos et al., 1996a, 1996b).

Il a fallu attendre 1994 pour découvrir que le gène du SW était lié à des marqueurs sur le bras court du chromosome 4 humain, basé sur l'étude génétique de 11 familles américaines à l'aide de polymorphismes de microsatellites dans tout le génome humain (Polymeropoulos et al., 1994). Cette localisation a été confirmée dans d'autres études (Barrett and Bunday, 1997; Collier et al., 1996; Inoue et al., 1998; Strom et al., 1998).

Le gène nucléaire WFS1 a été identifié dans le SW en 1998 à l'aide d'approches de cartographies génétiques et de gènes candidats (Inoue et al., 1998; Strom et al., 1998).

II. Description clinique du syndrome de Wolfram de type 1

Le SW est une maladie progressive dont le diagnostic clinique nécessite la coexistence d'un diabète non auto-immun insulino-dépendant, premier symptôme généralement diagnostiqué vers l'âge de 6 ans, et une atrophie optique bilatérale avant l'âge de 11 ans (Urano, 2016) caractérisée par la perte de la vision des couleurs et la vision périphérique. Une cécité est développée 8 ans après les premiers symptômes d'atrophie optique.

Bien qu'il s'agisse des deux symptômes principaux, environ 50% des patients atteints du SW présentent le phénotype complet "DIDMOAD" —l'acronyme de diabète insipide (*Diabetes insipidus*, DI), diabète sucré (*Diabetes mellitus*, DM), atrophie optique (*Optic atrophy*, OA) et surdité (*Deafness*, D) (Pilley and Thompson, 1976)—. Pour 70% des patients est noté un diabète insipide, caractérisé par une perturbation de la sécrétion de la vasopressine, hormone anti diurétique produite par l'hypothalamus, qui en condition physiologique diminue le volume des urines en augmentant la perméabilité à l'eau du tube collecteur du néphron.

Une étude de Heredia *et al.* a centralisé les données cliniques et génétiques de 412 patients atteints du SW issues de 49 références (de Heredia et al., 2013). Sur les 392 patients, 98.2% avaient un diabète sucré, 82.1% une atrophie optique, 48.2% une perte d'audition, 37.7% un diabète insipide et 44% des troubles psychiatriques. D'autres manifestations cliniques, telles que des anomalies rénales (19.4%) et des symptômes neurologiques (17.1%) ont été retrouvées chez un plus petit nombre de patients, et 7.4 % sont décédés au moment de cette étude (Tableau 1).

Principales caractéristiques cliniques	Âge au diagnostic	Pourcentage de patients ayant le déficit
Diabète sucré	6 ans (3 semaines-16 ans)	98.2%
Atrophie optique	11 ans (6 semaines-19 ans)	82.1%
Perte auditive neurosensorielle	12.5 ans (5-39 ans)	48.2%
Diabète insipide	14 ans (3 mois-40 ans)	37.7%
Troubles neurologiques et autonomes (apnée centrale, ataxie, dysphagie, aréflexie, épilepsie, diminution de la capacité à goûter et à détecter les odeurs, maux de tête, hypotension orthostatique, hyperpyrexie, hypothermie, constipation, gastroparésie)	16 ans (5-44 ans)	17.1%
Complications des voies urinaires (vessie neurogène, incontinence vésicale, infections des voies urinaires)	20 ans (13-33 ans)	19.4%
Autres caractéristiques cliniques courantes		
Troubles endocrinologiques (hypogonadisme, sécrétion déficiente de l'hormone de croissance, déficit en corticotropine, ménarche retardée chez la femme)	8 ans (7-9 ans)	6.6%
Symptômes psychiatriques (anxiété, crises de panique, dépression, sautes d'humeur, troubles du sommeil, psychose)	20.5 ans (17-23 ans)	44.4%

Tableau 1. Caractéristiques cliniques des patients atteints du SW. Les symptômes décrits dans les publications ont été regroupés et classés en fonction du pourcentage de patients développant les déficits. Adapté de (Rigoli et al., 2020).

La mortalité est d'environ 65% avant l'âge de 35 ans (Barrett et al., 1995), en raison d'une insuffisance respiratoire centrale avec atrophie du tronc cérébral, coma hypoglycémique, état de mal épileptique, suicide et insuffisance rénale secondaire à des infections (de Heredia et al., 2013).

1. Le diabète sucré

Le diabète insulino-dépendant et non auto-immun est le premier signe clinique du SW, déclaré en moyenne à l'âge de 6 ans, avec des extrêmes variant entre 3 semaines de vie et 16 ans. Il est important que les cliniciens tiennent compte des différences cliniques entre le SW et le diabète de type 1 auto-immun afin d'éviter un diagnostic erroné pouvant mener à de graves répercussions sur la santé du patient. En effet, le diabète de type 1 est une affection dans laquelle il existe une auto-immunité spécifique dirigée contre les cellules β pancréatiques, associée à une inflammation et une infiltration à prédominance lymphocytaire et macrophagique des îlots β pancréatiques menant, *in fine*, à une destruction des cellules β et un déficit absolu de sécrétion d'insuline (Karasik et al., 1989; Kinsley et al., 1995).

Des études immunohistochimiques chez des patients atteints de SW ont démontré l'absence d'insuline dans le pancréas, mais la présence de glucagon, de somatostatine et du polypeptide pancréatique, indiquant ainsi une perte sélective des cellules β et une préservation de la composante exocrine de la glande. Par conséquent, le diabète sucré développé dans le SW n'est pas causé par un défaut fonctionnel des cellules β pancréatiques, mais plutôt par une perte progressive de ces cellules (Karasik et al., 1989; Kinsley et al., 1995). Le diabète insulino-dépendant et non auto-immun rencontré dans le SW diffère également du diabète de type 1 auto-immun par son diagnostic précoce, des auto-anticorps rarement positifs, une acidocétose rare, des périodes de rémission plus longues, des besoins quotidiens en insuline plus faibles, des valeurs moyennes d'hémoglobine glyquée (HbA1c) inférieures et une fréquence moindre d'hypoglycémies (de Heredia et al., 2013; Rigoli et al., 2020; Rohayem et al., 2011) probablement dues à une activité résiduelle persistante des cellules β pancréatiques (Cano et al., 2007) et enfin de rares

complications microvasculaires (telle que la rétinopathie) se développant plus lentement que dans le diabète de type 1 (Cano et al., 2007; Kinsley et al., 1995) et une acidocétose (Barrett et al., 1995; Kinsley et al., 1995; Peden et al., 1986).

2. L'atrophie optique

Chez les patients atteints du SW, l'atrophie optique est diagnostiquée au cours de la première décennie de leur vie, généralement avant l'âge de 11 ans. La première manifestation clinique de l'atrophie optique est la diminution progressive de l'acuité visuelle associée à une perte de la vision des couleurs. L'atrophie optique est progressive et évolue vers la cécité en moyenne 8 ans après le diagnostic d'atrophie optique (de Heredia et al., 2013; Hoekel et al., 2014; Tranebjærg et al., 1993).

D'autres anomalies oculaires moins fréquentes signalées sont la cataracte (29.6 à 66.6%) (Al-Till et al., 2002; Baz et al., 1999), la rétinopathie pigmentaire (30%) (Al-Till et al., 2002), la rétinopathie diabétique (7.6 à 34.6%) (Al-Till et al., 2002; Cano et al., 2007; Kinsley et al., 1995), un glaucome (Bekir et al., 2000), des altérations des réflexes pupillaires à la lumière et un nystagmus (oscillation rythmique involontaire des yeux) souvent horizontal (Al-Till et al., 2002; Baz et al., 1999; Blasi et al., 1986; Cremers et al., 1977). Un cas de maculopathie pigmentaire atrophique bilatérale a été recensé dans la littérature chez un garçon de 12 ans (Chacón-Camacho et al., 2013; Dhalla et al., 2006).

Récemment, Waszczykowska et al. ont montré dans une étude sur 12 patients atteints du SW une diminution de la sensibilité cornéenne et une dégénérescence du nerf cornéen (diminution de la densité et de la longueur des fibres nerveuses cornéennes), notée également plus importante comparé à 30 individus atteints du diabète de type 1 (Waszczykowska et al., 2022).

L'amincissement rétinien s'est également avéré être un marqueur fiable de la progression de la maladie, induit notamment par une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) et des cellules horizontales et bipolaires de la rétine (Hilson et al., 2009; Hoekel et al., 2014; Zmyslowska et al., 2015) (Figure 1). Les CGR sont des cellules de type neurones qui transmettent les informations perçues par la rétine oculaire jusqu'au cerveau. Les cellules horizontales sont responsables de l'augmentation du contraste.

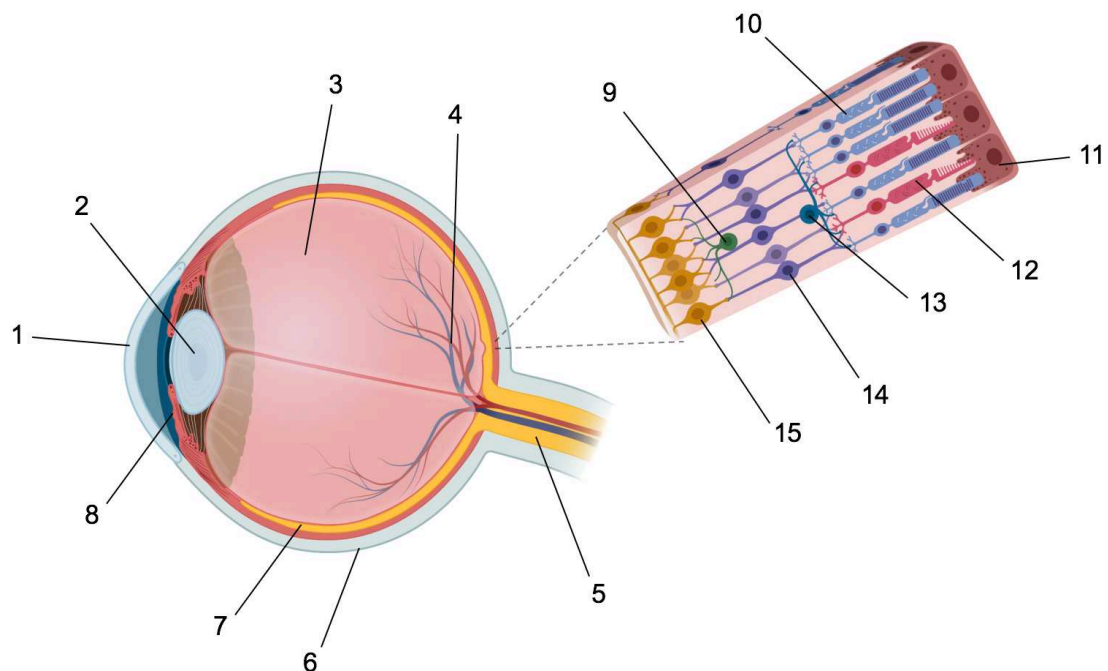


Figure 1. Schéma de l'œil humain et des différentes couches cellulaires composant la rétine. À gauche, l'œil, en coupe transversale, contient différentes structures permettant de traiter la lumière et/ou de maintenir la forme de l'œil. À droite, le schéma montre les différentes couches cellulaires de la rétine qui convertissent la lumière en signaux neuronaux envoyés au cerveau. Légende : 1. Cornée, 2. Cristallin, 3. Humeur vitrée, 4. Vaisseaux sanguins rétinien, 5. Nerf optique, 6. Sclérotique, 7. Rétine, 8. Iris, 9. Cellule amacrine, 10. Bâtonnet, 11. Epithélium pigmenté, 12. Cône, 13. Cellule horizontale, 14. Cellule bipolaire, 15. Cellule ganglionnaire.

Un examen oculaire annuel complet, évaluant l'acuité visuelle et la vision des couleurs, le fond de l'œil, le champ visuel et la tomographie par cohérence optique, est fortement recommandé et effectué précocement chez les patients pour améliorer le diagnostic et la prise en charge (Rigoli et al., 2004). La vision est souvent améliorée par le port de lunettes, l'utilisation de loupes, de télescopes ou d'aides non-optiques.

3. La surdité neurosensorielle

La surdité neurosensorielle survient en moyenne à l'âge de 12.5 ans, est progressive, souvent symétrique, et touche en premier les hautes fréquences (Cremers et al., 1977; Higashi, 1991).

En 2004, une étude clinique menée sur 11 patients hollandais atteints du SW a permis d'identifier que la progression de la déficience auditive se produisait principalement dans la gamme des moyennes et hautes fréquences, observant également un degré plus élevé de déficience auditive chez les femmes que chez les hommes, probablement induit par l'implication des œstrogènes (Pennings et al., 2004).

La perte des cellules ciliées, un dysfonctionnement des fibres nerveuses VIII et des voies nerveuses centrales du tronc cérébral et du colliculus inférieur (Rendtorff et al., 2011), une atrophie de l'organe de Corti (organe de la perception auditive constitué de cellules sensorielles et de cellules de soutien) ont été corrélés à la surdité à haute fréquence (Hilson et al., 2009). Une atrophie focale de la strie est également notée, très fréquente dans une grande variété de surdités congénitales, génétiques et acquises (Figure 2).

Les voies auditives centrales, situées dans le tronc cérébral (noyaux cochléaires, complexe olivaire supérieur), le mésencéphale (colliculus inférieur), le thalamus (corps genouillé médian) et le cortex auditif, sont d'une grande importance dans la discrimination de la parole, suggérant ainsi qu'elles sont légèrement ou non affectées chez les patients atteints du SW (Schuknecht and Montandon, 1993).

Une atteinte vestibulaire n'a été décrite que dans un nombre limité de cas et (Cremers et al., 1977; Higashi, 1991; Pennings et al., 2004), corrélée à une diminution de l'excitabilité des récepteurs vestibulaire d'origine centrale (Laffay and Lestradet, 1974), bien que l'étude d'Hilson *et al.* a mis en évidence une perte des neurones dans

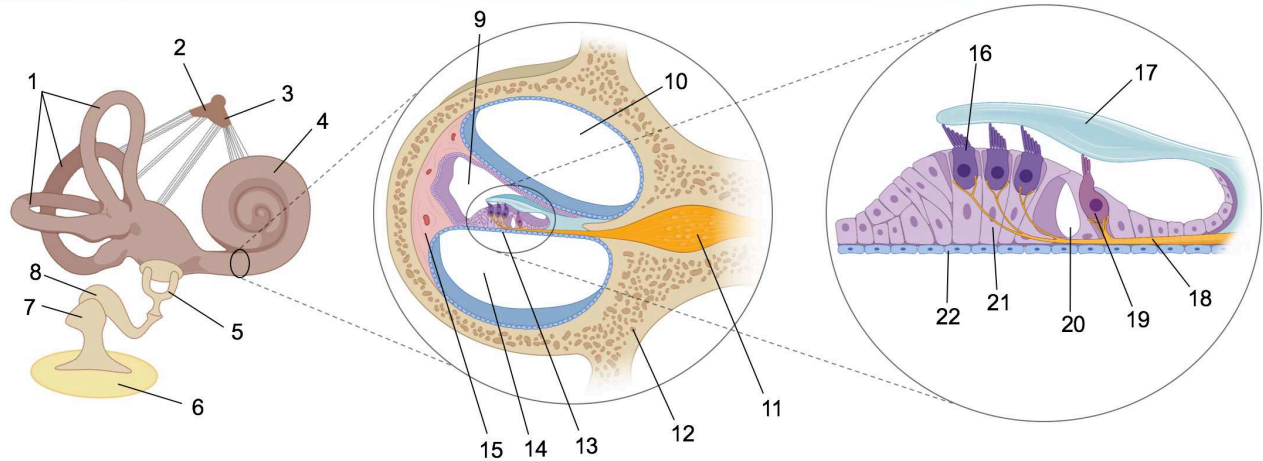


Figure 2. Schéma de l'oreille humaine allant de l'oreille interne à l'organe de Corti. Légende : 1. canaux semi-circulaires, 2. nerf vestibulaire, 3. nerf auditif, 4. cochlée, 5. étrier, 6. membrane tympanique, 7. marteau, 8. enclume, 9. canal cochléaire, 10. rampe vestibulaire, 11. nerf cochléaire, 12. paroi osseuse de la cochlée, 13. organe de Corti, 14. rampe tympanique, 15. strie vasculaire, 16. cellule ciliée externe, 17. membrane tectoriale, 18. nerf cochléaire, 19. cellule ciliée interne, 20. canal cochléaire, 21. cellules de Deiter, 22. membrane basilaire.

le noyau vestibulaire médial mais aucune atteinte des organes sensoriels vestibulaires (Hilson et al., 2009).

Les outils thérapeutiques, tels que les prothèses auditives et les implants cochléaires, améliorent quotidiennement la vie des patients. Si l'implant cochléaire permet de retrouver une perception auditive, il ne remplace pas l'ouïe et nécessite obligatoirement une rééducation auditive précoce par un orthophoniste pour tirer bénéfice de l'implant.

4. Le diabète insipide

Le diabète insipide est caractérisé par une polyurie sévère, souvent accompagnée d'une déshydratation plus ou moins importante. Les patients atteints du SW sont diagnostiqués vers l'âge de 14 ans (Barrett et al., 1995; de Heredia et al., 2013), diagnostic souvent confondu à tort avec la polyurie, généralement associée à un déséquilibre du diabète sucré ou à une conséquence de la vessie neurologique, ou encore à la potomanie (trouble du comportement qui provoque un besoin impérieux

de boire). Il reste indispensable de poser un diagnostic précis car le traitement est évidemment très différent d'une pathologie à l'autre.

Le diabète insipide est nommé ainsi car les urines sont pâles comme de l'eau, peu concentrées, et ne contiennent ni sucre, ni albumine. Les rapports neuroradiologiques et *post-mortem* ont montré l'absence de l'hypersignal T1 intracrânien normalement observé dans le lobe postérieur de l'hypophyse à l'origine de la sécrétion de la vasopressine, une hormone antidiurétique, de la gliose, et l'atrophie des noyaux paraventriculaires et supraoptiques de l'hypothalamus (Galluzzi et al., 1999; Ito et al., 2007; Pakdemirli et al., 2005). De plus, des études de sécrétion de vasopressine en réponse à des stimuli (Thompson et al., 1989) et des études *post-mortem* montrant une accumulation de précurseurs de vasopressine dans les noyaux paraventriculaires (Gabreëls et al., 1998) ont permis de mettre en évidence des défauts fonctionnels en plus de la perte des noyaux.

5. Les troubles neurologiques et psychiatriques

Les patients atteints du SW développent dans plus de 60% des cas des complications neurologiques vers l'âge de 16 ans (de Heredia et al., 2013).

La complication neurologique la plus fréquente, chez 45% des patients, est l'ataxie cérébelleuse, à l'origine de troubles de l'équilibre et de la coordination motrice (Barrett et al., 1995; Chausseu et al., 2011). Les autres anomalies neurologiques sont une neuropathie périphérique (à l'origine d'engourdissements, picotements ou sensation de brûlure dans les mains ou les pieds) dans 39% des cas, des troubles cognitifs (32%), une épilepsie (26%), une dysarthrie (trouble de l'articulation de la parole d'origine centrale et périphérique), une dysphagie (anomalie du transport des aliments liquides et/ou solides, du pharynx à l'estomac, entraînant bien souvent des fausses routes), et un nystagmus (10%) (Chausseu et al., 2011).

L'atrophie du cortex, de la région hypothalamique, du cervelet et du tronc cérébral sont des anomalies retrouvées chez 54% des patients atteints du SW (Alicanoğlu et al., 1994; Rando et al., 1992; Scolding et al., 1996), notamment mis en relation avec l'apparition de retards mentaux et d'épilepsies.

L'examen microscopique du cerveau révèle une perte neuronale modérée et une gliose dans les noyaux du tronc cérébral (Carson, 1977; Genís et al., 1997; Hilson et al., 2009; Shannon et al., 1999). Des symptômes cérébelleux ont été mis en évidence tels que des tremblements posturaux et une instabilité, corrélés à une perte modérée des neurones dans les noyaux dentés du cervelet, une atrophie cérébelleuse et une perte des cellules de Purkinje (Carson, 1977; Genís et al., 1997; Medlej et al., 2004). L'hypothalamus présente une gliose importante et une perte sévère de neurones magnocellulaires dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires (neurones responsables de la libération d'ocytocine et de vasopressine) (Genís et al., 1997; Hilson et al., 2009; Shannon et al., 1999). D'autres structures cérébrales sont modérément affectées telles que le thalamus avec une perte neuronale et une gliose dans les noyaux antérieurs et dorso-médians, la moelle épinière et la substance noire (Carson, 1977; Genís et al., 1997).

Les volumes intracrâniens et cérébraux totaux, le tronc cérébral et les volumes de la matière blanche et grise étaient inférieurs en condition pathologique comparé au témoin (Hershey et al., 2012). Le thalamus et le pallidum ont également montré un volume légèrement inférieur mais aucune différence n'est retrouvée pour les structures striatales (putamen, caudé et noyau accumbens), l'hippocampe et le corps calleux (Figure 3) (Hershey et al., 2012; Lugar et al., 2016). Concernant les troubles psychiatriques, une étude clinique a rapporté que sur 68 patients atteints du SW, 18% d'entre eux nécessitaient d'une hospitalisation psychiatrique et 60% avaient développé

des troubles psychiatriques ou comportementaux tels qu'un comportement violent, agressif ou non coopératif, une hostilité inhabituelle, des difficultés à contrôler les accès de colère, une démence progressive, une dépression sévère ou encore le suicide (Swift et al., 1990).

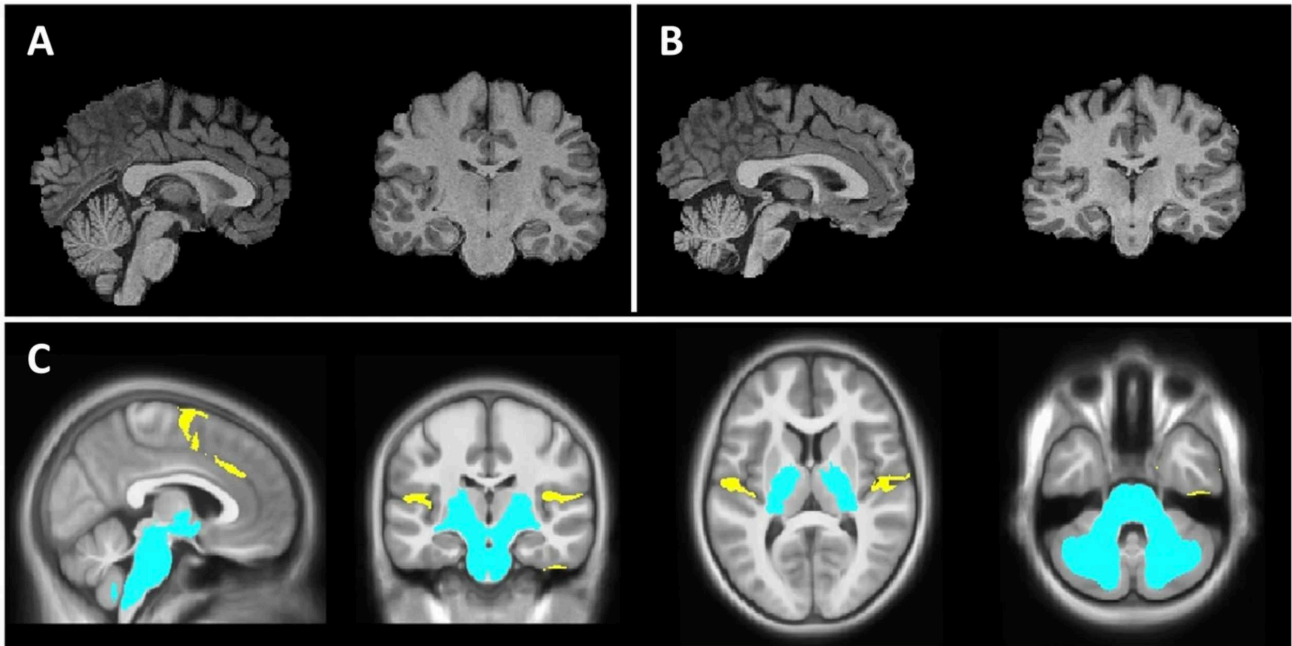


Figure 3. Imagerie et quantification du volume cérébral et des anomalies microstructurales du cerveau associées au SW. Vue sagittale et coronale d'un cerveau de sujet contrôlé (A) comparée à une vue sagittale et coronale d'un cerveau de sujet atteint du SW (B). (C) Différences volumétriques entre le patient et le témoin. Les régions en bleu sont les régions plus petites dans le SW, tandis que les régions en jaune sont plus grandes comparées au sujet contrôlé. Image issue de (Samara et al., 2019).

L'incidence élevée de comportement suicidaire rapportée chez les patients atteints du SW fait de la consultation et du suivi psychiatrique précoce une partie essentielle du traitement. La prise de conscience de la prévalence, de la gravité et de la diversité des troubles psychiatriques permet d'améliorer aujourd'hui la prise en charge clinique des patients atteints du SW.

6. Les troubles urologiques

Des complications des voies urinaires concernent environ 90% des patients atteints du SW, avec un âge moyen d'apparition de 20 ans (13-33 ans) (Barrett and

Bunday, 1997; de Heredia et al., 2013). Une dilatation bilatérale des voies urinaires allant d'une hydronéphrose légère à un méga-uretère et une vessie atonique ont été rapportés (Kumar, 2010; Simsek et al., 2003). La dilatation des voies supérieures, l'incontinence urinaire, l'énurésie (miction involontaire nocturne), le volume résiduel de la vessie post-mictionnelle et les infections récurrentes sont les conséquences de la vessie neurogène. Cependant, des rapports récents montrent que la vessie à faible capacité et à haute pression avec dyssynergie vésico-sphinctérienne est également fréquemment observée (Aboseif et al., 1993; Simsek et al., 2003; Tekgül et al., 1999).

La pathogenèse des troubles urologiques a connu plusieurs controverses. Historiquement, les patients atteints du SW ont été décrits comme ayant une dilatation marquée des voies urinaires supérieures et inférieures, qui était à l'origine attribuée à la polyurie due au diabète insipide (Chu et al., 1986; Najjar et al., 1985). Plus récemment, une étude clinique longitudinale menée sur 7 ans a mis en lumière l'origine neurodégénérative en tant que manifestation primaire (Rove et al., 2018). En effet, cette étude s'appuie sur des études antérieures révélant une diminution des volumes cérébraux, du tronc cérébral et du pont chez les patients atteints du SW comparé à des sujets sains du même âge (Hershey et al., 2012), suggérant donc un lien étroit entre un dysfonctionnement des voies urinaires inférieures chez les patients atteints du SW, une diminution du volume du pont et une qualité de vie impactée par ces troubles urologiques (Rove et al., 2018).

Les traitements permettant de soulager le dysfonctionnement de la vessie des patients comprennent les médicaments anticholinergiques et le sondage intermittent (de Heredia et al., 2013), avec parfois une stimulation électrique à travers les muscles de la vessie et de la physiothérapie (Urano, 2016). Une évaluation périodique des anomalies urologiques, avec la mesure du volume d'urine résiduelle post-mictionnelle

par échographie et des tests urodynamiques, sont recommandés. Des mesures régulières sur des cultures d'urine sont également obligatoires pour une reconnaissance rapide des infections.

7. Les troubles des systèmes endocrinologiques et reproducteurs

Le SW s'accompagne également d'une insuffisance rénale chronique. Des rapports ont révélé des complications rénales rapides chez certains membres de familles atteints du SW (Korkmaz, 2018; Lim and Thai, 1990; Yuca et al., 2012). Un cas atteint du SW a été décrit avec une insuffisance rénale terminale et nécessitait une hémodialyse à l'âge de 14 ans (Hasan et al., 2000). Des hypogonadismes primaires et secondaires ont été rapportés fréquemment chez les patients masculins (Barrett et al., 1995; Cremers et al., 1977; Homan and MacKay, 1987; Medlej et al., 2004; Simsek et al., 2003). Pour les femmes, la fonction ovarienne est normale avec seulement des ménarches retardées et des altérations du cycle menstruel rapportées chez les patientes (Lou Frances et al., 2008; Medlej et al., 2004).

L'hypofonction hypophysaire semble avoir une origine hypothalamique et comprend un déficit en hormone de croissance et une altération de la sécrétion de corticotrophine qui agit sur la production du cortisol (hormone du stress) par les glandes surrénales (Boutzios et al., 2011). La vitesse de croissance et le développement pubertaire doivent être soigneusement suivis.

8. Les anomalies additionnelles

Chez les patients, une atteinte respiratoire d'origine neurodégénérative est retrouvée, causant dans la plupart des cas une insuffisance respiratoire aiguë avec des apnées obstructives du sommeil souvent mortelles (Urano, 2016). Bien qu'encore mal documenté, le SW est associé dans certains cas à des anomalies cardiaques

telles que des tachycardies sinusales ou des arythmies ventriculaires et atriales, des troubles de la communication inter-auriculaire associée à une valvulopathie (Medlej et al., 2004; Mir et al., 2016). Par conséquent, une surveillance cardiaque est recommandée. Des troubles gastro-intestinaux sont également décrits tels que la gastroparésie, la dysmotilité et l'incontinence intestinale (Urano, 2016). Une perte du réflexe nauséux, une diminution du goût et de l'odorat, une hypotension orthostatique (baisse excessive de la pression artérielle en position debout), une anhidrose, une hypo/hyperhidrose (insuffisance ou excès de sécrétion de sueur, respectivement), et un trouble de la régulation thermique corporelle ont également été corrélés au SW (Chausseot et al., 2011).

III. La génétique du syndrome de Wolfram

1. La prévalence

Le SW est une maladie autosomique récessive très rare. Sa prévalence est de 1/770 000 au Royaume-Uni (Barrett et al., 1995), 1/710 000 au Japon (Matsunaga et al., 2014), 1/100 000 en Amérique du Nord (Fraser and Gunn, 1977) et 0.74/1 000 000 en Italie. Les prévalences les plus élevées sont retrouvées au Liban avec 1/68 000 (Medlej et al., 2004), ainsi que dans une petite région de Sicile (Italie) avec 1/54 478 (Lombardo et al., 2014), probablement dû aux taux élevés de consanguinité dans ces régions. Par ailleurs, la prévalence du SW chez des patients Libanais diagnostiqués comme ayant un diabète de type 1 a été estimée à 4.8% (Medlej et al., 2004) contre 0.57% (Barrett et al., 1995) au Royaume-Uni. Le recensement du SW reste encore difficile car ce syndrome n'est d'ordinaire diagnostiqué qu'après l'apparition du deuxième symptôme, bien souvent lors du début de la deuxième décennie du patient, et ceci plusieurs années après l'apparition du diabète sucré qui apparaît

majoritairement au cours de l'enfance (Barrett et al., 1995). Les patients sont souvent initialement diagnostiqués à tort comme ayant un diabète de type 1 (Zmyslowska et al., 2014).

2. Le syndrome de Wolfram de type 1, le gène *WFS1*

a) Structure de *WFS1* et de la wolframine

Plus de 90% des patients atteints de SW ont le syndrome de Wolfram de type 1 (SW1), causé par des mutations des deux allèles du gène nucléaire *WFS1*. Le gène *WFS1*, situé sur le chromosome 4p16, se compose de 8 exons (33.4 Kb d'ADN génomique) (Figure 4A) et code une glycoprotéine hydrophobe de 890 acides aminés, la wolframine. L'exon 1 est non codant, les exons 2 à 7 sont de petits exons codants et le plus grand exon, l'exon 8, mesure 2.6 Kb. La wolframine (100 KDa) est composée d'un domaine central hydrophobe de 9 segments transmembranaires dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et de 2 domaines hydrophiles à ses extrémités N et C terminales (Hofmann et al., 2003; Inoue et al., 1998) (Figure 4B).

WFS1 possède un homologue dans une grande variété d'organismes tels que l'Homme, le singe, le chien, le bœuf, le poisson zèbre, le Xénope, la souris, le rat et la poule. La séquence d'acides aminés est homologue à 86% entre l'Homme et la souris, 57% avec le poisson zèbre et 25% avec la drosophile.

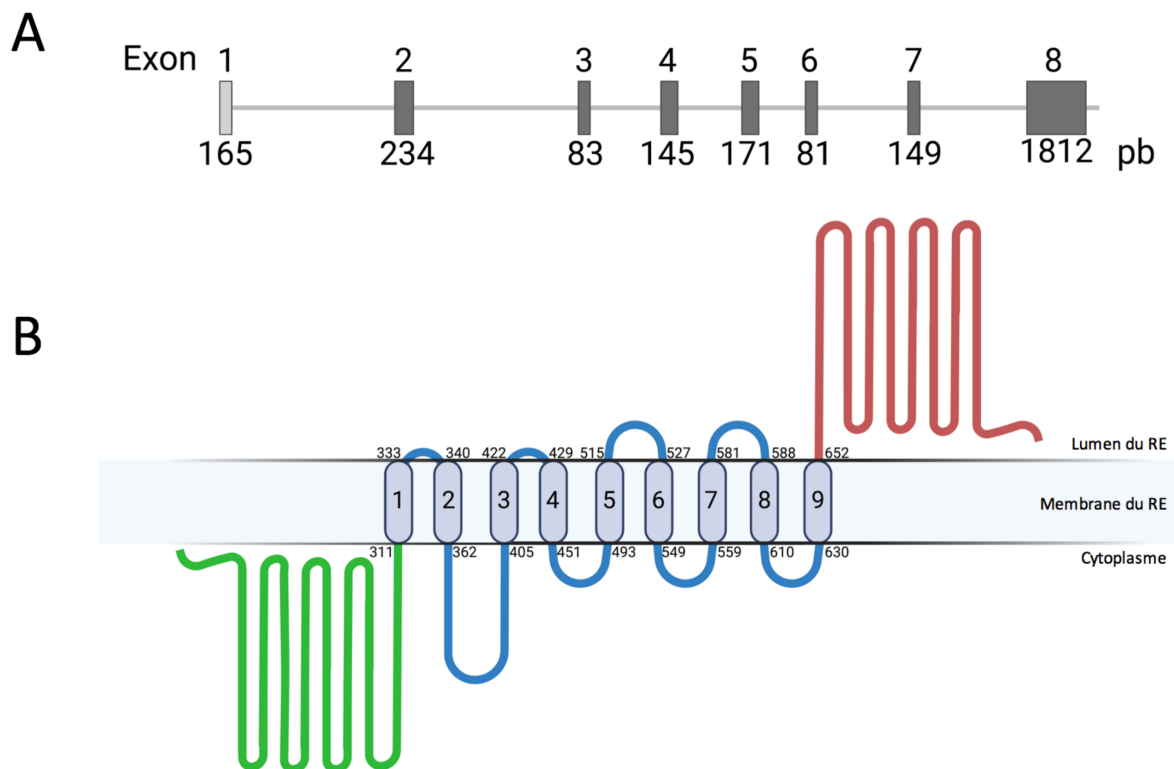


Figure 4. *WFS1* et la wolframine. (A) Le gène *WFS1* contenant huit exons, et le nombre de paires de bases (pb) de chaque exon est représenté ; l'exon 1 n'est pas codé. (B) Structure de la wolframine avec les emplacements des neuf domaines transmembranaires représentés par des ovales bleus. Les nombres représentent les résidus d'acides aminés. La partie verte et rouge de la protéine indique les extrémités N et C-terminales, respectivement. Adapté de (Hu et al., 2021).

b) Mutations de *WFS1*

Les analyses génétiques chez les patients atteints du SW ont permis d'identifier un large éventail de mutations (de Heredia et al., 2013).

Chez de nombreux patients ont été trouvées des mutations de perte de fonction telles que des mutations stop, des mutations par décalage du cadre de lecture du gène et des sites d'épissage, et des mutations faux-sens (Gómez-Zaera et al., 2001; Hardy et al., 1999; Inoue et al., 1998; S. Bretschger et al., 2002; Strom et al., 1998) entraînant une déplétion de l'ARNm ou de la wolframine, ou son expression défectueuse (de Heredia et al., 2013). Une distribution aléatoire des mutations de *WFS1* dans toute la séquence codante a été révélée (Khanim et al., 2001), bien que d'autres études ont montré une concentration dans l'exon 8 (Colosimo et al., 2003; Gasparin et al., 2009; Hardy et al., 1999; Inoue et al., 1998; Strom et al., 1998).

La majorité des mutations ont un mode de transmission autosomique récessif, mais des mutations autosomiques dominantes sont également à l'origine du *Wolfram-like syndrome*, et d'autres de surdités non-syndromiques (Fukuoka et al., 2007). Les patients atteints de *Wolfram-like syndrome* développent une perte progressive de l'audition, une atrophie optique et/ou une diminution de la régulation du glucose (Eiberg et al., 2006; Fujikawa et al., 2010; Gürtler et al., 2005; Hogewind et al., 2010; Rendtorff et al., 2011), notamment par la mutation faux-sens E864K présente dans l'exon 8 (Eiberg et al., 2006). Certains patients développent également des troubles psychiatriques (Eiberg et al., 2006; Fukuoka et al., 2007; Rigoli and Di Bella, 2012; Valéro et al., 2008). La surdité autosomique dominante non syndromique 6 (*Autosomal dominant nonsyndromic hearing loss 6, DFNA6*) est caractérisée par une perte auditive non-syndromique (c'est-à-dire que le déficit auditif est le seul signe clinique observé) touchant les basses fréquences (Bramhall et al., 2008; Chausseot et al., 2015; Gonçalves et al., 2014; Kunz et al., 2003; Lesperance et al., 2003; Noguchi et al., 2005; Sun et al., 2011; Young et al., 2001).

c) Localisation subcellulaire de la wolframine

La wolframine est exprimée au niveau du RE (Takeda et al., 2001) mais pas seulement car elle est également retrouvée dans la membrane de neuroblastomes humains (Gharanei et al., 2013) et des granules sécrétoires de cellules β pancréatiques de souris (Hatanaka et al., 2011). De plus, des études immunohistochimiques et d'hybridation *in situ* dans l'oreille interne de souris ont révélé que la wolframine réside également dans le réticulum canaliculaire (Cryns et al., 2003a), une forme spécialisée de RE, qui est impliqué dans les mouvements transcellulaires des ions pour le maintien de l'homéostasie cellulaire de l'oreille interne.

d) Pattern d'expression de *WFS1* chez l'Homme

L'expression de la wolframine est distribuée dans de nombreux organes, avec différents niveaux de localisation et d'expression tissulaire et cellulaire. Au stade fœtal (15 semaines), *WFS1* est faiblement exprimé mais augmente progressivement dans le temps pour atteindre un niveau d'expression stable après la maturité sexuelle (De Falco et al., 2012). *WFS1* est exprimé de manière ubiquitaire chez l'Homme, mais des niveaux d'expression particulièrement élevés sont observés dans une variété de tissus tels que les organes reproducteurs, les poumons, la vessie, le tissu adipeux, le cœur, le cerveau, le pancréas, les muscles striés et lisses (De Falco et al., 2012; Hofmann et al., 2003; Strom et al., 1998). Au niveau de l'œil, l'expression de *WFS1* a été relevée dans les CGR, dans les différentes couches du nerf optique et dans l'épithélium pigmentaire chez l'Homme et sur un modèle primate de type *Macaca fascicularis* (Schmidt-Kastner et al., 2009; Yamamoto et al., 2006).

e) Régulation du stress du réticulum endoplasmique par *WFS1*

e.1. Le stress du réticulum endoplasmique

Le RE est un organite cellulaire pour la survie des cellules, jouant un rôle essentiel dans la synthèse, le repliement, l'assemblage et la modification des protéines transmembranaires ou sécrétoires (Braakman and Balleid, 2011; Schwarz and Blower, 2016). L'équilibre de ce système est fragile et peut être perturbé par des processus physiologiques tels que la biosynthèse post-prandiale, ou pathologiques telles qu'une carence calcique dans le RE, l'hypoxie, le stress oxydatif, la malnutrition, les agents pathogènes infectieux, les cancers, les troubles neurodégénératifs et les maladies métaboliques (Kitamura, 2013; Oakes and Papa, 2015; Wang and Kaufman, 2014). L'accumulation de protéines mal repliées à l'intérieur de la lumière du RE ne pouvant

pas être traitée par la voie sécrétoire, une réponse adaptative cellulaire, appelée *Unfolded Protein Response* (UPR), est alors activée afin de : (1) diminuer la biosynthèse des protéines pour réduire l'accumulation de celles-ci dans le RE, (2) augmenter la biosynthèse de protéines impliquées dans les processus de dégradation des protéines associées au RE (*ER-associated degradation*, ERAD) et (3) augmenter la biosynthèse de protéines chaperonnes permettant de prévenir les dommages cellulaires et les mécanismes apoptotiques (Ariyasu et al., 2017; Han et al., 2009; Rutkowski and Kaufman, 2007).

Cependant, en condition pathologique avec un stress du RE chronique et élevé, l'UPR est incapable de réduire le stress et de récupérer l'homéostasie cellulaire, amenant à des dommages irréversibles et à l'apoptose (Riahi et al., 2018; Rouzier et al., 2017; Toppings et al., 2018).

Trois voies de signalisation sont impliquées dans l'UPR et sont initiées par la dissociation de *Binding immunoglobulin Protein* (BiP) de trois effecteurs, nommés *RNA-activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticular kinase* (PERK), *Inositol-Requiring Kinase 1* (IRE1) et *Activating Transcription Factor 6* (ATF6) (Bertolotti et al., 2000; Schröder and Kaufman, 2005) (Figure 5).

À l'état basal, ces trois protéines transmembranaires sont liées par leur partie luminale à BiP et sont inactives (Bertolotti et al., 2000; Shen et al., 2002). Lors d'un stress, BiP se dissocie de PERK, ATF6 et IRE1, entraînant leur activation (Almanza et al., 2019).

La protéine IRE1 s'oligomérisse, induisant l'autophosphorylation de son domaine cytosolique (Shamu and Walter, 1996). IRE1 α activé reconnaît la structure tige-boucle de l'ARNm de XBP1 contenant une séquence consensus (5'-CUGCAG-3') et induit un épissage en clivant 26 nucléotides introniques (531–556), formant un ARNm actif pour

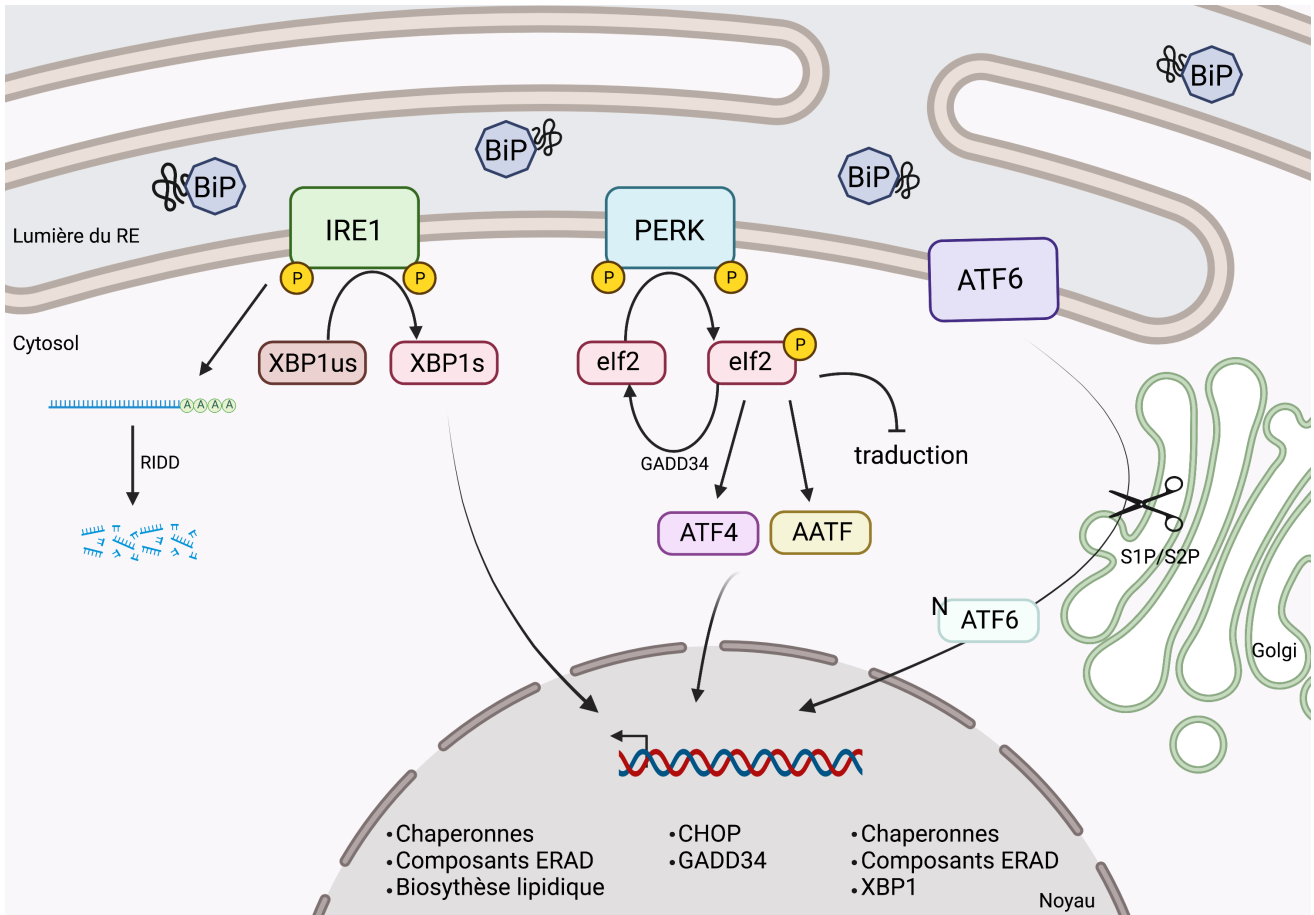


Figure 5. Les voies de signalisation de l'UPR. Les voies de signalisation de l'UPR sont médiées par 3 protéines transmembranaires du RE : IRE1, PERK et ATF6. En l'absence de stress du RE, BiP se lie au domaine luminal des 3 protéines et inhibe leur activation. Cependant, lors d'un stress induit par l'accumulation de protéines mal repliées, BiP se dissocie de ces protéines transmembranaires, entraînant par la suite une pléiade d'activation de gènes, permettant in fine la restauration de l'homéostasie cellulaire.

la transcription, appelé XBP1s. XBP1s se déplace alors vers le noyau cellulaire et favorise l'expression d'une variété de gènes cibles de l'UPR, y compris les composants d'ERAD, les protéines chaperonnes et les enzymes biosynthétiques lipidiques, afin de restaurer l'homéostasie des protéines et favoriser la cytoprotection. En raison de son activité endonucléasique, IRE1 induit la dégradation des ARNm localisés dans la membrane du RE afin de diminuer leur traduction par un mécanisme appelé *Regulated-IRE1 Dependent Decay* (RIDD) (Coelho and Domingos, 2014).

La protéine PERK, quant à elle, se dimérise et subit une trans-autophosphorylation. Une fois phosphorylée, PERK phosphoryle *eukaryotic Initiation translation Factor 2 α* (eIF2 α), induisant sous cette forme l'atténuation de la traduction

générale des protéines afin de diminuer l'activité biosynthétique du RE et ainsi protéger la cellule de l'apoptose (Martindale et al., 2006; Schroder and Kaufman, 2006). Cependant, la traduction de certains ARNm est augmentée tels que ceux codant pour *Activating Transcription Factor 4* (ATF4) (Lu et al., 2004), ou encore *Apoptosis Antagonizing Transcription Factor* (AATF) (Bruno et al., 2006, 2008; Ishigaki et al., 2010). ATF4 induit l'activation de gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des acides aminés, l'autophagie, la biosynthèse du glutathion, mais induit également ATF3 et *C/EBP homologous protein* (CHOP) (Harding et al., 2003).

Après la restauration du stress du RE, *Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein* (GADD34) interagit avec *protein phosphatase 1* (PP1) pour induire la déphosphorylation de eIF2 α , restaurant la traduction des protéines (Harding et al., 2009; Novoa et al., 2001).

ATF6 est transloqué de la membrane du RE vers l'appareil de Golgi, où il est clivé en deux sites par *site protease-1* (S1P) et 2 (S2P) (Ye et al., 2000). Son domaine N-terminal se transloque vers le noyau cellulaire et favorise l'expression de gènes codant des protéines chaperonnes (HSPA5, HSP90B1 et CALR), des composants ERAD et *X-box binding protein 1* (XBP1) afin d'améliorer la capacité de repliement, de traitement et de dégradation des protéines (Haze et al., 1999; Yoshida et al., 2000).

e.2. *WFS1* et le stress du RE

C'est en 2005 qu'est mis en évidence l'implication de *WFS1* dans l'homéostasie du RE. En effet, il a été montré dans des cellules β pancréatiques de souris, une augmentation des voies PERK et IRE1 α en absence de *WFS1* (Fonseca et al., 2005). Par ailleurs, le stress du RE augmente l'expression de *WFS1* (Ueda et al., 2005).

Localisé à la membrane du RE, WFS1 a une fonction dans l'homéostasie du RE en tant que régulateur négatif des voies UPR (Figure 6). En condition physiologique, WFS1 régule le niveau d'expression protéique d'ATF6 par l'intermédiaire de *E3 HydroxyMethyl Glutaryl-Coenzyme A reductase degradation protein 1* (HRD1), une ligase E3, en l'amenant à la dégradation par le protéasome (Takeda et al., 2001). La forme clivée d'ATF6 se transloque vers le noyau et sa forme non clivée est dégradée (Fonseca et al., 2010; Osowski and Urano, 2011).

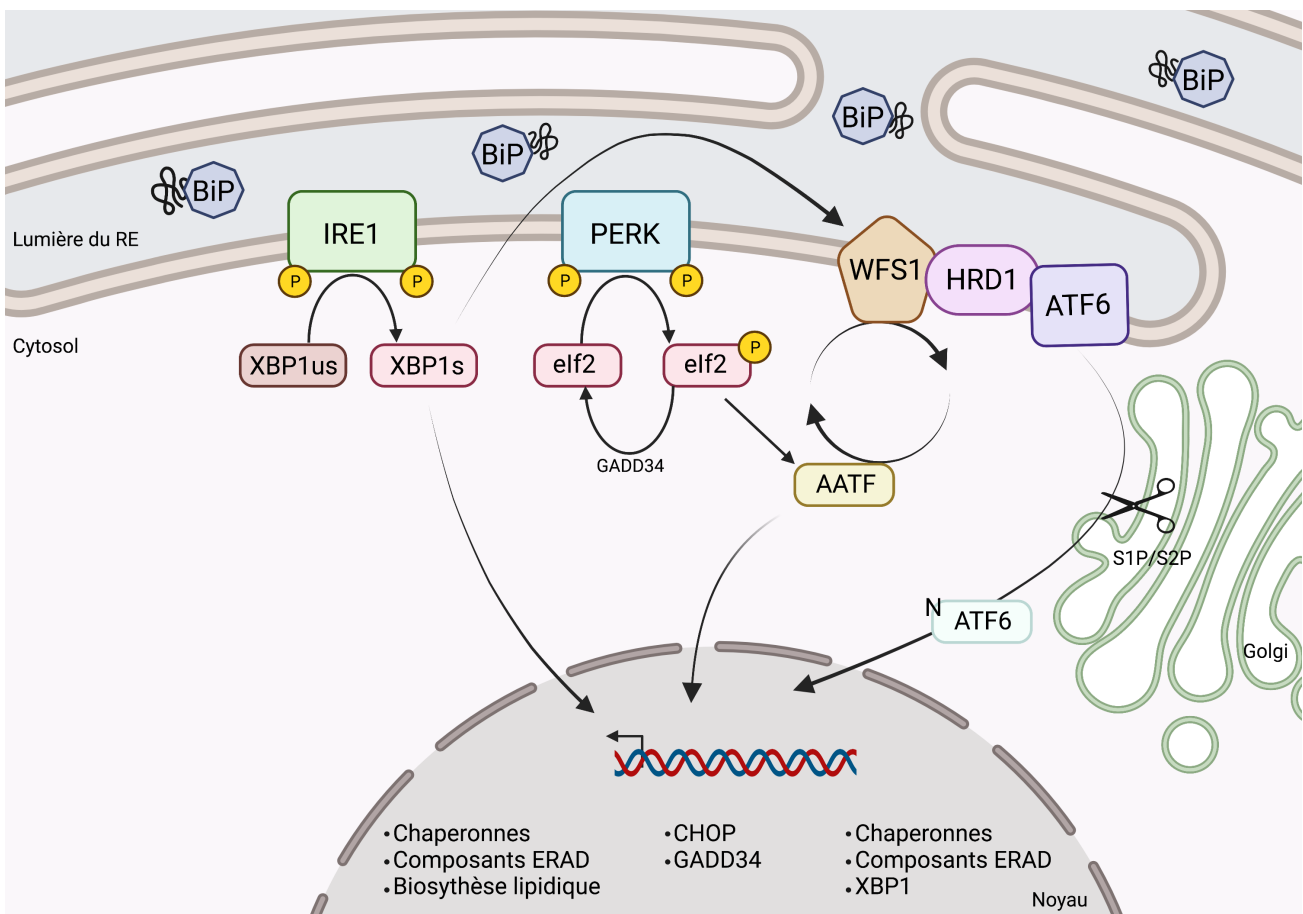


Figure 6. La régulation négative des voies de l'UPR par WFS1. En condition physiologique, WFS1 recrute le facteur de transcription ATF6 par l'intermédiaire de HRD1 et mène ATF6 à la dégradation protéasomique. En condition de stress du RE, ATF6 se dissocie de WFS1 et subit une protéolyse, et sa partie amino soluble migre vers le noyau cellulaire, où il régule à la hausse les gènes cibles du stress RE, tels que BiP, CHOP et XBP1. En condition pathologique, WFS1 n'est plus fonctionnel, ATF6 échappe donc à la dégradation, entraînant une hyperactivation chronique de la voie ATF6 menant à l'apoptose. AATF est induit par la voie PERK et active la transcription du gène *Akt1*, conférant aux cellules une résistance au stress du RE. Egalement, une diaphonie positive entre les voies AATF et WFS1 permet un cycle d'équilibre apoptotique. Enfin, *WFS1* a une séquence de type *ER stress response element* (ERSE) dans son promoteur et XBP1 régule indirectement l'expression de *WFS1* via ce motif. Image adaptée de (Ishigaki et al., 2010).

En condition de stress du RE, ATF6 se détache de WFS1 et régule les gènes cibles de la signalisation du stress du RE dans le noyau cellulaire. Une fois l'homéostasie cellulaire restaurée, l'expression de WFS1 est alors induite, provoquant une dégradation d'ATF6 (Osowski and Urano, 2011).

Des études menées sur des cellules issues de patients atteints du SW ou de souris *Wfs1*^{-/-} ont montré que la perte de fonction de WFS1 mène à ce qu'ATF6 ne soit plus dégradé par le protéasome, conduisant alors à une hyperactivation de la voie d'ATF6 quelles que soient les conditions de stress (Fonseca et al., 2010). ATF6 active donc constamment les gènes qui favorisent l'apoptose cellulaire tels que *Xbp1s*, *Atf4* et *Chop* et diminue l'expression des gènes de l'insuline menant donc à la mort des cellules β pancréatiques. En condition physiologique, l'expression de WFS1 est induite lors de la sécrétion d'insuline, suggérant que WFS1 est un composant important du repliement de la proinsuline et de son traitement dans le RE des cellules β pancréatiques (Fonseca et al., 2005, 2009; Lipson et al., 2006).

Par ailleurs, il a été montré un lien étroit entre les voies de signalisation WFS1, AATF et un cycle auto-entretenu de mort cellulaire (Ishigaki et al., 2010). En effet, AATF favorise la prolifération cellulaire en régulant la transcription de facteurs de survie cellulaire (p53 et XIAP) (Bruno et al., 2006, 2008). Il est montré que l'expression de WFS1 est diminuée dans les cellules AATF-*Knockout* (KO) (Ishigaki et al., 2010) et en utilisant une analyse par puce à ADN dans des cellules SH-SY5Y transfectées avec un vecteur exprimant XBP1, il a été prouvé que XBP1 est important dans l'activation du promoteur de *WFS1* (Kakiuchi et al., 2006, 2009). L'ajout de l'expression de l'AATF à l'expression de XBP1 améliore donc l'activité du promoteur de *WFS1*, montrant que le déficit en WFS1 en condition pathologique atténue la voie AATF et serait impliqué dans la mort des cellules β pancréatiques (Ishigaki et al., 2010). Enfin, l'activation de

l'autophagie en réponse à l'activation des voies de régulation du stress du RE est mis en place afin de le stabiliser (Crouzier et al., 2022a).

f) Régulation du transfert calcique mitochondrial

f.1. L'homéostasie calcique cellulaire

Au sein des cellules eucaryotes, la concentration cytosolique de calcium (Ca^{2+}) est étroitement contrôlée par des interactions complexes entre les pompes, les canaux, les échangeurs et les protéines de liaison, et des changements relativement faibles de sa concentration contrôlent un très grand nombre de processus biologiques, tels que la contraction musculaire, la mémorisation, la fertilisation, la sécrétion, la transcription des gènes, l'autophagie, le trafic cellulaire, le métabolisme, la prolifération et différenciation cellulaire ou encore l'apoptose (Berridge et al., 2000; Clapham, 2007).

L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire peut être provoquée par deux mécanismes fondamentaux : la mobilisation du Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires du RE, ou l'entrée du Ca^{2+} venant du milieu extracellulaire (Figure 7).

Un des éléments de la voie de signalisation calcique dépendante d'IP₃, induisant la mobilisation du Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires, est une protéine transmembranaire du RE, le récepteur de l'inositol-1,4,5 triphosphate (IP₃R). Lorsque des agonistes solubles extracellulaires se lient aux récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (RTK) et aux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), la phospholipase C (PLC) s'active et catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et IP₃. La liaison d'IP₃ à son récepteur induit son ouverture et la libération de Ca^{2+} du RE dans le cytosol.

Les récepteurs ionotropiques, sensibles à un ligand, sont des protéines membranaires qui ouvrent un canal ionique grâce à la liaison d'un messenger chimique ou un neurotransmetteur. Pour exemple, le récepteur au glutamate de type acide N-méthyl-D-aspartique (RNMDA) est un récepteur ionotrope qui joue un rôle important dans la régulation de la transmission synaptique excitatrice rapide et de la neuroplasticité dépendante de l'activité (Dingledine et al., 1999). Ces canaux sont

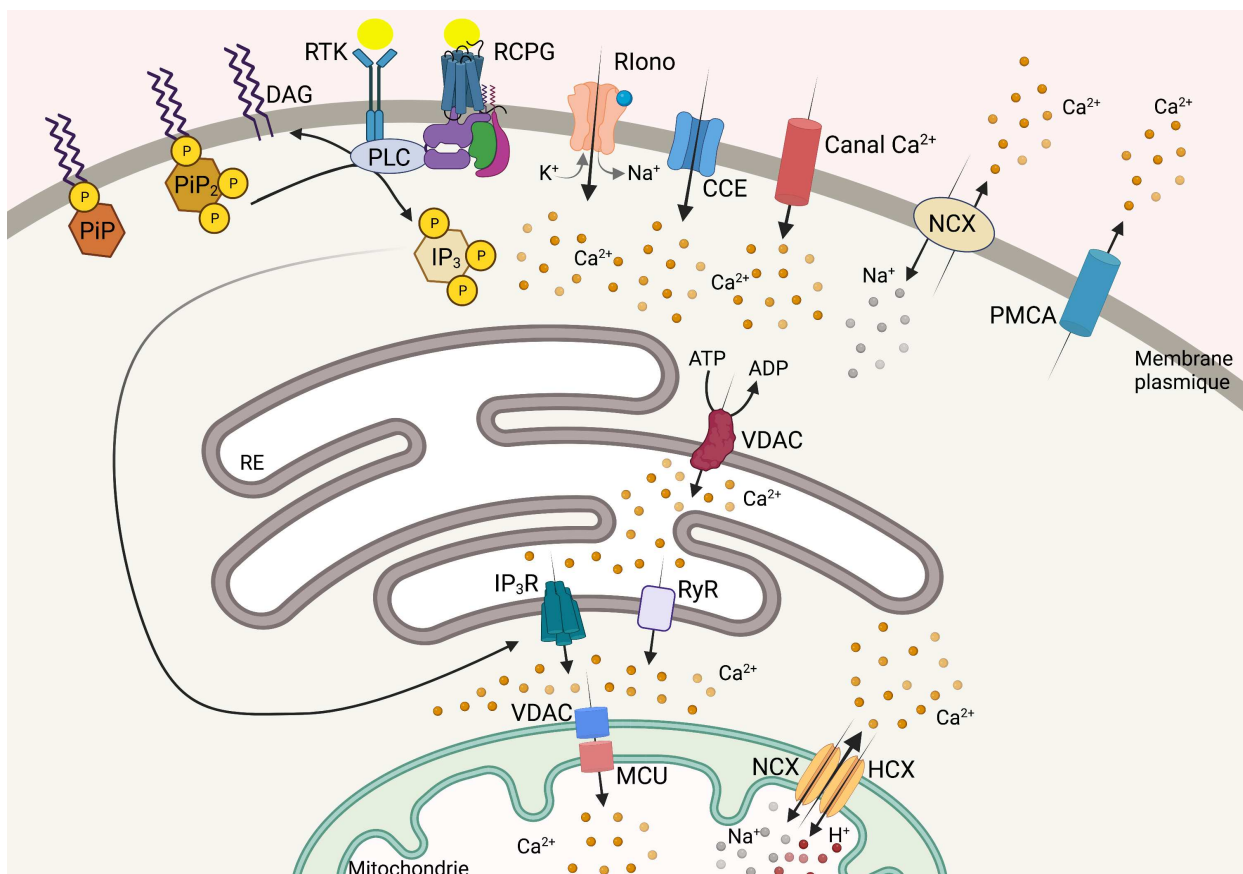


Figure 7. L'homéostasie calcique. L'homéostasie du Ca^{2+} est régulée par des mécanismes d'influx et d'efflux. Suite à la liaison du ligand à RCPG et RTK, l'activation de la PLC déclenche la production d'IP₃ et de DAG à partir de PIP₂. IP₃ se lie aux récepteurs IP₃ au niveau de la membrane du RE et ainsi le Ca^{2+} est libéré dans le cytosol. Inversement, le Ca^{2+} présent dans le cytosol entre dans le RE par la SERCA. Le Ca^{2+} entre dans la matrice mitochondriale via VDAC puis MCU et sa sortie dépend des échangeurs NCX et HCX. Les ions Ca^{2+} sont représentés par des points oranges, les ions Na^{2+} par des points gris et les ions H^{+} par des points rouges. Le ligand présent dans le milieu extracellulaire est représenté par des boules jaunes. Abréviations : PiP, Phosphatidylinositol 4,5-phosphate ; PIP₂, Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ; DAG, diacylglycerol ; RTK, récepteur tyrosine kinase ; RCPG, Récepteur couplé aux protéines G ; PLC, phospholipase C ; CCE, entrée capacitive de calcium ; PMCA, membrane plasmique Ca^{2+} ATPase ; RE, réticulum endoplasmique ; MCU, uniporteur de calcium mitochondrial ; Riono, récepteur ionotrope ; VDAC, canal anionique dépendant de la tension ; ATP, adénosine triphosphate ; ADP, adénosine diphosphate ; MCU, absorption de calcium mitochondrial ; IP₃R, récepteur inositol-1,4,5-triphosphate ; NCX, échangeur $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$; HCX, échangeur $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$. Image adaptée de (Chami et al., 2007).

hautement perméables au Na^+ et au Ca^{2+} (Dingledine et al., 1999; Mayer and Westbrook, 1987; McBain and Mayer, 1994). L'activation des RNMDA peut produire une augmentation prolongée de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et déclencher des voies de signalisation en aval (Dingledine et al., 1999; Mody and MacDonald, 1995).

Le récepteur de la ryanodine (RyR) est une protéine transmembranaire située à la membrane du RE et est activée par la ryanodine et le Ca^{2+} . L'épuisement des réserves intracellulaire est suivi de l'afflux de Ca^{2+} dans la cellule par des canaux membranaires sélectifs pour Ca^{2+} , appelés *Capacity Calcium Entry* (CCE) (Putney, 1986).

La seconde voie induisant la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire implique l'ouverture des canaux Ca^{2+} de la membrane plasmique tels que les *Voltage-Operated Channels* (VOC) qui s'ouvrent suite à une diminution du potentiel membranaire (Bertolino and Llinas, 1992), les *Receptor-Operated Channels* (ROC) qui s'ouvrent suite à la liaison d'un ligand externe (McFadzean and Gibson, 2002) et les *Second Messenger-Operated Channels* (SMOC) qui s'ouvrent suite à la liaison d'un second messenger sur la surface interne de la membrane (Meldolesi and Pozzan, 1987).

Pour retrouver un niveau de calcium cytosolique initial, le Ca^{2+} est éliminé du cytosol par différentes voies notamment par *Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase* (SERCA) qui pompe le Ca^{2+} du cytosol vers le RE couplé à l'hydrolyse de l'ATP en ADP, *Plasma Membrane Calcium ATPase* (PMCA) qui pompe le Ca^{2+} du cytosol vers l'espace extracellulaire et *$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger* (NCX) faisant sortir le Ca^{2+} du cytosol vers le milieu extracellulaire. La mitochondrie peut accumuler du Ca^{2+} par l'intermédiaire de 2 protéines transmembranaires : *Voltage-Dependent Anion Channel* (VDAC) et *Mitochondrial Calcium Uniporter* (MCU). MCU est localisé au niveau de la

membrane interne de la mitochondrie (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011) et permet le passage du Ca^{2+} du cytosol dans les mitochondries. L'efflux calcique mitochondrial est induit par NCX et $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (HCX) en utilisant l'entrée de d'ions sodium (Na^+) et d'hydrogène (H^+) dans la mitochondrie pour faire sortir le Ca^{2+} de la mitochondrie vers le cytosol. Mais le rôle de la mitochondrie ne s'arrête pas à diminuer la surcharge en calcium cellulaire. En effet, l'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie et la faible affinité au calcium de MCU révèlent que cette efficacité d'entrée du Ca^{2+} dans la mitochondrie est favorisée par son emplacement stratégique à proximité de l'ouverture des canaux Ca^{2+} résidents du RE.

f.2. La communication RE-mitochondrie

Les membranes associées aux mitochondries (*Mitochondria-Associated ER Membranes*, MAM) sont des points de contacts entre le RE et les mitochondries (Ruby et al., 1969; Vance, 1990) hautement dynamiques, qui comprennent plus de 1000 protéines (Poston et al., 2013; Zhang et al., 2011) et participent à de multiples processus cellulaires tels la stabilisation structurelle des MAM, les échanges de phospholipides (Vance, 1990) et de Ca^{2+} (Carreras-Sureda et al., 2017; Hayashi and Su, 2007; Hayashi et al., 2009; Raturi and Simmen, 2013; Rizzuto et al., 1998, 2004; Walter and Hajnóczky, 2005). La synthèse et le transfert de différentes classes de lipides sont assurés par un contact étroit (10 nm) et des ponts protéiques entre le RE et la mitochondrie. En effet, la majorité des phospholipides membranaires sont synthétisés à la membrane du RE et distribués par la suite dans différents organites pour leur permettre de fonctionner. Des contacts un peu plus grands (20 nm) permettent des échanges calciques du RE vers la mitochondrie par IP3R et VDAC (Danese et al., 2017). Des études antérieures ont montré que VDAC est lié à IP3R via *Glucose-regulated protein 75* (GRP75), un membre de la famille des *heat shock*

protein 70 (HSP70), qui régule directement le transfert de calcium du RE vers les mitochondries (Szabadkai et al., 2006).

L'entrée de Ca^{2+} dans les mitochondries régule le métabolisme cellulaire par la stimulation de 3 enzymes clés du métabolisme mitochondrial : la cétoglutarate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase et la pyruvate déshydrogénase phosphatase (Hansford, 1994). La stimulation de ces enzymes augmente la production de NADH et FADH_2 , cofacteurs des enzymes des complexes de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, une activité accrue de la chaîne respiratoire et une augmentation du pompage de H^+ (Rizzuto et al., 2012).

Les MAM ont des fonctions cellulaires multiples, telles que le contrôle de la signalisation cellulaire (Mori et al., 2013), la bioénergétique mitochondriale (Rossi et al., 2019), l'autophagie (Hamasaki et al., 2013), et l'inflammasome (Sutterwala et al., 2014; Zhou et al., 2011). L'altération de la fonction des MAM est liée à un dysfonctionnement mitochondrial menant au développement de nombreux troubles neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer (MA) (Area-Gomez et al., 2012), la maladie de Parkinson (MP) (Ramalingam et al., 2019), la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Parakh and Atkin, 2021), la maladie de Huntington (MH) (Bezprozvanny and Hayden, 2004), ou encore l'homéostasie du glucose (Betz et al., 2013), la résistance à l'insuline (Tubbs et al., 2014), l'infection virale (Horner et al., 2011; Huang et al., 2012), le cancer (Bononi et al., 2013; Cerqua et al., 2010), l'obésité (Arruda et al., 2014). Pour exemple, *B-cell leukemia/lymphoma 2* (Bcl-2), une protéine présente au niveau de la membrane mitochondriale externe et des MAM, a pour fonction de favoriser la survie cellulaire en inhibant les protéines pro-apoptotiques. Dans le cas de la SLA, Bcl-2 interagit avec les *superoxide dismutase 1* ^{G37R} (SOD1^{G37R}), SOD1^{G41D} et SOD1^{G85R} mutantes *in vitro* et avec SOD1^{G93A} *in vivo*,

perturbant alors l'activité d'IP3R en diminuant les niveaux de Ca^{2+} du RE (Eckenrode et al., 2010; Pasinelli et al., 2004; Pedrini et al., 2010). Aussi, les mutants SOD1^{G93A} et SOD1^{G85R} se lient à VDAC, réduisant la conductance de VDAC dans les lysats de moelle épinière de rat (Israelson et al., 2010).

f.3. WFS1 et la régulation du transfert calcique mitochondrial

WFS1 est présent à la membrane du RE au niveau des MAM (Angebault et al., 2018; Delprat et al., 2019). Ces informations sont appuyées par de précédentes études de WFS1 menées sur des fibroblastes humains (Zhang et al., 2011), de cerveaux de souris (Poston et al., 2013) ou encore sur de cellules huh7 (Horner et al., 2011).

En condition physiologique, WFS1 interagit avec *Neuronal Calcium Sensor 1* (NCS1) (Angebault et al., 2018; Delprat et al., 2019) et prévient sa dégradation. Avec l'IP3R, ces 3 protéines membranaires forment un complexe dont la fonction est de faciliter le transfert de Ca^{2+} entre le RE et la mitochondrie via VDAC et MCU, pour *in fine* activer le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 8). Les mitochondries sont des organites essentiels pour le bon fonctionnement cellulaire. Leur activité notamment dans le système nerveux central est impliquée dans la différenciation neuronale, la neuroplasticité et la production de neurotransmetteurs (Caicedo et al., 2021) et à l'inverse leurs altérations fonctionnelles participent au développement de maladies neurodégénératives et aux altérations neurodéveloppementales (Khacho et al., 2019; Murphy and Hartley, 2018).

Dans le contexte pathologique du SW, les interactions structurelles entre le RE et les mitochondries sont réduites, ainsi que l'expression de NCS1 dans les fibroblastes de patients (Angebault et al., 2018). Dans cette même étude est montrée une altération du transfert calcique mitochondrial résultant de la diminution de la libération de Ca^{2+} dans le cytosol par le RE et/ou de la désorganisation structurelle des

MAM. Ces dérégulations sont directement liées à la diminution de l'expression de NCS1 chez les cellules dont WFS1 est non fonctionnel, entraînant une altération de l'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie, et menant *in fine* à un déficit de la fonction mitochondriale. En effet, certaines enzymes du cycle de Krebs ont besoin de Ca^{2+} pour générer les cofacteurs nécessaires aux complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et certains complexes eux-mêmes (complexes I, III et V) sont dépendants du Ca^{2+} (Angebault et al., 2018; Gogvadze et al., 2019; Nakamura et al., 2016).

g) Synthèse et sécrétion protéique

Comme rapporté précédemment, WFS1 est exprimé dans les granules sécrétoires d'insuline de cellules β pancréatiques de souris (Hatanaka et al., 2011) et participe au repliement et au traitement de la proinsuline dans le RE des cellules β pancréatiques (Fonseca et al., 2005). Il a été montré que la déficience en WFS1 était une conséquence directe de la perte des cellules β pancréatiques (Ishihara et al., 2004) et également une atteinte du nombre de granules sécrétoires et un défaut d'acidification expliquant le fait que la sécrétion d'insuline induite par le glucose est profondément altérée (Hatanaka et al., 2011). Pour réguler le pH des organites intracellulaires, certaines cellules expriment des V-ATPases au niveau de la membrane plasmique, où elles exercent des fonctions spécifiques telles que l'acidification rénale, la résorption osseuse, l'homéostasie du pH cytoplasmique et la maturation des spermatozoïdes (Forgac, 2007). WFS1 est capable d'interagir avec la pompe à protons V-ATPases par son extrémité N-terminale et une altération de l'expression de WFS1 diminue l'expression de celles-ci (Gharanei et al., 2013). Elles ont été impliquées dans un certain nombre de maladies humaines, notamment les maladies rénales, les maladies osseuses et les métastases tumorales. WFS1 interagit

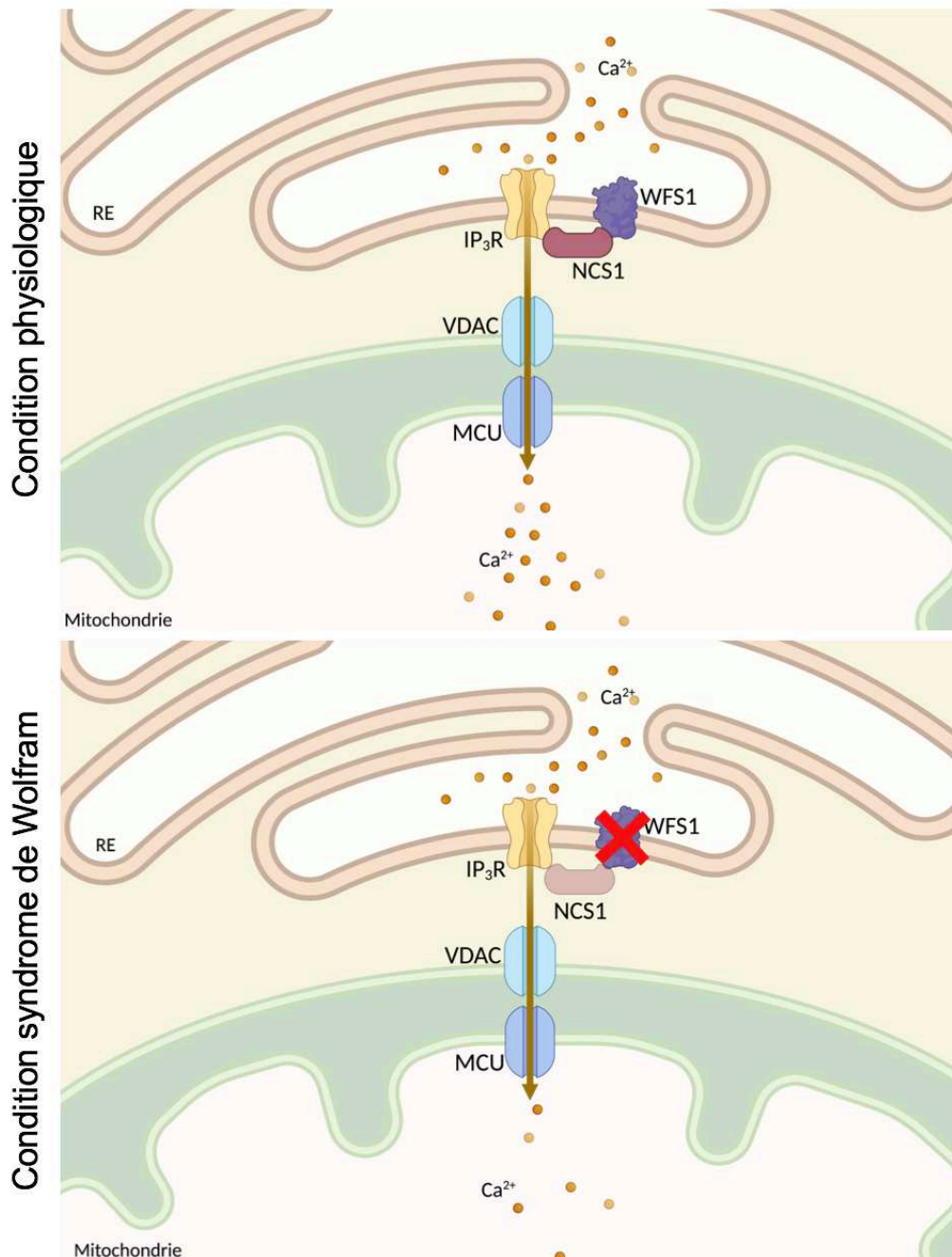


Figure 8. Altération mitochondriale induite par la perte de fonction de WFS1. En condition physiologique, WFS1 se lie à NCS1 pour former un complexe avec IP3R pour activer le transfert de Ca²⁺ entre le RE et la mitochondrie afin de promouvoir la fonction mitochondriale. Lorsque le complexe WFS1/NCS1/IP3R et VDAC sont fonctionnels, le Ca²⁺ est transféré de manière optimale du RE vers la mitochondrie et ainsi activer le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale. En condition SW, la perte de fonction de WFS1 entraîne la dégradation de NCS1, menant à un déficit du transfert de Ca²⁺ du RE vers la mitochondrie et *in fine* à une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale. Abréviations : RE, réticulum endoplasmique ; NCS1, *neuronal calcium sensor 1* ; IP3R, récepteur de l'inositol trisphosphate ; Ca²⁺, calcium ; MCU, uniporteur de calcium mitochondrial ; VDAC, *Voltage-dependent anion-selective channel*. Adapté de (Angebault et al., 2018).

également avec une autre pompe à proton, nommée ATPase Na⁺/K⁺ (Zatyka et al., 2008). C'est protéine transmembranaire dont l'activité enzymatique utilise l'énergie issue de la dégradation de l'ATP en ADP et phosphate inorganique pour transporter

des ions Na^+ et potassium (K^+) afin de maintenir le potentiel de repos des cellules nerveuses, musculaires et cardiaques, ou encore de rétablir l'équilibre initial après un potentiel d'action. Une diminution de l'expression de la ATPase Na^+/K^+ a été démontrée dans diverses affections notamment neurologiques (de Lores Arnaiz and Ordieres, 2014).

3. Le syndrome de Wolfram de type 2, le gène *CISD2*

Une plus petite fraction des patients sont atteints de la seconde forme du SW, le syndrome de Wolfram de type 2 (SW2), causée par des mutations du gène *CDGSH (Cys-Asp-Gly-Ser-His) iron-sulfur domain-containing protein 2 (CISD2)*. Les patients porteurs de la mutation du gène *CISD2* développent les mêmes symptômes que le SW1 sauf le diabète insipide, mais présentent d'autres symptômes, tels que des ulcérations gastro-intestinales profondes, des saignements et des troubles de la fonction plaquettaire (Amr et al., 2007; Mozzillo et al., 2014; Rondinelli et al., 2015).

a) Structure de *CISD2* et de ERIS

Le gène *CISD2*, situé sur le chromosome 4q24 (El-Shanti et al., 2000), se compose de 3 exons (23 Kb d'ADN génomique) (Figure 9A) et code pour une protéine de 135 acides aminés, ERIS (15 KDa), composée d'un unique domaine transmembranaire au RE, un domaine cytosolique CDGSH à l'extrémité C terminale, un cluster 2Fe-2S (Tamir et al., 2015) à activité redox, et de 2 domaines hydrophiles à ses extrémités N et C terminales (Figure 9B). Les domaines à doigts de zinc sont connus pour être capables de se lier aux acides nucléiques, aux lipides et aux protéines (Mackay and Crossley, 1998). Le gène *CISD2* possède un homologue dans une grande variété d'organismes tels que l'Homme, les insectes, les poissons, les amphibiens, les souris et les oiseaux (Chen et al., 2009a, 2010; Sengupta et al., 2018).

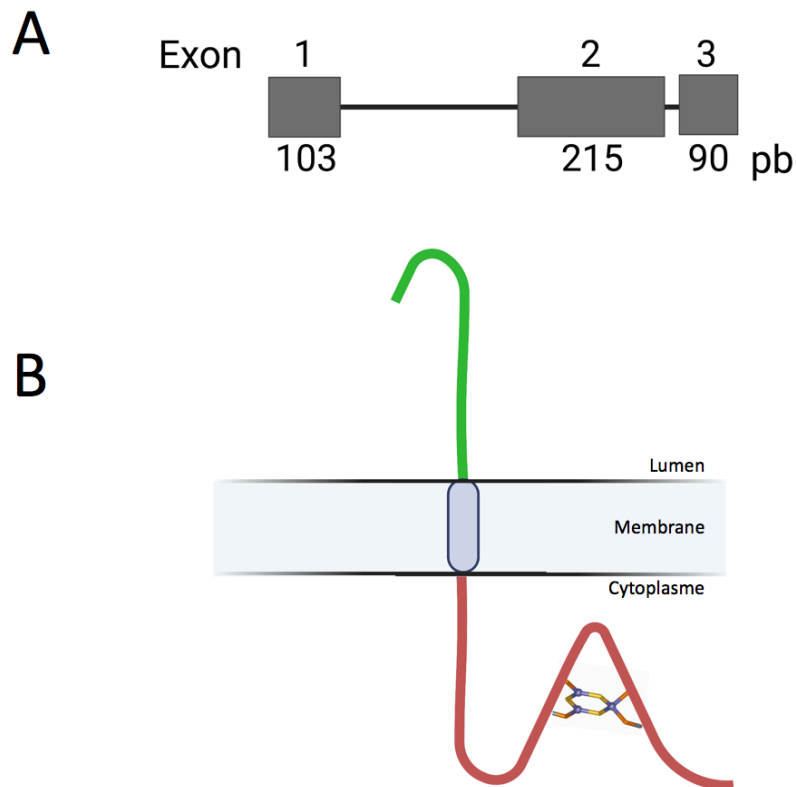


Figure 9. *CISD2* et ERIS. (A) Le gène *CISD2* contient 3 exons avec un nombre de pb défini. (B) Structure de la protéine ERIS avec un domaine transmembranaire représenté par un ovale bleu. La partie verte et rouge de la protéine indique les extrémités N et C terminales, respectivement. Un domaine CDGSH (Cys-Asp-Gly-Ser-His), contenant le motif 2Fe-2S, est présent dans l'extrémité C terminale de la protéine.

La séquence d'acides aminés est homologue à 96% entre l'Homme et la souris, à 98% avec le poisson zèbre et 71% avec la drosophile.

b) Mutations de *CISD2*

En condition physiologique, ERIS se localise à la membrane du RE, à la membrane externe de la mitochondrie mais aussi aux MAM (Puca et al., 2001; Shen et al., 2017; Wang et al., 2014). En condition SW, quatre mutations pathologiques dans *CISD2* ont été caractérisées. La mutation 1 (c.103 + 1G > A) aboutit à un épissage aberrant de l'ARN sautant l'exon 1 et introduisant un codon stop prématuré (Cattaneo et al., 2017; La Spada et al., 2018). La mutation 2 (c.109 G > C) aboutit à un épissage aberrant de l'ARN supprimant l'exon 2 et introduisant un codon stop prématuré dans

l'exon 3, conduisant finalement à une protéine tronquée avec seulement 25% du transcrit protéique (Amr et al., 2007) et l'élimination complète du motif 2Fe-2S. La mutation 3 (c.215 A > G) dans le domaine CDGSH mène à des altérations structurelles de la protéine (Rouzier et al., 2017). Enfin, la mutation 4 fait référence à une délétion génomique entraînant la délétion de l'exon 2 et éventuellement aussi d'une partie non connue de l'exon 3, conduisant à la non fonctionnalité du domaine CDGSH (Mozzillo et al., 2014).

Les patients atteints de SW2 présentent un diabète sucré juvénile, une atrophie optique, une surdité neurosensorielle une dilatation des voies urinaires, une fonction rénale altérée, un hypogonadisme et ulcère gastro-intestinal sévère, une tendance hémorragique significative mais pas de diabète insipide et une espérance de vie réduite (Al-Sheyab et al., 2001; Amr et al., 2007; El-Shanti et al., 2000).

c) Pattern d'expression de CISD2

CISD2 est exprimé de manière ubiquitaire, sous-tendant son rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire dans divers types de cellules et organes. Chez la souris, il a été montré que CISD2 est exprimée dans le cerveau, et plus précisément dans une grande variété de structures impliquées dans la mémoire, les émotions et la coordination motrice (Lein et al., 2007).

d) Fonctions de CISD2

CISD2 joue un rôle central dans la régulation de l'homéostasie mitochondrial, les échanges entre le RE et les mitochondries et dans l'activation de l'autophagie et de l'apoptose (Ait-Ei-Mkadem et al., 2017). En condition physiologique, CISD2 maintient la fonction mitochondriale, inhibe la production d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) et module l'homéostasie intracellulaire du

Ca²⁺ en préservant l'activité de la SERCA, essentielle au transport de Ca²⁺ du cytosol vers le RE et *in fine* à l'homéostasie cellulaire globale. En condition pathologique, le déficit en CISD2 perturbe notamment l'homéostasie du Ca²⁺, la communication entre le RE et les mitochondries et augmente le niveau de ROS. Ces altérations affectent *in fine* la survie cellulaire et induisent l'apoptose (Shen et al., 2021).

Au niveau cellulaire, la perte de fonction de CISD2 accélère la mort des cellules neuronales dans un modèle de souris transgénique développant la MA (Chen et al., 2020), et également provoque une insuffisance cardiaque et une arythmie (Yeh et al., 2019), entraîne une stéatose hépatique et une stéatohépatite non alcoolique (Shen et al., 2017), une dégénérescence des muscles et une sarcopénie (Wu et al., 2012).

Par ailleurs, les altérations fonctionnelles de CISD2 sont associées à divers cancers tels que le cancer du sein, (Darash-Yahana et al., 2016; Sohn et al., 2013), le cancer du col de l'utérus (Liu et al., 2014), le cancer gastrique (Wang et al., 2016) et le carcinome épidermoïde du larynx (Yang et al., 2016).

Enfin, CISD2 est impliquée dans l'espérance de vie. En effet, des souris CISD2 KO de 8 semaines ont montré une sénescence précoce et un vieillissement prématuré, accompagnés d'une dégénérescence cornéenne, des os et des poils plus fins et une diminution de la masse musculaire (Chen et al., 2010). Des études *in vitro* ont révélé que CISD2 est une protéine de la membrane mitochondriale externe. Ainsi, une déficience en protéine CISD2 conduit à une dégénérescence mitochondriale, et les mitochondries endommagées semblent induire une autophagie afin que les organites dysfonctionnels soient éliminés (Chen et al., 2009b, 2009a).

V. Les stratégies thérapeutiques dans le SW1

Le SW est un trouble systémique causé par un dysfonctionnement du RE et des mitochondries sans aucun traitement disponible actuellement pour retarder ou encore stopper la progression des différents symptômes. Cependant, de nombreuses pistes thérapeutiques sont actuellement suivies, donnant espoir aux patients et à la communauté scientifique quant à un futur traitement (Figure 10).

La mutation de *WFS1* entraîne la production d'une protéine non fonctionnelle, menant à des déficits de transfert calcique et de régulation du stress du RE.

- Une des stratégies thérapeutiques est d'optimiser la structure de la wolframine mutée produite par des traitements avec des molécules chaperonnes telles **l'acide 4-phénylbutyrique (PBA)** et **l'acide tauroursodésoxycholique (TUDCA)**. En effet, une étude révèle un taux d'insuline plus faible et une activité accrue des voies UPR chez des cellules productrices d'insuline issues de fibroblastes de patients atteints du SW, et ces déficits sont restaurés par ces 2 molécules chaperonnes (Shang et al., 2014).

- La seconde stratégie est de cibler la dérégulation de l'homéostasie calcique. Pour cela, des stabilisateurs de transfert calcique ont été testés. Dans le SW, l'activité des calpaïnes est stimulée, dû à une augmentation en Ca^{2+} cytosolique. Des cellules pancréatiques de rats *Wfs1^{KO}* traitées avec un **inhibiteur de la calpaïne XI** (*Calpain Inhibitor XI*) ou l'**Ibudilast**, voient leur niveau de Ca^{2+} cytosolique se stabiliser, ainsi que leur viabilité et la sécrétion d'insuline (Nguyen et al., 2020). À l'origine, l'Ibudilast permet de traiter des maladies des voies respiratoires pulmonaires, y compris la maladie pulmonaire obstructive chronique et l'asthme (Kawasaki et al., 1992).

Molécules chaperonnes

PBA et TUDCA (Shang et al., 2014; Abreu et al., 2019)
Stabilisation de la conformation de WFS1, amélioration du trafic de la Wolframine mutée, suppression de l'aggrégation de protéines mal repliées

Stabilisateurs du transfert calcique

-Calpain inhibitor XI (Nguyen et al., 2020)
Stabilisation du niveau de Ca^{2+} cytosolique
-Dantrolène (Kim et al., 2011; Lu et al., 2014)
Blocage du récepteur à la ryanodine menant à la stabilisation du niveau de Ca^{2+} du RE
-Ibutilast (Benbow et al., 2012; Pallotta et al., 2019; Nguyen et al., 2020)
Blocage du clivage de l'AMPc, qui interagit avec la voie du calcium et normalisation des taux de Ca^{2+} par interaction avec NCS1
-Pioglitazone (Akiyama et al., 2009)
Stabilisation de la libération de Ca^{2+} par inhibition de l'IP3R
-Rapamycine (Hara et al., 2013)
Réduit le Ca^{2+} cytoplasmique comme le Pioglitazone
-Carbachol (Toots et al., 2018)
Mobilisation des réserves intracellulaires de Ca^{2+} et augmentation de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose

Thérapie génique

-Transfection virale de WFS1 WT (Iway et al., 2006)
Expression de WFS1 WT dans les cellules endommagées afin de produire la Wolframine non mutée

Régulateurs du stress du RE

-Acide valproïque (Kakiuchi et al., 2009; Zhang et al., 2011, 2012; Sun et al., 2016; Li et al., 2017)
Favorisation de l'expression de WFS1 et protection contre l'apoptose
-Liraglutide (Danielpur et al., 2016; Kondo et al., 2018; Toots et al., 2018)
Activation de la voie PERK-ATF4 et atténuation de l'apoptose liée à la dérégulation du stress du RE

Modulateur mitochondrial

-Surexpression de NCS1 (Angebault et al., 2018)
Restauration de l'interaction RE-mitochondrie, du transfert de Ca^{2+} et de la fonction mitochondriale

Médecine régénératrice

-Thérapie de remplacement cellulaire (Urano et al., 2014)
Remplacement des tissus endommagés par la mutation de WFS1 (iPSC)
-MANF (Yagi et al., 2020)
Introduction d'une activité cytoprotectrice dans les cellules endommagées pour supprimer la neurodégénérescence

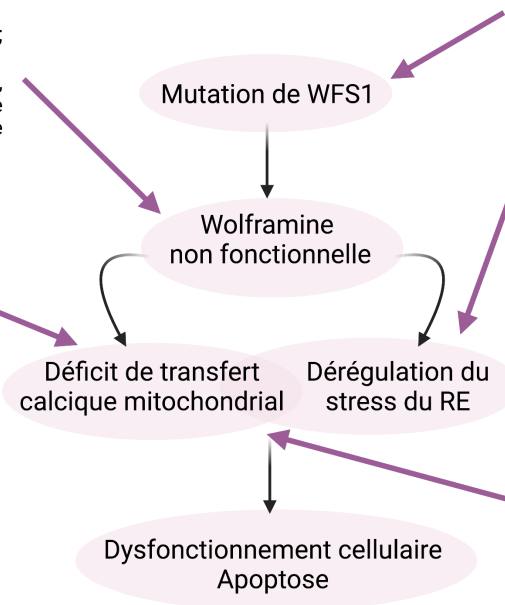


Figure 10. Stratégies thérapeutiques pour traiter le SW. La frise centrale décrit les différentes étapes physiopathologiques du SW. Les stratégies thérapeutiques pointent par des flèches le déficit qu'elles ciblent respectivement. Abréviations : WT, allèle sauvage ; RE, réticulum endoplasmique ; iPSC, cellule souche pluripotente induite ; NCS1, *Neuronal Calcium Sensor 1* ; MANF, *Mesencephalic Astrocyte-derived Feurotrophic Factor* ; IP3R, récepteur à l'IP3 ; PBA, 4-phenylbutyrate ; TUDCA, acide tauroursodeoxycholique. Adapté de (Abreu and Urano, 2019).

C'est un inhibiteur non sélectif de la phosphodiesterase 4 (PDE4), avec pour action de bloquer le clivage de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Gibson et al., 2006) impliquée dans la sécrétion d'insuline des cellules β pancréatiques (Landa et al., 2005). Egalement, l'Ibutilast normalise les niveaux de Ca^{2+} par interaction avec NCS1 (Benbow et al., 2012; Nguyen et al., 2020) et rétablit ainsi l'homéostasie cellulaire.

Le **dantrolène** agit également comme stabilisateur des niveaux de Ca^{2+} du RE en bloquant les récepteurs de la ryanodine (Paul-Pletzer et al., 2001), canaux calciques de la membrane du RE stimulant la sortie de Ca^{2+} vers le cytosol (Luciani et

al., 2009; Wei and Perry, 1996). Dans un contexte SW, le dantrolène prévient la mort cellulaire dans les cellules neuronales progénitrices dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) en inhibant l'activité des calpaïnes (Lu et al., 2014). Son indication thérapeutique première est un relaxant musculaire, prescrit pour la sclérose en plaques, la paralysie cérébrale et l'hyperthermie maligne (Krause et al., 2004). Des études récentes ont proposé un rôle potentiel du dantrolène sodique comme traitement des troubles neurodégénératifs, tels que la MH (Chen et al., 2011), l'ataxie spinocérébelleuse (Bezprozvanny and Klockgether, 2009; Liu et al., 2009) et la MA (Shi et al., 2019; Wang et al., 2017). Une récente étude a évalué l'innocuité, la tolérabilité et l'efficacité du dantrolène sur des patients atteints du SW (Abreu et al., 2021). Dans l'ensemble, le dantrolène a été très bien toléré et, mis à part une légère fatigue et une diarrhée, aucun effet indésirable cliniquement significatif n'a été signalé. Les enfants de cette étude ont montré une tendance à des niveaux plus élevés de peptide C, indicateur d'une forte production d'insuline endogène par le pancréas, stimulé après 6 mois de traitement au dantrolène. Les sujets adultes, en revanche, ont montré une augmentation négligeable des niveaux de peptide C stimulé tout au long de leur traitement, suggérant que le dantrolène pourrait être plus efficace chez les enfants, potentiellement dû à une plus grande sous-population survivante de cellules β pancréatiques fonctionnelles au cours de cette phase initiale du processus pathologique. Les sujets adultes sécrètent également de très faibles niveaux d'insuline, mais le dantrolène ne semble pas améliorer de manière significative la fonction de leurs cellules β pancréatiques. Actuellement, le dantrolène est en essai clinique de phase 1b/2 (NCT02829268) pour traiter le SW (Washington University School of Medicine, 2022).

IP3R est une autre cible possible pour contrôler la libération de Ca^{2+} du RE vers le cytoplasme. La **pioglitazone** est une substance utilisée dans le traitement du diabète de type 2, agissant par affinité avec les *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* (PPAR) dans les cellules adipeuses, du muscle et du foie, les rendant ainsi plus sensibles à l'insuline. Elle a pour action d'agir en inhibant la libération de Ca^{2+} médiée par l'IP3R à partir du RE (Hara et al., 2014). Dans un contexte SW, il a été montré que la pioglitazone protégeait de l'apoptose les cellules β pancréatiques de souris *Wfs1^{KO}* (Akiyama et al., 2009), mais des effets secondaires importants sont rapportés tels qu'une insuffisance cardiaque, de l'ostéoporose et un cancer de la vessie (Lewis et al., 2011; Nissen and Wolski, 2010).

La **rapamycine**, un médicament stimulant l'immunité chez les personnes atteintes d'un cancer et les personnes âgées (Mannick et al., 2014), améliore le diabète, augmente la teneur en insuline et prévient l'apoptose des cellules β pancréatiques par un mécanisme similaire à la pioglitazone (Bachar-Wikstrom et al., 2013), mais possède lui aussi des effets secondaires.

Enfin, le **carbachol**, un agoniste muscarinique, est étudié comme traitement du diabète sucré chez les patients atteints du SW, car il améliore la sécrétion d'insuline (Toots et al., 2019). Des études antérieures ont montré qu'un traitement au carbachol restaure la sécrétion d'insuline chez des souris nourries avec un régime riche en graisses (Ahrén et al., 1997) et chez des rats Goto-Kakizaki spontanément diabétiques (Guenifi et al., 2001). Comme l'acétylcholine, le carbachol se lie aux récepteurs muscariniques M3, amenant ainsi à la production d'IP3 et de DAG, puis mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire par la liaison d'IP3 à IP3R sur la membrane du RE, menant *in fine* à l'augmentation des niveaux de Ca^{2+} cytoplasmique, et donc une augmentation de la sécrétion d'insuline (Molina et al., 2014).

- La troisième stratégie thérapeutique est de cibler la dérégulation du stress du RE causée par la production d'une wolframine non fonctionnelle. **L'acide valproïque** est utilisé dans le traitement de troubles bipolaires, de l'épilepsie et de la migraine (Johannessen, 2000; Johannessen and Johannessen, 2003; Rosenberg, 2007). La protéine p21(cip), un inhibiteur de la kinase cycline-dépendante, joue un rôle dans la prolifération cellulaire et la survie en condition physiologique. Dans des cellules de neuroblastomes humain appauvries en WFS1, le niveau de p21(cip) est diminué, induisant la mort cellulaire. L'acide valproïque augmente l'expression de p21(cip), inhibant ainsi l'apoptose (Gharanei et al., 2013). D'autres études ont révélé des effets neuroprotecteurs de l'acide valproïque tels que des effets neurotrophiques et la favorisation de la croissance des neurites (Kakiuchi et al., 2009; Li et al., 2017). Ce médicament antiépileptique est en essai clinique de phase 2 (NCT03717909) pour devenir un futur traitement pour traiter la neurodégénérescence et les troubles visuels développés par les patients atteints du SW (University of Birmingham, 2020).

Le **liraglutide** est un analogue du *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1), une hormone intestinale qui augmente la sécrétion glucose-dépendante de l'insuline (Drucker, 2018), inhibe la sécrétion de glucagon, et, par action hypothalamique, réduit l'appétit et la prise alimentaire. Le liraglutide se lie et active donc le récepteur de GLP-1, potentialisant de façon glucose-dépendante la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques chez le modèle murin (Danielpur et al., 2016; Kondo et al., 2018; Toots et al., 2018) et chez un patient atteint du SW (Kondo et al., 2018). Par ailleurs, le liraglutide protège les CGR de l'apoptose et le nerf optique de la dégénérescence (Seppa et al., 2019).

- La quatrième stratégie est la régulation de la fonction mitochondriale. WFS1, NCS1 et IP3R forment un complexe pour faciliter le transfert calcique du RE

vers la mitochondrie (Angebault et al., 2018). En condition physiologique, WFS1 interagit avec NCS1 et empêche sa dégradation, et NCS1 favorise la modulation de la fonction d'IP3R par une interaction directe, menant à un transfert optimal de Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie et *in fine* à l'activation du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire mitochondriale. Dans un contexte SW, WFS1 est non fonctionnel et NCS1 partiellement dégradé, altérant ainsi le transfert calcique et conduisant à un dysfonctionnement bioénergétique mitochondrial et à l'apoptose (Angebault et al., 2018). La **surexpression de NCS1** par transfection dans des fibroblastes de patients atteints du SW, inverse la plupart des déficits observés. En conséquence, le modulateur mitochondrial, NCS1, est une cible médicamenteuse intéressante pour le traitement le SW (Angebault et al., 2018).

- La cinquième stratégie est de remplacer les tissus endommagés des patients atteints du SW. La priorité est d'améliorer la vie des patients notamment en ralentissant/stopant les symptômes les plus délétères sur leur qualité de vie, tels que la cécité et le diabète. Pour cela, des études menées sur la **thérapie régénératrice** utilisant des **iPSC** issues de cellules de peau de patients permettrait de générer des cellules différenciées telles des cellules β pancréatiques, des CGR ou encore des cellules souches neurales à des fins de transplantation (Shang et al., 2014; Szot et al., 2007; Urano, 2014). Aussi, par l'intermédiaire d'un vecteur viral de type Adéno-associé (AAV), le facteur de survie primaire **Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor (MANF)** pourrait être utilisé en médecine régénérative. MANF est un facteur de régénération dont son expression dans le RE des astrocytes est stimulé par le stress du RE. Il a été montré que MANF active la prolifération des cellules β pancréatiques et protège contre l'apoptose induite par le stress du RE (Lindahl et al., 2014; Petrova et al., 2003; Yagi et al., 2020). Par un vecteur AAV, MANF pourrait être

introduit dans des cellules de tissus particulièrement sensibles à la perte de fonction de WFS1, tels que les neurones, les cellules β pancréatiques et les cellules de la rétine afin de diminuer la neurodégénérescence et améliorer la tolérance au glucose et l'acuité visuelle.

- La dernière stratégie thérapeutique est la **thérapie génique** qui permettrait de réintroduire le **gène WFS1** de type sauvage par des systèmes viraux de type AAV dans les cellules endommagées chez les patients atteints du SW afin de produire la wolframine non mutée et ainsi compensée l'expression de la protéine mutée. La technologie d'édition génique CRISPR/Cas9 permettrait aussi de remplacer les variants WFS1 pathogènes par des allèles WFS1 de type sauvage dans les iPSC de patients (Abreu and Urano, 2019).

VI. Les différents modèles de la pathologie

Actuellement, il existe différents modèles cellulaires et animaux. Chaque modèle ne présentant qu'une partie de la symptomatologie du SW, il est donc important d'utiliser ces modèles en parallèle pour analyser les mécanismes physiopathologiques du SW de la manière la plus complète.

1. Le modèle cellulaire

Les iPSC sont identiques aux cellules souches embryonnaires, mais sont obtenues par reprogrammation génétique de cellules adultes différenciées telles que des cellules sanguines, des fibroblastes cutanés, des cellules épithéliales, etc. Ces cellules peuvent être obtenues à partir de donneurs sains ou de patients. Pour étudier la cause des déficits des cellules β pancréatiques dans le SW, des cellules

productrices d'insuline ont été générées à partir de fibroblastes de patients atteints du SW, et ces cellules β pancréatiques dont *WFS1* est muté possédaient une activité accrue des voies UPR corrélée à une dérégulation de la sécrétion d'insuline (Shang et al., 2014). Récemment, une étude a permis de générer un nouveau modèle cellulaire dans le but de modéliser les atteintes neurologiques du SW. Pour cela, la reprogrammation de fibroblastes de patients en neurones corticaux a été réalisée avec une différenciation intermédiaire en cellules souches neuronales plus stables. Ces cellules ont permis d'étudier le développement neuronal dans un contexte SW mais également d'étudier l'effet pharmacologique de composés chimiques sur les déficits cellulaires observés (Pourtoy-Brasselet et al., 2021).

La culture *in vitro* de fibroblastes est un moyen rapide d'obtenir des cellules représentant parfaitement la physiopathologie du SW car celles-ci sont issues des patients eux même. L'étude de ces fibroblastes a donc permis d'identifier à travers différentes mesures biochimiques une dérégulation de l'homéostasie calcique mitochondriale, une altération de la fonctionnalité mitochondriale et la physiologie des MAM (Angebault et al., 2018). Egalement, de nombreuses études ont induit plusieurs modèles *in vitro* du SW en induisant une déficience en *WFS1* dans des cellules immortalisées par transfection de *small interfering RNA* (siRNA) ou *short hairpin RNA* (shRNA) dirigés contre *WFS1*.

2. Les modèles souris

Il existe différents modèles de souris transgéniques, soit portant des mutations ponctuelles, soit des délétions entières ou partielles d'exon.

Le modèle souris *Wfs1* ^{Δ Exon2} développe une intolérance au glucose en raison d'une sécrétion d'insuline insuffisante et une perte progressive de cellules β pancréatiques est également observée. Les îlots isolés de souris mutantes ont

présenté une diminution de la sécrétion d'insuline et de la réponse calcique cellulaire en réponse au glucose, corrélées avec une apoptose accrue (Ishihara et al., 2004). Une étude longitudinale sur 9 mois chez les souris *Wfs1^{ΔExon2}* a révélé un dysfonctionnement du système visuel, associé à l'activation de la signalisation UPR (BiP et Ire1α) au niveau de la rétine, mais sans perte majeure de CGR (Wersinger et al., 2014). Enfin, ces souris développent une altération de l'acidification intragranulaire, une diminution de la densité des granules sécrétoires attachées à la membrane plasmique dans les cellules β pancréatiques et une altération du traitement de la proinsuline, en raison d'une augmentation du taux de proinsuline circulante (Hatanaka et al., 2011).

Le modèle souris *Wfs1^{ΔExon8}* portant le transgène β-galactosidase a été généré à l'aide d'une construction ciblant WFS1 et supprimant plus de 90% de l'exon 8 et 60% de la séquence codante totale, incluant 8 des 9 domaines transmembranaires, soit une délétion de 530 acides aminés sur 890. La caractérisation phénotypique de ces souris à 3 mois révèle des déficits d'apprentissage et de mémoire (Crouzier et al., 2022a) et une anxiété plus marquée chez les souris femelles *Wfs1^{ΔExon8}* (Crouzier et al., 2022a; Luuk et al., 2009). Une augmentation de la réponse au stress a été soulignée dans cette lignée *Wfs1^{ΔExon8}* par une élévation nettement accrue de la corticostérone plasmatique après le stress (Luuk et al., 2009). D'autres études ont montré également chez les souris *Wfs1^{ΔExon8}* une altération de la libération de dopamine (DA), compromettant la fonction du système dopaminergique (Matto et al., 2011; Visnapuu et al., 2013). Ce déficit pourrait être dû à l'altération du Ca²⁺ observée chez les souris déficientes en *Wfs1* (Ishihara et al., 2004). Enfin, une étude a montré sur cette lignée de souris dès 6 semaines une diminution progressive de la tolérance

au glucose, une perte concomitante des cellules β pancréatiques, une insuffisance pancréatique en insuline et une architecture aberrante des îlots (Abreu et al., 2020)

Le modèle $\beta Wfs^{-/-}$ est un modèle de souris mutante comportant une suppression conditionnelle de *Wfs1* dans les cellules β pancréatiques en croisant des souris dont la séquence codante de *Wfs1* dans l'exon 8 est flanquée de sites loxP, avec des souris exprimant la *Cre* recombinase sous le contrôle d'un promoteur d'insuline de rat (*Rat Insulin Promoter*, RIP2-Cre) (Riggs et al., 2005), empêchant donc la transcription de *Wfs1* dans les cellules β pancréatiques de ces souris. Ces souris développent à 12 semaines une intolérance au glucose progressive et une carence en insuline. L'analyse des îlots pancréatiques de ces souris a révélé une réduction de la masse des cellules β pancréatiques, une apoptose accrue, une élévation d'un marqueur de stress du RE (BiP et CHOP), et une dilatation du RE avec diminution de la sécrétion de granules traduisant un défaut de sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques vue par microscopie électronique (Riggs et al., 2005).

Le modèle *Wfs1*^{E864K}, créé par le Dr Benjamin DELPRAT, possède une mutation faux-sens E864K dans l'exon 8 (c.2590GA, E864K) retrouvé chez l'Homme. C'est une mutation de type *Wolfram-like syndrome*, induisant une modification structurelle de la protéine WFS1, qui provoque précocement chez l'Homme une surdité neurosensorielle à basse fréquence (Fukuoka et al., 2007), une atrophie optique et un diabète sucré (Eiberg et al., 2006). Certains des patients développent également des complications psychiatriques (Eiberg et al., 2006; Fukuoka et al., 2007; Rigoli and Di Bella, 2012; Valéro et al., 2008). Plus précisément, il est retrouvé une perte progressive de l'acuité visuelle, une pâleur du disque optique et un amincissement de la rétine associés à une dégénérescence axonale (Jagodzinska et al., 2016). Ces souris développent un déficit vestibulaire au 21^e jour, une perte auditive au 23^e jour,

une surdité profonde et un syndrome vestibulaire sévère au 27^e jour, et elles sont totalement aveugles au 31^e jour (données non publiées).

3. Le modèle rat

Un modèle de rat *Wfs1-exon5-KO232* possède une délétion de l'exon 5 entraînant la perte de 27 acides aminés de la séquence protéique de WFS1, développe à 12 mois une intolérance progressive qui aboutit à un diabète sucré avec une perte de sécrétion d'insuline et une perte des cellules β pancréatiques (Plaas et al., 2017). À 15 mois, une réduction des volumes médullaires liée à une dégénérescence, une réduction du volume du nerf optique, une cataracte, des signes de gliose de la rétine et une perturbation de la myéline dans le nerf optique sont observés (Plaas et al., 2017).

4. Le modèle drosophile

Le gène *wfs1* de la drosophile est le meilleur homologue protéique de WFS1 humain avec 25 % d'identité et 42 % de similarité dans la séquence primaire d'acides aminés, sont de taille similaire (853 et 890 acides aminés, respectivement) et ont tous deux neuf hélices transmembranaires. Des mouches exprimant *Wfs1* RNAi sous le contrôle d'un promoteur neuronal *elav* ont été créées (Sakakibara et al., 2018) : une lignée mutante possédant une version tronquée en C-terminal de WFS1 et une seconde lignée montrant une réduction de 60% de l'expression de son ARNm. Les mouches présentent des déficits locomoteurs, une neurodégénérescence et une durée de vie réduite mais aucune dérégulation du stress du RE n'a été mise en évidence ainsi qu'une absence de dysfonctionnement mitochondrial (Sakakibara et al., 2018). Ces modèles permettront de faire rapidement de la physiopathologie, notamment en les croisant avec des modèles transgéniques pour des gènes

responsables de pathologies humaines, et obtenir rapidement des informations mécanistiques.

5. Les modèles poisson zèbre

Du fait que 70% des gènes du poisson zèbre sont dupliqués, il est retrouvé deux gènes différents chez celui-ci, *wfs1a* et *wfs1b*. Par conséquent, deux mutants ont été créés par l'Institut de technologie de Karlsruhe (Allemagne) et générés par mutagenèse ENU. La première lignée *wfs1a^{C825X}*, a le gène *wfs1a* invalidé (remplacement d'une cystéine par un codon d'arrêt en position 825) et la seconde lignée, *wfs1b^{W493X}*, a le gène *wfs1b* invalidé (remplacement d'un tryptophane par un codon stop en position 493). À partir du croisement de ces deux lignées mutantes, une troisième lignée a été générée, appelée *wfs1ab^{KO}*, pour laquelle les deux gènes *wfs1* ont été invalidés.

Comme ce modèle est un modèle central dans ce travail de thèse, nous avons publié une revue intitulée *Use of Zebrafish Models to Boost Research in Rare Genetic Diseases* (Crouzier et al., 2021), décrivant l'intérêt des lignées poissons zèbres et plus précisément dans les maladies rares notamment par l'analyse de mécanismes physiopathologiques et l'identification de futures molécules thérapeutiques. Les deux maladies rares détaillées dans cette revue sont le SW et le syndrome de Dravet, dont nos collaborateurs Jo Sourbron et Lieven Lagae sont des experts reconnus de cette dernière.

Les outils actuels disponibles et leur utilité dans l'analyse phénotypique du poisson zèbre sont présentés, notamment dans le cadre de voies défectueuses conduisant à des déficits locomoteurs, visuels, auditifs et à des phénotypes épileptiques.

Revue 1 : Use of Zebrafish Models to Boost Research in Rare Genetic Diseases

Lucie Crouzier, Elodie M. Richard, Jo Sourbron, Lieven Lagae, Tangui Maurice and Benjamin Delprat

Résumé

Les maladies génétiques rares constituent un groupe de pathologies dont les besoins cliniques sont souvent insatisfaits. Même si rare par une seule maladie génétique (de 1/2000 à 1/1 000 000), le nombre total de patients concernés représentent environ 400 millions de personnes dans le monde. La recherche de traitements reste difficile en raison de la complexité de ces maladies, du faible nombre de patients et de la difficulté dans la conduite des essais cliniques. Des stratégies de recherche préclinique innovantes sont donc nécessaires. Le poisson zèbre s'est révélé être un modèle animal puissant pour l'étude des maladies rares. Le poisson zèbre combine des caractéristiques conservées des vertébrés, un taux de reproduction élevé, des exigences limitées en matière d'élevage et à faible coût. Plus de 84 % des gènes humains responsables de maladies présentent un orthologue, ce qui suggère que la majorité des maladies génétiques pourraient être modélisées chez le poisson zèbre. Dans cette revue, nous mettons l'accent sur les avantages uniques du modèle de poisson zèbre par rapport aux autres modèles *in vivo*, en soulignant en particulier la capacité phénotypique à haut débit pour le dépistage thérapeutique. Nous présentons brièvement comment la génération de lignées transgéniques de poisson zèbre par des technologies de modulation génique peut être utilisée pour modéliser des maladies génétiques rares. Ensuite, nous décrivons comment le poisson zèbre peut être phénotypé à l'aide de technologies de pointe. Deux exemples prototypiques de maladies rares illustrent la façon dont les modèles de poisson zèbre peuvent jouer un rôle critique dans la caractérisation des maladies génétiques rares et dans leur utilisation pour identifier des solutions thérapeutiques innovantes.

International Journal of Molecular Sciences, 2021

Chapitre 2. *Neuronal calcium sensor-1* et récepteur sigma-1

1. *Le Neuronal calcium sensor-1*

Le *Neuronal Calcium Sensor-1* (NCS1) a été identifié pour la première fois chez la drosophile, sous le nom de Fréquénine (Angaut-Petit et al., 1993; Pongs et al., 1993). Le gène codant pour la protéine NCS1 a été isolé dans une grande variété d'organismes tels que la levure, *C. elegans*, la drosophile, le Xénope, les mollusques, les crustacés, le poulet, le bovin, la souris, le rat, le poisson-zèbre et l'Homme (Blasiolo et al., 2005; Braunewell and Gundelfinger, 1999; Chen et al., 2002; Cox et al., 1994; De Castro et al., 1995; De Raad et al., 1995; Gomez et al., 2001; Hamasaki-Katagiri et al., 2004; Nef et al., 1995).

1. Structure de NCS1

Chez l'Homme, *NCS1* se trouve sur le chromosome 9 et se compose de 8 exons codant pour une protéine de 190 acides aminés. La protéine NCS1 est une petite protéine (22 KDa) de liaison au Ca^{2+} contenant 4 motifs en main EF (EF1, EF2, EF3 et EF4), motifs formés respectivement de deux hélices α liées à une boucle formée de 12 acides aminés, dont 3 (EF2, EF3 et EF4) se lient à Ca^{2+} (Bourne et al., 2001) (Figure 11). EF1 est incapable de se lier à Ca^{2+} en raison d'une substitution Cys/Pro conservée dans le motif de liaison au Ca^{2+} . L'appariement des motifs en main EF permet une liaison de haute affinité au Ca^{2+} (Chazin, 2011; Cox et al., 1994), lui conférant la propriété de capteur de Ca^{2+} (Treloar et al., 2005).

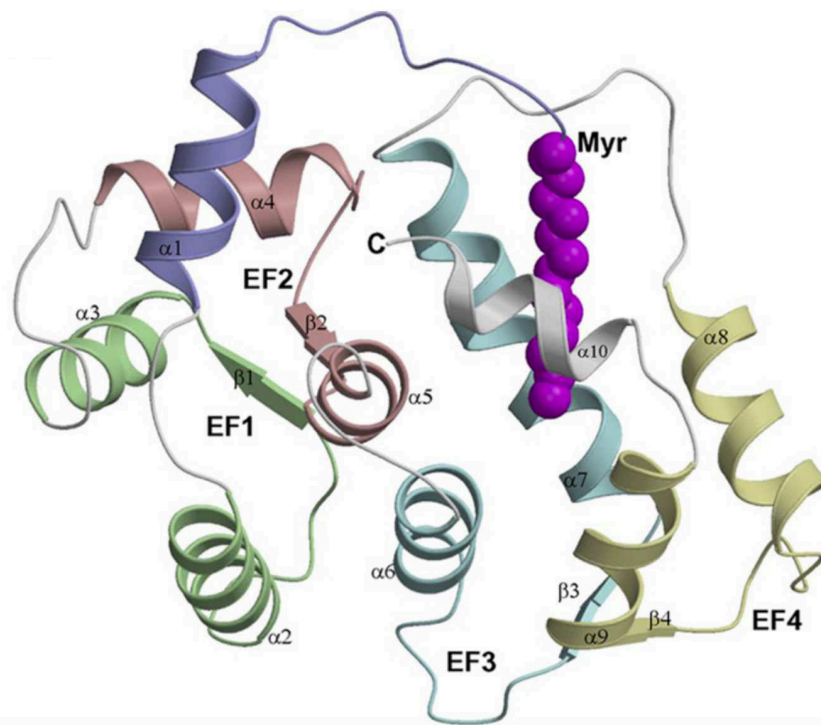


Figure 11. Structure de NCS1 en absence de Ca^{2+} . Le groupe myristoyle, représenté par des boules roses, est attaché de manière covalente à Gly2 et connecté à une structure étendue (résidus Gly2–Arg21) de l'extrémité N-terminale, représentée en violet. NCS1 contient deux domaines comprenant quatre mains EF, avec EF1 représenté en vert (résidus 26–55) et EF2 en rouge (résidus 62–91), tous deux formant le domaine N-terminal ; EF3 est représenté en cyan (résidus 101–130) et EF4 en jaune (résidus 146–175), formant le domaine C-terminal. L'interface entre les deux domaines est établie par des interactions entre l'hélice 5 de EF2 et les hélices 6 et 7 de EF3. Image issue de (Lim et al., 2011).

Les quatre mains EF sont appariées 2 à 2, divisant NCS1 en une paire N-terminale (EF1 et EF2), liée à un groupe myristoyle, et une paire C-terminale (EF3 et EF4). La glycine N-terminale de NCS1 est myristoylée par l'action de la N-myristoyltransférase, permettant à la protéine de s'ancrer à la membrane cellulaire et de manière calcium dépendante (McFerran et al., 1999). La liaison de Ca^{2+} aux mains EF 2 et 3 entraîne un changement de conformation de la paire C-terminale (Bourne et al., 2001; Heidarsson et al., 2012), renversant le groupe myristoyle séquestré au sein d'une poche hydrophobe, et l'exposant alors aux protéines cibles telles que *phosphatidylinositol-4-kinase III β* (PI4K III β) (de Barry et al., 2006 ; Haynes et al., 2005), *ADP-ribosylation factor-1* (ARF1) (Haynes et al., 2005 ; 2007), *interleukin receptor accessory protein like -1* (IL1RAPL1) (Bahi et al., 2003), le canal potentiel de récepteur transitoire court 5 (*Short transient receptor potential channel 5*, TRPC5) (Hui

et al., 2006), IP3R (Boehmerle et al., 2006 ; Schlecker et al., 2006), le canal calcique dépendant de la tension P/Q (*P/Q voltage-dependent calcium channel*, Cav 2.1), (Tsujiimoto, 2002), le récepteur dopaminergique de type 2 (D2R) (Benkert et al., 2019; Dragicevic et al., 2014) et le récepteur dopaminergique de type 3 (D3R) (Kabbani et al., 2002), *Calcium-dependent Activator Protein for Secretion* (CAPS) (Haynes et al., 2006), calcineurine (McFerran et al., 1999; Schaad et al., 1996), TGF β R1 (Haynes et al., 2006), PDE (Schaad et al., 1996), *voltage-gated potassium channel 4.2* (Kv4.2) (Guo et al., 2002), GRK2 (Kabbani et al., 2002), *clathrine adaptator 1* (AP1) et *clathrine adaptator 2* (AP2) (Haynes et al., 2006).

Pour exemple, des données biochimiques révèlent que NCS1 est co-immunoprécipité avec Kv4.3, appartenant à la famille des protéines transmembranaires responsables du transport des ions potassium à travers la membrane cellulaire des cellules excitables telles que les cardiomyocytes (Guo et al., 2002). Kv4.3 est fortement et uniformément exprimé dans les ventricules de souris adultes et NCS-1 co-immunoprécipite avec Kv4.3 à partir d'extraits de ventriculaires. De plus, des études de co-expression ont révélé que NCS1 augmente les densités de courant K⁺ codées par Kv4 fonctionnel et diminue le taux d'inactivation du courant. Prises ensemble, ces observations suggèrent que NCS1 est une sous unité accessoire des canaux Kv4 cardiaques, qui régulent le courant potassique transitoire cardiaque (Guo et al., 2002).

2. Pattern d'expression de NCS1

Au niveau cellulaire, NCS1 est retrouvé dans les cellules endocriniennes, cardiaques (Guo et al., 2002; Nakamura et al., 2003), musculaires lisses, le tissu du tractus gastro-intestinal (Uhlén et al., 2015), le cortex cérébral (Chen et al., 2002), l'hippocampe (Mun et al., 2015; Nakamura et al., 2017; Saab et al., 2009) et les cellules

ganglionnaires de la racine dorsale (Averill et al., 2004). Au niveau de la rétine, NCS1 est présent dans le segment interne des photorécepteurs, les CGR et la couche plexiforme interne chez le rat, le bovin et le poussin (De Raad et al., 1995; Reynolds et al., 2001). Il est également retrouvé dans la corne centrale de la moelle épinière chez la souris (Olafsson et al., 1997) et dans les jonctions neuromusculaires chez la drosophile au stade larvaire (Pongs et al., 1993).

Dans l'oreille interne de souris adulte, une immunocoloration de NCS1 a été observée dans les systèmes neuronaux efférentes et afférentes des terminaisons nerveuses vestibulaires et cochléaires mais n'a pas été trouvée dans les cellules ciliées vestibulaires et dans les cellules ciliées internes et externes cochléaires (Sage et al., 2000).

Dans l'hippocampe, les neurones pyramidaux CA1-CA3 et les cellules granulaires du gyrus denté expriment uniformément NCS1 (Paterlini et al., 2000). NCS1 est retrouvé dans les neurones du cerveau antérieur, du cervelet, du mésencéphale et du tronc cérébral ainsi que dans les jonctions neuromusculaires et le tectum optique (Nef et al., 1995). NCS1 est exprimé dans les synapses telles que les terminaisons nerveuses motrices au niveau des jonctions neuromusculaires (Garcia et al., 2005; Jeromin et al., 1999; Pongs et al., 1993). Chez l'homme, NCS1 est fortement exprimé dans le cerveau, avec un taux d'ARNm très élevé dans le cortex cérébelleux (Chen et al., 2002). Une forte expression a été également observée dans le lobe temporal, occipital et frontal, le thalamus, l'amygdale et l'hippocampe et des niveaux plus faibles ont été trouvés dans le cervelet, le putamen, le noyau caudé, la moelle épinière, la substance noire, le thalamus et le corps calleux. Seuls des traces d'ARNm de NCS1 ont été détectées dans les reins, le cœur, l'intestin, les ovaires, les testicules et la prostate (Chen et al., 2002).

Au niveau subcellulaire, NCS1 est principalement localisé à la membrane cellulaire (Ames et al., 2000; Weisz et al., 2000), et exprimé dans les somas neuronaux, les dendrites et les terminaisons nerveuses (Martone et al., 1999; Olafsson et al., 1997; Paterlini et al., 2000; Sage et al., 2000; Schaad et al., 1996).

3. Fonctions de NCS1

Les protéines neuronales capteurs de Ca^{2+} sont la sous-famille de la super famille de la calmoduline qui participent à la régulation de la transduction du signal dans les neurones et les cellules photoréceptrices (Bourne et al., 2001; Burgoyne and Haynes, 2012; Burgoyne and Weiss, 2001; McFerran et al., 1999; Weiss et al., 2010).

NCS1 est impliqué dans un large éventail de fonctions importantes. En effet, il régule les canaux ioniques et les récepteurs postsynaptiques, et joue un rôle sur la croissance des neurites et la transmission synaptique (Dason et al., 2009; Hui et al., 2007; Pongs et al., 1993; Romero-Pozuelo et al., 2007; Saab et al., 2009). Plus précisément, NCS1 joue un rôle dans l'apprentissage et la mémoire, comme montré chez un modèle *C. elegans* NCS1 KO (Gomez et al., 2001), et chez le modèle murin NCS1 KO est noté un comportement anxieux/dépressif (de Rezende et al., 2014) et une réduction de la motivation (Ng et al., 2016). Chez la souris, la surexpression de NCS1 dans le gyrus denté stimule le développement de la mémoire spatiale (Nakamura et al., 2017; Saab et al., 2009), du comportement exploratoire et de la plasticité synaptique médiée par les récepteurs dopaminergiques (Saab et al., 2009). La surexpression de NCS1 dans l'hippocampe de souris augmente la potentialisation à long terme (LTP), et chez la Drosophile et le Xénope la surexpression induit une facilitation chronique de la libération du neurotransmetteurs à la jonction neuromusculaire (Olafsson et al., 1995; Pongs et al., 1993; Rivosecchi et al., 1994).

L'interaction de NCS1 avec le récepteur de la dopamine D2 (Kabbani et al., 2012) soutient l'implication de NCS1 dans la susceptibilité à la dépendance à la cocaïne (Multani et al., 2012) et l'efficacité de la thérapie de remplacement de la nicotine (Dahl et al., 2006). Dans la MP, des niveaux élevés d'ARNm de NCS1 ont été mesurés dans les neurones de la substance noire (Dragicevic et al., 2014). Egalement, l'expression ou la fonction aberrante de NCS1 a été impliquée dans la schizophrénie et les troubles bipolaires (Koh et al., 2003), l'autisme (Handley et al., 2010; Ng et al., 2020), et dans le syndrome de l'X fragile (Mansilla et al., 2017). Enfin, une étude sur des neurones obtenus à partir de patients parkinsoniens hétérozygotes pour une mutation ponctuelle (N370S) dans le gène *GBA1* a montré que les niveaux protéiques de NCS1 étaient inférieurs d'environ 40% comparé aux contrôles (Benkert et al., 2019).

4. NCS1 et le SW

Dans les fibroblastes humains, l'inactivation de *NCS1* par siRNA a altéré l'homéostasie du Ca^{2+} et la fonction mitochondriale, démontrant que NCS1 modulait l'absorption de Ca^{2+} mitochondrial et pouvait être une cible pour maintenir la fonction mitochondriale et l'intégrité des MAM. De plus, la surexpression de NCS1, par nucléofection, dans des fibroblastes de patients a restauré le déficit mitochondrial et le niveau de Ca^{2+} cytosolique au repos (Angebault et al., 2018).

Egalement, une étude a montré que dans des cellules β pancréatiques de rat *wfs1^{KO}*, la surexpression de NCS1, via la transfection d'un plasmide avec de la lipofectamine, a restauré la libération de Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie et le niveau de Ca^{2+} cytosolique au repos (Nguyen et al., 2020). Une autre étude a montré que des cellules β pancréatiques contrôles présentaient une augmentation de l'expression de NCS1, tandis que des cellules *wfs1^{KO}* présentaient une diminution, suggérant que

l'interaction NCS1-WFS1 protège NCS1 de la dégradation, potentiellement par la calpaïne dépendante du Ca^{2+} (Fischer et al., 2020).

NCS1 exerce des fonctions similaires à celles de WFS1 : les deux protéines régulent les niveaux de Ca^{2+} cytosolique et la libération de Ca^{2+} dépendante d'IP3R (Ben-Shachar et al., 2004; Gromada et al., 2005; Przedborski et al., 1993), modulent la morphologie neuronale et le développement neurologique (Cagalinec et al., 2016; Fischer et al., 2021), interviennent dans la neuroprotection (Nakamura et al., 2006) et sont également impliquées dans des maladies neurodégénératives et des troubles psychiatriques au-delà du SW (Cryns et al., 2003b).

II. Le récepteur sigma-1

Le récepteur sigma-1 (S1R), autre protéine résidente des MAM (Hayashi and Su, 2007), assure l'homéostasie cellulaire en modulant notamment la communication RE-mitochondrie (Brailoiu et al., 2016; Zhang and Cuevas, 2002; Zhemkov et al., 2021). L'activité de S1R peut être modulée par de petites molécules induisant des effets thérapeutiques dans les maladies neurodégénératives (Mancuso et al., 2012; Mavlyutov et al., 2013; Peviani et al., 2014).

La découverte de S1R remonte aux travaux de Martin et collaborateurs sur l'existence de différents récepteurs opioïdes, décrits notamment en différenciant les effets psychomimétiques uniques de la N-allylnormetazocine ((+)-SKF-10,047), des effets de la morphine et de la kétocyclazocine, définissant respectivement les effets σ , μ et κ opioïdes (Martin et al., 1976). Les sites σ ont été rapidement sortis de la classification opioïde, leurs effets n'étant pas bloqués par la naloxone ou la naltrexone, antagonistes opioïdes de référence (Vaupel, 1983). Mais ce n'est qu'en 1996 que S1R

a été cloné à partir de foie de cobaye après purification et séquençage partiel de la protéine (Hanner et al., 1996), conduisant par la suite à l'identification d'homologues humains (Kekuda et al., 1996), de souris (Pan et al., 1998; Seth et al., 1997) et de rat (Mei and Pasternak, 2001; Seth et al., 1998) par criblage de bibliothèques d'ADNc ou clonage.

1. Structure de *sigmar1* et de sa protéine

Le gène *sigmar1*, codant S1R, est situé sur le chromosome 9p13 (Prasad et al., 1998). Le gène contient 4 exons intercalés par 3 introns (Prasad et al., 1998) (Figure 12A). L'exon 1 contient la région non traduite 5' et une partie de la séquence codante de la protéine. L'exon 2 code pour la région qui contient le domaine transmembranaire putatif. L'exon 3 est le plus court. L'exon 4 est le plus long et contient la région 3' non traduite et une partie de la séquence codante de la protéine. L'exon 4 contient également le signal de polyadénylation AATAAA, celle-ci permettant la protection de l'ARNm contre la dégradation, le transport nucléo-cytoplasmique et enfin dans le recrutement du ribosome pour permettre sa traduction en protéine (Seth et al., 1997).

L'ADNc de *sigmar1* humain mesure 1 653 pb de long, avec une séquence codante de 672 pb. La région codante est flanquée d'une région non codante en 5' de 59 pb et en 3' de 922 pb. Le motif de séquence d'acides aminés MQWAVGRR, présent à l'extrémité N-terminale de la protéine, est un signal de rétention à la membrane RE (Schutze et al., 1994).

La protéine S1R est hautement conservée dans diverses espèces de mammifères avec plus de 90% de similarité dans les séquences d'acides aminés. (Seth et al., 1998). C'est une petite protéine de 25 KDa dont la conformation dans les membranes cellulaires est apparue sous 2 formes en fonction des études biochimiques de S1R. D'une part, elles ont montré l'existence de deux segments

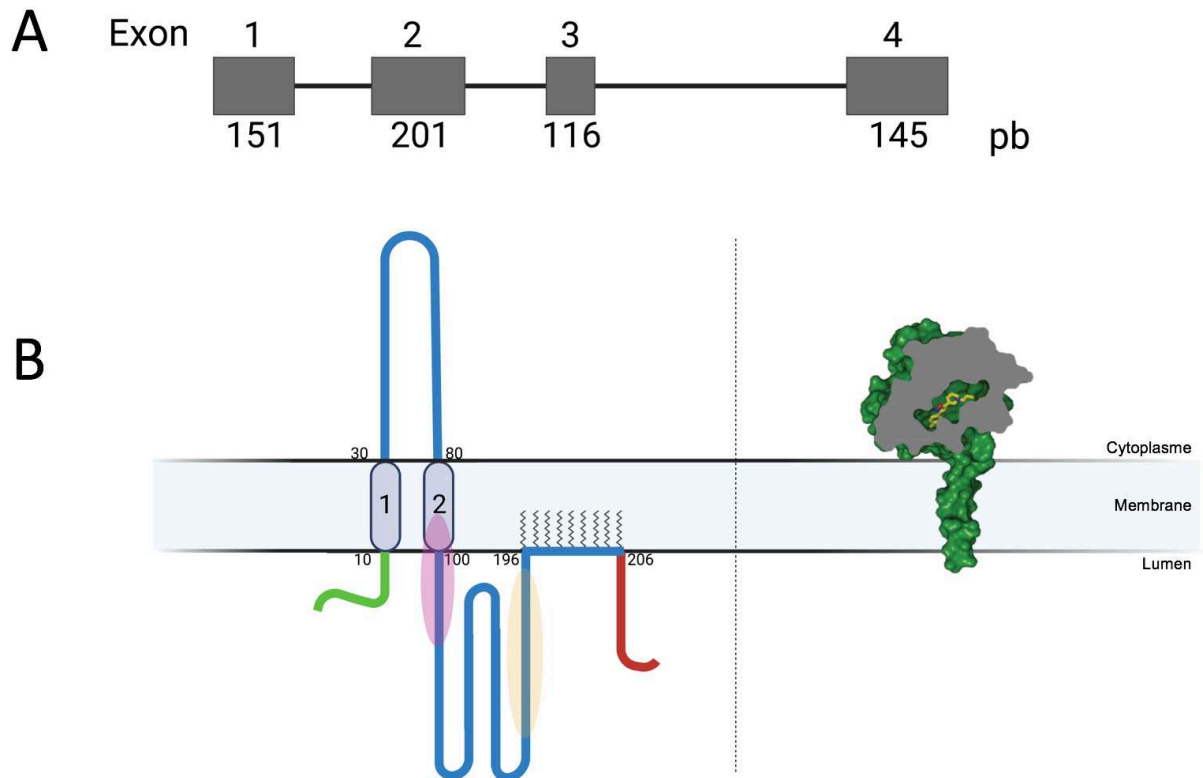


Figure 12. Représentation du gène *sigmar1* et de sa protéine. (A) Le gène *sigmar1* contenant quatre exons, et le nombre de pb de chaque exon est représenté. (B) À gauche, la structure de la protéine S1R avec les 2 domaines hydrophobes transmembranaires représentés par des ovals bleus. Les nombres représentent les résidus d'acides aminés. La zone rose correspond à SBDLI et la zone jaune correspond à SBDLII. La partie verte et rouge de la protéine indique les extrémités N et C-terminales, respectivement. À droite, la structure cristallographique de S1R avec un ligand représenté en jaune. Adapté de (Laurini et al., 2017) et (Schmidt et al., 2016), respectivement.

transmembranaires hélicoïdaux hydrophobes, reliés entre eux dans le compartiment extracellulaire par une boucle d'environ 50 résidus d'acides aminés avec ses extrémités N et C terminales orientées vers le cytoplasme (Aydar et al., 2002; Hayashi and Su, 2007; Laurini et al., 2017), alors que la structure cristallographique plus récente de S1R ne rapporte qu'un seul segment transmembranaire (Schmidt et al., 2016) avec des extrémités N et C terminales face à la lumière du RE (Hayashi and Su, 2007; Mavylutov et al., 2018) (Figure 12B). Egalement, la partie C-terminale de la protéine contient 2 domaines de liaisons aux stéroïdes, nommés *sterol-binding domain like-I* (SBDLI) et *sterol-binding domain like-II* (SBDLII) (Pal et al., 2007). Les 2 formes

de S1R sont considérées comme valides et apportent des informations quant à la pharmacologie de la protéine.

2. Pattern d'expression de S1R

S1R est distribué dans différents organes tels que le tube digestif (Samovilova and Vinogradov, 1992), le foie (Dumont and Lemaire, 1991; Hellewell et al., 1994; Maurice et al., 1996), les reins (Hellewell et al., 1994), le cœur (Ela et al., 1994; Jansen et al., 1992) et les organes sexuels (Jansen et al., 1992). Des taux élevés de S1R ont été relevés dans des neurones du bulbe olfactif sur des rats, dans les noyaux hypothalamiques, le septum, le gris central, certains noyaux moteurs du cerveau postérieur et la corne dorsale de la moelle épinière. Des cellules intensément immunomarquées ont été observées dans l'hippocampe, en particulier dans le gyrus denté, et les cellules modérément marquées étaient localisées dans le noyau accumbens (Alonso et al., 2000). Au niveau subcellulaire, S1R est localisé dans la membrane plasmique, la membrane mitochondriale et le RE (Hayashi and Su, 2007; McLean and Weber, 1988). Lors de son activation, S1R est transloqué du RE, soit à la membrane plasmique, soit à la membrane nucléaire (Hayashi and Su, 2001; Morin-Surun et al., 1999).

3. Implication de S1R dans les pathologies, notamment neurodégénératives

De nombreux travaux chez la souris $S1r^{KO}$ ont permis de mettre en évidence l'implication de S1R dans différents types cellulaires. Au niveau cardiaque, un dysfonctionnement systolique progressif a été noté (Abdullah et al., 2018). Au niveau hépatique, les souris S1R KO possèdent une augmentation des marqueurs de stress oxydatif (Pal et al., 2012), tels que le glutathion et le glutamate mais aussi une augmentation de l'alanine, de la glutamine, de l'acide lactique, de l'AMP, du myo-

inositol et de la bétaine, qui sont des signes de stress oxydatif mais aussi d'une augmentation de la défense contre le stress oxydatif.

Des expériences menées dans les années 1990 ont révélé une très forte expression de S1R dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales issues de divers tissus cancéreux humains (Aydar et al., 2004; Vilner et al., 1995). Une étude a montré que la surexpression de S1R, retrouvée dans les lignées cellulaires d'hépatome, pouvait entraîner une augmentation de la prolifération des hépatocytes et de la stéatose comme retrouvé chez les patients atteints de tumeurs hépatiques bénignes stéatosées (HCA) (Villemain et al., 2020). Egalement, l'inactivation de *HNF1α*, une caractéristique majeure des HCA (Nault et al., 2017), entraîne la surexpression de S1R dans le foie de souris, probablement par une liaison direct de HNF1α sur le promoteur de *sigmar1*, suggérant que S1R pourrait être une cible potentielle dans le traitement des cancers mais aussi de la stéatose hépatique (Villemain et al., 2020).

Concernant le système nerveux central, des altérations de la mémoire spatiale de travail (Chevallier et al., 2011), la mémoire à long terme (Xu et al., 2017), et topographique (Crouzier et al., 2020) ont été notées chez les souris *S1r^{KO}* comparés aux contrôles. Elles présentent aussi une augmentation de l'anxiété (Chevallier et al., 2011; Sabino et al., 2009) probablement induite par une dérégulation de la réponse au stress du RE, ainsi qu'une diminution de la coordination motrice (Mavlyutov et al., 2010). Au niveau cellulaire, les souris *S1r^{KO}* développe une altération de la survie des nouveaux neurones (Sha et al., 2015) et une diminution de la densité des neurites (Crouzier et al., 2020). Une dérégulation de la voie NMDA (Sha et al., 2013) et de l'activité de l'axe HPA (Di et al., 2017), une diminution de la forme phosphorylée du récepteur des glucocorticoïdes et de la protéine kinase C (PKC) (Kotitschke et al.,

2009), et une neurodégénérescence progressive des neurones dopaminergiques (Hong et al., 2015) sont retrouvées à différents stade de développement.

Des troubles des jonctions neuromusculaires sont également notés tels qu'une diminution de la force musculaire (Bernard-Marissal et al., 2015; Hong et al., 2017) et du potentiel d'action dans les motoneurones (Mavlyutov et al., 2013), une diminution de la contractilité des myotubules (Ionescu et al., 2019) corrélée avec un déficit de transport rétrograde du *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) dans les motoneurones (Ionescu et al., 2019), un raccourcissement des axones des motoneurones, une augmentation de la mort cellulaire, et un défaut de signalisation calcique et métabolique des mitochondries dans les motoneurones (Bernard-Marissal et al., 2015). Ces études révèlent l'impact de perte de fonction de S1R sur la dégénérescence des motoneurones et la modulation de son activité pourrait être une stratégie thérapeutique pour traiter les maladies du motoneurone.

Au niveau de l'œil est noté une perte des cellules de la couche des CGR lors d'un stress induit (Mavlyutov et al., 2011), une dégénérescence axonale du nerf optique (Ha et al., 2012), un électrorétinogramme anormal (Ha et al., 2011a) et une diminution de la concentration en BDNF mature dans la rétine (Mysona et al., 2018). Ces résultats montrent que la physiologie de la rétine dépend fortement de S1R pour réguler le stress cellulaire.

Les agonistes S1R sont anti-amnésiques et neuroprotecteurs (Antonini et al., 2009; Earley et al., 1991; Hindmarch and Hashimoto, 2010; Maurice and Privat, 1997; Maurice et al., 1994a; Ruscher et al., 2011), comme par exemple dans des modèles de maladies neurodégénératives telles que la SLA (Ionescu et al., 2019; Mancuso et al., 2012; Ono et al., 2014; Peviani et al., 2014), la MA (Fisher et al., 2016; Gogvadze et al., 2019; Hall et al., 2018; Maurice and Gogvadze, 2017; Meunier and Hayashi,

2010; Ryskamp et al., 2019), la MP (Francardo et al., 2014, 2019), la MH (Bol'shakova et al., 2017; Garcia-Miralles et al., 2017; Geva et al., 2016; Kusko et al., 2018; Ryskamp et al., 2017; Squitieri et al., 2015), le SW (Crouzier et al., 2022a), ou encore les accidents vasculaires cérébraux (Allahtavakoli and Jarrott, 2011; Ruscher et al., 2011, 2012; Urfer et al., 2014) et les traumatismes crâniens (Dong et al., 2016).

L'ensemble de ces observations montre que la suppression de S1R induit de nombreuses altérations et variées, tant au niveau comportemental que cellulaire.

4. Oligomérisation de S1R

Un agoniste est une molécule qui interagit avec un récepteur, naturellement activé par son ligand endogène, en imitant l'action de celui-ci et en exerçant ainsi une action physiologique similaire. Un antagoniste se fixe sur le récepteur mais n'induit pas d'action et, par compétition, bloque l'action de l'agoniste. Concernant S1R, des expériences comportementales sur les animaux ont permis d'identifier différents antagonistes tels que le NE-100 et l'halopéridol, et des agonistes comme le (+)-SKF10047, le PRE-084, la (+)-pentazocine, l'imipramine, la fluvoxamine et le di-o-tolylguanidine (Hashimoto, 2009; Matsumoto et al., 1995; Maurice et al., 1994a, 1998; Narita et al., 1996; Okuyama et al., 1995; Wang et al., 1987; Yagasaki et al., 2006).

Les ligands peuvent être aujourd'hui qualifiés antagonistes ou agonistes S1R par un test *in vitro* lié à la capacité de S1R de chaperonner BiP et donc des agonistes de dissocier S1R de BiP. Par exemple, la (+)-pentazocine, le (+)-SKF10047, le PRE-084, la cocaïne, la fluoxétine, la progestérone et la prégénolone sont des agonistes de S1R, et le NE-100 et le rimcazole des antagonistes (Hayashi and Su, 2007).

S1R existe sous plusieurs formes oligomériques, comme montré initialement par l'utilisation d'un marqueur radioiodé, le 1-N-(2',6'-diméthyl-morpholino)-3-(4-azido-3-[¹²⁵I]iodo-phenyl)propane ([¹²⁵I]IAF), révélant la forme oligomérique de S1R à la

membrane de cellules hépatiques de rats (Pal et al., 2007). Ce changement de conformation de S1R est responsable de sa liaison à différentes protéines et peut se présenter sous plusieurs formes selon le type d'interaction (Schmidt et al., 2018). Des études de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) ont confirmé l'existence de plusieurs états oligomères et révèlent que les agonistes stabilisent les espèces de faible poids moléculaire (monomère), tandis que les antagonistes favorisent les oligomères (Gromek et al., 2014; Mishra et al., 2015). Une gamme d'états d'oligomérisation de S1R a été confirmée par chromatographie d'exclusion de taille avec diffusion de la lumière multi-angle et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, dont la masse moléculaire des oligomères varie d'environ 140 KDa à 400 KDa (Schmidt et al., 2016). De plus, la cristallisation aux rayons X a montré que S1R humain existait sous forme de trimère avec un domaine transmembranaire et un site de liaison de ligand dans chaque protomère (Schmidt et al., 2016). Ce changement de conformation de S1R pourrait conduire aux différentes réponses fonctionnelles.

L'oligomérisation de S1R est induit par son motif GXXXG correspondant aux résidus d'acides aminés 87–91. Il a été montré que des mutations dans cette région provoquent un déplacement vers l'état monomère de S1R, associé à une diminution significative de la liaison du ligand, suggérant que l'affinité du ligand à S1R dépendrait des processus d'oligomérisation de S1R (Gromek et al., 2014; Ortega-Roldan et al., 2015). La séquence à l'origine de d'oligomérisation est hautement conservée parmi les espèces, confirmant son importance physiologique (Schmidt et al., 2016).

L'extrémité C-terminale de S1R (acides aminés 110 à 223) possède des fonctions de chaperon (Hayashi et Su, 2007 ; Wu et Bowen, 2008) et permet l'interaction avec BiP (Ortega-Roldan et al., 2013). De plus, la conversion des états oligomères de S1R en monomères améliorerait sa capacité de liaison aux protéines

partenaires, y compris BiP, car davantage d'extrémité C-terminale de S1R sont exposées sous la forme monomère. Une récente étude a montré que l'halopéridol, antagoniste de S1R, favorise l'homomérisation de S1R et par conséquent diminue l'interaction de S1R avec BiP, tandis que la pentazocine, un agoniste de S1R, favorise la production de monomères et par conséquent augmente cette interaction (Yano et al., 2018).

5. Les différentes interactions protéiques avec S1R

De par sa localisation et la nature de ses interactions protéiques, S1R est un modulateur avec de multiples manifestations fonctionnelles. Sur le RE, S1R réside principalement au niveau des MAM (Hayashi and Su, 2007) mais est aussi capable de se déplacer vers la membrane plasmique afin d'interagir avec les canaux ioniques, des kinases et d'autres récepteurs (Chu and Ruoho, 2016; Su et al., 2010). S1R peut également se transloquer au niveau de l'enveloppe nucléaire (Mavlyutov et al., 2015; Tsai et al., 2015), où celui-ci se lie à l'émerine pour recruter des molécules de remodelage de la chromatine et régule la transcription des gènes (Tsai et al., 2015) ou interagit directement avec des protéines aux pores nucléoplasmiques et les stabilise (Lee et al., 2020). Enfin, S1R interagit avec d'autres protéines membranaires ou solubles, y compris dans le cytosol (Hayashi et al., 2012; Ivanova et al., 2014).

À la membrane plasmique (Figure 13), S1R interagit et module directement les canaux ioniques à détection d'acide (*Acid-Sensing Ion Channels*, ASICs), qui sont des senseurs du pH ambiant, activés en cas d'acidité du milieu (Vullo and Kellenberger, 2020). La sous unité ASIC1a, qui a une perméabilité élevée au Ca^{2+} , est impliquée dans un certain nombre de processus physiologiques tels que la plasticité synaptique, la peur, l'apprentissage et la mémoire (Wemmie et al., 2002, 2003, 2004). L'inhibition des ASIC1a par S1R est un composant potentiel des propriétés

neuroprotectrices des récepteurs sigma, car il a été démontré que l'activation de l'ASIC1a contribuait aux lésions induites par les arrêts vasculaires cérébraux (Xiong et al., 2004).

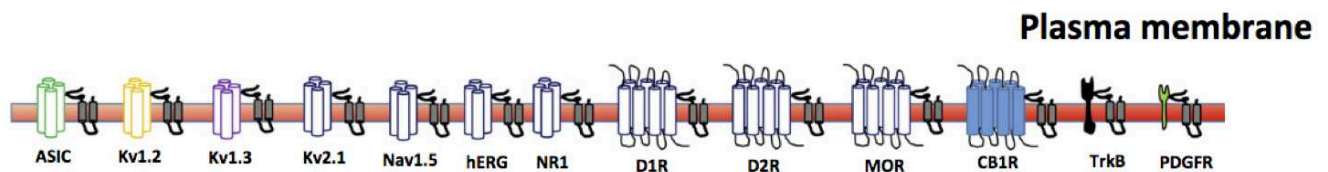


Figure 13. Différents interacteurs démontrés de S1R. S1R est représenté en gris avec ces 2 domaines transmembranaires à côté de chaque protéine avec qui S1R interagit. Abréviations : ASIC, *acid-sensing ion channel* ; Kv1.2, Kv1.3, and Kv2.1, *voltage-gated potassium channel* ; Nav1.5, *voltage-gated sodium channel* ; hERG, *human ether-a-go-go related gene* ; NR1, *NMDA receptor subunit 1* ; D1R, *dopamine receptor 1* ; D2R, *dopamine receptor 2* ; MOR, *mu opioid receptor* ; CB1R, *cannabinoid receptor 1* ; TrkB, *Tropomyosin receptor kinase B* ; PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*. Image rognée issue de (Su et al., 2016).

Des études ont montré un lien direct entre S1R et les canaux potassiques voltage-dépendants. Ces canaux sont des canaux spécifiques au potassium présents dans la membrane cellulaire, qui jouent un rôle important dans la repolarisation après le passage d'un potentiel d'action dans les tissus excitables tels que les neurones ou les muscles. L'activation de S1R améliore le trafic des canaux Kv1.2 vers la membrane plasmique dans le noyau accumbens et le cortex préfrontal, médié par l'interaction S1R-Kv1.2 et l'injection *in vivo* de cocaïne induit la translocation de S1R vers la membrane plasmique pour s'associer à Kv1.2 et augmente le courant Kv1.2 dans les neurones du noyau accumbens via cette interaction (Kourrich et al., 2013).

Les canaux sodiques voltage-dépendants sont responsables de l'initiation du potentiel d'action et de sa propagation dans les cellules excitables, telles que les cellules nerveuses, musculaires et neuroendocrines. L'activation S1R modifie l'excitabilité neuronale par ses interactions avec les canaux sodiques voltage-dépendants. En effet, il a été montré que les ligands S1R tels que l'halopéridol, la (+)-

pentazocine et le SKF-10047 dissocient S1R des *voltage-gated potassium channels* 1.5 (Nav1.5), inhibant leur activité (Johannessen et al., 2009 ; Balasuriya et al., 2012). Des études utilisant l'imagerie par AFM ont fourni des preuves de l'association directe entre S1R et Nav1.5 (Balasuriya et al., 2012). Les agonistes S1R limitent également l'excitabilité en inhibant d'autres canaux Nav, notamment Nav1.2 et Nav1.4 (Gao et al., 2012; Johannessen et al., 2009).

Le récepteur mu-opioïde (MOR) est un récepteur couplé aux RCPG qui contrôle sélectivement la perception des signaux sensoriels nociceptifs (Díaz et al., 2009). L'administration fréquente d'opioïdes tels que la morphine et ses dérivés conduit généralement au développement d'une tolérance aux analgésiques. Il a été montré que S1R est un modulateur négatif de l'analgésie aux opioïdes (Chien and Pasternak, 1994, 1995; Mei and Pasternak, 2002, 2007), notamment en interagissant avec la sous-unité NR1 des RNMDA (Rodríguez-Muñoz et al., 2015).

Les récepteurs dopaminergiques sont une classe de récepteurs couplés aux protéines G, jouant un rôle important dans de nombreux processus neurologiques, comme la locomotion, la motivation et les processus cognitifs. En utilisant des techniques basées sur le transfert d'énergie de résonance de bioluminescence, il a été rapporté une interaction moléculaire entre S1R et D1R (Navarro et al., 2010). Dans cette même étude, l'ajout de cocaïne induit une liaison de celle-ci à un hétéromère constitué de S1R et de D1R et a favorisé des changements structurels dans l'hétéromère qui ont conduit à des modifications fonctionnelles de D1R, indiquant que les altérations de la neurotransmission dopaminergique médiées par les hétéromères S1R-D1R constituent un mécanisme d'action de la cocaïne (Navarro et al., 2010). Le même groupe a découvert plus tard que le S1R interagissait avec D2R et que la liaison

de la cocaïne à ce complexe inhibait les voies de signalisation médiées par D2R en aval (Navarro et al., 2013).

Le récepteur cannabinoïde de type 1 (*Cannabinoid Receptor 1*, CB1R) est un récepteur couplé à la protéine G, impliqué dans la régulation des RNMDA (Liu et al., 2009; Marsicano et al., 2003). Une étude montre que S1R stabilise l'interaction CB1R-RNMDA, régulant ainsi l'équilibre entre les effets opposés de CB1R et RNMDA dans le cadre de l'analgésie et de certains troubles psychiatriques (Sánchez-Blázquez et al., 2014).

Le récepteur de la tropomyosine kinase B (*Tropomyosin Receptor Kinase B*, TrkB) est un récepteur catalytique de haute affinité pour plusieurs neurotrophines, tel que le BDNF qui favorise la survie, la croissance et la différenciation neuronale et synaptique (Acheson et al., 1995; Ernfors et al., 1995; Huang and Reichardt, 2001). Les agonistes de S1R favorisent la plasticité synaptique notamment car il favorise la régulation de la sécrétion de BDNF et la signalisation du récepteur TrkB à la fois *in vitro* et *in vivo* (Kikuchi-Utsumi and Nakaki, 2008; Peviani et al., 2014). Les agonistes de S1R semblent activer TrkB à la fois par des mécanismes dépendants du BDNF (Kimura et al., 2013) et des mécanismes indépendants (Ka et al., 2016), pouvant impliquer la régulation de l'expression du BDNF ainsi que des interactions directes de S1R avec le récepteur TrkB (Fujimoto et al., 2012; Ka et al., 2016; Kimura et al., 2013).

S1R stimule également la signalisation par d'autres récepteurs tyrosine kinases, notamment *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* (PDGFR) (Yao et al., 2011). En effet, S1R interagit avec PDGFR dans les cellules endothéliales microvasculaires de cerveau humain, et la cocaïne intensifie cette interaction, provoquant la translocation de S1R des MAM à la membrane plasmique.

Au niveau cytosolique, S1R agit comme un effecteur de l'activité GTPase des protéines *Cell Engulfment and Motility Domain* (ELMOD) car sa liaison directe à ELMOD1 ou ELMOD2 a entraîné une perte d'activité GTPase (Ivanova et al., 2014). Les protéines ELMOD sont des protéines activant la GTPase pour les facteurs *ADP-Ribosylation* et ARF-like et peuvent se lier à la forme activée de la GTPase pour accélérer le taux d'hydrolyse du Guanosine triphosphate (GTP) et, par conséquent, inactiver la signalisation associée. Des mutations des protéines ELMOD ont été associées à un développement de surdité chez l'Homme (Jaworek et al., 2013) et la souris (Johnson et al., 2012). Des études ont également montré que S1R est un régulateur endogène de la formation et la maturation des épines dendritiques hippocampiques via une voie de signalisation impliquant Rac1-GTP (Tsai et al., 2009).

Au niveau des MAM, S1R joue un rôle central qui nous a particulièrement intéressé dans ce travail. S1R est une protéine chaperonne résidant dans la région des MAM où il interagit avec plusieurs partenaires impliqués dans la réponse au stress du RE (Hayashi et al., 2010; Koshenov et al., 2021; Mitsuda et al., 2011; Su et al., 2010), ou dans l'échange de Ca^{2+} entre le RE et la mitochondrie (Hayashi and Su, 2007; Hayashi et al., 2000). S1R peut être activé au niveau cellulaire par de petites molécules, dites agonistes ou modulateurs positifs, qui permettent des actions pharmacologiques efficaces dans plusieurs modèles précliniques (Francardo et al., 2014; Hyrskyluoto et al., 2013; Mancuso et al., 2012; Oxombre et al., 2015; Peviani et al., 2014; Smith et al., 2008; Zhao et al., 2017). La revue ci-dessous, intitulée *At the Crossing of ER Stress and MAMs: A Key Role of Sigma-1 Receptor?* (Delprat et al., 2018), décrit le rôle majeur de S1R au niveau des MAM, notamment dans la régulation des échanges calciques et du stress du RE, et des interactions protéiques au niveau des MAM. L'efficacité de plusieurs molécules dans des modèles précliniques de

différentes pathologies décrivent ici l'importance des altérations MAM et RE dans les processus neurodégénératifs et renforce également la pertinence de S1R en tant qu'agent pharmacologique cible.

Revue 2 : **At the Crossing of ER Stress and MAMs: A Key Role of Sigma-1 Receptor?**

Benjamin Delprat, Lucie Cruzier, Tsung-Ping Su, and Tangui Maurice

Résumé

Les échanges de calcium et l'homéostasie sont finement régulés entre les organelles cellulaires et en réponse à des signaux physiologiques. Outre les ionophores, notamment les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, les récepteurs ionotropes des neurotransmetteurs ou l'entrée du Ca^{2+} par stockage, l'activité de protéines intracellulaires régulatrices règle finement l'homéostasie du calcium. L'un des mécanismes les plus intrigants, par sa nature unique, mais aussi les plus prometteurs par les opportunités thérapeutiques qu'il porte, est le récepteur sigma 1 (S1R). S1R est une protéine chaperonne résidant dans le réticulum endoplasmique associée à la mitochondrie (MAM), où elle interagit avec plusieurs partenaires impliqués dans la réponse au stress du RE, ou dans l'échange de Ca^{2+} entre le RE et les mitochondries. De petites molécules ont été identifiées, activant spécifiquement et sélectivement S1R (agonistes ou modulateurs positifs de S1R) au niveau cellulaire et permettant également des actions pharmacologiques efficaces dans plusieurs modèles précliniques de pathologies. La présente revue résume les données récentes sur le mécanisme d'action de S1R dans la régulation des échanges de Ca^{2+} et des interactions protéiques au niveau des MAM et le RE. Comme les altérations des MAM et le stress du RE apparaissent maintenant comme une piste commune dans de la plupart des maladies neurodégénératives, l'action intracellulaire de S1R est discutée dans le contexte de l'efficacité récemment rapportée des médicaments S1R dans des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington ou la sclérose latérale amyotrophique.

Advances in Experimental Medicine and Biology, 2020



**PROBLEMATIQUE ET
DEMARCHE
EXPERIMENTALE**

Le SW est une maladie génétique rare caractérisée par un diabète sucré et salé, une atrophie optique, une surdité et des troubles neurologiques. Les patients meurent en moyenne vers 35 ans, principalement d'une insuffisance respiratoire ou d'une dysphagie. Il n'existe aucun traitement pour atténuer ou stopper la progression des symptômes et il existe un besoin urgent de modèles de recherche adéquats.

L'objectif de mon travail a été d'identifier des cibles thérapeutiques pertinentes pour proposer un futur traitement aux patients atteints du SW. Il a donc conduit à identifier des molécules originales dans cette indication.

- La première étape de ma thèse a consisté à développer et caractériser des modèles d'études du SW dans le but d'isoler et de caractériser un large panel de phénotypes pathologiques comportementaux et moléculaires similaires à ceux retrouvés chez les patients atteints du SW, avec pour objectif par la suite de les ralentir/stopper.

Tout d'abord, nous avons caractérisé trois lignées de poissons-zèbres portant des mutations codons stop chez les orthologues du gène *WFS1*. Le poisson zèbre est devenu un modèle de laboratoire populaire, car il possède de nombreux avantages par rapport aux autres modèles, tels que sa facilité et son faible coût d'élevage, sa grande fécondité et son développement rapide (Kimmel et al., 1995; Spence et al., 2008). De plus, son génome est entièrement séquencé (Howe et al., 2013), et présente 70% d'homologies avec le génome humain et 84% des gènes connus pour être associés à des maladies humaines ont un homologue chez le poisson zèbre (Howe et al., 2013). Le poisson zèbre est donc un modèle pertinent pour étudier les maladies génétiques liées à des maladies humaines (Lieschke and Currie, 2007; Phillips and Westerfield, 2014; White, 2015) comme des troubles neurodégénératifs et neurologiques (Bai and Burton, 2011; Bandmann and Burton, 2010; Das and

Rajanikant, 2014; Laird et al., 2016), et il est d'autant plus un modèle puissant car il permet d'optimiser le coût et le temps d'expérimentation menant à l'identification à haut débit de molécules.

Comme le génome du poisson zèbre est dupliqué, l'impact de la mutation de *wfs1* dans les deux copies du gène, *wfs1a* et *wfs1b*, a été étudié en utilisant deux lignées mutantes : *wfs1a*^{C825X} et *wfs1b*^{W493X}. Pour supprimer complètement la fonctionnalité de la protéine Wfs1 dans ce modèle, nous avons croisé ensemble les deux lignées mentionnées ci-dessus pour créer la troisième lignée double mutante, *wfs1a*^{C825X} x *wfs1b*^{W493X}, appelée *wfs1ab*^{KO}. Un phénotypage précis des 3 lignées mutantes a participé à la compréhension de la physiopathologie du SW et a permis de confirmer leur utilité en tant que modèle pour la validation de nouvelles stratégies thérapeutiques et de manière optimiser.

Le modèle murin, second modèle animal utilisé dans cette étude, a permis de valider les effets de la modulation de l'expression/activité des cibles thérapeutiques dans un modèle mammifères du SW. La souris *Wfs1*^{ΔExon8} est un KO de l'exon 8 du gène *Wfs1* (Köks et al., 2009). La délétion de l'exon 8 murin est similaire à la mutation humaine Q366X (De Franco et al., 2017; Rigoli et al., 2018) et reproduit la forme récessive du SW. Un phénotypage comportemental de ces souris à 3 mois a permis de mettre en évidence l'impact de la mutation de *Wfs1* sur l'exploration générale, l'anxiété, l'apprentissage et la mémoire.

- La seconde étape du projet a été d'identifier des cibles thérapeutiques impliquées dans la fonction des MAM pour atténuer et/ou stopper les altérations comportementales et moléculaires isolés chez les différents modèles d'étude précédemment présentés.

Les MAM représentent une région du RE attachée de manière réversible aux mitochondries. Ces membranes sont impliquées dans l'importation de certains lipides (Lev, 2012) du RE vers les mitochondries, dans la régulation de l'homéostasie calcique (Rizzuto et al., 1998; Wu et al., 2018) et la fonction mitochondriale (Galmes et al., 2016), l'autophagie (Gomez-Suaga et al., 2017), l'apoptose (Iwasawa et al., 2011) et jouent notamment un rôle dans le développement des maladies neurodégénératives (Joshi et al., 2016; Krols et al., 2016).

Il a précédemment été montré qu'en condition pathologique, WFS1 était non fonctionnel et l'expression de NCS1, une protéine résidente des MAM, était alors réduite de 50%, induisant un déficit du transfert calcique et un dysfonctionnement mitochondrial (Angebault et al., 2018). Ces dysfonctionnements sont associés à une altération de la structure des MAM (Angebault et al., 2018; Delprat et al., 2018, 2019). De manière intéressante, la surexpression de NCS1 dans les fibroblastes de patients a restauré les déficits cellulaires observés (Angebault et al., 2018), montrant la possibilité de renverser les altérations mitochondriales induite par le SW en ciblant une protéine clé des MAM.

Notre **première hypothèse** était donc de moduler *in vivo* l'expression de NCS1 afin de corriger le dysfonctionnement des MAM en condition pathologique dans différents modèles d'étude.

Une alternative était d'identifier des protéines cibles dans les MAM dont l'activité pourrait être modulée par de petites molécules cliniquement développables, menant *in fine* à une récupération fonctionnelle.

S1R est une protéine transmembranaire du RE, hautement enrichie dans les MAM et interagissant avec plusieurs partenaires impliqués dans le transfert calcique entre le RE et la mitochondrie (Hayashi et al., 2000). Il participe aussi à l'activation des

voies de régulation du stress du RE (Hayashi and Su, 2007; Su et al., 2010). La modulation de l'activité de S1R par des agonistes a montré des effets protecteurs dans les troubles de l'apprentissage et de la mémorisation et les maladies neurodégénératives, telles que la MA, la MP, la SLA, la sclérose en plaques et la MH (Maurice and Gogvadze, 2017). L'étude d'une lignée poisson zèbre *s1r* KO, appelée *s1r^{+25/+25}*, comportant une insertion de 25 pb dans l'exon 2 du gène *sigmar1*, a permis d'analyser l'inactivation de S1r *in vivo* sur différents paramètres phénotypiques incluant les fonctions neurosensorielles (vision, audition), la locomotion, les altérations morphologiques et métaboliques. L'étude de la lignée *s1r^{+25/+25}* a confirmé les potentialités de ce modèle pour analyser plus précisément les rôles physiopathologiques *in vivo* de S1R.

Notre **seconde hypothèse** était de moduler l'activité de S1R par de petites molécules. Dans un premier temps, un des agonistes de référence de S1R, le **2-(4-morpholino)éthyl-1-phénylcyclohexane-1-carboxylate (PRE-084)** a permis de valider de manière spécifique l'effet de la modulation de l'activité de S1R dans nos différents modèles afin de corriger le dysfonctionnement des MAM en condition pathologique. Dans un second temps, l'effet du PRE-084 a été comparé à l'effet de petites molécules affines pour S1R de par leur structure dans une contexte SW, afin d'isoler une/des nouvelle/s entité/s chimique/s (NEC) brevetables dont l'efficacité serait identique voir meilleure que celle du PRE-084.

- La troisième partie du projet a donc été de rechercher des molécules originales dans cette indication afin de trouver un futur traitement pour les patients atteints du SW. Pour cela, un criblage à moyen débit de molécules a été réalisé sur le modèle poisson-zèbre *wfs1ab^{KO}*, lignée mutante la plus pertinente quant au développement de phénotypes pathologiques à 5 jours post fertilisation (jpf) comparé

aux 2 autres lignées de poissons zèbres mutantes de cette étude. Les molécules testées provenaient d'une chimiothèque issue de collaborations avec des chimistes médicaux Strasbourgeois (Laboratoire d'innovation thérapeutique, France) et Italiens (Université de Bari, Italie). Une part des molécules étaient donc sélectionnées pour leur potentialité d'être ligands S1R et leurs effets pharmacologiques ont été comparés à celui du PRE-084 sur nos modèles animaux. La modulation de l'activité de S1R par le PRE-084 a en effet été caractérisée dans de nombreuses maladies neurodégénératives et a montré une efficacité marquée (Francardo et al., 2014; Hyrskyluoto et al., 2013; Mancuso et al., 2012; Maurice et al., 1998; Peviani et al., 2014). C'est à ce titre une molécule de référence. La seconde partie du crible comprenait des molécules naturelles ou repositionnables, c'est-à-dire qui avaient par le passé atteint les phases précliniques ou cliniques dans une indication médicale. Identifier une telle molécule est une stratégie qui permettrait de gagner du temps sur le développement clinique dans le contexte SW.

Le schéma général de ce travail est décomposé donc en trois parties : (1) La caractérisation de trois modèles d'études pertinents qui reproduisent différents panels de phénotypes pathologiques observés chez les patients atteints du SW. (2) La validation de l'intérêt thérapeutique de deux cibles NCS1 et S1R, dans nos modèles du SW. (3) L'identification de NEC et d'une molécule naturelle, dans le modèle poisson zèbre mutant *wfs1ab*^{KO} de manière stratégique et efficace, ouvrant des perspectives sur le développement clinique de nouveaux médicaments.



RÉSULTATS



Partie I. Le modèle poisson zèbre est un modèle pertinent et prometteur pour étudier la physiopathologie du SW et identifier de nouvelles pistes thérapeutiques

Contexte

Pour mener à bien la première partie notre travail, deux lignées de poissons zèbres ont été obtenues par mutagénèse N-nitroso-N-éthylurée (*N-ethyl-N-nitrosourea*, ENU) afin d'induire une mutation sur le gène *wfs1*. Comme le génome du poisson zèbre est dupliqué, son génome contient deux gènes différents, *wfs1a* et *wfs1b*, et deux lignées mutantes ont été générées. La première lignée, *wfs1a*^{C825X}, a le gène *wfs1a* invalidé par le remplacement d'une cystéine par un codon stop en position 825. La seconde lignée, *wfs1b*^{W493X}, a le gène *wfs1b* invalidé par le remplacement d'un tryptophane par un codon stop en position 493. Une troisième lignée mutante a ensuite été générée à partir du croisement de ces deux lignées afin d'obtenir un double mutant *wfs1a*^{C825X} × *wfs1b*^{W493X}, appelée la lignée *wfs1ab*^{KO}, pour laquelle les deux gènes *wfs1* sont invalidés. La caractérisation phénotypique et cellulaire de la lignée *wfs1ab*^{KO} sera présentée en partie II de résultats de ce mémoire.

La caractérisation phénotypique et cellulaire des lignées *wfs1a*^{C825X} et *wfs1b*^{W493X} était dans un premier temps nécessaire pour déterminer la validité des modèles et dans un second temps pour mieux comprendre la physiopathologie du SW pour *in fine* tester des molécules actives sur une/des altérations préalablement identifiées. Une caractérisation phénotypique, en lien avec les différents symptômes développés chez l'Homme, a été réalisée. Pour cela, la morphologie générale des larves a été mesurée, ainsi que la vision, la locomotion et l'audition par l'utilisation

d'outils innovants. Par ailleurs, les impacts de la mutation de *wfs1* chez ces deux lignées au niveau cellulaire ont été étudiés, notamment sur le développement de l'œil, la taille des motoneurones mais aussi sur la régulation des voies du stress du RE et la respiration mitochondriale.

Cet article met en évidence le rôle critique de *wfs1a* et *wfs1b* sur les voies du stress du RE, la fonction mitochondriale et la physiologie de la vision. Ces modèles poissons zèbres seront les outils utilisés pour mieux comprendre la fonction cellulaire de *Wfs1* et permettront de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour traiter le SW.

Article 1

Morphological, behavioral and cellular analyses revealed different phenotypes in Wolfram syndrome *wfs1a* and *wfs1b* zebrafish mutant lines

Lucie Crouzier, Elodie M. Richard, Camille Diez, Hala Alzaeem, Morgane Denus, Nicolas Cubedo, Thomas Delaunay, Emily Glendenning, Sarah Baxendale, Jean-Charles Liévens, Tanya T. Whitfield, Tangui Maurice et Benjamin Delprat

Human Molecular Genetics, 2022

Résultats

La combinaison des caractéristiques génétiques et développementales du poisson zèbre place le criblage de petites molécules sur ce modèle à la pointe de la biologie chimique, permettant ainsi d'identifier des cibles thérapeutiques et de découvrir des médicaments (Crouzier et al., 2021; Taylor et al., 2010).

Dans le but de trouver un modèle pertinent pour tester et identifier des molécules thérapeutiques, nous avons ici caractérisé deux lignées de poissons zèbres mutantes pour le gène *wfs1*. Les lignées mutantes *wfs1a*^{C825X} et *wfs1b*^{W493X} ont été étudiées afin d'analyser la perte de fonction de chaque protéine sur le développement des larves de poisson zèbre à 5 jpf, mais aussi sur leurs fonctions visuelles, auditives, locomotrices, mitochondriales et sur la réponse au stress du RE.

Le pattern d'expression de *wfs1a* et *wfs1b* par hybridation *in situ* chez la larve de poisson zèbre a permis de mettre en évidence l'expression musculaire spécifique de *wfs1a* alors que l'expression de *Wfs1b* est plus ubiquitaire, comme observés dans d'autres études (Cairns et al., 2021; Diez-Roux et al., 2011; Yamada et al., 2006). Chez des patients atteints du *Wolfram-like syndrome*, des mutations faux-sens dominantes dans le gène *WFS1* mènent à une hypotonie (De Franco et al., 2017), suggérant qu'un défaut métabolique dans le muscle des larves *wfs1a*^{C825X} pourrait contribuer aux déficits locomoteurs observés.

Les deux gènes *wfs1* ont été exprimés dans le cerveau aux étapes que nous avons analysé (24 hpf–10 jpf), avec une expression plus marquée pour *wfs1b* aux premiers stades de développement.

Aucun des deux gènes n'a montré de forte expression dans l'oreille ou l'œil des larves de poissons zèbres entre 3 et 4 jpf, mais à 7 et 10 jpf l'expression de ceux-ci était évidente au niveau de la rétine ainsi que le long de la vésicule otique. Chez les

larves *wfs1a*^{C825X}, une altération de la taille des segments externes des photorécepteurs de type bâtonnets a été notée, pouvant être corrélée avec des électrorétinogrammes anormaux dans certains cas chez des patients atteints du SW (Scaramuzzi et al., 2019). Aucune différence dans la taille des bâtonnets, du nombre de cônes ou de CGR n'a été révélée pour les larves *wfs1b*^{W493X}. Néanmoins, les deux lignées ont une fonction visuelle altérée lors de la mesure par les tests *Visual Motor Response* (VMR) et *Optokinetic Response* (OKR). Une diminution de la distance parcourue durant les phases sombres et, pour les larves *wfs1b*^{W493X} uniquement, une diminution du nombre de saccades, permet de suggérer un déficit de leur acuité visuelle à 5 jpf.

Aucun impact de la mutation de *wfs1* n'a été observé sur la morphologie globale des deux lignées mutantes à 5 jpf, mais des différences à des stades plus précoces ont été relevées par Cairns et collaborateurs telles qu'une diminution de la taille des larves (Cairns et al., 2021). L'absence de tout défaut morphologique global chez nos deux lignées est également en faveur d'une atteinte rétinienne et/ou rétinoectale plutôt qu'une anomalie musculaire ou locomotrice qui pourrait donc biaiser la mesure de la réponse locomotrice suite à une quelconque stimulation. Comme Cairns *et al.*, nous avons observé un défaut transitoire de la longueur des motoneurones de la queue des larves à 24 heures post fertilisation (hpf), défaut totalement restauré à 48 hpf. Cependant, une augmentation de la longueur des motoneurones de la queue des deux lignées a été observée dans notre étude alors que Cairns *et al.* ont rapporté une diminution chez la lignée *wfs1b* (Cairns et al., 2021), ceci pouvant s'expliquer par une différence de conditions d'élevage ou bien la région de comptage des motoneurones n'a pas été exactement identique, biaisant ainsi la mesure. Une autre explication serait

que puisque la mutation *wfs1* n'est pas la même dans nos lignées *wfs1a* (Crouzier et al., *wfs1a*^{C825X}; Cairns et al., *wfs1a*^{W692X}), elle peut induire un phénotype différent.

L'expression de *wfs1* dans l'oreille interne semble être présente pour les deux gènes. À cela, peut être corrélé l'augmentation de la taille de la zone de l'oreille chez les larves *wfs1a* mutantes à 5 jpf. Cependant, aucune différence dans la fonction auditive n'a été observée chez les deux lignées mutantes en utilisant le test *Acoustic Startle Response* (ASR), suggérant que l'anomalie structurelle n'était pas corrélée à une anomalie fonctionnelle. Si l'on compare à l'Homme, la perte auditive apparaît chez 46% des patients (Chausseot et al., 2011) à la seconde décennie de vie et même si la surdité est un phénotype éminent du SW, aucune étude chez la souris n'a rapporté de déficit auditif, évoquant un déficit auditif léger ou inexistant ou une apparition tardive du phénotype. À cela s'ajoute le manque de corrélation structurale de l'oreille interne de poisson zèbre avec l'Homme. Il est donc difficile de déterminer si l'absence de surdité chez nos deux lignées mutantes est liée à l'âge des larves par rapport à l'Homme ou si la structure/fonction de l'oreille interne du poisson zèbre est trop différente de celle de l'Homme.

Au niveau cellulaire, l'une des fonctions de *wfs1* est la régulation du stress du RE (Eizirik et al., 2008; Fonseca et al., 2007; Riggs et al., 2005; Yamada et al., 2006). En condition basale, la perte de fonction de *wfs1a* a eu un impact sur les niveaux d'expression de *bip*, *atf4α* et *chop*, suggérant que la voie PERK a été modifiée, et la perte de fonction de *wfs1b* a eu un impact sur le niveau d'expression de *bip*, *atf4α*, *ire1* et *xbp1us*, suggérant que les voies IRE1 et PERK ont été modifiées.

En condition de stress du RE par traitement à la Tunicamycine, la perte de fonction de *wfs1a* impacte de manière relative et/ou significative seulement l'expression de *perk* et *atf4α*, suggérant ici une régulation du stress du RE. La perte

de fonction de *wfs1b* a entraîné une altération relative et/ou significative des niveaux d'expression de *bip*, *ire1*, *xbp1s*, *xbp1us*, *perk*, *atf4 α* et *chop*, confirmant ainsi que les voies PERK et IRE1 sont affectées par la mutation en condition de stress.

L'autre fonction de *wfs1* est la régulation de l'activité mitochondriale (Angebault et al., 2018). À travers la technologie du Seahorse XFe24, la respiration mitochondriale des larves vivantes de 5 jpf en temps réel a été analysée. À 2 jpf, les larves mutantes *wfs1b*^{W493X} ont montré une diminution de la respiration basale, de la production d'ATP et de la respiration maximale, mais curieusement, à 5 jpf, une diminution de la respiration non mitochondriale chez les mutants *wfs1b*^{W493X} a uniquement été observée. La lignée *wfs1a*^{C825X} n'a montré aucune altération de l'activité mitochondriale à 2 et 5 jpf. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'expression de *wfs1a*, vue en hybridation *in situ*, semble être plus spécifique des tissus comparé à *wfs1b*, suggérant que de la mesure d'une potentielle altération mitochondriale dans le(s) tissu(s) exprimant *wfs1a* est dilué dans l'organisme entier du poisson zèbre.

En résumé, ces deux lignées permettent de mettre évidence le rôle critique de *wfs1a* et *wfs1b* dans la régulation du stress du RE, la fonction mitochondriale et la physiologie visuelle. Le tableau clinique retrouvés chez les larves *wfs1a* et *wfs1b* mutantes sont cohérents avec les déficits induits par WFS1 chez les mammifères. Cependant, les résultats de cette étude suggèrent que *wfs1b* est plus proche de WFS1 chez les mammifères que son orthologue *wfs1a* chez le poisson zèbre en terme de pattern d'expression cellulaire, de fonction et de physiopathologie. Une modification vraisemblablement plus pertinente consisterait à croiser les lignées *wfs1a*^{C825X} et *wfs1b*^{W493X} pour abolir complètement Wfs1 afin d'être dans des conditions géniques identiques aux patients, créant ainsi la lignée double mutante *wfs1ab*^{KO}. Ce modèle a donc été caractérisé dans la suite de ce travail de la même manière que ci-dessus.

Partie II. Caractérisation de la lignée poisson zèbre *wfs1ab^{KO}* et exploration du potentiel thérapeutique de NCS1 dans un contexte physiopathologique du SW

Contexte

L'altération de l'expression de WFS1 entraîne un stress du RE associé à un dysfonctionnement d'IP3R, menant à une altération du Ca^{2+} cellulaire et un déficit de la dynamique mitochondriale, à l'origine de l'inhibition du développement neuronal (Cagalinec et al., 2016).

NCS1 est un partenaire d'interaction direct avec WFS1 au niveau des MAM (Angebault et al., 2018). C'est une protéine cytoplasmique de liaison au Ca^{2+} , abondante dans les neurones (Pongs et al., 1993). NCS1 est un capteur de Ca^{2+} qui régule de manière générale la neurotransmission (Dason et al., 2012; Pongs et al., 1993), la plasticité synaptique (Saab et al., 2009), l'exocytose (McFerran et al., 1998) et l'endocytose, la croissance neuronale (Hui et al., 2007; Iketani et al., 2009), la neuroprotection (Nakamura et al., 2006) et la régulation du Ca^{2+} nucléaire (Nakao et al., 2015). En condition physiologique, NCS1 favorise les contacts entre le RE et les mitochondries et le transfert de Ca^{2+} , contrôlant ainsi la bioénergétique mitochondriale. En condition pathologique, l'absence de cette interaction entraîne l'altération du transfert calcique et le dysfonctionnement de la bioénergétique mitochondriale, pouvant entraîner l'activation de la mort cellulaire dans les tissus affectés par le syndrome de Wolfram (Angebault et al., 2018; Cagalinec et al., 2016).

Dans les fibroblastes humains, l'inactivation de NCS1 a altéré l'homéostasie calcique et la fonction mitochondriale, démontrant ainsi que NCS1 est une cible permettant de maintenir la fonction mitochondriale et l'intégrité des MAM. Ceci est

validé par la surexpression de NCS1 dans les fibroblastes de patients qui a permis de restaurer le déficit mitochondrial et le niveau de Ca^{2+} cytosolique (Angebault et al., 2018). NCS1 est donc une cible médicamenteuse pour le traitement du SW.

Le modèle poisson zèbre est un modèle efficace qui permet d'identifier de nouveaux traitements, en particulier dans les maladies génétiques rares (Crouzier et al., 2021). Dans un premier temps, la caractérisation phénotypique et cellulaire de la lignée mutante *wfs1ab*^{KO} a été réalisée. Cette lignée possède les gènes *wfs1* invalidés car il est issu du croisement des deux lignées mutantes *wfs1a*^{C825X} et *wfs1b*^{W493X}. Chez le double mutant, ni *Wfs1a* ni *Wfs1b* ne sont fonctionnels et aucune compensation ou expression altérée n'interfererait. La lignée *wfs1ab*^{KO} a été caractérisée au niveau comportemental et cellulaire afin d'identifier un phénotype pathologique robuste et en cohérence avec les différents symptômes présents chez l'Homme. Pour cela, la morphologie générale des larves a été mesurée, ainsi que la vision, la locomotion et l'audition via l'utilisation d'outils innovants. Les impacts de la mutation de *wfs1* au niveau cellulaire ont également été étudiés, notamment sur le développement de l'œil, les voies du stress du RE et la respiration mitochondriale.

Dans un second temps, l'effet de la surexpression de *Ncs1* chez le modèle poisson zèbre *wfs1ab*^{KO} a été analysé au niveau comportemental et cellulaire. Il existe deux copies de *ncs1* chez le poisson zèbre, *ncs1a* et *ncs1b*. En utilisant une séquence optimisée pour son expression chez le poisson zèbre, le gène murin *Ncs1* a été surexprimé par microinjection d'ARNm chez la lignée *wfs1ab*^{KO} au stade embryonnaire.

De manière générale, cet article évalue l'efficacité de la surexpression de *Ncs1* dans un modèle *in vivo* du SW sur la plupart des altérations comportementales et cellulaires caractérisées.

Article 2

**NCS1 overexpression restored mitochondrial activity and behavioral alterations
in a novel zebrafish model of Wolfram syndrome**

Lucie Crouzier, Elodie M. Richard, Camille Diez, Morgane Denus, Hala Alzaeem,
Amandine Peyrel, Nicolas Cubedo, Thomas Delaunay, Tangui Maurice, Benjamin
Delprat

Soumis dans *Molecular Therapy Methods and Clinical Development*, 2022

Résultats

La lignée poisson zèbre mutante *wfs1ab*^{KO} a été caractérisée à 5 jpf afin de mesurer l'impact de la mutation de *wfs1* sur son comportement et ses fonctions cellulaires. L'absence de Wfs1 n'a eu aucun effet sur la morphologie globale de la larve de poisson zèbre, à l'exception de l'augmentation de la taille de l'oreille, comme observée chez les larves *wfs1a*^{C825X} (Crouzier et al., 2022b). Cette anomalie morphologique n'est pas à corrélée avec une altération fonctionnelle car les larves *wfs1ab*^{KO} ne présentent aucun déficit auditif mesuré par le test ASR.

La perte de fonction de Wfs1 impacte la fonction visuelle et locomotrice des larves *wfs1ab*^{KO}, mesurée par le test VMR. Ce déficit est traduit par une augmentation de la réponse locomotrice des larves *wfs1ab*^{KO} comparés aux contrôles durant les différentes phases de variations lumineuses, pouvant être corrélée avec une diminution du nombre de photorécepteurs des larves mutantes vues par analyses immunohistochimiques des cônes et bâtonnets de coupes de rétine de larves de 5 jpf.

La réponse du reflexe moteur des larves a également été mesurée en utilisant le comportement d'échappement par une stimulation tactile (le test du contact-fuite). Après stimulation, les larves *wfs1ab*^{KO} ont montré une augmentation significative de leur distance parcourue dans le rail comparé aux contrôles, suggérant ainsi une altération motrice qui pourrait être liée à la réponse locomotrice accrue précédemment observée dans le test VMR.

Au niveau cellulaire, *wfs1* participe à la régulation du stress du RE (Eizirik et al., 2008; Fonseca et al., 2007; Riggs et al., 2005; Yamada et al., 2006). Les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la cascade de régulation du stress du RE ont donc été analysés par qPCR et western blot chez le poisson zèbre mutant *wfs1ab*^{KO} entier à 5 jpf. En condition basale, la perte de Wfs1 n'affecte que le niveau d'expression

de *eif2s1* et *chop*. En condition de stress du RE, le génotype a eu un léger impact sur la réponse des gènes au traitement à la Tunicamycine. Ces résultats suggèrent que l'inactivation de *Wfs1* chez le poisson zèbre n'a eu qu'un léger impact au niveau des voies UPR, limité à certains marqueurs de la voie dépendante de PERK.

Les déficits observés chez les larves *wfs1ab*^{KO} ne seraient donc pas induits par une dérégulation du stress du RE comme décrit chez les cellules β pancréatiques (Fonseca et al., 2005; Shang et al., 2014) mais plutôt une altération de la fonction mitochondriale démontrée dans les fibroblastes de patients humains et les souris *Wfs1* ^{Δ Exon8} (Angebault et al., 2018; Crouzier et al., 2022a).

L'autre fonction de *wfs1* est d'interférer avec l'activité mitochondriale. En ce sens, il a été montré qu'un déficit en WFS1 dans les fibroblastes humains était associé à une diminution de l'absorption de Ca^{2+} par les mitochondries, à une réduction du contact RE/mitochondrie et à une diminution de la respiration mitochondriale (Angebault et al., 2018; Crouzier et al., 2022a). La respiration mitochondriale en temps réel et sur larves vivantes de 5 jpf a été analysée avec un analyseur Seahorse XFe24. Une augmentation de la respiration basale et maximale, et de la consommation d'ATP est notée chez les larves *wfs1ab*^{KO} comparées aux contrôles. Cette augmentation de l'activité mitochondriale pourrait être liée à un niveau de glucose anormalement élevé corrélée à la mutation de *wfs1* même si nos résultats de dosage du glucose ne révèlent aucune altération, probablement dû à l'utilisation d'une technique de dosage trop grossière (Accu-Chek Performa). En effet, une concentration élevée de glucose dans des cellules de primate non humain entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène (Wang et al., 2005). Une autre hypothèse serait que la concentration en dopamine serait altérée chez les larves *wfs1ab*^{KO}, comme mesuré par microdialyse *in vivo* chez des souris *Wfs1*^{KO} perfusé au K^+ (Matto et al., 2011). Cette différence de

production de dopamine pourrait partiellement contribuer aux troubles d'adaptation des souris *Wfs1*^{KO} dans un environnement stressant (Luuk et al., 2009). Deux autres études ont également montré qu'un traitement à la L-DOPA et à la dopamine entraînaient une diminution de la production d'ATP et de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ben-Shachar et al., 2004; Przedborski et al., 1993). À l'inverse, le déficit en neurotransmetteur pourrait entraîner une augmentation de la consommation d'oxygène cellulaire (*Oxygen consumption rate*, OCR) chez les larves *wfs1ab*^{KO}, mais cette hypothèse reste à vérifier.

L'analyse de l'effet de la surexpression de NCS1 dans un contexte du SW *in vivo* est la dernière partie de cette étude. Pour cela, l'ARNm de Ncs1 murin a donc été microinjecté au stade embryonnaire chez la lignée *wfs1ab*. À 5 jpf, l'hyperlocomotion des larves *wfs1ab*^{KO} mesurée par le test VMR et l'altération de la respiration mitochondriale mesurée ont été atténuées partiellement ou totalement après la surexpression de Ncs1. La restauration de ces déficits locomoteurs et visuels est probablement directement corrélée à la restauration initiale de l'altération mitochondriale induite par la surexpression de Ncs1 observée par la mesure de la respiration mitochondriale.

Pour conclure, le modèle poisson zèbre *wfs1ab*^{KO} est un modèle pertinent dans le contexte SW, mimant certains déficits physiologiques et cellulaires associés aux patients. La thérapie génique utilisant NCS1 comme cible thérapeutique dans un contexte SW est innovant et aujourd'hui seules des études *in vitro* ont montré son efficacité thérapeutique (Angebault et al., 2018; Nguyen et al., 2020). Notre étude sur modèles *in vivo* révèle pour la première fois l'effet thérapeutique de NCS1 dans un organisme entier, ouvrant la voie à une stratégie thérapeutique efficace.

Partie III. Analyse de l'inactivation de S1R dans un modèle poisson zèbre sur différentes fonctions cellulaires associées aux MAM

Contexte

De par sa localisation à la membrane du RE, tout comme NCS1, S1R joue un rôle important au niveau des MAM (Hayashi and Su, 2007). En condition physiologique, S1R est une protéine qui chaperonne différentes protéines partenaires dont IP3R, IRE1, et d'autres protéines à la membrane du RE (Hayashi and Su, 2007; Hayashi et al., 2000; Mori et al., 2012; Su et al., 2010). Dans des conditions de stress cellulaire ou via une stimulation par des agonistes, S1R se dissocie de BiP, améliorant ainsi l'entrée de Ca^{2+} dans les mitochondries et la production d'ATP (Boehning et al., 2003; Hayashi et al., 2000; Mori et al., 2013).

De plus, sous stress du RE induit par traitement à la Tunicamycine, S1R est régulé positivement, suggérant qu'il protège contre le stress du RE. Fait intéressant, la surexpression sur S1R diminue l'activation du stress du RE induit par l'activation de la voie PERK et ATF6 (Ha et al., 2011b). S1R améliore également la stabilité de IRE1 au niveau des MAM en favorisant le niveau de phosphorylation de IRE1 lors d'un stress du RE, régulant la survie cellulaire en transmettant le message des ROS des mitochondries au noyau ainsi qu'en atténuant le stress du RE (Mori et al., 2013). De plus, l'activation de S1R augmente l'expression de Bcl-2, permettant l'interaction Bcl-2/IP3R, conduisant à l'augmentation de l'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie et à l'augmentation de la production d'ATP (Yang et al., 2007). S1R atténue également la formation des ROS en améliorant la signalisation de Nrf2 (Wang et al., 2015).

Lors de la stimulation de S1R par des agonistes ou par des facteurs de stress, S1R se déplace vers la membrane plasmique pour interagir avec les canaux ioniques,

les récepteurs et les kinases (Chu and Ruoho, 2016; Su et al., 2010). S1R se déplace également à l'enveloppe nucléaire (Mavlyutov et al., 2015; Tsai et al., 2015), interagissant alors avec des protéines résidentes de l'enveloppe nucléaire. Par exemple, une étude collaborative impliquant l'équipe a montré récemment que dans un sous-groupe de patients atteints de la SLA/démence frontotemporale (FTD), l'expansion répétée G4C2 de l'ARN du chromosome C9orf72 se lie aux *Ran activating proteins* (RanGAP) au niveau des pores nucléaires, entraînant un déficit du transport nucléocytoplasmique et une accumulation de Ran dans le cytosol, une GTPase qui assure l'échange nucléocytoplasmique de macromolécules à travers l'enveloppe nucléaire. Chez les patients C9orf72, Ran est fortement accumulée dans le cytoplasme, ce qui est associé à un déficit du transport nucléocytoplasmique (Ferreira, 2019; Zhang et al., 2015a). S1R inverse les effets pathologiques des répétitions G4C2 *in vitro* et chez la drosophile. Pour cela, S1R colocalise avec RanGAP et les protéines de pores nucléaires (nucléoporines) en stabilisant ces dernières. Fait intéressant, S1R se lie directement aux répétitions G4C2. Ces résultats suggèrent que S1R pourraient bénéficier aux patients atteints de SLA/FTD C9orf72 en chaperonnant l'assemblage des pores nucléaires et l'atténuation des répétitions G4C2 délétères (Lee et al., 2020). Dans une étude plus récente, il a été montré que S1R facilite le transport du facteur de transcription TFEB dans le noyau en chaperonnant la nucléoporine POM121 à l'enveloppe nucléaire, nécessaire pour initier l'autophagie et améliorer la survie cellulaire (Wang et al., 2022).

Déterminer le mécanisme par lequel des molécules neuroactives exercent leurs effets reste l'un des grands défis de la neuropharmacologie. La plupart des composés neuro-actifs agissent sur plusieurs cibles, avec une difficulté d'isoler les cibles responsables des effets *in vivo*. L'activité de S1R peut être modulée par de petites

molécules agissant comme des agonistes, ayant bien souvent des effets thérapeutiques dans les maladies neurodégénératives telles que la MA, la MP, la MH et la SLA (Mancuso et al., 2012; Marrazzo et al., 2005; Mavlyutov et al., 2013; Meunier et al., 2006; Peviani et al., 2014), mais aussi dans d'autres maladies telles que les troubles cardiaques (Bhuiyan and Fukunaga, 2009; Lewis et al., 2020; Tagashira et al., 2010), la douleur chronique (Gris et al., 2014; Kibaly et al., 2008; Xiong et al., 2020), la dépression (Chaki et al., 2004; Omi et al., 2014; Urani et al., 2001), l'addiction (Kourrich et al., 2013; Maurice et al., 2003; Peeters et al., 2004) et le cancer (John et al., 1999; Palmer et al., 2007; Vilner et al., 1995).

De par ses nombreux avantages, le poisson zèbre est un précieux modèle pour la recherche pharmacologique et toxicologique (Howe et al., 2013; Taylor et al., 2010). Par conséquent, une étude sur des poissons zèbres $s1r^{KO}$ permettrait de renforcer l'importance de S1R sur la communication RE/mitochondrie et serait donc un outil utile pour analyser plus en profondeur les rôles physiopathologiques de S1R *in vivo* dans de nombreux troubles.

Pour cela, une lignée poisson zèbre, nommée $s1r^{+25/+25}$, a été créée récemment par Rennekamp et collaborateurs en utilisant la mutagenèse médiée CRISPR/Cas9 (Rennekamp et al., 2016). Cette lignée $s1r^{+25/+25}$ possède une insertion de 25 pb dans l'exon 2 du gène *sigmar1*, entraînant un décalage du cadre de lecture. La mutation a été créée juste en amont de la séquence du gène qui code la partie la plus conservée de la protéine S1R.

La caractérisation phénotypique et cellulaire de la lignée poisson zèbre $s1r^{+25/+25}$ a été réalisée en lien avec les différentes fonctions physiologiques et cellulaires de S1R mais également en lien avec les différents déficits observés dans d'autres modèles déficitaires en S1R (Bernard-Marissal et al., 2015; Chevallier et al.,

2011; Ha et al., 2011a; Pal et al., 2012; Sha et al., 2015). Pour cela, la morphologie générale des larves a été mesurée, ainsi que les fonctions neurosensorielles telles que la vision, l'audition, et la locomotion. Au niveau cellulaire, l'impact de l'invalidation de *sigma1* chez la lignée *s1r^{+25/+25}* a été étudié, notamment sur le développement de l'œil mais aussi sur la régulation des voies du stress du RE et l'activité mitochondriale.

De manière générale, cet article évalue l'effet de l'activité de S1R dans la régulation physiopathologie de la bioénergétique mitochondriale dans un modèle poisson zèbre et confirme les potentialités de ce modèle pour analyser plus précisément les rôles physiopathologiques *in vivo* de S1R.

Article 3

Sigma-1 Receptor Is Critical for Mitochondrial Activity and Unfolded Protein Response in Larval Zebrafish

Lucie Crouzier, Morgane Denus, Elodie M. Richard, Amarande Tavernier, Camille Diez, Nicolas Cubedo, Tanguy Maurice and Benjamin Delprat

International Journal of Molecular Sciences, 2021

Résultats

La lignée poisson zèbre $s1r^{+25/+25}$ a été caractérisée à 5 jpf afin de mesurer l'impact de l'inactivation de *sigmar1* sur son comportement et ses fonctions cellulaires. De manière générale, l'absence de *sigmar1* n'a eu aucun effet sur la morphologie globale de la larve de poisson zèbre, en termes de taille corporelle, de diamètre de l'œil, de surface de l'oreille et d'otolithes antérieurs et postérieurs.

La perte de *sigmar1* impacte la fonction locomotrice des larves à 5 jpf. Ce paramètre est analysé par le test VMR et une augmentation de la distance parcourue durant les phases ON et OFF est observée chez les larves $s1r^{+25/+25}$ à 5 jpf comparé aux contrôles. De manière intéressante, S1R est fortement exprimé dans les interneurones (Zhang et al., 2017) et les motoneurones (Alonso et al., 2000), permettant respectivement de transmettre l'information au muscle et d'activer par la suite le muscle pour effectuer un mouvement. Ces informations peuvent donc être mises en relation avec la perte de *sigmar1* au cours du développement dans ce modèle, induisant rapidement des altérations locomotrices à 5 jpf. Cependant, ce trait phénotypique n'est pas retrouvé dans d'autres études menées chez d'autres modèles animaux tels que la souris ou le rat (Chevallier et al., 2011; Eachus et al., 2021; Fontanilla et al., 2009; Langa et al., 2003; Sabino et al., 2009). Enfin, de manière étonnante, la réponse d'échappement tactile mesurée par le test de contact-fuite n'a pas été altérée chez les larves $s1r^{+25/+25}$. Une étude menée sur cette lignée mutante révèle une augmentation de l'immobilité des larves comparé aux contrôles suite à des changements de lumière dans la Zebrabox[®] (Rennekamp et al., 2016). Ces résultats ne sont pas directement comparables avec nos résultats car les analyses ne sont pas réalisées au même stade de développement (5 jpf vs 7 jpf) et le protocole de lumière appliqué est différent, ce qui peut influencer de manière significative les résultats.

Les réseaux neuronaux de la larve de poisson zèbre permettent en condition physiologique une réponse comportementale dynamique qui interrompt de manière transitoire la nage continue, éloignant le poisson de la menace (Berg et al., 2018). L'absence de ce déficit dans notre étude est probablement induite par une adaptation du réseau neuronal des larves $s1r^{+25/+25}$ en absence de *sigmar1* dans les motoneurones et interneurones.

Au niveau de l'œil, S1R est exprimé dans la glande lacrymale, la cornée, le corps iris-ciliaire, le cristallin et la rétine (Bucolo et al., 1999; Ola et al., 2001; Schoenwald et al., 1993). Dans la rétine, S1R est fortement exprimé dans les cellules de la couche ganglionnaire, dans les cellules de la couche nucléaire interne, dans l'épithélium pigmentaire et le nerf optique (Liu et al., 2010; Ola et al., 2002; Senda et al., 1997). Dans les cellules de Müller et les CGR, des études d'immunohistochimiques localisent S1R à la membrane du RE et à la membrane nucléaire (Ha et al., 2011b; Jiang et al., 2006). Un traitement à la (+)-pentazocine, un ligand spécifique de S1R dérivé de la morphine, protège contre la perte des CGR induite par le stress oxydatif sur des modèles *in vitro* (Dun et al., 2007; Martin et al., 2004) et *in vivo* (Smith et al., 2008).

Dans cette étude, l'effet de la perte de S1R sur les CGR et les photorécepteurs de larves de poisson zèbre a été analysé à 5 jpf. Chez les larves $s1r^{+25/+25}$, une diminution significative du nombre de CGR et de la taille des segments externes des bâtonnets a été mesurée par immunofluorescence, confirmant le rôle de S1R dans la physiologie rétinienne. Cependant, ce déficit n'est probablement pas assez important pour induire une altération physiologique au test VMR.

Au niveau cellulaire, S1R module l'induction de voies du stress du RE (Koshenov et al., 2021; Mitsuda et al., 2011; Su et al., 2010; Zhemkov et al., 2021).

En condition basale, le taux d'ARNm de *bip* et *hsp90b1* n'était pas affecté chez les larves *s1r^{+25/+25}*, mais le taux d'ARNm de *ire1*, *xbp1s* et *xbp1us* était fortement diminué comparé aux contrôles. Les taux d'ARNm de *perk*, *eif2s1* et *atf4β* ont également été fortement réduits en absence de S1R. Cependant, *atf6* est resté inchangé et le taux d'ARNm de *chop* a augmenté de manière significative chez les larves *s1r^{+25/+25}*. Au niveau protéique, l'expression de Bip et p-Eif2α /Eif2α a été significativement diminuée chez les larves *s1r^{+25/+25}* par rapport aux contrôles, tandis que l'expression de Chop est inchangée. Ces résultats suggèrent que l'invalidation de *sigmar1* chez le poisson zèbre conduirait à une dérégulation de la réponse au stress et plus particulièrement des voies IRE1 et PERK.

En activant les différentes voies de régulation de stress du RE par un traitement des larves durant 24 h à la Tunicamycine (Jackisch et al., 2020), la modulation de l'expression des différents marqueurs du stress du RE, et en absence de S1R, a été analysée par qPCR. Fait intéressant, le génotype a eu un impact majeur sur la réponse au stress du RE avec le traitement à la Tunicamycine, montrant une surexpression plus élevée de *bip*, *ire1*, *xbp1s*, *xbp1us*, *atf4β* et *atf6*, chez les larves *s1r^{+25/+25}* comparé aux larves contrôles, suggérant que l'absence de S1R chez les larves modifie la réponse UPR et la régulation du stress du RE. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études montrant que l'activité de S1R était liée aux voies IRE1 et PERK dans des conditions physiopathologiques (Moriyama et al., 2018; Shenkman et al., 2021).

S1R participe également à la régulation de l'homéostasie mitochondriale (Boehning et al., 2003; Hayashi et al., 2000; Mori et al., 2013). En effet, l'activité S1R facilite la respiration oxydative en condition physiologique dans les cellules cérébrales (Gogvadze et al., 2019) ainsi que dans les cellules cardiaques (Abdullah et al., 2018; Tagashira et al., 2013). L'inhibition ou la perte de la fonction de S1R réduit les contacts

entre les mitochondries et le RE dans les motoneurones à la fois *in vitro* et *in vivo*, causant potentiellement une altération de la bioénergétique et du transport mitochondrial vers la synapse (Bernard-Marissal et al., 2015). L'effet de S1R sur le complexe I est Ca^{2+} dépendant et l'activité du complexe I est également dépendante de Ca^{2+} et directement modulée par l'activité de MCU. En effet, le Ca^{2+} module plusieurs enzymes du cycle de Krebs dont l'isocitrate déshydrogénase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase, responsables de la génération de NADH et fournissent ainsi le substrat pour l'activité du complexe I (Abdullah et al., 2018; Gogvadze et al., 2019; Morihara et al., 2018).

Le taux de consommation d'oxygène sur la lignée *s1r* a été mesurée à 5 jpf, révélant une diminution significative de la respiration basale et de la production d'ATP a été mesurée chez les larves *s1r^{+25/+25}* comparé aux contrôles. Egalement, après traitement des larves à la Tunicamycine pendant 24 h, les niveaux de respiration mitochondriale basal et la production d'ATP diminuent au même niveau qu'en absence de S1R sans traitement. Ces résultats confirment le rôle spécifique de S1R dans la bioénergétique cellulaire et en particulier la respiration oxydative mitochondriale liée à la production d'ATP.

Pour conclure, la lignée mutante *s1r^{+25/+25}* a montré à 5 jpf des déficiences visuelles et locomotrices, une atteinte des voies de stress du RE plus particulièrement des voies de IRE1 et de PERK, et un déficit de l'activité mitochondriale. Ce nouveau modèle de poisson zèbre a confirmé l'importance de l'activité S1R sur la communication entre le RE et les mitochondries. Ce sera un outil utile pour analyser plus précisément les rôles physiopathologiques de S1R.

Partie IV. L'importance pharmacologique de l'activité de S1R dans la restauration des symptômes du SW

Contexte

Le modèle poisson zèbre est un modèle d'étude pertinent qui peut développer des déficits comportementaux et cellulaires spécifiques de pathologies humaines permettant, par ses avantages morphologiques, génétiques et reproducteurs, d'optimiser l'identification et le développement de médicament.

La valorisation de la première cible que nous avons validée, NCS1, peut se concevoir dans une approche de thérapie génique, chez le patient. Cependant, la thérapie génique a des limitations importantes qui sont la sélection de vecteurs pertinents, la sélection du promoteur approprié, un développement coûteux du médicament pour une maladie aussi rare et *in fine* le taux de réponse des patients. La plupart des études cliniques en cours sur la cible sont basées sur des résultats obtenus sur modèles cellulaires, ne montrant pas l'efficacité de NCS1 dans un système complexe et vivant. Le modèle poisson zèbre présente également des limites car l'expression de l'ARNm injecté au stade embryonnaire est transitoire. Une meilleure alternative serait donc d'identifier une protéine cible des MAM pouvant être modulée avec de petites molécules administrables par voie systémique et actives en administration chronique, pour permettre une récupération fonctionnelle cellulaire de l'ensemble des tissus endommagés.

S1R est à ce titre une cible pertinente des MAM. La modulation de son activité par l'agoniste de référence, le PRE-084, a été décrite dans de nombreux contextes pathologiques (De Pablo-Fernandez et al., 2017; Maurice et al., 1994b, 1998; Motawe et al., 2020; Peviani et al., 2014; Su et al., 1991). Nous avons donc analysé l'impact

de l'activation de S1R, par surexpression dans le poisson zèbre *wfs1ab*^{KO} et par administration de PRE-084 dans le modèle poisson et la modèle souris *Wfs1*^{ΔExon8}. Ces analyses *in vivo* ont été approfondies sur le modèle *in vitro* des fibroblastes de patients en collaboration avec le groupe du Dr Paolo Pinton et ses collaborateurs (Université de Ferrare, Italie).

Le modèle souris *Wfs1*^{ΔExon8} reproduit la pathologie humaine récessive, avec la suppression de plus de 90% de l'exon 8 et 60% de la séquence codante totale. Nous avons commencé par une caractérisation phénotypique de ces souris à 3 mois d'âge, pour identifier comment elle développe des déficits comportementaux suite à la mutation de WFS1. L'article suivant présente la caractérisation de différents modèles d'étude du SW montrant chacun un panel de déficits propre à la pathologie et évalue l'efficacité de la modulation de S1R par une stratégie pharmacologique ou par surexpression sur les altérations des MAM, menant potentiellement à une récupération fonctionnelle.

Article 4

Activation of the sigma-1 receptor chaperone alleviates symptoms of Wolfram syndrome in preclinical models

Lucie Crouzier, Alberto Danese, Yuko Yasui, Elodie M. Richard, Jean-Charles Liévens, Simone Patergnani, Simon Couly, Camille Diez, Morgane Denus, Nicolas Cubedo, Mireille Rossel, Marc Thiry, Tsung-Ping Su, Paolo Pinton, Tangui Maurice, Benjamin Delprat

Science Translational Medicine, 2022

Résultats

S1R est un modulateur d'IP3R (Delprat et al., 2020; Hayashi et al., 2000), qui interagit avec plusieurs protéines impliquées dans le transfert de Ca^{2+} et/ou l'activation du stress du RE (Hayashi and Su, 2007). En stabilisant la conformation d'IP3R, S1R augmente l'efflux de Ca^{2+} dans la mitochondrie (Giorgi et al., 2018; Hayashi et al., 2000).

S1R a été identifié comme cible pertinente pour traiter les déficits induits par le SW. Pour cela, la caractérisation phénotypique des souris $Wfs1^{\Delta Exon8}$ a été réalisée et des troubles de la mémoire et de l'anxiété ont été identifiés à 3 mois, avec quelques différences liées au sexe dans l'intensité des déficits. Ces résultats ont confirmé d'autres études montrant des troubles anxieux chez des souris $Wfs1^{\Delta Exon2}$ (Kato et al., 2008) et $Wfs1^{\Delta Exon8}$ (Luuk et al., 2008). Ces résultats sont cohérents avec la symptomatologie du SW, avec dans 32% des cas, des troubles cognitifs développés par les patients (Chaussonnet et al., 2011), et également il a été montré que WFS1 était impliqué dans les troubles de l'humeur (Koido et al., 2005). Cependant, aucune différence liée au sexe n'a été signalée chez les patients. Après un traitement aigu au PRE-084 à 0.3 mg/Kg par voie intrapéritonéale (IP) 20 min avant les tests de comportements, les déficits décrits chez les souris $Wfs1^{\Delta Exon8}$ sont atténués, voir complètement restaurés.

Des analyses *post-mortem* sur des structures cérébrales impliquées dans la mémoire ont été réalisées chez les souris $Wfs1^{\Delta Exon8}$. L'expression de S1R n'était pas affectée dans l'hippocampe ou le cortex de ces souris par rapport aux animaux $Wfs1^{WT}$ permettant ainsi de valider que S1R est un candidat idéal pour intervenir pharmacologique avec une expression non altérée en condition pathologique. Une diminution de 20% de l'expression de NCS1 est mesurée dans le cortex et

l'hippocampe de souris *Wfs1*^{ΔExon8} à 3 mois, comme montré précédemment chez des fibroblastes de patients (Angebault et al., 2018), confirmant une répercussion directe de l'invalidation de WFS1 sur les niveaux protéiques de NCS1. En collaboration avec l'équipe de Tsung Ping Su (NIDA, Baltimore, Etats Unis), il a été montré que les niveaux d'expression de NCS1 et WFS1 chez des souris *S1r*^{KO} restent inchangés. Cette équipe a également mis en évidence *in vitro* l'interaction directe de S1R et NCS1, et plus partiellement avec WFS1 dans des conditions physiologiques. Notre hypothèse est que l'activation de S1R par un agoniste sélectif ou sa surexpression directe pourrait moduler IP3R, induisant une facilitation/restauration du transfert de Ca²⁺ dans les mitochondries, même en condition SW lorsque l'expression de NCS1 est altérée.

Nous avons identifié une hyperlocomotion des larves *wfs1ab*^{KO}, durant les phases d'obscurité du test VMR, comparés aux *wfs1ab*^{WT}. Cette réponse hyperlocomotrice peut se traduire par un comportement suite aux changements brusques d'intensité lumineuse (Basnet et al., 2019; Peng et al., 2016; Schnörr et al., 2012). Après un traitement pharmacologique de 24 h des larves avec un ligand spécifique de S1R, le PRE-084, l'hyperlocomotion des larves *wfs1ab*^{KO} est partiellement restaurée de manière dose dépendante et totale à 10 μM.

La spécificité de l'efficacité de la modulation de S1R dans le SW chez les larves *wfs1ab*^{KO} a été validée par co-traitement d'un agoniste de S1R, le PRE-084, et d'un antagoniste, le NE-100. La concentration efficace a été revue à la baisse (3 μM au lieu de 10 μM) pour cette expérience car le co-traitement de ces 2 molécules entraînait des effets délétères sur la physiologie des larves. L'hyperlocomotion des larves a donc été atténuée par le PRE-084 à 3 μM, et cette efficacité est bloquée par l'ajout du NE-100, apportant donc la preuve que l'effet du PRE-084 sur le déficit mesuré est bien spécifique de la modulation de S1R. Cette efficacité est également validée par la

surexpression de S1R par micro injection de l'ARNm S1R humain dans des embryons de poisson *wfs1ab*^{KO} au stade 1-2 cellules. L'ARNm injecté est réparti plus ou moins uniformément dans les cellules en division de l'embryon. La surexpression de l'ARNm injecté est un outil d'analyse fonctionnelle des gènes par expression globale de gain ou de perte de fonction (Finckbeiner et al., 2011; Rosen et al., 2009).

Au niveau cellulaire, la collaboration avec le groupe de Paolo Pinton (LTTA, Ferrara, Italie) a permis de montrer chez des fibroblastes de patients que lorsque WFS1 est non fonctionnel, le niveau d'expression de NCS1 est diminué, altérant le bon fonctionnement d'IP3R. Ce complexe, à la membrane du RE, ne permettant plus la facilitation du passage du Ca²⁺ vers la mitochondrie, une réduction de la concentration de Ca²⁺ dans la matrice mitochondriale est induite, altérant *in fine* l'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale et la production d'énergie cellulaire liée au cycle de Krebs (Angebault et al., 2018; Delprat et al., 2018, 2019). Ces résultats sont corrélables avec ceux obtenus par les équipes de Marc Thiry (Laboratoire de Biologie Cellulaire, Liège, Belgique) et de P. Pinton qui ont mis en évidence, sur des cultures de neurones hippocampiques de souris *Wfs1*^{ΔExon8}, un déficit du transfert calcique, une altération de l'activité mitochondriale et une diminution du nombre de contacts entre le RE et les mitochondries vue par microscope électronique à transmission (Crouzier et al., 2022a).

Comme décrit dans d'autres études (Hayashi et al., 2000; Peeters et al., 2004), le traitement des fibroblastes de patients au PRE-084 a augmenté l'accumulation du taux intracellulaire de Ca²⁺ et la capacité des mitochondries à absorber le Ca²⁺, mais aussi a permis d'améliorer la fonction mitochondriale liée à la production d'ATP de manière dose dépendante et optimale à une concentration de 1 μM.

La dérégulation de WFS1 serait donc liée à un dysfonctionnement de la transmission du Ca^{2+} , menant à la dérégulation de la dynamique mitochondriale et, en particulier, au processus autophagique (Caglinec et al., 2016). La mitophagie est un mécanisme qui permet aux cellules de se débarrasser de leurs mitochondries défectueuses, mais une mitophagie excessive est néfaste pour le bon fonctionnement et la survie cellulaire. L'autophagie est un processus d'auto-digestion hautement régulé et utilisé par les cellules pour recycler le contenu cellulaire lorsque l'énergie nécessaire à leur survie devient insuffisante. L'autophagie commence lorsqu'une membrane se forme autour des matériaux à dégrader. Simultanément, la *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-I* (LC3-I) est conjuguée à la phosphatidyléthanolamine et forme LC3-II, qui pénètre à son tour dans la membrane, favorisant la formation de l'autophagosome. L'autophagosome formé fusionne alors avec les lysosomes pour dégrader les matériaux à dégrader (Patergnani et al., 2013). Afin de mettre en évidence l'impact de la mutation de *WFS1* sur l'autophagie, les fibroblastes de patients ont été transfectés avec LC3 fusionné à la GFP afin de quantifier l'autophagie par immunofluorescence et western blot. La collaboration avec P. Pinton a permis de mettre en évidence une augmentation du nombre de points autophagiques chez les fibroblastes de patients comparés aux contrôles et le traitement au PRE-084 a réduit, de manière concentration-dépendante, cette autophagie excessive. À 1 μM , la dose la plus élevée testée, l'autophagie est restaurée au niveau des cellules contrôles. La collaboration avec P. Pinton a permis de montrer également une augmentation de l'autophagie dans les neurones hippocampiques et corticaux de souris *Wfs1* ^{ΔExon8} .

Ensuite, la mitophagie a été spécifiquement analysée par microscopie confocale à fluorescence par l'intermédiaire de sondes fluorescentes transfectées

dans les fibroblastes, permettant de visualiser indépendamment les autophagolysosomes et les mitochondries. La quantité de co-marquage au sein de la cellule est donc proportionnelle à l'activation de la mitophagie. Les fibroblastes de patients présentaient une activation mitophagique accrue et le traitement au PRE-084 à 1 μ M a atténué de manière quasi-totale la mitophagie excessive.

Les résultats révèlent donc que la perte de WSF1 augmenterait l'autophagie et la mitophagie et que la signalisation calcique du RE vers les mitochondries, médiée par S1R au niveau des MAM, jouerait probablement un rôle de récupération fonctionnelle contre l'augmentation de l'autophagie et de la mitophagie. Des expériences complémentaires permettraient de savoir si l'altération de l'autophagie dans le SW proviendrait d'un problème de flux autophagique ou du processus autophagique lui-même (activation, élongation, fermeture des autophagosomes ou encore la formation des autolysosomes).

L'activation de S1R est une stratégie thérapeutique pertinente pour traiter le SW. Le PRE-084 est un agoniste prototypique de S1R qui s'est avéré efficace dans de nombreux troubles neurodégénératifs (Francardo et al., 2014; Meunier et al., 2006; Motawe et al., 2020; Peviani et al., 2014), mais ce n'est qu'un outil utilisé dans la recherche expérimentale qui ne peut pas être développé au stade clinique. Une molécule sélective, efficace, biodisponible et agoniste de S1R n'a pas encore été proposée et développée au stade clinique pour traiter le SW.

Partie V. Criblage à moyen débit de molécules thérapeutiques sur la lignée poisson zèbre *wfs1ab*^{KO}

Contexte

L'altération de la fonction des MAM est reconnue comme un facteur de neurodégénérescence (Joshi et al., 2016; Krols et al., 2016; Paillusson et al., 2016) et il est publié que le SW est une maladie liée à des altérations des MAM, influençant la physiologie et la viabilité cellulaire (Giorgi et al., 2015; Hajnóczky et al., 2006). En effet, WFS1 code pour une protéine localisée dans la membrane du RE, qui en condition physiologique, est impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique et la régulation du stress du RE (Fonseca et al., 2005; Osman et al., 2003; Takei et al., 2006). En condition pathologique, la production de la wolframine non fonctionnelle entraîne le dysfonctionnement et la dégénérescence des tissus affectés.

Afin d'identifier de nouveaux traitements, et ce de manière rapide et efficace, l'utilisation du poisson zèbre est devenu un puissant outil comparé aux modèles rongeurs et cellulaires. En effet, ce poisson possède un coût d'élevage faible, une fécondité élevée et un génome proche de l'Homme. Les défauts morphologiques et de développement induits par des traitements peuvent être facilement suivi grâce à leur transparence au stade embryonnaire et au développement externe des larves. Enfin leur petite taille (± 4 mm à 5 jpf) et une perméabilité aux petites molécules les rendent facilement expérimentables pour le criblage à petit, moyen ou haut débit de molécules.

L'utilisation d'embryons de poisson zèbre dans un crible chimique de 1100 molécules a été réalisé pour la première fois par Peterson et son équipe dans le but d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le développement (Peterson et al.,

2000). Par la suite, de nombreux criblages ont été réalisés sur le poisson zèbre au stade embryonnaire ou larvaire (Khersonsky et al., 2003; Mathew et al., 2007; Milan et al., 2003; Moon et al., 2002; Shafizadeh et al., 2004; Spring et al., 2002; Stern et al., 2005; Sternson et al., 2001; Wong et al., 2004).

La cinquième partie de ce mémoire décrit donc l'identification de NEC et d'une molécule d'origine naturelle identifiés dans le modèle poisson zèbre. Pour cela, nous disposons de la lignée poisson zèbre *wfs1ab^{KO}* préalablement caractérisée (Crouzier et al., en revision). Les analyses phénotypiques et cellulaires des larves ont permis de mettre en évidence une augmentation de la locomotion des larves *wfs1ab^{KO}* à 5 jpf comparé aux contrôles en test VMR et par le test de contact-fuite. Les analyses métaboliques ont par ailleurs révélé une augmentation de la respiration mitochondriale chez les larves *wfs1ab^{KO}* mais sans altération de la réponse de stress du RE en condition basale ou de stress induit par la Tunicamycine. Nous avons identifié une cible thérapeutique potentielle pour traiter le SW, S1R, qui stimule efficacement la fonction des MAM. La stratégie a donc été d'utiliser l'hyperlocomotion des larves *wfs1ab^{KO}* mesurée par VMR pour identifier de nouveaux ligands agonistes S1R. Pour cela, une collaboration avec des équipes de chimistes médicaux nous a permis de collecter 371 molécules. La majorité de la chimiothèque provenait du laboratoire des Drs Jean-Jacques Bourguignon et Martine Schmitt (LIT, Strasbourg, France) et comprenait à la fois des molécules potentiellement développables et sélectionnées pour leur possibilité d'être structurellement des ligands S1R, mais également 108 composés naturels ou repositionnables. Ce dernier aspect du travail sera présenté en partie VI du mémoire. Une seconde collaboration avec le Dr Carmen Abate (Université de Bari, Italie) nous a permis d'avoir accès à un ensemble de composés identifiés comme des ligands S1R de forte affinité.

Les molécules ont été incluses dans la chimiothèque sur la base de leurs caractéristiques structurales répondant au pharmacophore proposé pour S1R par Glennon *et al.* : les ligands doivent inclure un atome d'azote (N) et au moins deux régions hydrophobes à des distances données du groupe azoté, 2.5-3.9 Å et 6-10 Å, respectivement (Figure 14A) (Díaz et al., 2012; Glennon, 2005; Glennon et al., 1994). La structure chimique du PRE-084 (Figure 14B) contient ces trois éléments de pharmacophores de façon cohérente avec sa sélectivité et son efficacité pour S1R (Su et al., 1991).

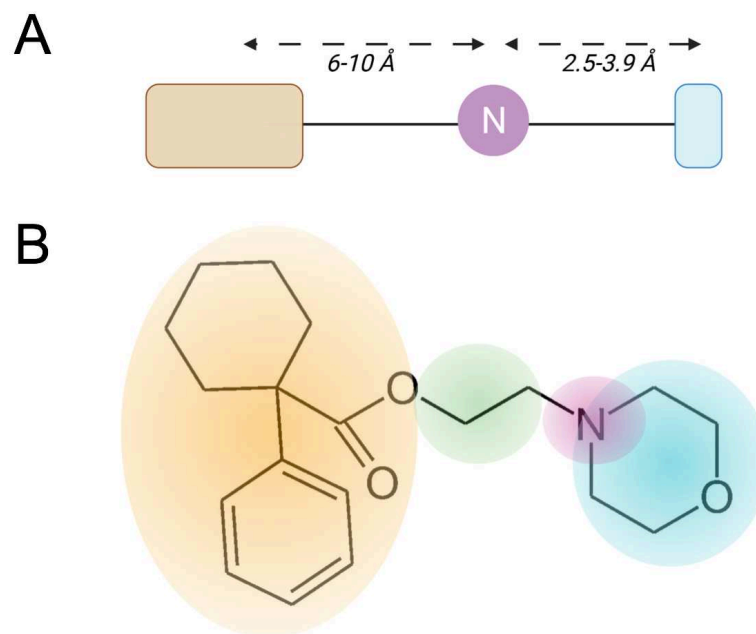


Figure 14. Pharmacophores spécifiques de S1R contribuant à une liaison optimale de ses ligands. (A) Modèle pharmacophorique initial de S1R par Glennon contenant deux régions hydrophobes : une distale au site amine, représentée en orange (6-10 Å) et une proximale en bleu (2.5-3.9 Å). (B) La structure chimique du PRE-084 contient un premier groupe hydrophobe distal arylcycloalkyle en orange, un groupe amine en rose, une chaîne intermédiaire en vert et un second groupe hydrophobe proximal. Schéma fait à partir de (Glennon et al., 1994).

Nous avons donc criblé *in vivo* les molécules sur le modèle poisson zèbre par VMR. Dans un second temps, les affinités pour S1R des molécules les plus efficaces chez le poisson ont été évaluées par un test de déplacement de la [³H](+)-pentazocine,

réalisé par la société CEREP. Enfin, leur activité pharmacologique a été déterminée par le test de dissociation entre S1R et BiP. Finalement, l'efficacité des molécules les plus intéressantes sera testée dans le modèle murin *Wfs1*^{ΔExon8} de la pathologie.

Matériels et méthodes

Élevage de poissons zèbres

La lignée mutante *wfs1ab*^{KO} a été générée en croisant les deux lignées *wfs1a*^{C825X} et *wfs1b*^{W493X} (Crouzier et al., 2022b). Les poissons zèbres adultes ont été élevés et maintenus dans des conditions standards dans un système automatisé (ZebTEC, Tecniplast) à 28°C, pH 7, conductivité autour de 500 mS et avec un cycle lumière: obscurité de 14 h: 10 h. Après fécondation, les œufs ont été maintenus dans du milieu E3 (NaCl 5 mM, KCl 0.17 mM, CaCl₂ 0.33 mM, MgSO₄ 0.33 mM, bleu de méthylène 0.05%) à 28°C. Pour chaque expérimentation, les larves provenaient de plusieurs croisements différents.

Traitements chimiques

Les molécules du crible ont été solubilisées soit directement dans du milieu E3, soit dans du DMSO et les solutions stocks ont été stockées à -20°C ou 4°C. Les ligands S1R de référence proviennent de différents fournisseurs (PRE-084, P2607, Sigma-Aldrich ; Fluvoxamine, F2802, Sigma-Aldrich ; SA4503, SML2181, Sigma-Aldrich ; Norfenfluramine, RS111L, Onyx Scientific ; (+)-Norfenfluramine, IB44C, Onyx Scientific ; (-)-Norfenfluramine, IB53B, Onyx Scientific ; (S)-(+)-Fenfluramine, MC9954A, Onyx Scientific ; Fenfluramine, A0675/16/4, Aptuit ; NE-100, 3133, Biotechne) ou de notre stock personnel (OZP002, Igmésine, ANAVEX2-73). Les traitements ont été administrés à une concentration de 3 μM directement dans le milieu

E3 contenant les larves et appliqués de 4 à 5 jpf. Les traitements ont été renouvelés à 5 jpf lors de la mise en plaque des larves et durant le test (Figure 15).

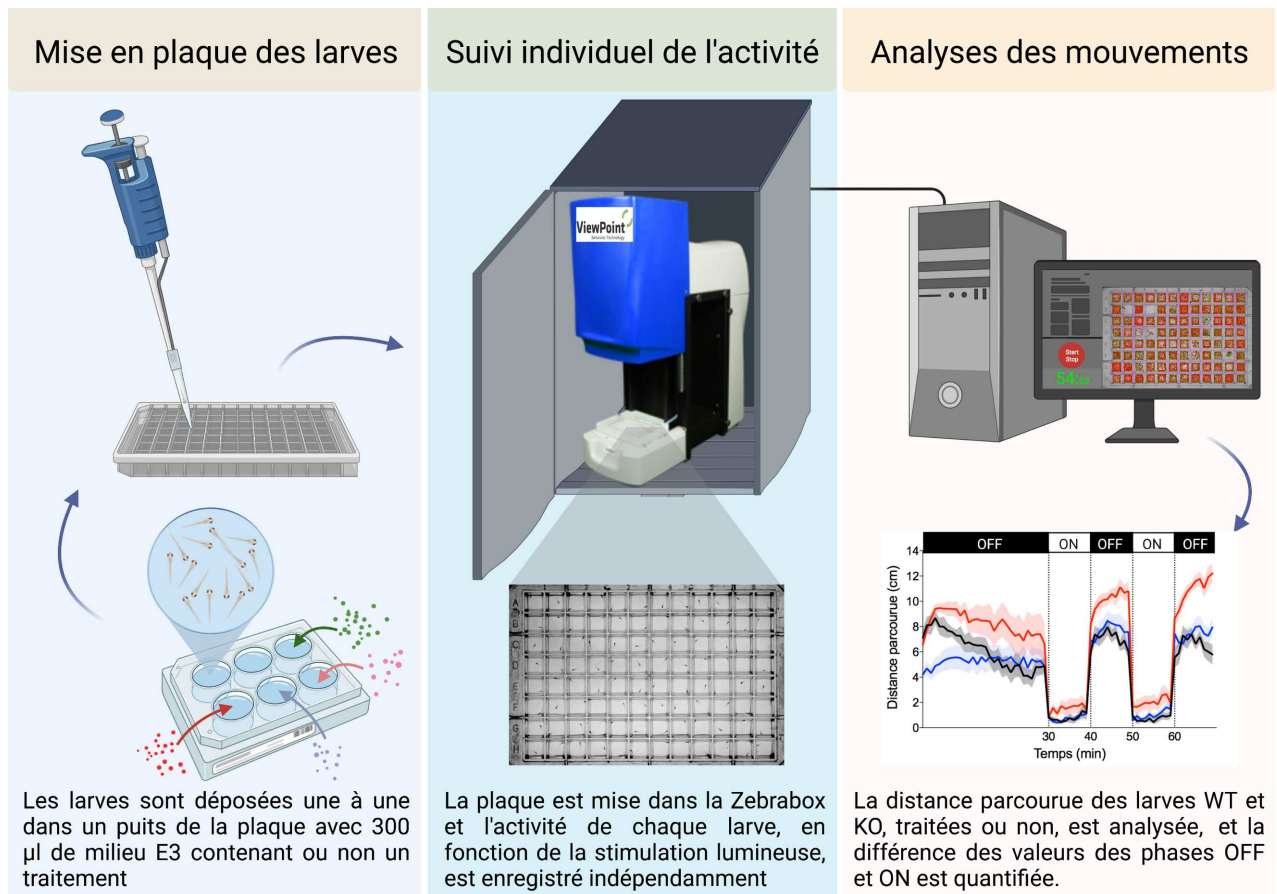


Figure 15. Schéma du criblage chimique chez la lignée poisson zèbre *wfs1ab*^{KO} en utilisant le test VMR. Les larves sont traitées à 4 jpf durant 24 h avec les molécules du crible directement dans le milieu E3 d'une plaque 6 puits contenant environ 15 larves par puits. Les molécules sont testées à une concentration de 3 µM. Le jour du test, les larves sont prélevées une par une dans 300 µL de milieu contenu dans le puits et déposées dans une plaque 96 puits selon un plan de dépôt défini. Une fois remplie, la plaque 96 puits est placée dans la Zebrabox® afin d'être testée. Le protocole de lumière appliqué alterne des phases de lumière (ON) et d'obscurité (OFF) sur une durée de 70 min. Plusieurs paramètres du mouvement des larves sont relevés en temps réel durant l'expérience : la distance parcourue, la durée et la vitesse de mouvement. Ces résultats sont ensuite exploités sur Excel et mettent en avant les potentiels effets thérapeutiques des molécules sur la distance parcourue des larves durant les phases OFF-ON.

Test VMR

Le test VMR quantifie l'activité locomotrice des larves de poisson zèbre en fonction de changements d'intensité lumineuses. L'expérience consistait à transférer individuellement les larves de 5 jpf dans une plaque 96 puits (Whatman, # 7701-1651,

puits à fond carré et plat) avec 300 μ L de milieu E3 avec ou sans traitement et placée dans une Zebrabox[®] (ViewPoint). Le comportement locomoteur a été filmé à l'aide d'un dispositif de suivi vidéo automatisé équipé d'une caméra infrarouge (IR) sous éclairage IR (Zebralab[®], Viewpoint). Le protocole de lumière était le suivant : 30 min d'acclimatation dans l'obscurité (phase OFF, 0% d'intensité lumineuse), puis deux cycles de 10 min de lumière (phase ON, 100% d'intensité lumineuse) et de 10 min d'obscurité. Les changements de luminosité ont été immédiats ($\ll 1$ s). La distance parcourue était mesurée en mm/s. Les valeurs obtenues en phases OFF ont été soustraites pour chaque larve à leurs valeurs en phases ON afin de normaliser avec la locomotion de base pour chaque larve.

Test de liaison à S1R *in vitro*

Le dosage a été réalisé par CEREP (Celle l'Evescault, France) (étude 100062023). La liaison S1R a été réalisée selon Ganapathy *et al.* (Ganapathy et al., 1999). Des concentrations croissantes de médicament (100 nM à 30 μ M) ont été incubées avec 15 nM de [³H](+)-pentazocine dans des préparations de membranes de cellules T leucémiques humaines Jurkat. Les échantillons ont été incubés pendant 120 min à 37°C et le niveau de liaison non spécifique a été déterminé en utilisant 10 μ M d'halopéridol. Les essais ont été effectués en double et les résultats ont été exprimés en % du niveau de liaison spécifique.

Test de dissociation de BiP

Le test a été effectué comme décrit par Hayashi et Su (Hayashi and Su, 2007). Les cellules CHO qui surexpriment S1R marqué GFP (fourni par T-P. Su, NIDA, Baltimore, MD, États-Unis) ont été maintenues dans un milieu de culture DMEM/Glutamax

additionné de 10% de SVF inactivé par la chaleur. Les cellules ont été étalées dans des plaques 6 puits et traitées avec les composés dissous dans le milieu de culture pendant 30 min à 37°C, à différentes concentrations (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 µM). La réaction a été terminée en retirant le milieu de culture contenant le médicament testé et en le remplaçant par 1 mL de PBS. Les cellules *Green Fluorescent Protein-Sigma 1 Receptor-OverExpressed Chinese Hamster Ovary* (GFP-S1R-oe CHO) ont été récoltées et mises en suspension dans du PBS (pH 7.4), puis réticulées avec 50 µg/mL de propionate de dithiobis succinimidyle (ThermoFisher, France). La réaction a été stoppée par addition de Tris/HCl 50 mM (pH 8.8). Après une incubation de 15 min sur glace, les cellules ont été lysées avec 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X/100, 0.3% désoxycholate de sodium, 0.1% tampon SDS contenant un cocktail inhibiteur de protéase (Sigma-Aldrich, France). Après centrifugation à 16 000 × g pendant 1 min, le surnageant a été incubé avec de l'agarose Chromotek GFP-trap (Proteintech, Royaume-Uni) pendant une nuit à 4°C. Après centrifugation à 16 000 × g pendant 1 min, le culot a été mis en suspension dans 0.5 mL de tampon (50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X/100, 0.3% désoxycholate de sodium, 0.1% SDS), rincé deux fois et analysé par test ELISA BiP (#CL-SEC343Mu, Euromedex, France).

Calculs et analyses

La locomotion de chaque larve est relevée par tranche de 60 s. Les distances parcourues des larves (± 12 larves) ont été moyennées pour chaque condition. Les valeurs obtenues en phase OFF ont ensuite été soustraites pour chaque larve à leurs valeurs en phase ON pour normaliser avec la locomotion basale pour chaque larve. Pour mesurer l'effet du traitement sur la locomotion des larves, les valeurs obtenues chez les larves *wfs1ab*^{WT} non traitées ont été soustraites à celles des larves *wfs1ab*^{WT}

traitées (WT T) avec les molécules du crible pour obtenir un pourcentage de locomotion de référence (Loc (WT) %). L'hyperlocomotion résiduelle (Hyperloc (KO) %), définie comme l'hyperlocomotion restante chez les larves *wfs1ab*^{KO} après traitement (KO T), a été calculée comme suit : $\frac{(KO T)-(WT NT)}{(KO NT)-(WT NT)} \times 100$. Un indice de

protection (IPr, unité arbitraire) a été défini comme le rapport entre l'Hyperloc (KO) % et la Loc (WT) %, traduisant l'efficacité de la molécule à atténuer l'hyperlocomotion pathologique chez les larves KO par rapport à son effet sur la locomotion des larves WT. Indice de protect = $\frac{100 - \text{Hyperloc (KO)\%} + \text{Loc (WT)\%}}{100}$.

Le logiciel G*Power a permis de calculer le nombre d'animaux nécessaire pour avoir une significativité statistique des résultats. 26 poissons d'une même condition, traduit par une probabilité d'erreur alpha de 0.05, une puissance de 0.95 et une taille d'effet de 0.941. Les résultats de VMR obtenus n'ont pas été analysés statistiquement car les expériences pour chaque traitement ont été réalisées une fois pour des raisons de praticabilité expérimentale.

Résultats

Dans un premier temps, une mise au point du protocole de criblage concernant l'utilisation du modèle poisson zèbre dans cette application, des paramètres phénotypiques associés utilisés pour analyser un potentiel effet thérapeutique des molécules, la mise en place de la durée et de la concentration des traitements, ainsi que l'interprétation de l'efficacité des molécules a été réalisée au préalable sur des ligands S1R de référence.

I. Efficacité des ligands S1R de référence sur la lignée *wfs1ab*^{KO}

Les larves ont été traitées durant 24 h, de 4 jpf à 5 jpf et durant le test de VMR, avec les molécules de la chimiothèque à une concentration de 3 μ M dans le milieu E3 contenant les larves. Des cinétiques de traitement allant de 1 h à 24 h, non présentées ici, ont été réalisées au préalable afin d'isoler la fenêtre d'efficacité la plus favorable. La durée de traitement pour laquelle l'efficacité du PRE-084 à 10 μ M permettait aux larves de retrouver un niveau de locomotion équivalent à celui des contrôles était de 24 h. Les autres traitements ont donc été réalisés de la même manière afin de comparer leur efficacité sur les larves à celle du PRE-084.

Les résultats de locomotion des larves traitées ou non avec les molécules ont été analysés de manière à isoler 3 paramètres représentatifs de l'efficacité et de la spécificité des molécules. Ces 3 paramètres sont : un pourcentage de spécificité, par l'effet des molécules sur la locomotion des larves contrôles : Loc (WT) %¹ ; un pourcentage d'efficacité, par leur effet sur l'hyperlocomotion des larves KO : Hyperloc (KO) %² ; et, calculé à partir de ces 2 pourcentages un IPr, traduisant l'effet global des molécules.

Une molécule avec une valeur Hyperloc (KO) % comprise entre [-20% ; +20%] est considérée comme d'excellente efficacité et traduit une diminution de l'hyperlocomotion des larves mutantes traitées plus ou moins au niveau des contrôles non-traitées. Si cette valeur est comprise entre [-50% ; +50%], la molécule est considérée comme active mais moins efficace (Figure 17A).

Si la molécule présente une valeur de Loc (WT) % entre [-20 ; +20], elle est considérée sans effet chez les *wfs1ab*^{WT}, traduisant alors par la suite une bonne

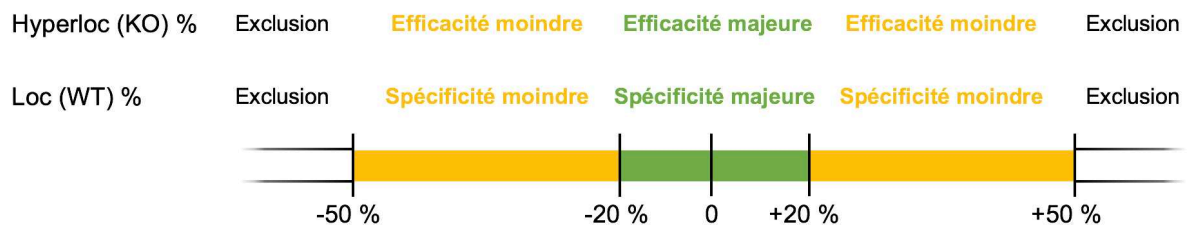
¹ calculé comme : 0% = larve immobile, 100% = mobilité moyenne des larves *wfs1*^{WT} non-traitées.

² calculé comme : 0% = mobilité moyenne des larves *wfs1*^{WT} non-traitées, 100% = hypermobilité des larves *wfs1*^{KO} non-traitées.

spécificité d'action de la molécule chez les larves *wfs1ab*^{KO}. Si cette valeur est comprise entre [-50% ; +50%], la molécule est considérée comme moins spécifique car ayant un effet hypo/hyperlocomoteur chez les larves *wfs1ab*^{WT}. Au-delà, les molécules testées sont exclues (Figure 16A). Enfin, une molécule dont l'IPr est compris entre [0.8 ; 1.2], est considérée comme potentiellement très intéressante. Si l'IPr est compris entre [0.5 ; 1.5], la molécule est moins pertinente. Toutes les autres valeurs conduisent à l'exclusion de la molécule (Figure 16B). Les "hits" du criblage seront les molécules les meilleures sur les 3 paramètres, donc triplement verte selon le code couleur de la Figure 16.

Dans un premier temps, les effets des ligands S1R (à la concentration de 3 µM) de référence ont été mesurés. Ils sont présentés dans le Tableau 2. Trois groupes de ligands S1R ont été testés : agonistes, modulateurs positifs et antagonistes.

A



B

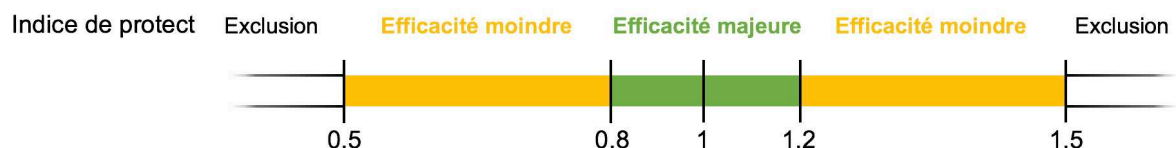


Figure 16. Echelle d'efficacité d'une molécule testée selon les valeurs obtenues en test VMR. (A) L'hyperlocomotion résiduelle, appelée Hyperloc (KO) %, définit l'hyperlocomotion restante chez les larves KO comparé à l'effet de la molécule sur les WT, traduisant l'efficacité de la molécule. Le pourcentage de locomotion de référence, appelée Loc (WT) %, révèle l'effet de la molécule sur les WT, traduisant la bonne spécificité d'action de la molécule chez les larves *wfs1ab*^{KO} dans le contexte SW. (B) L'indice de protection a été défini comme le rapport entre la Hyperloc (KO) % et la Loc (WT) %, et permet de déterminer l'efficacité de la molécule en fonction de sa spécificité chez les WT.

Les 11 ligands testés ont eu un impact marginal ou nul sur l'activité basale des larves *wfs1ab*^{WT} et 4 ont eu une efficacité majeure (le PRE-084 à 10 µM, l'Igmésine) ou moindre (le PRE-084 à 3 µM, le SA4503) sur l'hyperlocomotion des larves *wfs1ab*^{KO}. Ces 4 molécules sont des agonistes S1R (Hindmarch and Hashimoto, 2010; Maurice et al., 1995; Roman et al., 1990; Urani et al., 2001), il n'est donc pas étonnant

	Loc (WT) %	Hyperloc (KO) %	Indice de protect	Références	
Agonistes	Anavex 2-73	-5,0	73,2	0,22	[1]
	PRE-084 3 µM	2,0	48,4	0,54	[2]
	PRE-084 10 µM	-10,9	-2,4	0,91	[3]
	Igmésine	-15,0	-13,3	0,98	[4]
	SA4503	-14,9	-38,7	1,24	[5]
	Fluvoxamine	-46,0	-97,5	1,52	[6]
Mod (+)	S-(+) Fenfluramine	-3,0	64,7	0,32	[7]
	OZP002	3,0	54,9	0,48	[8]
	Fenfluramine	-16,0	64,7	0,19	[9]
Antagonistes	NE-100	7,0	74,4	0,33	[10]
	Norfenfluramine	6,0	92,6	0,13	[11]
	(+) Norfenfluramine	11,0	77,8	0,33	[12]
	(-) Norfenfluramine	-6,0	55,6	0,38	[13]

Tableau 2. Effets des ligands S1R de référence sur l'hyperlocomotion des larves *wfs1ab*^{KO}. 12 larves ont été testées par condition et leur valeurs des phases OFF-ON ont moyennées. Les points verts représentent les deux agonistes induisant une restauration totale de l'hyperlocomotion des larves KO en ayant aucun effet sur la locomotion des larves WT. Tous les traitements ont été réalisés à 3 µM, et le PRE-084 a également été testé à 10 µM. Les traitements sont classés en 3 groupes : les agonistes S1R, les modulateurs positifs (Mod (+)) et les antagonistes. Les références associées documentent l'activité *in vitro* ou *in vivo* de ces molécules : [1] (Villard et al., 2011), [2] (Maurice et al., 1995), [3] (Urani et al., 2001), [4] (Roman et al., 1990), [5] (Hindmarch and Hashimoto, 2010), [6] (Martin et al., 2020), [7] (Maurice et al., 2019), [8] (Okuyama and Nakazato, 2006), [9] (Martin et al., 2022).

de retrouver une efficacité de ces traitements dans un contexte SW (Crouzier et al., 2022a). De manière intéressante, l'Igmésine est un agoniste de S1R (Roman et al., 1990) qui présente une efficacité d'antidépresseur montrée dans des modèles animaux utilisant le test de suspension par la queue et de nage forcée (Kinsora et al., 1998; Urani et al., 2001), mais aussi observée cliniquement avec une amélioration significative de la psyché des patients sévèrement déprimés (Leadbetter et al., 1999;

Pande et al., 1998). Il est donc probable que l'hyperlocomotion des larves *wfs1ab*^{KO} puisse traduire une anxiété exacerbée, retrouvée de manière marquée chez les souris *Wfs1*^{ΔExon8} femelles (Crouzier et al., 2022a) et chez les patients atteints du SW (Sequeira et al., 2003; Swift and Swift, 2005). L'igmésine atténuerait alors totalement ce déficit et de manière spécifique (Tableau 2). Le second agoniste efficace chez les larves *wfs1ab*^{KO} est le PRE-084, partiellement à 3 μM et totalement à 10 μM (Tableau 2) (Crouzier et al., 2022a).

Les antagonistes ne présentent pas d'effet positif sur la locomotion des *wfs1ab*^{KO} comme attendu, confirmant la spécificité d'action des agonistes S1R dans un contexte du SW.

De manière étonnante, aucun modulateur positif n'a eu d'effet sur la locomotion des larves *wfs1ab*^{KO}. C'est possiblement dû à une concentration testée trop faible. En effet, une étude a montré l'efficacité anti-convulsivante de la Fenfluramine dans un modèle poisson zèbre mutant *Scn1a*, gène muté à l'origine du syndrome de Dravet (Sourbron et al., 2019). Cependant le traitement était réalisé à une concentration de 6.25 μM contre 3 μM pour notre étude, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet des modulateurs positifs de S1R dans notre essai. A priori, les modulateurs positifs S1R peuvent se révéler efficaces dans le crible VMR (voir partie VI de ce mémoire).

II. Identification de molécules toxiques ou non efficaces

Dans un second temps, le criblage des 263 NEC de la chimiothèque a été réalisé. Le nom et la structure chimique des molécules ne seront pas dévoilés dans ce mémoire pour des raisons de confidentialité mais cela n'impactera pas la compréhension et l'intérêt thérapeutique de ces molécules.

Initialement, la concentration de traitement appliquée aux larves était de 10 μ M afin de comparer le niveau d'efficacité des molécules du crible avec celui du PRE-084 à la même dose. Or, à 10 μ M un grand nombre de molécules se sont révélées toxiques pour les larves, entraînant des œdèmes cardiaques, des malformations, voire de la mortalité. La concentration des traitements a été revue à la baisse en traitant les larves à 3 μ M pendant 24 h. L'objectif était donc d'isoler un petit lot de molécules plus efficaces que le PRE-084 à l'effet modéré à 3 μ M.

Des effets délétères chez les larves ont tout de même été observés à 3 μ M sur un certain nombre de molécules. En effet, 98 NEC ont été considérées comme toxiques sur les larves lorsque plus de 40% d'entre elles ont développé l'un des déficits suivants : œdèmes cardiaques, déformations générales des larves, absence de vessie natatoire, atrophie corporelle, courbure dorsale de la larve, mortalité. Par conséquent, ces molécules ont été exclues du crible (Tableau 3).

Parmi les 263 molécules testées sur les larves *wfs1ab*^{KO}, 123 ont présenté des valeurs Hyperloc (KO) % situées dans la zone d'exclusion, traduisant une absence d'efficacité de ces molécules sur l'hyperlocomotion des larves *wfs1ab*^{KO}, voir un effet délétère sur celles-ci (drastiquement diminuée au-delà de la locomotion des *wfs1ab*^{WT} non traitées ou amplification de l'hyperlocomotion des *wfs1ab*^{KO}). Ces molécules n'ont donc pas été testées chez les *wfs1ab*^{WT} (Tableau 4).

NDG01A05	NDG03B08	NDG04B04
NDG01B04	NDG03B10	NDG04B07
NDG01C02	NDG03B11	NDG04B09
NDG01C04	NDG03C02	NDG04C03
NDG01D03	NDG03C03	NDG04C04
NDG01D07	NDG03C04	NDG04C05
NDG01D08	NDG03C08	NDG04D03
NDG01E07	NDG03C09	NDG04D04
NDG01H07	NDG03C10	NDG04D05
NDG02A02	NDG03C11	NDG04D06
NDG02A05	NDG03D03	NDG04E05
NDG02A08	NDG03D04	NDG04E06
NDG02A09	NDG03D05	NDG04E07
NDG02B02	NDG03D06	NDG04F05
NDG02B03	NDG03D08	NDG04F06
NDG02B05	NDG03D10	NDG04G03
NDG02C04	NDG03E02	NDG04H05
NDG02C09	NDG03E05	F270
NDG02D08	NDG03E08	F218
NDG02E03	NDG03F02	F279
NDG02E09	NDG03F03	F198
NDG02F02	NDG03F06	F283
NDG02F04	NDG03F08	F201
NDG02F07	NDG03G07	F175
NDG02F11	NDG03G08	F189
NDG02G07	NDG03G09	F180
NDG02G11	NDG03H03	F195
NDG02H04	NDG03H06	PAT0032
NDG03A04	NDG03H07	PAT0030
NDG03A05	NDG03H08	PAT0027
NDG03A09	NDG03H09	LPS01-10L-C10
NDG03B04	NDG04B02	RF0848
NDG03B07	NDG04B03	

Tableau 3. Listes de molécules toxiques chez les larves *wfs1ab* traitées durant 24 h à une concentration de 3 μM . Ces 98 molécules ont été exclues de par leur toxicité et n'ont pu être testées en VMR.

Hyperloc (KO) %		Hyperloc (KO) %		Hyperloc (KO) %		Hyperloc (KO) %	
NDG02D09	-1283,5	NDG03C05	-126,1	NDG02H11	101,3	F205	176,6
NDG03A11	-1003,6	NDG04H03	-124,7	NDG02E02	102,8	NDG02A07	182,8
NDG03E11	-992,2	NDG03H02	-112,6	NDG04G02	103,9	NDG04F08	185,0
NDG03F09	-834,4	NDG04H02	-109,1	NDG02E10	110,4	NDG02B11	185,7
NDG03F11	-596,2	NDG02D02	-106,5	RF0774	114,2	NDG02G02	186,0
NDG03D11	-583,5	F278	-104,9	L13	115,3	NDG02H06	186,3
NDG03B05	-548,1	LPI3118	-93,6	LPI2186	115,6	RF0522F	187,8
NDG03D07	-523,7	NDG03C07	-81,3	NDG04F02	118,7	NDG03G02	188,4
F207	-516,0	F204	-80,7	NDG02H02	124,1	RF0812	198,0
NDG03A08	-503,5	NDG04D02	-79,0	NDG02D07	124,3	NDG04E02	202,8
NDG03C06	-468,2	NDG02D06	-78,0	NDG03B06	127,6	NDG03E07	203,8
NDG02E08	-462,9	NDG02A03	-77,4	NDG02E06	128,3	NDG04D07	207,0
F188	-405,8	NDG04C09	-73,1	F276	129,9	NDG02F10	210,3
RF0790	-396,7	NDG04F03	-72,8	RF1278F	130,0	NDG03E09	223,1
NDG01B07	-355,6	NDG02E11	-72,5	RF0728	130,1	NDG02H03	227,1
NDG02C10	-355,4	NDG04B08	-70,2	NDG02C11	131,0	NDG03H10	233,1
NDG04A04	-343,5	F90	-68,3	NDG04C02	131,7	NDG03A07	234,6
NDG02A10	-341,7	NDG02C03	-65,9	NDG04A02	138,9	NDG02B07	240,4
PAT0028	-316,0	NDG01C08	-55,7	NDG03B02	139,8	NDG04E04	247,6
F181	-285,0	F271	-45,8	RF0664Br	140,0	NDG02H09	248,5
F249	-274,9	NDG01H05	-40,8	NDG04H07	140,5	NDG02G10	263,2
F206	-273,2	NDG02C02	-29,5	NDG03D02	141,6	NDG03G06	264,2
NDG01H06	-269,6	F191	-26,8	LPI3088	141,7	NDG04G08	271,5
F190	-266,9	NDG03G03	40,9	LPI3013	145,6	NDG02E04	275,3
NDG03E06	-257,8	NDG03F07	51,1	NDG01E08	146,1	RF0698	278,3
F227	-254,7	NDG03A06	52,6	NDG04A07	147,4	NDG02H08	284,9
NDG02G04	-244,6	NDG03E04	58,6	LPS02-06	147,9	NDG03B09	293,7
NDG01C06	-230,2	NDG04F04	62,9	AP17	150,1	NDG03A03	299,6
PB212	-203,4	NDG02D05	72,2	RF0639	151,2	FA5	304,3
NDG02D04	-197,6	NDG02G05	80,1	NDG01F06	153,7	NDG03F10	310,2
NDG02D03	-195,7	NDG02G06	80,9	LPS02-18L	154,7	NDG02H10	325,0
RF0646	-195,2	RF0902F	82,8	NDG04E03	158,5	NDG02D10	325,4
F297	-184,1	NDG04H08	82,8	NDG02F06	159,7	NDG03A02	334,0
NDG03B03	-180,3	F280	83,0	NDG01G07	160,5	NDG04A09	344,7
F94	-172,8	AP5	83,3	NDG02G09	161,9	NDG02C08	429,4
F268	-171,5	NDG04C07	83,9	NDG04G06	163,8	NDG02B08	445,7
NDG03D09	-170,2	LPI3013Cl	84,9	NDG04E08	165,8	NDG03A10	477,2
NDG02G08	-157,5	NDG02C06	88,7	NDG04E08	165,8	NDG03E10	545,7
RF0766	-149,4	RF0802	93,3	NDG03G11	173,1	NDG02G03	545,8
NDG02A06	-140,4	NDG02B04	94,5	RF0766	173,5	NDG02A11	615,3
NDG02B10	-127,3	NDG02F03	98,0	NDG03F04	176,2	NDG02F09	824,2

Tableau 4. Listes des molécules non efficaces chez les larves *wfs1ab*^{KO}. Les valeurs d'Hyperloc (KO) % des 123 molécules ont été classées par ordre croissant. Les valeurs d'Hyperloc (KO) % comprises en [-20 ; +20] étant considérées comme d'excellente efficacité chez les KO, ces molécules sont toutes situées dans la zone d'exclusion, c'est à dire au-delà de +/- 50% d'efficacité.

III. Identification de molécules efficaces et caractéristiques moléculaires

Les résultats du criblage sur les 42 molécules restantes ont révélé 9 composés efficaces et spécifiques (NDG02H07, NDG04C08, F192, RF0852, NDG04D08, RF0767, NDG03H11, L6, RF1222Cl), ce qui s'est traduit par leurs 2 valeurs Loc (WT) % et Hyperloc (KO) % dans les plages d'efficacité ou de spécificité majeure et avec un IPr égal ou proche de 1. Ces composés diminuent donc l'hyperlocomotion

pathologique des larves *wfs1ab*^{KO} et n'ont aucun ou très peu d'effet sur la locomotion des larves *wfs1ab*^{WT} (Tableau 5). Les autres composés ont des IPr dans les zones d'efficacité moindre ou d'exclusion, signifiant soit qu'ils ont un effet moindre ou délétère sur les larves *wfs1ab*^{KO} et/ou qu'elles affectent la locomotion des larves *wfs1ab*^{WT}. Ces molécules sont donc exclues, bien qu'il pourrait être intéressant d'en tester certaines à une concentration supérieure à 3 µM.

Concernant les molécules issues de la chimiothèque Italienne, des études ont montré que la molécule L6 faisant partie d'une nouvelle série chimique appelée phenoxyalkylpiperidines et présentant une affinité subnanomolaire pour S1R dépassant de loin l'affinité du PRE-084, avait de puissants effets anti-amnésiques chez un modèle murin (Abatematteo et al., 2022). La molécule est un agoniste S1R très efficace et il n'est donc pas étonnant de la trouver parmi nos 9 hits. La molécule structurellement proche, L13, présente également une bonne affinité pour S1R et des effets anti-amnésiques, mais à des doses 10 fois plus élevées comparé au L6. Ceci pourrait contribuer à expliquer pourquoi le L13 n'était pas efficace à une concentration de 3 µM dans le crible, même si des considérations de biodisponibilité ne sont pas à exclure. Il serait intéressant de valider cette hypothèse en testant la molécule à une concentration plus élevée sur les larves. Enfin, la structure de la molécule F192 et sa haute affinité pour S1R ont également été décrites (Berardi et al., 2005). Cependant, aucune étude n'avait encore révélé son pouvoir thérapeutique sur un modèle *in vivo*, notre étude étant donc la première à montrer l'efficacité du F192 dans un contexte SW. Ces 3 hits ne peuvent être brevetés en tant que médicament car leur structures affinité et activité *in vitro* ou *in vivo* ont déjà été publiés mais ils ont permis de valider que de puissants ligands S1R ont des effets spécifiques dans notre crible phénotypique chez le poisson zèbre *wfs1ab*^{KO}.

	Loc (WT) %	Hyperloc (KO) %	Indice de protect
NDG04F07	-92,7	50,6	-0,43
NDG04G07	-18,2	49,0	0,33
NDG02B09	-1,2	65,8	0,33
RF0954	2,8	66,8	0,36
NDG03H04	-2,7	60,8	0,36
NDG03G05	2,0	58,4	0,44
FA10	-27,4	27,6	0,45
NDG02D11	9,7	63,0	0,47
RF0523F	3,9	50,5	0,53
NDG02E05	-3,3	42,4	0,54
RF0630F	1,1	43,7	0,57
NDG01C11	7,8	48,0	0,60
NDG03H05	-2,8	33,2	0,64
NDG02B06	35,2	68,4	0,67
NDG02A04	-17,9	12,2	0,70
NDG02H05	26,3	54,8	0,71
NDG02E07	22,9	51,2	0,72
NDG02F05	-5,1	19,1	0,76
NDG04G04	5,9	26,0	0,80
NDG02C05	42,1	56,3	0,86
NDG04B05	21,3	30,9	0,90
NDG02H07	-2,6	2,9	0,94
NDG04C08	-9,8	-4,9	0,95
F192	13,5	16,4	0,97
NDG01B06	-29,8	-29,9	1,00
NDG01A02	27,6	27,3	1,00
NDG04A03	26,5	26,2	1,00
RF0852	3,0	2,4	1,01
NDG04A05	24,1	21,0	1,03
NDG04H04	-19,7	-24,6	1,05
NDG04H06	-13,4	-20,3	1,07
NDG04D08	-8,1	-16,8	1,09
RF0745	34,4	24,6	1,10
RF0767	-1,9	-12,5	1,11
NDG03H11	2,3	-9,0	1,11
L6	-4,9	-16,7	1,12
RF1222CI	14,7	-2,8	1,17
F169	14,7	-13,7	1,28
NDG04A08	23,8	-17,4	1,41
NDG02F08	26,9	-20,1	1,47
NDG03E03	3,2	-56,2	1,59
NDG03F05	14,4	-54,1	1,68

Tableau 5. Liste des molécules du crible classées en fonction de leur indice de protection sur les larves *wfs1ab*. Les molécules sont classées par ordre croissant d'indice de protection. L'indice de protection optimal étant 1. Les 9 points verts indiquent les molécules efficaces sur l'hyperlocomotion des larves KO et qui n'ont aucun effet sur la locomotion des larves WT.

a. Affinité des hits pour S1R

Dans un premier temps, l'affinité pour S1R des hits a été mesurée par un test de compétition avec la fixation de la [³H](+)-pentazocine sur S1R. L'affinité (K_i) de notre molécule de référence, le PRE-084, est de 44 nM (Su et al., 1991). Les résultats présentés dans le Tableau 6 montrent que les molécules L6 et F192 sont très affines pour S1R avec des K_i de 0.86 nM et de 1.78 nM respectivement. Parmi les 7 hits identifiés du lot Strasbourgeois, 2 se sont montrés très affins pour S1R (NDG02H07, NDG04C08), 2 autres moyennement affins (RF0767, RF0852) et 3 sans effet (NDG03H11, NDG04D08, RF1222CI). L'efficacité de ces 3 molécules dans le criblage est probablement induite par un autre mécanisme cellulaire que la modulation directe de S1R, qui demandera à être étudiée par la suite.

	K _i (nM)	% inhibition à 100 nM de [³ H](+)-pentazocine	K _i estimé (nM)
L6	0.86 [1]	-	-
F192	1.78 [2]	-	-
PRE-084	44 [3]	-	-
NDG02H07	-	67	50
NDG04C08	-	64	56
RF0767	-	41	144
RF0852	-	21	376

Tableau 6. Déplacement de la [³H](+)-pentazocine de S1R par des molécules du crible. Les molécules sont classées par force d'affinité à S1R, traduit par une valeur de K_i faible. Le L6 est donc la molécule du crible la plus affine pour S1R avec un K_i ≈ 0.86 nM. La ligne grisée correspond au PRE-084. Références : [1] (Abatematteo et al., 2022), [2] C. Abate, communication personnelle, [3] (Su et al., 1991).

b. Mesure de l'activité S1R des hits

Dans un second temps, l'efficacité des composés affins pour S1R a été évaluée sur un test cellulaire (Hayashi and Su, 2007). Afin de déterminer l'activité, agoniste ou antagoniste, leur effet sur la dissociation de S1R et BiP dans des cellules CHO

surexprimant S1R tagué par une GFP a été mesurée par dosage ELISA. Un agoniste dissocie le complexe S1R-BiP. Un antagoniste n'induit pas la dissociation et bloque la dissociation induite par l'agoniste de référence (PRE-084). Les efficacités du PRE-084, de NDG02H07, de RF0852 et de RF0767 ont été évaluées. Comme le montre la Figure 17, les 3 hits ont induit la dissociation du complexe S1R/BiP avec des IC_{50} inférieures à celle mesurée pour le PRE-084 (125 nM pour le RF0852 ; 237 nM pour le RF0767 et 383 nM pour le NDG02H07). De manière intéressante, les dissociations S1R-BiP, ont été bloquées par l'antagoniste de référence, le NE-100 à 3 μ M. Sur la base de ces résultats, le NDG02H07, le RF0852 et le RF0767 sont bien identifiés comme des agonistes de S1R. Leur efficacité *in vivo* est donc corrélable à la modulation directe de l'activité de S1R dans un contexte SW. La molécule NDG04C08 n'a pas été testée car nous avons identifié des limitations dans son développement possible (squelette moléculaire difficile à moduler et liberté d'exploitation pas évidente).

De manière générale, le test VMR chez les larves de la lignée *wfs1ab* a donc permis de tester l'efficacité d'un grand nombre de molécules dans un contexte SW. Les ligands S1R de référence ont permis de mettre au point le protocole de traitement applicable aux molécules de la chimiothèque ainsi que l'analyse des résultats des VMR associées. Le criblage phénotypique a été réalisé dans un temps assez court (environ 6 mois) et de manière peu coûteuse comparé à l'utilisation d'autres modèles animaux.

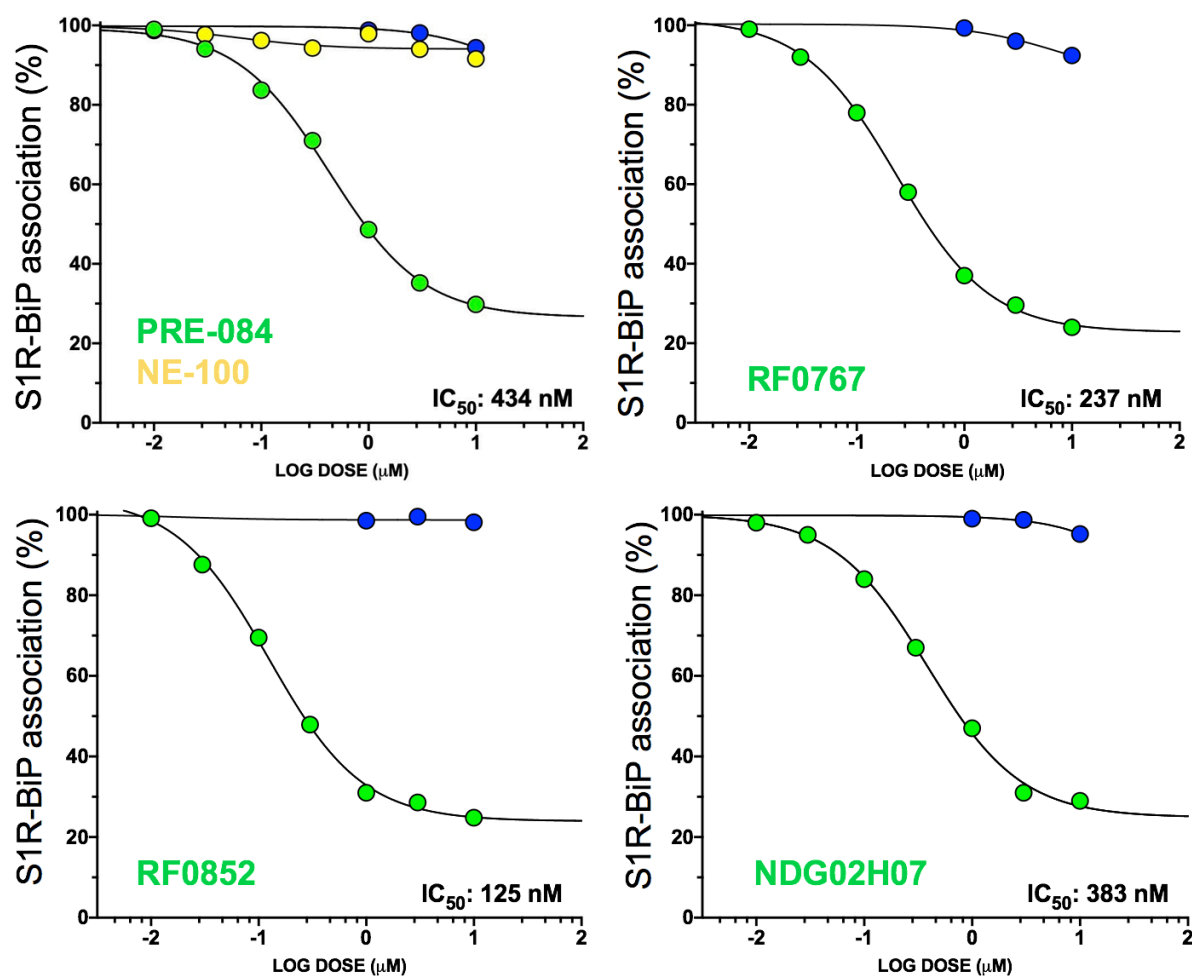


Figure 17. Régulation de l'association du complexe S1R-BiP par les molécules affines S1R du criblé. Les efficacités (IC₅₀) de NDG02H07, de RF0852 et RF0767 ont été comparées à celle de l'agoniste S1R de référence, le PRE-084. Les molécules ont été ajoutées dans le milieu de culture pendant 30 min à 37°C. Les lysats cellulaires ont été collectés et utilisés pour la détection de BiP couplés à S1R. Les molécules ont été testées à une concentration finale de 0.01 à 10 μM . Les valeurs représentées par des points verts représentent une seule mesure. Les valeurs résultants du co-traitement des molécules avec le NE-100 à 3 μM sont représentées par des points bleus.

La répartition de l'effet des 263 molécules de cette banque sur les larves *wfs1ab* a donc été la suivante (Figure 18) : 3% des composés se sont révélés très efficaces et spécifiques, 13% avaient une efficacité ou spécificité moindre ou nulle ou un IPr dans la zone d'efficacité majeure induits par des effets compensés des *Loc* (WT) % et des *Hyperloc* (KO) %. 47% se sont révélés non efficaces chez les KO, voir délétères sur la locomotion et 37% toxiques.

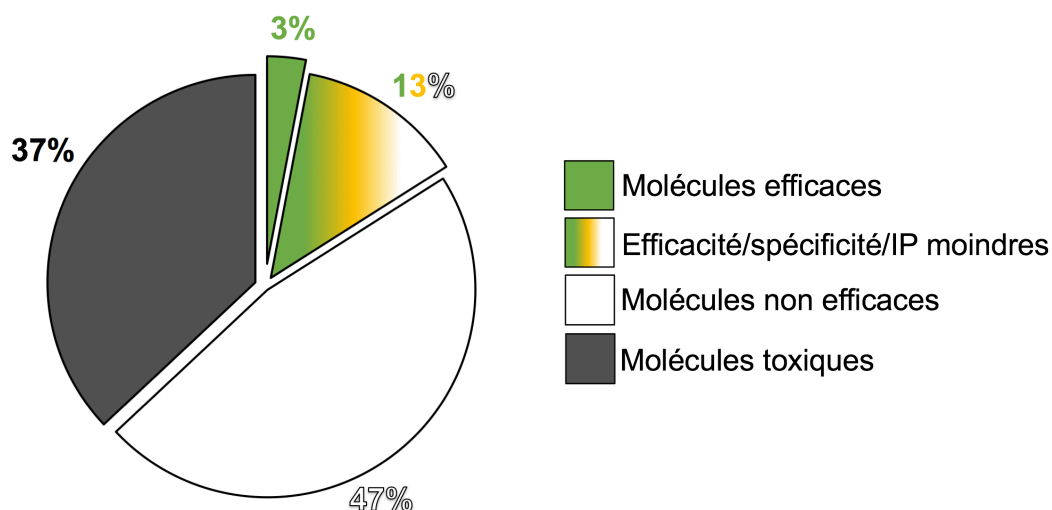


Figure 18. Récapitulatif de la proportion des effets des molécules de la chimiothèque sur l'hyperlocomotion des larves *wfs1ab*^{KO} et la locomotion des larves *wfs1ab*^{WT}. La proportion de molécules très efficaces est représentée en vert, les molécules moyennement efficaces en gradient vert/jaune/blanc, les molécules non efficaces ou ayant un effet délétère sur la locomotion des KO sont représentées en blanc et les molécules toxiques en gris. Abréviation : IP, indice de protection.

On réalise ici l'intérêt d'avoir travaillé sur une chimiothèque « biaisée », nos collaborateurs chimistes ayant intentionnellement sélectionnés les composés à tester comme de probables ligands S1R de par leur structure chimique. On a donc obtenu un ratio élevé de molécules efficaces (3%) comparé à d'autres études où le pourcentage de hits identifiés était compris entre 0.01 et 0.5% dans des cribles cellulaires à haut débit, plus classiques (Avery et al., 2014; Xiong et al., 2021).

À l'issu de ce crible, une démarche détaillée de la relation structure-activité a été initiée et les chimistes synthétisent actuellement de nouveaux composés issus de la structure chimique initiale de ces 3 composés afin d'améliorer leur stabilité, affinité et efficacité *in vivo*, tout en conservant le squelette initial de la molécule à l'origine de son efficacité. Le but étant de créer un grand nombre de molécules structurellement proche du RF0767, RF0852, et du NDG02H07 et efficaces afin d'isoler plusieurs molécules compétentes dont une infime partie pourra être développée en médicament chez l'Homme.

Partie VI. Identification d'un alcaloïde issu du crible, le MED0092, en tant que nouveau modulateur positif de S1R, avec des activités anti-amnésiques et neuroprotectrices dans la MA et le SW.

Contexte

La chimiothèque fournie par les collaborateurs Strasbourgeois était composée non seulement des 371 composés décrits plus haut, mais également de 108 molécules naturelles ou repositionnables. Une dizaine de ces composés ont eu un effet pharmacologique sur l'hyperlocomotion des larves *wfs1ab*^{KO}. L'un de ces composés est très efficace. Le MED0092 est un alcaloïde très concentré dans des préparations ethnopharmacologiques qui sont traditionnellement utilisées et dont les effets thérapeutiques ont largement été décrits dans la littérature. Sa nature et sa structure chimique ne seront pas révélées ici pour des raisons de confidentialité. Nous envisageons une valorisation de cette molécule sur la base des résultats mécanistiques obtenus suite à son identification comme hit dans notre criblage phénotypique. En effet, nos résultats montrent que le MED0092 n'est pas un agoniste S1R mais agit comme un modulateur positif de S1R. Il est sélectif et efficace car il potentialise la capacité du PRE-084 à dissocier S1R de BiP à des concentrations nanomolaires et se comporte comme un agoniste de S1R *in vivo* : (i) il renverse les troubles d'apprentissage chez les souris *Wfs1*^{ΔExon8}, (ii) il atténue l'amnésie induite par la Dizocilpine chez les souris Swiss et (iii) il prévient les déficits d'apprentissage induits par l'Aβ₂₅₋₃₅, un modèle pharmacologique de la MA. Les effets du MED0092, chez le poisson zèbre *wfs1ab*^{KO} et les souris traitées à la Dizocilpine, ont été bloqués par le NE-100 confirmant la sélectivité de son effet. Cette étude identifie donc un nouveau

modulateur positif de S1R aux propriétés cognitives et neuroprotectrices puissantes, qui pourrait être rapidement utilisé dans plusieurs indications.

Article 5

The alkaloid MED0092 is a potent sigma-1 receptor positive modulator with cognitive and neuroprotective properties

Lucie Crouzier, Johann Meunier, Allison Carles, Axelle Morilleau, Cassandre Vrigneau, Martine Schmitt, Jean-Jacques Bourguignon, Benjamin Delprat, Tangui Maurice

En préparation

Résultats

Comme S1R est exprimé dans de nombreux organes et différents types de cellules, son rôle est d'une importance majeure dans la physiologie normale ainsi que dans des conditions physiopathologiques (Su et al., 2010, 2016). Des ligands S1R développés comme médicaments ont une affinité S1R de l'ordre du nanomolaire, tels que la fluvoxamine, la sertraline, le donépézil et l'afobasole (Kato et al., 1999; Narita et al., 1996; Seredenin et al., 2009). Nous avons par ailleurs décrit la neuroprotection médiée par S1R dans des modèles murins de la MA (Espallergues et al., 2007; Maurice et al., 1998; Meunier et al., 2006; Villard et al., 2009, 2011) et, plus récemment, dans le SW (Crouzier et al., 2022a). Sur la base de ces résultats, le lot de 108 molécules naturelles ou repositionnables a été criblé chez les larves de *wfs1ab*^{KO} en utilisant la stratégie de criblage phénotypique définie plus haut (Crouzier et al., 2022a). Trente composés ont été écartés car ils étaient toxiques pour les larves, entraînant des œdèmes cardiaques, des altérations morphologiques ou de la mortalité. Cinquante-sept composés n'ont pas réussi à diminuer la réponse hyperlocomotrice des larves *wfs1ab*^{KO} et ont été considérés comme inefficaces. Parmi les 21 composés présentant une efficacité modérée ou totale, le MED0092, a permis de bloquer la réponse hyperlocomotrice des larves *wfs1ab*^{KO} sans affecter la mobilité spontanée des larves *wfs1ab*^{WT}, montrant ainsi un IPr de 1. Le MED0092 n'a aucune affinité pour S1R ($K_i > 30 \mu\text{M}$) et une affinité modérée pour S2R ($K_i = 13 \mu\text{M}$). Ce manque d'affinité pour S1R pourrait s'expliquer par le fait que si la structure chimique du MED0092 présente bien un groupe hydrophobe à une distance de 8,4 Å d'un atome d'azote, cohérent avec le modèle pharmacophorique initial de S1R par Glennon (Glennon et al., 1994), on note l'absence du second domaine hydrophobe nécessaire à une fixation

« orthostérique » sur S1R (sur le site reconnu par la [³H](+)-pentazocine), l'azote étant seulement monométhylé.

L'activité S1R du MED0092 a été analysée par le test de dissociation S1R/BiP. Le MED0092 n'a pas réussi à dissocier S1R de BiP à des concentrations allant jusqu'à 30 µM, confirmant que ce n'est pas un agoniste de S1R. Mais, lorsque le MED0092 a été co-administré avec des concentrations croissantes de PRE-084, un déplacement de la courbe de réponse du PRE-084 a été observé vers des concentrations plus faibles et des IC₅₀ diminués à 140-150 µM, démontrant une modulation positive S1R du MED0092, avec une IC₅₀ pour effet modulateur évaluée à 289 nM. Ces résultats sont donc cohérents avec une modulation positive non orthostérique sur S1R.

Une activité modulatrice positive de S1R a été décrite depuis l'identification précoce des sites de liaison sigma. Plusieurs composés ont été identifiés depuis, comme le SKF-83959, le SKF-38393, le SCH-23390, le SOMCL-668, le méthylphénylpiracétam (E1R), l'OZP002 et la Fenfluramine (Guo et al., 2013, 2015; Martin et al., 2020; Maurice et al., 2019; Vavers et al., 2019; Zvejniece et al., 2014). L'allostéricité a été clairement démontrée pour le SKF83959, le SKF38393, le SCH23390 (Guo et al., 2013) et le SOMCL-668 (Guo et al., 2015) et la modulation positive a été démontrée en utilisant le test de dissociation S1R/BiP pour l'OZP002 (Maurice et al., 2019) et la Fenfluramine (Martin et al., 2020). La molécule est en outre très sélective puisqu'elle ne présente, dans un crible mené sur 47 récepteurs et protéines, que des activités sur les récepteurs 5-HT₃ et 5-HT_{1B} mais qui méritent d'être étudiées par la suite (60% d'inhibition à 1 µM signifiant une affinité submicromolaire pour le récepteur 5-HT₃). Des études ont en effet montré des relations fonctionnelles entre les ligands 5-HT₃ et S1R, avec, par exemple, un impact sur la libération de

dopamine dans le noyau accumbens et le striatum mesurée par microdialyse chez le rat (Volonté et al., 1992, 1995).

On notera que le MED0092 est bien actif par lui-même puisque son métabolite le plus évident, par déméthylation de l'azote, le dMED0092, n'est pas efficace.

Enfin, le MED0092 a montré une activité pharmacologique, non seulement chez la souris *Wfs1^{ΔExon8}*, confirmant les résultats du modèle poisson zèbre, mais également chez les souris injectées à la Dizocilpine et les souris injectées centralement avec du peptide A β ₂₅₋₃₅, un modèle pharmacologique de MA (Maurice et al., 1996). La molécule montre donc des activités anti-amnésiques et neuroprotectrices dans des modèles de MA et du SW et se comporte *in vivo* comme un agoniste S1R, une propriété déjà décrite pour tous les modulateurs positifs S1R. Ils ont en effet montré une activité anticonvulsivante, pour la Phénytoïne, la Ropizine, le SKF-83959, le SKF-38393, le SCH23390, le SOMCL-668, E1R et la Fenfluramine, une activité neuroprotectrice pour le SKF-83959 et l'OZP002, ou une activité anti-amnésique pour le SKF-83959, le SKF-38393, l'OZP002 ou la Fenfluramine. Cette particularité n'est pas encore expliquée mais peut reposer sur la nature particulière de S1R qui est une chaperonne sans ligand endogène indubitablement identifié. S1R s'active par des changements physiologiques (modifications locales de taux de calcium ou de niveau de stress oxydant) et on peut concevoir qu'un modulateur en impactant la conformation de la protéine puisse directement induire un effet *in vivo* (Vavers et al., 2019).

En conclusion, en utilisant un criblage phénotypique de ligands potentiels de S1R chez le poisson zèbre *wfs1ab^{KO}*, le MED0092 a été identifié comme nouveau modulateur positif de S1R, avec des activités anti-amnésiques et neuroprotectrices dans des modèles de MA et du SW. Le médicament est actif *in vivo* à faible dose et

ses effets contribuent probablement aux effets pharmacologiques décrits dans la phytothérapie traditionnelle. La valorisation de ce composé est en cours de discussion.

A watercolor illustration of a group of people, rendered in soft, muted tones of grey, brown, and white. The figures are depicted in a loose, sketchy style, suggesting movement and interaction. The background is a light, textured wash of color. The overall mood is contemplative and artistic.

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

Cette thèse avait pour but principal d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques pour traiter une maladie génétique rare et orpheline, le SW. Des études cellulaires ont permis d'apporter des connaissances sur la physiopathologie du SW, notamment sur le rôle de *WFS1* dans la régulation des voies UPR (Fonseca et al., 2005; Morikawa et al., 2017; Shang et al., 2014; Ueda et al., 2005) et la régulation du transfert calcique (Angebault et al., 2018; Cagalinec et al., 2016; Osman et al., 2003; Takei et al., 2006). La dérégulation de ces mécanismes cellulaires, induite par la mutation de *WFS1*, entraîne la mort des cellules. Des molécules thérapeutiques ont été mises en évidence *in vitro* et permettent d'espérer un nouveau médicament (Abreu et al., 2021; Angebault et al., 2018; Kakiuchi et al., 2009; Li et al., 2017; Lu et al., 2014; Nguyen et al., 2020; Shang et al., 2014; Toots et al., 2018). Bien que les modèles soient largement utilisés par leur facilité d'emploi et leur reproductibilité, ils montrent des limitations. En effet, un organisme vivant comprend des interactions moléculaires complexes qu'une cellule en culture ne peut avoir. Les modèles *in vitro* et *in vivo* sont donc indissociables pour caractériser au mieux la physiopathologie d'une maladie.

Actuellement, il existe différents modèles cellulaires et animaux permettant d'étudier le SW. Chaque modèle ne présentant qu'une partie de la symptomatologie, l'étude de plusieurs modèles en parallèle permet donc une analyse plus complète des mécanismes physiopathologiques. Durant ma thèse, plusieurs modèles ont été utilisés en parallèle pour aborder au mieux les altérations comportementales et cellulaires induites par la mutation de *WFS1*.

Caractérisation et validation des différents modèles d'étude du SW

Comme présenté dans la Figure 19, les patients atteints du SW développent plusieurs symptômes tels qu'un diabète sucré insulino-dépendant, un diabète insipide,

	Homme	Fibroblastes	<i>wfs1a^{C825X}</i> <i>wfs1b^{W493X}</i> <i>wfs1ab^{KO}</i>	<i>Wfs1^{ΔExon8}</i>
Mutation	Récessive/Dominante		Récessive	Récessive
Diabète sucré	✓		✗	✓
Atrophie optique	✓		✓	✓
Surdité	✓		✗	✓
Déficit vestibulaire	✓		?	?
Diabète insipide	✓		?	?
Troubles neuro	✓		✳ ✓ ✨	✓ ✨
Altération de la réponse au stress		✓	✓	?
Altération du transfert calcique		✳ ✓ ✨	?	✓ ✨
Altération mitochondriale		✳ ✓ ✨	✳ ✓	✓ ✨
Autophagie/mitophagie		✓ ✨	?	✓ ✨

Figure 19. Les symptômes du SW observés dans différents modèles d'étude et la restauration de ces déficits par modulation de S1R ou de NCS1. Les patients possèdent une mutation de *WFS1* récessive ou dominante, induisant des symptômes, présentés en ligne dans ce tableau, et des études *in vitro* sur des fibroblastes ont permis de mettre en évidence des altérations cellulaires. Les différents modèles d'étude utilisés dans cette thèse ont permis d'étudier un large panel de déficits, permettant ainsi de mieux comprendre la physiopathologie du SW. Les OK de couleur verte mettent en évidence les déficits développés par chaque modèle, les croix bleues les déficits qui ne sont pas développés par ces modèles et les points d'interrogation des paramètres non étudiés aujourd'hui. Les différents modèles ont permis également d'identifier des pistes thérapeutiques, telles que S1R et NCS1 dans notre étude. L'efficacité thérapeutique de la surexpression de NCS1 sur les déficits développés par les modèles d'étude est représentée par une étoile rose et l'efficacité de l'activation ou la surexpression de S1R par une étoile jaune.

une atrophie optique, une perte auditive et des troubles neurologiques (Wolfram and Wagener, 1938). Au niveau cellulaire, les études *in vitro* ont permis de mettre en évidence une altération de la régulation du stress du RE, une altération du transfert calcique, des déficit mitochondriaux et autophagiques/mitophagiques (Angebault et al., 2018; Caglinec et al., 2016; Crouzier et al., 2022a; Fonseca et al., 2005, 2010; Yamada et al., 2006). Les modèles *in vivo*, lignées poissons zèbres mutantes *wfs1a*, *wfs1b* et *wfs1ab*, et souris *Wfs1^{ΔExon8}*, ont permis d'étudier certains déficits induits par

la pathologie chez l'Homme mais une synthèse des études sur l'ensemble des modèles s'avère nécessaire pour décrire la quasi-totalité des déficits développés par les patients. Les lignées de poisson zèbre mutantes pour *wfs1* développent à 5 jpf des potentiels troubles neurologiques, visuels, une altération des voies UPR et de l'activité mitochondriale (Crouzier et al., 2022b, en revision) (Figure 19). Certaines altérations physiopathologiques retrouvées chez l'Homme, telles que le diabète sucré, la surdité et le déficit vestibulaire, n'ont pas été identifiées chez le modèle poisson zèbre. Plusieurs hypothèses sont possibles. Soit les études ont été réalisées à un stade de développement trop précoce pour observer des déficits, soit car les organes du poisson zèbre ne sont pas tous morphologiquement et fonctionnellement corrélables avec l'Homme comme par exemple l'oreille interne. En effet, les poissons n'ont pas d'organe auditif dédié comme la cochlée des mammifères, mais leur oreille interne est constituée de trois chambres, c'est-à-dire le saccule et la lagena, qui sont nécessaires pour la perception auditive, et l'utricule, indispensable à l'équilibre postural (Bever and Fekete, 2002; Nicolson, 2005; Riley and Moorman, 2000). Cette absence de déficit mesurée chez les larves peut également être induit par des méthodes d'analyses pas assez fines pour permettre d'identifier un déficit. Pour des questions de praticité et d'éthique, toutes les expériences ont été réalisées au stade larvaire.

Certains déficits restent encore à explorer chez ce modèle tels que le diabète insipide à un niveau symptomatologique, le déficit vestibulaire ou encore le transfert calcique et l'autophagie/mitophagie à un niveau cellulaire. La mesure du niveau de glucose a été réalisée sur des larves *wfs1ab^{KO}* et une légère altération non significative a été observée comparé aux contrôles, malgré une stimulation par un traitement de 24 h au glucose (Singh et al., 2019). Le protocole de mesure de la glycémie des larves, pourtant publié dans une autre étude (Singh et al., 2019), paraît être une analyse trop

grossière pour mesurer un déficit dans notre étude. En effet, la teneur en glucose contenu dans l'homogénat de poisson mesuré avec le dispositif Accu-Chek Performa® est réalisé à partir de larves entières. Le séchage total des larves avant l'extraction du glucose de larves par homogénéisation de l'échantillon est une étape délicate et cruciale pour une mesure du glucose de manière optimale et reproductible. Si cette étape est mal réalisée, le petit volume final d'extraction (5 µL) peut être biaisé par le volume d'eau déposé dans le tube avec les larves, diluant ainsi le taux de glucose de l'échantillon. Il serait intéressant d'infirmer ou de confirmer ce résultat avec un dosage biologique à partir du kit Amplex™ Red Glucose/Glucose Oxidase, qui permet de mesurer l'activité de la glucose oxydase ou la libération de glucose à l'aide d'un spectrophotomètre. La glucose oxydase réagit avec le d-Glucose pour former la d-Gluconolactone et le peroxyde d'hydrogène. En présence de peroxydase de raifort, le peroxyde d'hydrogène réagit avec le réactif Amplex™ Red pour générer la résorufine, un indicateur coloré fortement fluorescent dans le rouge (Morris et al., 2021).

Le système vestibulaire chez les larves de poisson zèbre est fonctionnel à partir de 3 jpf (Easter and Nicola, 1997). Les réflexes vestibulaires coordonnent les mouvements ou les entrées sensorielles avec les changements de position du corps ou de la tête. Les réponses évoquant le vestibule impliquent les muscles extraoculaires de la larves qui induisent un mouvement oculaire compensatoire permettant de stabiliser les images rétiniennes appelé réflexe vestibulo-oculaire (VOR) (Mo et al., 2010). Récemment, une équipe a développé un nouveau dispositif de test de VOR des larve des poisson zèbre, évoqué par le mouvement de la tête autour d'un axe horizontal à la terre (Sun et al., 2018). En comparaison avec les différences mesures du VOR réalisées sur de précédentes études (Beck et al., 2004; Easter and Nicola, 1997; Mo et al., 2010), le test du VOR développé par Sun *et al.* possède de nombreux

avantages dont notamment la position figée de la larves sans anesthésie durant l'acquisition du VOR, évitant d'affecter le mouvement des yeux. En utilisant ce dispositif, il serait possible d'étudier la fonction vestibulaire des lignées de poisson zèbre *wfs1* mutantes à 5 jpf.

La régulation de l'homéostasie ionique des fluides corporels médiée par la vasopressine (hormone antidiurétique) chez les mammifères est régulée par la vasotocine, analogue structural de la vasopressine, chez les non mammifères tels que le poisson (Lema et al., 2019). Pour analyser l'effet de la mutation de *wfs1* sur le développement d'un diabète insipide chez les lignées poissons zèbres *wfs1* mutantes, l'expression de la vasotocine et des gènes transporteurs d'ions pertinents pourraient être analysés, ainsi que la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices des ionocytes (cellules riches en $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPases}$, les cellules riches en $\text{H}^+\text{-ATPases}$ et les cellules cotransportrices $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$, respectivement responsables de l'absorption du Ca^{2+} , de l'équilibre acido-basique et de l'absorption du chlorure et des fonctions de transporteur d'ions) (Tong et al., 2020; Wang et al., 2009).

De manière intéressante, des expériences d'imagerie calcique permettent d'analyser l'impact de la mutation de *wfs1* sur l'influx de Ca^{2+} dans différents types cellulaires affectées par le SW. En utilisant une sonde de type GCaMP, largement utilisée aujourd'hui chez le poisson zèbre (Liu and Baraban, 2019; Muto and Kawakami, 2011; Muto et al., 2011), il suffirait de croiser nos lignées *wfs1* mutantes avec des poissons transgéniques exprimant GCaMP dans des cellules spécifiques qui dégénèrent chez les patients SW, telles que les cellules β pancréatiques. Pour cela, la séquence génétique codante pour GCaMP peut être insérée sous le contrôle du promoteur *ins* spécifique des cellules pancréatiques (Lorincz et al., 2018), ou *isl2b* pour les CGR (Walker et al., 2013). GCaMP est une sonde calcique ratiométrique

composée d'une protéine cpEGFP, protéine fluorescente verte modifiée qui se replie circulairement sur elle-même et liée à la calmoduline (CaM), qui est capable de s'associer au Ca^{2+} présent dans le milieu cellulaire, et à un peptide synthétique M13 (Nakai et al., 2001). La cpEGFP est fluorescente et la calmoduline, quant à elle, est présente naturellement dans le cytoplasme des cellules. La fixation de Ca^{2+} sur CaM induit un changement de conformation du peptide M13, qui à son tour change la conformation de la protéine cpEGFP, ce qui accroît sa fluorescence. Ainsi par imagerie confocale, il est possible de mettre en évidence une potentielle altération du transfert calcique entre le RE et la mitochondrie des lignées *wfs1* mutantes en quantifiant la fluorescence émise par les cellules.

De la même manière que présentée dans la partie II de ce mémoire sur les modèles cellulaires et murins, l'autophagie et la mitophagie peuvent être mesurées sur des larves de poisson zèbre. La transparence des larves facilite la quantification des marqueurs autophagiques LC3 et des sondes lysosomales et mitochondriales. Il serait donc possible, par exemple, de générer des lignées de poissons zèbres transgéniques exprimant une LC3 fusionnée à la protéine fluorescente verte (GFP) (GFP-LC3) comme réalisé dans d'autres études (Cui et al., 2012; He et al., 2009; Muñoz-Sánchez et al., 2020). Sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire tel que l'actine, nous pourrions ainsi déterminer si le nombre d'autophagosome est altéré quand *wfs1* n'est plus fonctionnelle. Cependant, le croisement de la lignée double mutant *wfs1ab*^{KO} avec des lignées transgéniques peut prendre plusieurs mois mais cela reste réalisable. En effet, à la seconde génération de poisson zèbre généré à partir d'un premier croisement de *GCaMP* x *wfs1ab*^{KO}, les larves homozygotes pour les mutations *wfs1a* et *wfs1b*, et présentant le transgène *GCaMP* ou *GFP-LC3* ne représenteront que $1/32^e$ de la ponte. Plusieurs croisements seront donc nécessaires afin d'obtenir un nombre

conséquent de larves *wfs1ab*^{KO}-transgénique (+) permettant de devenir de géniteurs afin de produire des larves sur lesquelles il sera possible de réaliser *in fine* la quantification du flux calcique ou l'autophagie/mitophagie.

Enfin, comme mesuré chez les fibroblastes de patients et sur des neurones hippocampiques de souris *Wfs1*^{ΔExon8} (Crouzier et al., 2022a) et afin de corrélérer les phénotypes comportementaux à 5 jpf à des altérations cellulaires, nous avons voulu analyser l'impact de la mutation de *wfs1* sur la qualité des contacts RE/mitochondries chez les larves *wfs1ab*^{KO}. Nous avons d'abord examiné les CGR en utilisant la microscopie électronique à transmission. Nous avons été confrontés à une limitation technique due au type de cellules lui-même. Alors que nous avons réussi à imager les mitochondries et les sites de contact RE-mitochondries dans d'autres tissus de la larve (cellules musculaires, neuromastes), nous n'avons pas réussi à obtenir de bonnes acquisitions dans les CGR. Ceci est inhérent au type de cellules étudiés (libération rapide de glutamate, gonflement du cytoplasme), et nous n'avons pas été en mesure d'inverser ce problème. Nous avons donc décidé d'essayer un test de ligature de proximité (*Proximity ligation assay*, PLA) sur des coupes de rétine de larves. Un marquage immunohistochimique a donc été mis en place à l'aide du kit PLA en immunomarquant les interactions IP3R/VDAC, présentes respectivement à la membrane du RE et de la mitochondrie. Les résultats, non présentés dans ce mémoire, permettent d'observer de petites taches brunes (en fond clair) au niveau des différentes couches de la rétine traduisant les interactions IP3R/VDAC. Cependant, la profondeur du tissu et la superposition de certaines taches ne permettent pas un comptage optimal de celles-ci au microscope optique. Il serait intéressant d'utiliser un kit PLA avec des anticorps visible par fluorescence et ainsi réaliser des stacks d'image

de la rétine au microscope confocal afin de dissocier aisément les différents spots d'interaction au niveau des différentes couches de la rétine.

Concernant le modèle murin *Wfs1* ^{Δ Exon8}, les souris développent à 3 mois un diabète sucré, une atrophie optique, une surdité, des troubles neurologiques et au niveau cellulaire, une altération du transfert calcique dans l'hippocampe et le cortex, un déficit de l'activité mitochondriale et des altérations de l'autophagie/mitophagie (Abreu et al., 2020; Crouzier et al., 2022a; Luuk et al., 2009). Il est mesuré des altérations de la mémoire et de l'apprentissage et de l'anxiété, comme retrouvé chez 32% des patients atteints du SW (Chaussonnet et al., 2011). Certains déficits n'ont pas encore été étudiés sur des modèles murins tels que le déficit vestibulaire, le diabète insipide et l'altération des voies UPR. Le déficit vestibulaire peut être quantifié par une batterie de tests comportementaux (orientation dans l'espace, régularité de la marche, mouvement de tête, qualité de nage) (Fasquelle et al., 2011), et la sévérité du diabète insipide pourrait être évaluée par la consommation d'eau, l'osmolalité plasmatique et urinaire, et la quantité de vasopressine présente dans les excréments urinaire des souris (Morishita et al., 2005). Enfin, la mesure du taux d'ARNm et l'expression protéique de marqueurs du stress du RE (BiP, IRE1, XBP1, PERK, ATF4, ATF6, CHOP, Eif2 α) dans différents tissus tels que le cerveau, la rétine, le pancréas ou encore l'oreille interne permettrait de mesurer l'impact de la mutation de *WFS1* sur ces différents tissus et ainsi corrélérer les déficits fonctionnels aux différentes altérations cellulaires.

La seconde lignée de souris *Wfs1* mutantes, non présentée dans ce mémoire, appelée *Wfs1*^{E864K}, développe précocement et rapidement des déficits vestibulaires, une coordination motrice altérée, une surdité et une cécité (données en cours de publication de l'équipe). Des analyses biochimiques permettraient de mettre en

évidence un éventuel diabète chez ces souris, et les déficits cellulaires associés pourront être mis en évidence par des études *post mortem*.

Thérapie génique par NCS1

Depuis 2009, plusieurs études de thérapie génique ont montré un intérêt thérapeutique chez l'Homme pour diverses maladies (Aiuti et al., 2013; Biffi et al., 2013; Costa et al., 2013; Hauswirth et al., 2008; Isgrò et al., 2010; Liu et al., 2013; Maguire et al., 2008; Miniarikova et al., 2018). Le modèle murin est largement utilisé dans ces études de thérapie génique, notamment pour le cancer (Zhang et al., 2015b), les dystrophies musculaires (DelloRusso et al., 2002; Larcher et al., 2014), les troubles hématologiques (Kuether et al., 2012; Negre et al., 2015), neurologiques (Haase et al., 1997), respiratoires (Tuggle et al., 2014), hépatiques (Domvri et al., 2012) et cardiovasculaires (Mearini et al., 2014). Des cibles thérapeutiques issues de protéines situées dans les MAM ont été identifiées et validées dans nos modèles *in vivo* et *in vitro*. Comme présenté dans la Figure 19 (étoiles roses), la surexpression de NCS1 chez les larves *wfs1ab*^{KO} a permis de restaurer l'hyperlocomotion et l'activité mitochondriale (Crouzier et al., 2022a) probablement en restaurant les déficits de transfert calcique entre le RE et les mitochondries et l'activité mitochondriale (Figure 20), comme retrouvé chez les fibroblastes de patients (Angebault et al., 2018).

En effet, dans les cellules saines, WFS1 se lie à NCS1 pour former un complexe avec IP3R et activer le transfert de Ca²⁺ entre le RE et la mitochondrie afin de promouvoir la fonction mitochondriale. Lorsque le complexe WFS1/NCS1/IP3R et VDAC sont fonctionnels, le Ca²⁺ peut être transféré correctement du RE vers les mitochondries et activer le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale. Dans le SW, la perte de fonction de WFS1 conduit à la dégradation de NCS1 et une

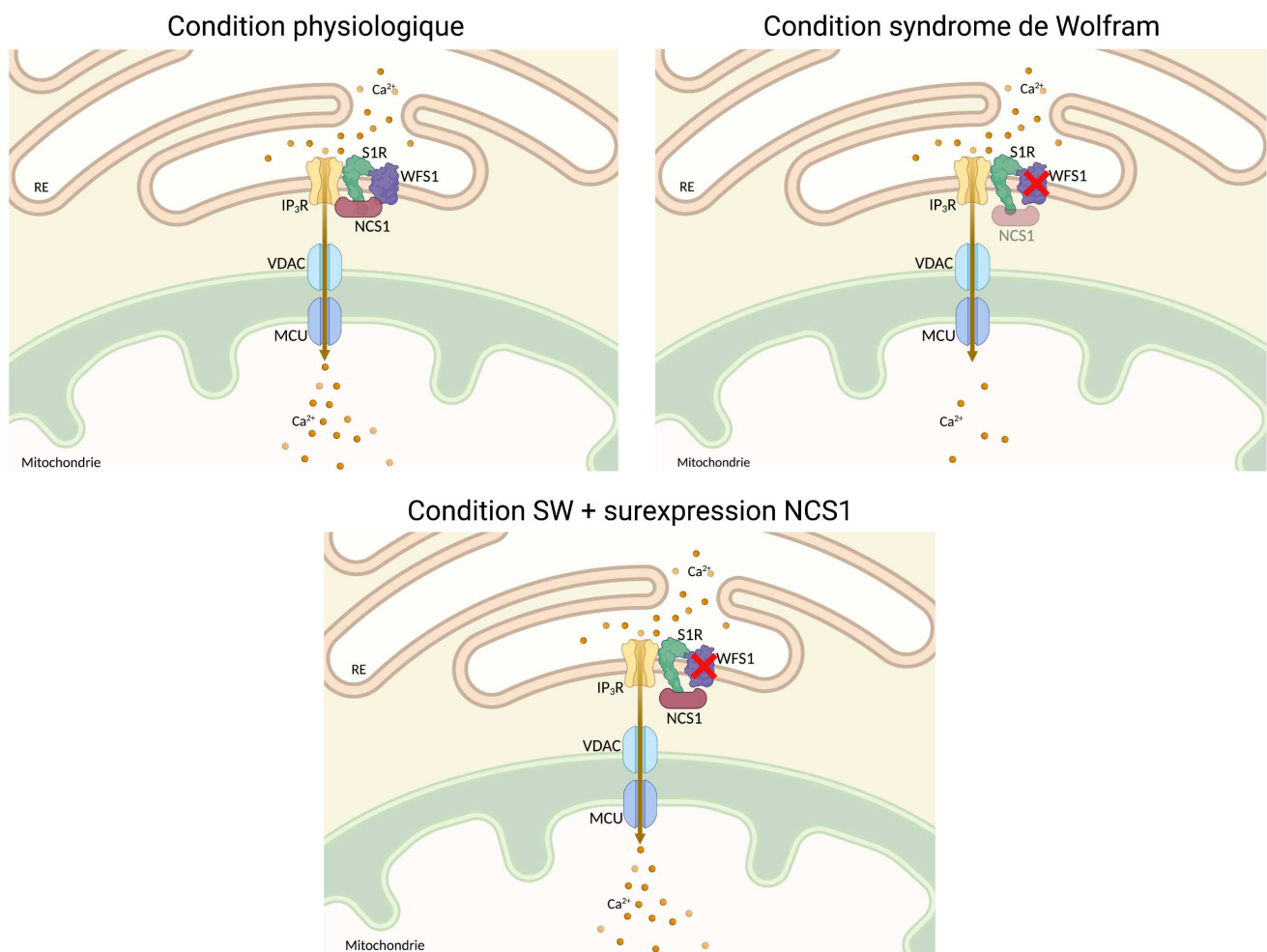


Figure 20. Modèle d'altération mitochondriale induite par la perte de fonction de WFS1, et restaurée par la surexpression de NCS1. L'altération du transfert calcique ainsi que la fonction mitochondriale induites par la mutation de *wfs1* seraient restaurées par la surexpression de NCS1 chez les larves *wfs1ab^{KO}*.

diminution du transfert de Ca^{2+} du RE vers les mitochondries. En conséquence, la chaîne respiratoire mitochondriale est altérée. La surexpression de NCS1 chez les larves *wfs1ab^{KO}* pourrait non seulement restaurer les interactions RE/mitochondries, le transfert de Ca^{2+} , mais également le dysfonctionnement mitochondrial comme retrouvé dans les travaux d'Angebault *et al.* à partir de fibroblastes de patients (Angebault *et al.*, 2018). Nos travaux ont donc confirmé l'intérêt thérapeutique de NCS1 dans le contexte du SW en validant son efficacité thérapeutique sur un modèle *in vivo*.

Par la suite, l'effet de la surexpression de NCS1 chez les larves *wfs1ab*^{KO} pourrait être analysée au niveau de la dérégulation des voies UPR.

Bien que le modèle poisson zèbre ait permis d'identifier des phénotypes pathologiques ainsi que de valider des cibles protéiques pertinentes permettant de traiter le SW, il est important de valider l'efficacité de la modulation de l'expression de NCS1 sur un modèle mammifère. C'est pourquoi, une étude de thérapie génique ciblant NCS1 chez les souris *Wfs1*^{Δexon8} est en cours au sein de l'équipe. Le but étant de surexprimer l'ARNm de NCS1 chez les souris à un stade précoce afin de prévenir l'apparition des déficits neurodégénératifs observés à 3 mois. Pour cela, des souriceaux âgés de 24 h sont transduits avec un vecteur viral de type AAV codant le transgène NCS1. Selon le mode d'injection, nous pouvons obtenir soit la surexpression locale de NCS1 par injection intracérébroventriculaire (ICV) du virus, soit de manière systémique par injection dans la veine temporale. L'injection systémique permettra potentiellement de restaurer les altérations sur différents organes. L'efficacité du mode d'injection de NCS1 sera évaluée sur les troubles cognitifs et l'anxiété de ces souris, développés à 3 mois. Il serait également intéressant de mesurer leur glycémie.

Dans une étude *in vitro* complémentaire non présentée dans ce mémoire, sur des cellules de pancréas de souris (Min6), appelées *Wfs1*^{KD} et modifiées génétiquement par la transfection de shRNAs dirigé contre WFS1, m'a permis de mettre en évidence une altération de la respiration mitochondriale par analyse de la consommation d'oxygène (Seahorse XFe24). En effet, j'ai observé une diminution significative de la respiration basale, de la respiration associée à la production d'ATP, de la respiration maximale, et de la fuite de protons. Il serait intéressant de mesurer la survie de ces cellules. Une étude a montré une diminution de la survie cellulaire chez

des cellules de rat *Wfs1*^{KO} (INS1) comparé aux contrôles après un traitement au glucose (30 mM) pendant 24 h (Nguyen et al., 2020). L'impact de la mutation de *wfs1* sur la survie cellulaire des Min6 pourrait être déterminé par exemple avec un test MTT, test permettant de mesurer l'activité métabolique cellulaire en tant qu'indicateur de la viabilité, de la prolifération et de la cytotoxicité des cellules.

NCS1 est un régulateur des voies de signalisation dépendantes du calcium (Nakamura et al., 2019), telles que la survie (Nakamura et al., 2006) et la sécrétion d'insuline (Gromada et al., 2005). Il serait donc intéressant de surexprimer NCS1 dans les cellules Min6 par transfection d'ARNm NCS1 avec de la lipofectamine ou par vecteur viral (lentivirus), afin d'analyser son potentiel effet thérapeutique sur l'activité mitochondriale et la survie des cellules β pancréatiques déficient en *wfs1* encore méconnues aujourd'hui.

Thérapie pharmacologique ciblant S1R

L'activation de S1R par l'agoniste de référence PRE-084 ou par surexpression de son ARNm a permis de restaurer de nombreux phénotypes comportementaux et cellulaires tels que les troubles neurologiques chez les modèles poissons zèbres et souris, les déficits du transfert calcique et de l'activité mitochondriale et une altération autophagiques/mitophagiques chez les fibroblastes de patients et la souris (Figure 19) (Crouzier et al., 2022a). De par son efficacité sur différentes altérations et dans plusieurs modèles du SW, ces résultats confirment l'intérêt de S1R en tant que cible thérapeutique.

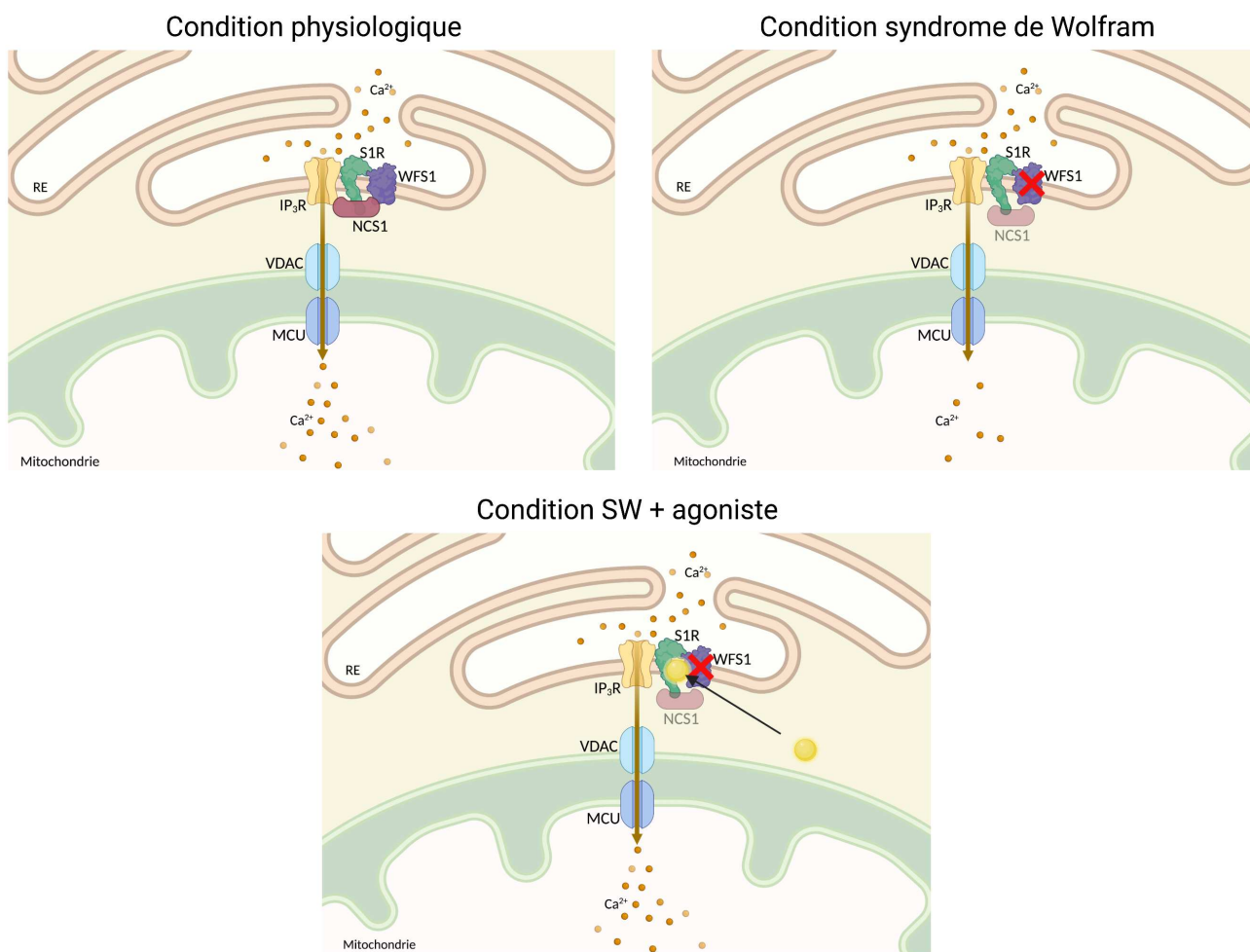


Figure 21. Modèle de rétablissement fonctionnel des MAM par un agoniste de S1R induisant l'augmentation du transfert de Ca²⁺ médié par IP3R vers les mitochondries. L'altération du transfert calcique ainsi que la fonction mitochondriale induites par la mutation de *wfs1* seraient restaurées par l'action de l'agoniste de S1R chez les larves *wfs1ab^{KO}*.

Comme résumé en Figure 19 (étoiles jaunes), l'effet pharmacologique du PRE-084 sur le transfert calcique entre le RE et les mitochondries et l'activité mitochondriale (Figure 21), montré dans les fibroblastes de patients ou dans d'autres études (Gogvadze et al., 2019; Hayashi et al., 2000), est un mécanisme cellulaire cohérent avec l'efficacité comportementale de la molécule. En effet, en condition physiologique WFS1 stabilise NCS1 à IP3R, augmentant ainsi le transfert de Ca²⁺. En condition SW, la mutation de *WFS1* entraîne une diminution de l'expression de NCS1. Étant donné que S1R et le NCS1 interagissent, l'action d'un agoniste sélectif de S1R pourrait fonctionnellement compenser par une modulation positive du transfert de Ca²⁺ médié

par IP3R et, par conséquent restaurer hypothétiquement les fonctions mitochondriales (Figure 21).

Il serait intéressant de mesurer l'effet de l'activation de S1R sur le diabète, l'atrophie optique et la surdité des souris *Wfs1* ^{Δ Exon8}, et sur la dérégulation du stress du RE et les altérations mitochondriales chez les poissons zèbres *wfs1* mutants. Cela permettrait d'étendre l'indication thérapeutique de S1R à d'autres pathologies comme notamment le diabète de type 1.

L'étude préliminaire sur cellules Min6 a permis de mettre en évidence une altération de la respiration mitochondriale, avec diminution de la respiration basale, de la production d'ATP, de la respiration maximale et de la fuite de protons. Après un traitement au PRE-084, aucune restauration de ces déficits n'a cependant pu être observée. On pourrait expliquer cela par les concentrations élevées de progestérone, dans le sérum de veau fœtal (SVF) ajouté au milieu de culture qui est connu pour agir comme antagoniste S1R endogène de forte affinité (268 nM) (Su et al., 1988). En effet, une étude a montré que l'efficacité comportementale des agonistes S1R sur les capacités de mémoire ou le désespoir comportemental est directement liée aux niveaux de progestérone endogène (Phan et al., 2002). Cette observation est d'importance pour considérer en pratique clinique les meilleures indications pour des agonistes S1R (jeunes patients prépubères, patients âgés) (Maurice et al., 2001; Phan et al., 1999; Urani et al., 2001). Il sera donc intéressant de renouveler l'expérience en veillant à diminuer au maximum la concentration de SVF durant le traitement avec le PRE-084 et les différentes mesures OCR.

Enfin, les souris *Wfs1*^{E864K} ont également été traitées au PRE-084 par voie intrapéritonéale (0.3 et 1 mg/Kg) une fois par jour durant 15 jours avant l'apparition des symptômes (P15 à P30). Le PRE-084 a permis de restaurer la coordination

motrice au test du Rotarod. Le cervelet étant indispensable à la coordination des mouvements et à l'équilibre et les patients ayant une atrophie du cervelet, il serait intéressant d'analyser, par des études histochimiques d'une part, la morphologie générale du cervelet sur tranche afin d'observer une potentielle atrophie, et par un marquage immunohistochimique d'autre part, la microglie (Iba1) ou les astrocytes (GFAP) de cette région cérébrale. Si une altération est identifiée, il serait intéressant de regarder si le PRE-084 induit des effets bénéfiques sur la morphologie générale du cervelet (arborisation dendritique des cellules de Purkinje, par exemple), qui pourrait conduire à la restauration des déficits moteurs. Concernant le déficit vestibulaire, aucune amélioration n'est notée avec le traitement. Ce déficit étant important et avec un développement rapide, son atténuation par le PRE-084 n'est probablement pas envisageable.

Devenir des nouvelles entités chimiques

La sélectivité des effets pharmacologiques de S1R dans les différents modèles *in vitro* et *in vivo* du SW, l'utilité d'un modèle de poisson zèbre pour définir un test de dépistage phénotypique rapide utilisant la l'augmentation de la réponse motrice visuelle des poissons pour cribler d'importantes bibliothèques de médicaments, et la nécessité d'optimiser la découverte de médicaments dans une maladie aussi rare que le SW, nous ont amené à explorer une chimiothèque. À l'issue de ce criblage à moyen débit de molécules, plus ou moins affines pour S1R, 4 hits ont été identifiés. Il serait intéressant d'étudier les mécanismes cellulaires induits par les 4 molécules efficaces sur la locomotion des larves et notamment d'analyser leurs effets sur les déficits cellulaires associés, tels que le stress du RE et l'activité mitochondriale des larves de la lignée *wfs1ab^{KO}*, afin de corrélérer leur efficacité sur les phénotypes pathologiques à

la restauration des déficits cellulaires. Leurs effets thérapeutiques devront être également testés sur un modèle mammifère, comme la souris *Wfs1^{ΔExon8}* (Crouzier et al., 2022a). Par analogie avec le PRE-084, cela permettra de confirmer ou d'infirmier leur potentiel thérapeutique en agissant directement sur les phénotypes pathologiques.

Une molécule a été particulièrement étudiée en dernière partie de cette thèse, le MED0092. Cette molécule naturelle a été caractérisée comme modulateur positif de S1R, ce qui est un résultat inattendu car le crible devait nous permettre d'identifier plus logiquement des agonistes. Le MED0092 permet de restaurer *in vivo* des phénotypes pathologiques induits par le SW et la MA. Il montre un mécanisme d'action original sur S1R et par, possiblement, des synergies avec une composante sérotoninergique. Ce mécanisme d'action doit être caractérisé. La valorisation de la molécule est en discussion avant des études cliniques pour vérifier son innocuité, sa tolérabilité et son efficacité dans les indications qui seront choisies.

Conclusion

La progression récente de plusieurs molécules en phases cliniques a renforcé la validité des protéines des MAM en tant qu'agents pharmacologiques cibles, tel que S1R. Leur efficacité dans des modèles précliniques de différentes pathologies décrit l'importance des altérations des MAM et le stress du RE dans les processus neurodégénératifs. Durant ma thèse, le développement et l'étude de différents modèles ont permis d'identifier des déficits cellulaires et comportementaux corrélables avec les patients pour *in fine* identifier des pistes thérapeutiques capables de renverser ces déficits. Deux protéines présentes à la région dans les MAM, S1R et NCS1, ont été identifiées comme des cibles thérapeutiques permettant de restaurer les

altérations comportementales et cellulaires induites par le SW. À l'issue du criblage, des nouvelles entités chimiques ont été identifiées comme futurs médicaments. Une démarche de relation structure-activité autour des molécules les plus efficaces est actuellement en cours sur les larves *wfs1ab*^{KO} afin d'augmenter le nombre de molécules efficaces pouvant être développées en phase clinique. Pour cela, un programme de maturation vient de commencer au laboratoire. Celui-ci devrait, à terme, permettre la création d'une startup pour initier des essais cliniques chez l'Homme. Par ailleurs, le MED0092 est une molécule prometteuse, pour un développement rapide de futur médicament, et son efficacité peut être appliquée à d'autres maladies neurodégénératives impliquant une altération des MAM.

Au cours de ce projet, nous avons donc montré que : (1) les fibroblastes de patients, les poissons zèbres *wfs1a*^{C825X}, *wfs1b*^{W493X} et *wfs1ab*^{KO} et les souris *Wfs1*^{ΔExon8} développent des déficits comportementaux et cellulaires, (2) la surexpression de NCS1 chez les larves *wfs1ab*^{KO} a permis de restaurer les déficits comportementaux et cellulaires induits par la mutation de *wfs1*, (3) l'activation de S1R, par un agoniste ou par surexpression de son ARNm, chez les fibroblastes de patients, les poissons *wfs1ab*^{KO} et les souris *Wfs1*^{ΔExon8} permettait de renverser les altérations comportementales et cellulaires, et (4) à partir de la réponse motrice des larves *wfs1ab*^{KO}, un criblage phénotypique a permis d'identifier 8 hits restaurant le déficit locomoteur des larves mutantes, dont le MED0092, une molécule repositionnable, qui est un modulateur positif de S1R possédant des effets bénéfiques sur les déficits comportementaux de deux modèles murins, le SW et la MA.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abatematteo, F.S., Mosier, P.D., Niso, M., Brunetti, L., Berardi, F., Liodice, F., Contino, M., Delprat, B., Maurice, T., Laghezza, A., et al. (2022). Development of novel phenoxyalkylpiperidines as high-affinity Sigma-1 (σ 1) receptor ligands with potent anti-amnesic effect. *Eur J Med Chem* 228, 114038. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.114038>.
- Abdullah, C.S., Alam, S., Aishwarya, R., Miriyala, S., Panchatcharam, M., Bhuiyan, M.A.N., Peretik, J.M., Orr, A.W., James, J., Osinska, H., et al. (2018). Cardiac Dysfunction in the Sigma 1 Receptor Knockout Mouse Associated With Impaired Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics. *J Am Heart Assoc* 7, e009775. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.009775>.
- Aboseif, S., Gasparini, M., Schmidt, R., and Tanagho, E. (1993). Wolfram's (DIDMOAD) syndrome and its urological manifestation. *Br J Urol* 72, 106–111. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410x.1993.tb06469.x>.
- Abreu, D., and Urano, F. (2019). Current Landscape of Treatments for Wolfram Syndrome. *Trends in Pharmacological Sciences* 40, 711–714. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.07.011>.
- Abreu, D., Asada, R., Revilla, J.M.P., Lavagnino, Z., Kries, K., Piston, D.W., and Urano, F. (2020). Wolfram syndrome 1 gene regulates pathways maintaining beta cell health and survival. *Lab Invest* 100, 849–862. <https://doi.org/10.1038/s41374-020-0408-5>.
- Abreu, D., Stone, S.I., Pearson, T.S., Bucelli, R.C., Simpson, A.N., Hurst, S., Brown, C.M., Kries, K., Onwumere, C., Gu, H., et al. (2021). A phase Ib/IIa clinical trial of dantrolene sodium in patients with Wolfram syndrome. *JCI Insight* 6, 145188. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.145188>.
- Acheson, A., Conover, J.C., Fandl, J.P., DeChiara, T.M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S.P., Yancopoulos, G.D., and Lindsay, R.M. (1995). A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374, 450–453. <https://doi.org/10.1038/374450a0>.
- Ahrén, B., Simonsson, E., Scheurink, A.J.W., Mulder, H., Myrsén, U., and Sundler, F. (1997). Dissociated insulinotropic sensitivity to glucose and carbachol in high-fat diet—induced insulin resistance in C57BL/6J mice. *Metabolism* 46, 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(97\)90175-X](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(97)90175-X).
- Ait-El-Mkadem, S., Dayem-Quere, M., Gusic, M., Chaussonot, A., Bannwarth, S., François, B., Genin, E.C., Fragaki, K., Volker-Touw, C.L.M., Vasnier, C., et al. (2017). Mutations in MDH2, Encoding a Krebs Cycle Enzyme, Cause Early-Onset Severe Encephalopathy. *Am J Hum Genet* 100, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.11.014>.
- Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, M.P., Baricordi, C., Dionisio, F., Calabria, A., Giannelli, S., Castiello, M.C., et al. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 341, 1233151. <https://doi.org/10.1126/science.1233151>.

Akiyama, M., Hatanaka, M., Ohta, Y., Ueda, K., Yanai, A., Uehara, Y., Tanabe, K., Tsuru, M., Miyazaki, M., Saeki, S., et al. (2009). Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in *Wfs1* knockout mice. *Diabetologia* 52, 653–663. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1270-6>.

Alicanoğlu, R., Canbakan, B., Yildiz, N., Arikan, E., Kundur, H., Bahtiyar, K., and Sayali, E. (1994). [DIDMOAD syndrome. *Wien Med Wochenschr* 144, 78–81. .

Allahtavakoli, M., and Jarrott, B. (2011). Sigma-1 receptor ligand PRE-084 reduced infarct volume, neurological deficits, pro-inflammatory cytokines and enhanced anti-inflammatory cytokines after embolic stroke in rats. *Brain Res Bull* 85, 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.03.019>.

Almanza, A., Carlesso, A., Chinthra, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., et al. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J* 286, 241–278. <https://doi.org/10.1111/febs.14608>.

Alonso, G., Phan, V., Guillemain, I., Saunier, M., Legrand, A., Anoa, M., and Maurice, T. (2000). Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 97, 155–170. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00014-2).

Al-Sheyab, M., Jarrah, N., Younis, E., Shennak, M.M., Hadidi, A., Awidi, A., El-Shanti, H., and Ajlouni, K. (2001). Bleeding tendency in Wolfram syndrome: a newly identified feature with phenotype genotype correlation. *Eur J Pediatr* 160, 243–246. <https://doi.org/10.1007/s004310000704>.

Al-Till, M., Jarrah, N.S., and Ajlouni, K.M. (2002). Ophthalmologic Findings in Fifteen Patients with Wolfram Syndrome. *European Journal of Ophthalmology* 12, 84–88. <https://doi.org/10.1177/112067210201200202>.

Ames, J.B., Hendricks, K.B., Strahl, T., Huttner, I.G., Hamasaki, N., and Thorner, J. (2000). Structure and Calcium-Binding Properties of Frq1, a Novel Calcium Sensor in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 39, 12149–12161. <https://doi.org/10.1021/bi0012890>.

Amr, S., Heisey, C., Zhang, M., Xia, X.-J., Shows, K.H., Ajlouni, K., Pandya, A., Satin, L.S., El-Shanti, H., and Shiang, R. (2007). A homozygous mutation in a novel zinc-finger protein, ERIS, is responsible for Wolfram syndrome 2. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 673–683. <https://doi.org/10.1086/520961>.

Angaut-Petit, D., Ferrús, A., and Faille, L. (1993). Plasticity of motor nerve terminals in *Drosophila* T(X, Y) V7 mutant: Effect of deregulation of the novel calcium-binding protein frequenin. *Neuroscience Letters* 153, 227–231. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90328-I](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90328-I).

Angebault, C., Fauconnier, J., Patergnani, S., Rieusset, J., Danese, A., Affortit, C.A., Jagodzinska, J., Mégy, C., Quiles, M., Cazevieille, C., et al. (2018). ER-mitochondria cross-talk is regulated by the Ca²⁺ sensor NCS1 and is impaired in Wolfram syndrome. *Sci Signal* 11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aag1380>.

Antonini, V., Prezzavento, O., Coradazzi, M., Marrazzo, A., Ronsisvalle, S., Arena, E., and Leanza, G. (2009). Anti-amnesic properties of (+/-)-PPCC, a novel sigma receptor ligand, on cognitive dysfunction induced by selective cholinergic lesion in rats. *J*

Neurochem 109, 744–754. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06000.x>.

Area-Gomez, E., del Carmen Lara Castillo, M., Tambini, M.D., Guardia-Laguarta, C., de Groof, A.J.C., Madra, M., Ikenouchi, J., Umeda, M., Bird, T.D., Sturley, S.L., et al. (2012). Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J* 31, 4106–4123. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.202>.

Ariyasu, D., Yoshida, H., and Hasegawa, Y. (2017). Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Endocrine Disorders. *Int J Mol Sci* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18020382>.

Arruda, A.P., Pers, B.M., Parlakgöl, G., Güney, E., Inouye, K., and Hotamisligil, G.S. (2014). Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum–mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med* 20, 1427–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.3735>.

Averill, S., Robson, L.G., Jeromin, A., and Priestley, J.V. (2004). Neuronal calcium sensor-1 is expressed by dorsal root ganglion cells, is axonally transported to central and peripheral terminals, and is concentrated at nodes. *Neuroscience* 123, 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.09.031>.

Avery, V.M., Bashyam, S., Burrows, J.N., Duffy, S., Papadatos, G., Puthukkuti, S., Sambandan, Y., Singh, S., Spangenberg, T., Waterson, D., et al. (2014). Screening and hit evaluation of a chemical library against blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 13, 190. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-190>.

Aydar, E., Palmer, C.P., Klyachko, V.A., and Jackson, M.B. (2002). The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron* 34, 399–410. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00677-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00677-3).

Aydar, E., Palmer, C.P., and Djamgoz, M.B.A. (2004). Sigma Receptors and Cancer: Possible Involvement of Ion Channels. *Cancer Research* 64, 5029–5035. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2329>.

B

Bachar-Wikstrom, E., Wikstrom, J.D., Ariav, Y., Tirosh, B., Kaiser, N., Cerasi, E., and Leibowitz, G. (2013). Stimulation of Autophagy Improves Endoplasmic Reticulum Stress–Induced Diabetes. *Diabetes* 62, 1227–1237. <https://doi.org/10.2337/db12-1474>.

Bai, Q., and Burton, E.A. (2011). Zebrafish models of Tauopathy. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.09.004>.

Balasuriya, D., Stewart, A.P., Crottès, D., Borgese, F., Soriani, O., and Edwardson, J.M. (2012). The Sigma-1 Receptor Binds to the Nav1.5 Voltage-gated Na⁺ Channel with 4-Fold Symmetry*. *Journal of Biological Chemistry* 287, 37021–37029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.382077>.

Bandmann, O., and Burton, E.A. (2010). Genetic zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Dis.* 40, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.017>.

Barrett, T.G., and Bundey, S.E. (1997). Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *J Med Genet* 34, 838–841. <https://doi.org/10.1136/jmg.34.10.838>.

Barrett, T.G., Bunday, S.E., and Macleod, A.F. (1995). Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* 346, 1458–1463. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)92473-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)92473-6).

Barrientos, A., Volpini, V., Casademont, J., Genís, D., Manzanares, J.M., Ferrer, I., Corral, J., Cardellach, F., Urbano-Márquez, A., Estivill, X., et al. (1996a). A nuclear defect in the 4p16 region predisposes to multiple mitochondrial DNA deletions in families with Wolfram syndrome. *J. Clin. Invest.* 97, 1570–1576. <https://doi.org/10.1172/JCI118581>.

Barrientos, A., Casademont, J., Saiz, A., Cardellach, F., Volpini, V., Solans, A., Tolosa, E., Urbano-Mairquez, A., and Estivill, X. (1996b). Autosomal Recessive Wolfram Syndrome Associated with an 8.5-kb mtDNA Single Deletion. *Am. J. Hum. Genet.* 8. .

Basnet, R.M., Zizioli, D., Taweedet, S., Finazzi, D., and Memo, M. (2019). Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. *Biomedicines* 7. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7010023>.

Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., et al. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 341–345. <https://doi.org/10.1038/nature10234>.

Baz, P., Azar, S.T., Medlej, R., Bejjani, R., Halabi, G., and Salti, I. (1999). Role of early funduscopy for diagnosis of Wolfram syndrome in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 22, 1376–1378. <https://doi.org/10.2337/diacare.22.8.1376a>.

Beck, J.C., Gilland, E., Tank, D.W., and Baker, R. (2004). Quantifying the ontogeny of optokinetic and vestibuloocular behaviors in zebrafish, medaka, and goldfish. *J Neurophysiol* 92, 3546–3561. <https://doi.org/10.1152/jn.00311.2004>.

Bekir, N.A., Güngör, K., and Güran, Ş. (2000). A DIDMOAD syndrome family with juvenile glaucoma and myopia findings. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 78, 480–482. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0420.2000.078004480.x>.

Benbow, J.H., Mann, T., Keeler, C., Fan, C., Hodsdon, M.E., Lolis, E., DeGray, B., and Ehrlich, B.E. (2012). Inhibition of Paclitaxel-induced Decreases in Calcium Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 287, 37907–37916. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.385070>.

Benkert, J., Hess, S., Roy, S., Beccano-Kelly, D., Wiederspohn, N., Duda, J., Simons, C., Patil, K., Gaifullina, A., Mannel, N., et al. (2019). Cav2.3 channels contribute to dopaminergic neuron loss in a model of Parkinson’s disease. *Nat Commun* 10, 5094. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12834-x>.

Ben-Shachar, D., Zuk, R., Gazawi, H., and Ljubuncic, P. (2004). Dopamine toxicity involves mitochondrial complex I inhibition: implications to dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Biochem Pharmacol* 67, 1965–1974. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.02.015>.

Berardi, F., Ferorelli, S., Abate, C., Pedone, M.P., Colabufo, N.A., Contino, M., and Perrone, R. (2005). Methyl substitution on the piperidine ring of N-[omega-(6-methoxynaphthalen-1-yl)alkyl] derivatives as a probe for selective binding and activity at the sigma(1) receptor. *J Med Chem* 48, 8237–8244. <https://doi.org/10.1021/jm050654o>.

- Berg, E.M., Björnfors, E.R., Pallucchi, I., Picton, L.D., and El Manira, A. (2018). Principles Governing Locomotion in Vertebrates: Lessons From Zebrafish. *Front Neural Circuits* 12, 73. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00073>.
- Bernard-Marissal, N., Médard, J.-J., Azzedine, H., and Chrast, R. (2015). Dysfunction in endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk underlies SIGMAR1 loss of function mediated motor neuron degeneration. *Brain* 138, 875–890. <https://doi.org/10.1093/brain/awv008>.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>.
- Bertolino, M., and Llinas, R.R. (1992). The Central Role of Voltage-Activated and Receptor-Operated Calcium Channels in Neuronal Cells. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 32, 399–421. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.32.040192.002151>.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326–332. <https://doi.org/10.1038/35014014>.
- Betz, C., Stracka, D., Prescianotto-Baschong, C., Frieden, M., Demaux, N., and Hall, M.N. (2013). mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 12526–12534. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302455110>.
- Bever, M.M., and Fekete, D.M. (2002). Atlas of the developing inner ear in zebrafish. *Dev. Dyn.* 223, 536–543. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10062>.
- Bezprozvanny, I., and Hayden, M.R. (2004). Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 1310–1317. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.035>.
- Bezprozvanny, I., and Klockgether, T. (2009). Therapeutic prospects for spinocerebellar ataxia type 2 and 3. *Drugs Future* 34. <https://doi.org/10.1358/dof.2009.034.12.1443434>.
- Bhuiyan, M.S., and Fukunaga, K. (2009). Stimulation of sigma-1 receptor signaling by dehydroepiandrosterone ameliorates pressure overload-induced hypertrophy and dysfunctions in ovariectomized rats. *Expert Opin Ther Targets* 13, 1253–1265. <https://doi.org/10.1517/14728220903264064>.
- Biffi, A., Montini, E., Lorioli, L., Cesani, M., Fumagalli, F., Plati, T., Baldoli, C., Martino, S., Calabria, A., Canale, S., et al. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* 341, 1233–1238. <https://doi.org/10.1126/science.1233158>.
- Blasi, C., Pierelli, F., Rispoli, E., Saponara, M., Vingolo, E., and Andreani, D. (1986). Wolfram's Syndrome: A Clinical, Diagnostic, and Interpretative Contribution. *Diabetes Care* 9, 521–528. <https://doi.org/10.2337/diacare.9.5.521>.
- Blasiolo, B., Kabbani, N., Boehmler, W., Thisse, B., Thisse, C., Canfield, V., and Levenson, R. (2005). Neuronal calcium sensor-1 gene ncs-1a is essential for semicircular canal formation in zebrafish inner ear. *J Neurobiol* 64, 285–297. <https://doi.org/10.1002/neu.20138>.
- Boehning, D., Patterson, R.L., Sedaghat, L., Glebova, N.O., Kurosaki, T., and Snyder,

- S.H. (2003). Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5, 1051–1061. <https://doi.org/10.1038/ncb1063>.
- Bol'shakova, A.V., Kraskovskaya, N.A., Gainullina, A.N., Kukanova, E.O., Vlasova, O.L., and Bezprozvanny, I.B. (2017). Neuroprotective Effect of σ_1 -Receptors on the Cell Model of Huntington's Disease. *Bull Exp Biol Med* 164, 252–258. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3968-7>.
- Bononi, A., Bonora, M., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Giorgi, C., Pandolfi, P.P., and Pinton, P. (2013). Identification of PTEN at the ER and MAMs and its regulation of Ca²⁺ signaling and apoptosis in a protein phosphatase-dependent manner. *Cell Death Differ* 20, 1631–1643. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.77>.
- Borgna-Pignatti, C., Marradi, P., Pinelli, L., Monetti, N., and Patrini, C. (1989). Thiamine-responsive anemia in DIDMOAD syndrome. *The Journal of Pediatrics* 114, 405–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(89\)80558-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(89)80558-X).
- Bourne, Y., Dannenberg, J., Pollmann, V., Marchot, P., and Pongs, O. (2001). Immunocytochemical Localization and Crystal Structure of Human Frequentin (Neuronal Calcium Sensor 1). *Journal of Biological Chemistry* 276, 11949–11955. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009373200>.
- Boutzios, G., Livadas, S., Marinakis, E., Opie, N., Economou, F., and Diamanti-Kandarakis, E. (2011). Endocrine and metabolic aspects of the Wolfram syndrome. *Endocrine* 40, 10–13. <https://doi.org/10.1007/s12020-011-9505-y>.
- Braakman, I., and Bulleid, N.J. (2011). Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 80, 71–99. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062209-093836>.
- Brailoiu, G.C., Deliu, E., Console-Bram, L.M., Soboloff, J., Abood, M.E., Unterwald, E.M., and Brailoiu, E. (2016). Cocaine inhibits store-operated Ca²⁺ entry in brain microvascular endothelial cells: critical role for sigma-1 receptors. *Biochemical Journal* 473, 1–5. <https://doi.org/10.1042/BJ20150934>.
- Bramhall, N.F., Kallman, J.C., Verrall, A.M., and Street, V.A. (2008). A novel WFS1 mutation in a family with dominant low frequency sensorineural hearing loss with normal VEMP and EcochG findings. *BMC Med Genet* 9, 48. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-9-48>.
- Braunewell, K.-H., and Gundelfinger, E.D. (1999). Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell and Tissue Research* 295, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s004410051207>.
- Bretz, G.W., Baghdassarian, A., Graber, J.D., Zacherle, B.J., Norum, R.A., and Blizzard, R.M. (1970). Coexistence of diabetes mellitus and insipidus and optic atrophy in two male siblings. *The American Journal of Medicine* 48, 398–403. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(70\)90071-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(70)90071-9).
- Bruno, T., De Nicola, F., Iezzi, S., Lecis, D., D'Angelo, C., Di Padova, M., Corbi, N., Dimiziani, L., Zannini, L., Jekimovs, C., et al. (2006). Che-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint. *Cancer Cell* 10, 473–486. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.012>.
- Bruno, T., Iezzi, S., De Nicola, F., Di Padova, M., Desantis, A., Scarsella, M., Di Certo,

M.G., Leonetti, C., Floridi, A., Passananti, C., et al. (2008). Che-1 activates XIAP expression in response to DNA damage. *Cell Death Differ.* 15, 515–520. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402284>.

Bucolo, C., Campana, G., Di Toro, R., Cacciaguerra, S., and Spampinato, S. (1999). Sigma1 recognition sites in rabbit iris-ciliary body: topical sigma1-site agonists lower intraocular pressure. *J Pharmacol Exp Ther* 289, 1362–1369. .

Bunday, S., Poulton, K., Whitwell, H., Curtis, E., Brown, I.A.R., and Fielder, A.R. (1992). Mitochondrial abnormalities in the DIDMOAD syndrome. *J Inherit Metab Dis* 15, 315–319. <https://doi.org/10.1007/BF02435965>.

Burgoyne, R.D., and Haynes, L.P. (2012). Understanding the physiological roles of the neuronal calcium sensor proteins. *Molecular Brain* 5, 2. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-2>.

Burgoyne, R.D., and Weiss, J.L. (2001). The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem. J.* 353, 1–12. .

C

Cagalinec, M., Liiv, M., Hodurova, Z., Hickey, M.A., Vaarmann, A., Mandel, M., Zeb, A., Choubey, V., Kuum, M., Safiulina, D., et al. (2016). Role of Mitochondrial Dynamics in Neuronal Development: Mechanism for Wolfram Syndrome. *PLoS Biol* 14, e1002511. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002511>.

Caicedo, A., Zambrano, K., Sanon, S., and Gavilanes, A.W.D. (2021). Extracellular mitochondria in the cerebrospinal fluid (CSF): Potential types and key roles in central nervous system (CNS) physiology and pathogenesis. *Mitochondrion* 58, 255–269. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.02.006>.

Cairns, G., Burté, F., Price, R., O'Connor, E., Toms, M., Mishra, R., Moosajee, M., Pyle, A., Sayer, J.A., and Yu-Wai-Man, P. (2021). A mutant wfs1 zebrafish model of Wolfram syndrome manifesting visual dysfunction and developmental delay. *Sci Rep* 11, 20491. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99781-0>.

Cano, A., Molines, L., Valéro, R., Simonin, G., Paquis-Flucklinger, V., Vialettes, B., and the French Group of Wolfram Syndrome (2007). Microvascular Diabetes Complications in Wolfram Syndrome (Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, and Deafness [DIDMOAD]). *Diabetes Care* 30, 2327–2330. <https://doi.org/10.2337/dc07-0380>.

Carreras-Sureda, A., Pihán, P., and Hetz, C. (2017). The Unfolded Protein Response: At the Intersection between Endoplasmic Reticulum Function and Mitochondrial Bioenergetics. *Front Oncol* 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00055>.

Carson, M.J. (1977). Simultaneous Occurrence of Diabetes Mellitus, Diabetes Insipidus, and Optic Atrophy in a Brother and Sister. *Arch Pediatr Adolesc Med* 131, 1382. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1977.02120250064010>.

Cattaneo, M., La Sala, L., Rondinelli, M., Errichiello, E., Zuffardi, O., Puca, A.A., Genovese, S., and Ceriello, A. (2017). A donor splice site mutation in C1SD2 generates multiple truncated, non-functional isoforms in Wolfram syndrome type 2 patients. *BMC Med Genet* 18, 147. <https://doi.org/10.1186/s12881-017-0508-2>.

- Cerqua, C., Anesti, V., Pyakurel, A., Liu, D., Naon, D., Wiche, G., Baffa, R., Dimmer, K.S., and Scorrano, L. (2010). Trichoplein/mitostatin regulates endoplasmic reticulum–mitochondria juxtaposition. *EMBO Rep* 11, 854–860. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.151>.
- Chacón-Camacho, O., Arce-Gonzalez, R., Granillo-Alvarez, M., Flores-Limas, S., Ramírez, M., and Zenteno, J.C. (2013). Expansion of the Clinical Ocular Spectrum of Wolfram Syndrome in a Family Carrying a Novel *WFS1* Gene Deletion. *Ophthalmic Genetics* 34, 243–248. <https://doi.org/10.3109/13816810.2012.755631>.
- Chaki, S., Nakazato, A., Kennis, L., Nakamura, M., Mackie, C., Sugiura, M., Vinken, P., Ashton, D., Langlois, X., and Steckler, T. (2004). Anxiolytic- and antidepressant-like profile of a new CRF1 receptor antagonist, R278995/CRA0450. *Eur J Pharmacol* 485, 145–158. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.11.032>.
- Chami, M., Linda Benali, N., Bréchet, C., and Paterlini-Bréchet, P. (2007). Impact de la signalisation calcique dans la carcinogenèse hépatique. *Med Sci (Paris)* 23, 133–135. <https://doi.org/10.1051/medsci/2007232133>.
- Chausseot, A., Bannwarth, S., Rouzier, C., Vialettes, B., Mkaem, S.A.E., Chabrol, B., Cano, A., Labauge, P., and Paquis-Flucklinger, V. (2011). Neurologic features and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Annals of Neurology* 69, 501–508. <https://doi.org/10.1002/ana.22160>.
- Chausseot, A., Rouzier, C., Quere, M., Plutino, M., Ait-El-Mkaem, S., Bannwarth, S., Barth, M., Dollfus, H., Charles, P., Nicolino, M., et al. (2015). Mutation update and uncommon phenotypes in a French cohort of 96 patients with *WFS1*-related disorders. *Clinical Genetics* 87, 430–439. <https://doi.org/10.1111/cge.12437>.
- Chazin, W.J. (2011). Relating Form and Function of EF-hand Calcium Binding Proteins. *Acc Chem Res* 44, 171–179. <https://doi.org/10.1021/ar100110d>.
- Chen, C., Yu, L., Zhang, P., Jiang, J., Zhang, Y., Chen, X., Wu, Q., Wu, Q., and Zhao, S. (2002). Human neuronal calcium sensor-1 shows the highest expression level in cerebral cortex. *Neuroscience Letters* 319, 67–70. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02555-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02555-1).
- Chen, X., Wu, J., Lvovskaya, S., Herndon, E., Supnet, C., and Bezprozvanny, I. (2011). Dantrolene is neuroprotective in Huntington’s disease transgenic mouse model. *Mol Neurodegener* 6, 81. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-81>.
- Chen, Y.-F., Kao, C.-H., Kirby, R., and Tsai, T.-F. (2009a). *Cisd2* mediates mitochondrial integrity and life span in mammals. *Autophagy* 5, 1043–1045. <https://doi.org/10.4161/auto.5.7.9351>.
- Chen, Y.-F., Kao, C.-H., Chen, Y.-T., Wang, C.-H., Wu, C.-Y., Tsai, C.-Y., Liu, F.-C., Yang, C.-W., Wei, Y.-H., Hsu, M.-T., et al. (2009b). *Cisd2* deficiency drives premature aging and causes mitochondria-mediated defects in mice. *Genes Dev* 23, 1183–1194. <https://doi.org/10.1101/gad.1779509>.
- Chen, Y.-F., Wu, C.-Y., Kirby, R., Kao, C.-H., and Tsai, T.-F. (2010). A role for the *CISD2* gene in lifespan control and human disease. *Ann N Y Acad Sci* 1201, 58–64. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05619.x>.
- Chen, Y.-F., Chou, T.-Y., Lin, I.-H., Chen, C.-G., Kao, C.-H., Huang, G.-J., Chen, L.-K., Wang, P.-N., Lin, C.-P., and Tsai, T.-F. (2020). Upregulation of *Cisd2* attenuates

Alzheimer's-related neuronal loss in mice. *The Journal of Pathology* 250, 299–311. <https://doi.org/10.1002/path.5374>.

Chevallier, N., Keller, E., and Maurice, T. (2011). Behavioural phenotyping of knockout mice for the sigma-1 (σ_1) chaperone protein revealed gender-related anxiety, depressive-like and memory alterations. *J Psychopharmacol* 25, 960–975. <https://doi.org/10.1177/0269881111400648>.

Chien, C.C., and Pasternak, G.W. (1994). Selective antagonism of opioid analgesia by a sigma system. *J Pharmacol Exp Ther* 271, 1583–1590. .

Chien, C.-C., and Pasternak, G.W. (1995). Sigma antagonists potentiate opioid analgesia in rats. *Neuroscience Letters* 190, 137–139. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11504-P](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11504-P).

Chu, U.B., and Ruoho, A.E. (2016). Biochemical Pharmacology of the Sigma-1 Receptor. *Mol Pharmacol* 89, 142–153. <https://doi.org/10.1124/mol.115.101170>.

Chu, P., Staff, W.G., Morris, J.A., and Polak, J.M. (1986). DIDMOAD syndrome with megacystis and megaureter. *Postgrad Med J* 62, 859–863. .

Clapham, D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell* 131, 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>.

Coelho, D.S., and Domingos, P.M. (2014). Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay. *Front Genet* 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00076>.

Collier, D.A., Barrett, T.G., Curtis, D., Macleod, A., Arranz, M.J., Maassen, J.A., and Bunday, S. (1996). Linkage of Wolfram Syndrome to Chromosome 4p1 6.1 and Evidence for Heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* 9. .

Colosimo, A., Guida, V., Rigoli, L., Di Bella, C., De Luca, A., Briuglia, S., Stuppia, L., Carmelo Salpietro, D., and Dallapiccola, B. (2003). Molecular detection of novel WFS1 mutations in patients with Wolfram syndrome by a DHPLC-based assay. *Human Mutation* 21, 622–629. <https://doi.org/10.1002/humu.10215>.

Cooper, I., Ryneerson, E., Bailey, A., and MacCarty, C. (1950). The relation of spinal cord diseases to gynecomastia and testicular atrophy. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 12, 320–326. .

Costa, M. do C., Luna-Cancalon, K., Fischer, S., Ashraf, N.S., Ouyang, M., Dharia, R.M., Martin-Fishman, L., Yang, Y., Shakkottai, V.G., Davidson, B.L., et al. (2013). Toward RNAi therapy for the polyglutamine disease Machado-Joseph disease. *Mol Ther* 21, 1898–1908. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.144>.

Cox, J.A., Durussel, I., Comte, M., Nef, S., Nef, P., Lenz, S.E., and Gundelfinger, E.D. (1994). Cation binding and conformational changes in VILIP and NCS-1, two neuron-specific calcium-binding proteins. *J Biol Chem* 269, 32807–32813. .

Cremers, C.W., Wijdeveld, P.G., and Pinckers, A.J. (1977). Juvenile diabetes mellitus, optic atrophy, hearing loss, diabetes insipidus, atonia of the urinary tract and bladder, and other abnormalities (Wolfram syndrome). A review of 88 cases from the literature with personal observations on 3 new patients. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1977.tb15069.x>.

Crouzier, L., Couly, S., Roques, C., Peter, C., Belkhiter, R., Arguel Jacquemin, M., Bonetto, A., Delprat, B., and Maurice, T. (2020). Sigma-1 (σ_1) receptor activity is necessary for physiological brain plasticity in mice. *European*

<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2020.08.010>.

Crouzier, L., Richard, E.M., Sourbron, J., Lagae, L., Maurice, T., and Delprat, B. (2021). Use of Zebrafish Models to Boost Research in Rare Genetic Diseases. *Int J Mol Sci* 22, 13356. <https://doi.org/10.3390/ijms222413356>.

Crouzier, L., Danese, A., Yasui, Y., Richard, E.M., Liévens, J.-C., Patergnani, S., Couly, S., Diez, C., Denus, M., Cubedo, N., et al. (2022a). Activation of the sigma-1 receptor chaperone alleviates symptoms of Wolfram syndrome in preclinical models. *Science Translational Medicine* 14, eabh3763. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abh3763>.

Crouzier, L., Richard, E.M., Diez, C., Alzaem, H., Denus, M., Cubedo, N., Delaunay, T., Glendenning, E., Baxendale, S., Liévens, J.-C., et al. (2022b). Morphological, behavioral and cellular analyses revealed different phenotypes in Wolfram syndrome *wfs1a* and *wfs1b* zebrafish mutant lines. *Hum Mol Genet* ddac065. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac065>.

Crouzier, L., Richard, E.M., Diez, C., Denus, M., Peyrel, A., Alzaem, H., Cubedo, N., Delaunay, T., Maurice, T., and Delprat, B. (en revision). NCS1 overexpression restored mitochondrial activity and behavioral alterations in a novel zebrafish model of Wolfram syndrome. *Molecular Therapy*.

Cryns, K., Thys, S., Van Laer, L., Oka, Y., Pfister, M., Van Nassauw, L., Smith, R.J.H., Timmermans, J.-P., and Van Camp, G. (2003a). The WFS1 gene, responsible for low frequency sensorineural hearing loss and Wolfram syndrome, is expressed in a variety of inner ear cells. *Histochem Cell Biol* 119, 247–256. <https://doi.org/10.1007/s00418-003-0495-6>.

Cryns, K., Sivakumaran, T.A., Van den Ouweland, J.M.W., Pennings, R.J.E., Cremers, C.W.R.J., Flothmann, K., Young, T.-L., Smith, R.J.H., Lesperance, M.M., and Camp, G.V. (2003b). Mutational spectrum of the WFS1 gene in Wolfram syndrome, nonsyndromic hearing impairment, diabetes mellitus, and psychiatric disease. *Hum. Mutat.* 22, 275–287. <https://doi.org/10.1002/humu.10258>.

Cui, J., Sim, T., Gong, Z., and Shen, H.-M. (2012). Generation of transgenic zebrafish with liver-specific expression of EGFP-Lc3: A new in vivo model for investigation of liver autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 422, 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.145>.

D

Dahl, J.P., Jepson, C., Levenson, R., Wileyto, E.P., Patterson, F., Berrettini, W.H., and Lerman, C. (2006). Interaction between variation in the D2 dopamine receptor (DRD2) and the neuronal calcium sensor-1 (FREQ) genes in predicting response to nicotine replacement therapy for tobacco dependence. *Pharmacogenomics J* 6, 194–199. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500358>.

Danese, A., Patergnani, S., Bonora, M., Wieckowski, M.R., Previati, M., Giorgi, C., and Pinton, P. (2017). Calcium regulates cell death in cancer: Roles of the mitochondria and mitochondria-associated membranes (MAMs). *Biochim Biophys Acta Bioenerg*

1858, 615–627. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2017.01.003>.

Danielpur, L., Sohn, Y.-S., Karmi, O., Fogel, C., Zinger, A., Abu-Libdeh, A., Israeli, T., Riahi, Y., Pappo, O., Birk, R., et al. (2016). GLP-1-RA Corrects Mitochondrial Labile Iron Accumulation and Improves β -Cell Function in Type 2 Wolfram Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* *101*, 3592–3599. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-2240>.

Darash-Yahana, M., Pozniak, Y., Lu, M., Sohn, Y.-S., Karmi, O., Tamir, S., Bai, F., Song, L., Jennings, P.A., Pikarsky, E., et al. (2016). Breast cancer tumorigenicity is dependent on high expression levels of NAF-1 and the lability of its Fe-S clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 10890–10895. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612736113>.

Das, S., and Rajanikant, G.K. (2014). Huntington disease: can a zebrafish trail leave more than a ripple? *Neurosci Biobehav Rev* *45*, 258–261. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.06.013>.

Dason, J.S., Romero-Pozuelo, J., Marin, L., Iyengar, B.G., Klose, M.K., Ferrús, A., and Atwood, H.L. (2009). Frequentin/NCS-1 and the Ca²⁺-channel α 1-subunit co-regulate synaptic transmission and nerve-terminal growth. *Journal of Cell Science* *122*, 4109–4121. <https://doi.org/10.1242/jcs.055095>.

Dason, J.S., Romero-Pozuelo, J., Atwood, H.L., and Ferrús, A. (2012). Multiple roles for frequentin/NCS-1 in synaptic function and development. *Mol Neurobiol* *45*, 388–402. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8250-4>.

De Castro, E., Nef, S., Fiumelli, H., Lenz, S.E., Kawamura, S., and Nef, P. (1995). Regulation of rhodopsin phosphorylation by a family of neuronal calcium sensors. *Biochem Biophys Res Commun* *216*, 133–140. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2601>.

De Falco, M., Manente, L., Lucariello, A., Baldi, G., Fiore, P., Laforgia, V., Baldi, A., Iannaccone, A., and De Luca, A. (2012). Localization and distribution of wolframin in human tissues. *Front Biosci (Elite Ed)* *4*, 1986–1998. <https://doi.org/10.2741/519>.

De Franco, E., Flanagan, S.E., Yagi, T., Abreu, D., Mahadevan, J., Johnson, M.B., Jones, G., Acosta, F., Mulaudzi, M., Lek, N., et al. (2017). Dominant ER Stress-Inducing WFS1 Mutations Underlie a Genetic Syndrome of Neonatal/Infancy-Onset Diabetes, Congenital Sensorineural Deafness, and Congenital Cataracts. *Diabetes* *66*, 2044–2053. <https://doi.org/10.2337/db16-1296>.

De Lawter, D.E. (1949). Coexistence of diabetes insipidus and diabetes mellitus. *Med Ann DC* *18*, 398. .

De Pablo-Fernandez, E., Tur, C., Revesz, T., Lees, A.J., Holton, J.L., and Warner, T.T. (2017). Association of Autonomic Dysfunction With Disease Progression and Survival in Parkinson Disease. *JAMA Neurol* *74*, 970–976. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.1125>.

De Raad, S., Comte, M., Nef, P., Lenz, S.E., Gundelfinger, E.D., and Cox, J.A. (1995). Distribution pattern of three neural calcium-binding proteins (NCS-1, VILIP and recoverin) in chicken, bovine and rat retina. *Histochem J* *27*, 524–535. <https://doi.org/10.1007/BF02388752>.

De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., and Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* *476*, 336–340. <https://doi.org/10.1038/nature10230>.

DelloRusso, C., Scott, J.M., Hartigan-O'Connor, D., Salvatori, G., Barjot, C., Robinson, A.S., Crawford, R.W., Brooks, S.V., and Chamberlain, J.S. (2002). Functional correction of adult mdx mouse muscle using gutted adenoviral vectors expressing full-length dystrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12979–12984. <https://doi.org/10.1073/pnas.202300099>.

Delprat, B., Maurice, T., and Delettre, C. (2018). Wolfram syndrome: MAMs' connection? *Cell Death & Disease* 9. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0406-3>.

Delprat, B., Rieusset, J., and Delettre, C. (2019). Defective Endoplasmic Reticulum–Mitochondria Connection Is a Hallmark of Wolfram Syndrome. *Contact* 2, 251525641984740. <https://doi.org/10.1177/2515256419847407>.

Delprat, B., Crouzier, L., Su, T.-P., and Maurice, T. (2020). At the Crossing of ER Stress and MAMs: A Key Role of Sigma-1 Receptor? In *Calcium Signaling*, Md.S. Islam, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 699–718.

Dhalla, M.S., Desai, U.R., and Zuckerbrod, D.S. (2006). Pigmentary maculopathy in a patient with Wolfram syndrome. *Canadian Journal of Ophthalmology* 41, 38–40. [https://doi.org/10.1016/S0008-4182\(06\)80064-5](https://doi.org/10.1016/S0008-4182(06)80064-5).

Di, T., Zhang, S., Hong, J., Zhang, T., and Chen, L. (2017). Hyperactivity of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Due to Dysfunction of the Hypothalamic Glucocorticoid Receptor in Sigma-1 Receptor Knockout Mice. *Front Mol Neurosci* 10, 287. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00287>.

Díaz, J.L., Zamanillo, D., Corbera, J., Baeyens, J.M., Maldonado, R., Pericàs, M.A., Vela, J.M., and Torrens, A. (2009). Selective sigma-1 (sigma1) receptor antagonists: emerging target for the treatment of neuropathic pain. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 9, 172–183. <https://doi.org/10.2174/1871524910909030172>.

Díaz, J.L., Cuberes, R., Berrocal, J., Contijoch, M., Christmann, U., Fernández, A., Port, A., Holenz, J., Buschmann, H., Laggner, C., et al. (2012). Synthesis and biological evaluation of the 1-arylpyrazole class of $\sigma(1)$ receptor antagonists: identification of 4-{2-[5-methyl-1-(naphthalen-2-yl)-1H-pyrazol-3-yloxy]ethyl}morpholine (S1RA, E-52862). *J Med Chem* 55, 8211–8224. <https://doi.org/10.1021/jm3007323>.

Diez-Roux, G., Banfi, S., Sultan, M., Geffers, L., Anand, S., Rozado, D., Magen, A., Canidio, E., Pagani, M., Peluso, I., et al. (2011). A High-Resolution Anatomical Atlas of the Transcriptome in the Mouse Embryo. *PLOS Biology* 9, e1000582. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000582>.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51, 7–61. .

Domvri, K., Zarogoulidis, P., Porpodis, K., Koffa, M., Lambropoulou, M., Kakolyris, S., Kolios, G., Zarogoulidis, K., and Chatzaki, E. (2012). Gene therapy in liver diseases: state-of-the-art and future perspectives. *Curr Gene Ther* 12, 463–483. <https://doi.org/10.2174/156652312803519788>.

Dong, H., Ma, Y., Ren, Z., Xu, B., Zhang, Y., Chen, J., and Yang, B. (2016). Sigma-1 Receptor Modulates Neuroinflammation After Traumatic Brain Injury. *Cell Mol Neurobiol* 36, 639–645. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0244-0>.

Dragicevic, E., Poetschke, C., Duda, J., Schlaudraff, F., Lammel, S., Schiemann, J.,

Fauler, M., Hetzel, A., Watanabe, M., Lujan, R., et al. (2014). Cav1.3 channels control D2-autoreceptor responses via NCS-1 in substantia nigra dopamine neurons. *Brain* 137, 2287–2302. <https://doi.org/10.1093/brain/awu131>.

Drucker, D.J. (2018). Mechanisms of Action and Therapeutic Application of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metabolism* 27, 740–756. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.001>.

Dumont, M., and Lemaire, S. (1991). Interaction of 1,3-di(2-[5-3H]tolyl) guanidine with sigma 2 binding sites in rat heart membrane preparations. *Eur J Pharmacol* 209, 245–248. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(91\)90176-q](https://doi.org/10.1016/0014-2999(91)90176-q).

Dun, Y., Thangaraju, M., Prasad, P., Ganapathy, V., and Smith, S.B. (2007). Prevention of Excitotoxicity in Primary Retinal Ganglion Cells by (+)-Pentazocine, a Sigma Receptor-1–Specific Ligand. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48, 4785–4794. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0343>.

E

Eachus, H., Choi, M.-K., and Ryu, S. (2021). The Effects of Early Life Stress on the Brain and Behaviour: Insights From Zebrafish Models. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. .

Earley, B., Burke, M., Leonard, B.E., Gouret, C.J., and Junien, J.L. (1991). Evidence for an anti-amnesic effect of JO 1784 in the rat: a potent and selective ligand for the sigma receptor. *Brain Res* 546, 282–286. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91492-j](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91492-j).

Easter, S.S., and Nicola, G.N. (1997). The development of eye movements in the zebrafish (*Danio rerio*). *Dev Psychobiol* 31, 267–276. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2302\(199712\)31:4<267::aid-dev4>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2302(199712)31:4<267::aid-dev4>3.0.co;2-p).

Eckenrode, E.F., Yang, J., Velmurugan, G.V., Foskett, J.K., and White, C. (2010). Apoptosis Protection by Mcl-1 and Bcl-2 Modulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor-dependent Ca²⁺ Signaling*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 13678–13684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096040>.

Eiberg, H., Hansen, L., Kjer, B., Hansen, T., Pedersen, O., Bille, M., Rosenberg, T., and Tranebjaerg, L. (2006). Autosomal dominant optic atrophy associated with hearing impairment and impaired glucose regulation caused by a missense mutation in the WFS1 gene. *J. Med. Genet.* 43, 435–440. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.034892>.

Eizirik, D.L., Cardozo, A.K., and Cnop, M. (2008). The Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetes Mellitus. *Endocrine Reviews* 29, 42–61. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0015>.

Ela, C., Barg, J., Vogel, Z., Hasin, Y., and Eilam, Y. (1994). Sigma receptor ligands modulate contractility, Ca⁺⁺ influx and beating rate in cultured cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 269, 1300–1309. .

El-Shanti, H., Lidral, A.C., Jarrah, N., Druhan, L., and Ajlouni, K. (2000). Homozygosity Mapping Identifies an Additional Locus for Wolfram Syndrome on Chromosome 4q. *The American Journal of Human Genetics* 66, 1229–1236. <https://doi.org/10.1086/302858>.

Ernfors, P., Kucera, J., Lee, K.F., Loring, J., and Jaenisch, R. (1995). Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice. *Int J Dev Biol* 39, 799–807. .

Espallergues, J., Lapalud, P., Christopoulos, A., Avlani, V.A., Sexton, P.M., Vamvakides, A., and Maurice, T. (2007). Involvement of the sigma1 (σ 1) receptor in the anti-amnesic, but not antidepressant-like, effects of the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX1-41. *British Journal of Pharmacology* 152, 267–279. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707386>.

F

Fasquelle, L., Scott, H.S., Lenoir, M., Wang, J., Rebillard, G., Gaboyard, S., Venteo, S., François, F., Mausset-Bonnefont, A.-L., Antonarakis, S.E., et al. (2011). Tmprss3, a transmembrane serine protease deficient in human DFNB8/10 deafness, is critical for cochlear hair cell survival at the onset of hearing. *J Biol Chem* 286, 17383–17397. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.190652>.

Ferreira, P.A. (2019). The coming-of-age of nucleocytoplasmic transport in motor neuron disease and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci* 76, 2247–2273. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03029-0>.

Finckbeiner, S., Ko, P.-J., Carrington, B., Sood, R., Gross, K., Dolnick, B., Sufrin, J., and Liu, P. (2011). Transient knockdown and overexpression reveal a developmental role for the zebrafish *enosf1b* gene. *Cell Biosci* 1, 32. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-1-32>.

Fischer, T.T., Nguyen, L.D., and Ehrlich, B.E. (2020). Neuronal Calcium Sensor 1 (NCS1) as a Potential Drug Target for Treatment of Wolfram Syndrome. *The FASEB Journal* 34, 1–1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.00556>.

Fischer, T.T., Nguyen, L.D., and Ehrlich, B.E. (2021). Neuronal calcium sensor 1 (NCS1) dependent modulation of neuronal morphology and development. *The FASEB Journal* 35. <https://doi.org/10.1096/fj.202100731R>.

Fisher, A., Bezprozvanny, I., Wu, L., Ryskamp, D.A., Bar-Ner, N., Natan, N., Brandeis, R., Elkon, H., Nahum, V., Gershonov, E., et al. (2016). AF710B, a Novel M1/ σ 1 Agonist with Therapeutic Efficacy in Animal Models of Alzheimer's Disease. *Neurodegener Dis* 16, 95–110. <https://doi.org/10.1159/000440864>.

Fonseca, S.G., Fukuma, M., Lipson, K.L., Nguyen, L.X., Allen, J.R., Oka, Y., and Urano, F. (2005). WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 280, 39609–39615. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507426200>.

Fonseca, S.G., Lipson, K.L., and Urano, F. (2007). Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Pancreatic β -Cells. *Antioxidants & Redox Signaling* 9, 2335–2344. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1790>.

Fonseca, S.G., Burcin, M., Gromada, J., and Urano, F. (2009). Endoplasmic reticulum stress in beta-cells and development of diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 9, 763–770. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.07.003>.

Fonseca, S.G., Ishigaki, S., Osowski, C.M., Lu, S., Lipson, K.L., Ghosh, R., Hayashi,

E., Ishihara, H., Oka, Y., Permutt, M.A., et al. (2010). Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* 120, 744–755. <https://doi.org/10.1172/JCI39678>.

Fontanilla, D., Johannessen, M., Hajipour, A.R., Cozzi, N.V., Jackson, M.B., and Ruoho, A.E. (2009). The Hallucinogen N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Is an Endogenous Sigma-1 Receptor Regulator. *Science* 323, 934–937. <https://doi.org/10.1126/science.1166127>.

Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 917–929. <https://doi.org/10.1038/nrm2272>.

Fraccaro, M., and Gastaldi, F. The pathology of the syndrome of Laurence-Moon-Biedl. *Folia Hered Path* 2, 171–214. .

Francardo, V., Bez, F., Wieloch, T., Nissbrandt, H., Ruscher, K., and Cenci, M.A. (2014). Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism. *Brain* 137, 1998–2014. <https://doi.org/10.1093/brain/awu107>.

Francardo, V., Geva, M., Bez, F., Denis, Q., Steiner, L., Hayden, M.R., and Cenci, M.A. (2019). Pridopidine Induces Functional Neurorestoration Via the Sigma-1 Receptor in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neurotherapeutics* 16, 465–479. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00699-9>.

Fraser, F.C., and Gunn, T. (1977). Diabetes mellitus, diabetes insipidus, and optic atrophy. An autosomal recessive syndrome? *J. Med. Genet.* 14, 190–193. <https://doi.org/10.1136/jmg.14.3.190>.

Fujikawa, T., Noguchi, Y., Ito, T., Takahashi, M., and Kitamura, K. (2010). Additional heterozygous 2507A>C mutation of WFS1 in progressive hearing loss at lower frequencies. *Laryngoscope* 120, 166–171. <https://doi.org/10.1002/lary.20691>.

Fujimoto, M., Hayashi, T., Urfer, R., Mita, S., and Su, T.-P. (2012). Sigma-1 receptor chaperones regulate the secretion of brain-derived neurotrophic factor. *Synapse* 66, 630–639. <https://doi.org/10.1002/syn.21549>.

Fukuoka, H., Kanda, Y., Ohta, S., and Usami, S.-I. (2007). Mutations in the WFS1 gene are a frequent cause of autosomal dominant nonsyndromic low-frequency hearing loss in Japanese. *J Hum Genet* 52, 510–515. <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0144-3>.

G

Gabreëls, B.A., Swaab, D.F., de Kleijn, D.P., Dean, A., Seidah, N.G., Van de Loo, J.W., Van de Ven, W.J., Martens, G.J., and Van Leeuwen, F.W. (1998). The vasopressin precursor is not processed in the hypothalamus of Wolfram syndrome patients with diabetes insipidus: evidence for the involvement of PC2 and 7B2. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 4026–4033. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.11.5158>.

Galluzzi, P., Filisomi, G., Vallone, I.M., Bardelli, A.M., and Venturi, C. (1999). MRI of Wolfram syndrome (DIDMOAD). *Neuroradiology* 41, 729–731. <https://doi.org/10.1007/s002340050832>.

Galmes, R., Houcine, A., van Vliet, A.R., Agostinis, P., Jackson, C.L., and Giordano, F. (2016). ORP5/ORP8 localize to endoplasmic reticulum-mitochondria contacts and

are involved in mitochondrial function. *EMBO Rep* 17, 800–810. <https://doi.org/10.15252/embr.201541108>.

Ganapathy, M.E., Prasad, P.D., Huang, W., Seth, P., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (1999). Molecular and ligand-binding characterization of the sigma-receptor in the Jurkat human T lymphocyte cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 289, 251–260. .

Gao, X.-F., Yao, J.-J., He, Y.-L., Hu, C., and Mei, Y.-A. (2012). Sigma-1 Receptor Agonists Directly Inhibit NaV1.2/1.4 Channels. *PLOS ONE* 7, e49384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049384>.

Garcia, N., Lanuza, M.A., Besalduch, N., Santafe, M.M., Jeromin, A., and Tomas, J. (2005). Localization of neuronal calcium sensor-1 at the adult and developing rat neuromuscular junction. *J Neurosci Res* 82, 1–9. <https://doi.org/10.1002/jnr.20593>.

Garcia-Miralles, M., Geva, M., Tan, J.Y., Yusof, N.A.B.M., Cha, Y., Kusko, R., Tan, L.J., Xu, X., Grossman, I., Orbach, A., et al. (2017). Early pridopidine treatment improves behavioral and transcriptional deficits in YAC128 Huntington disease mice. *JCI Insight* 2, 95665. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.95665>.

Gasparin, M.R.R., Crispim, F., Paula, S.L., Freire, M.B.S., Dalbosco, I.S., Manna, T.D., Salles, J.E.N., Gasparin, F., Guedes, A., Marcantonio, J.M., et al. (2009). Identification of novel mutations of the WFS1 gene in Brazilian patients with Wolfram syndrome. *Eur J Endocrinol* 160, 309–316. <https://doi.org/10.1530/EJE-08-0698>.

Genís, D., Dávalos, A., Molins, A., and Ferrer, I. (1997). Wolfram syndrome: a neuropathological study. *Acta Neuropathol* 93, 426–429. <https://doi.org/10.1007/s004010050635>.

Geva, M., Kusko, R., Soares, H., Fowler, K.D., Birnberg, T., Barash, S., -Wagner, A.M., Fine, T., Lysaght, A., Weiner, B., et al. (2016). Pridopidine activates neuroprotective pathways impaired in Huntington Disease. *Hum Mol Genet* 25, 3975–3987. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw238>.

Gharanei, S., Zatyka, M., Astuti, D., Fenton, J., Sik, A., Nagy, Z., and Barrett, T.G. (2013). Vacuolar-type H⁺-ATPase V1A subunit is a molecular partner of Wolfram syndrome 1 (WFS1) protein, which regulates its expression and stability. *Hum Mol Genet* 22, 203–217. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds400>.

Gibson, L.C.D., Hastings, S.F., McPhee, I., Clayton, R.A., Darroch, C.E., Mackenzie, A., Mackenzie, F.L., Nagasawa, M., Stevens, P.A., and Mackenzie, S.J. (2006). The inhibitory profile of Ibudilast against the human phosphodiesterase enzyme family. *Eur J Pharmacol* 538, 39–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.02.053>.

Giorgi, C., Missiroli, S., Patergnani, S., Duszyński, J., Wieckowski, M.R., and Pinton, P. (2015). Mitochondria-Associated Membranes: Composition, Molecular Mechanisms, and Physiopathological Implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 22, 995–1019. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6223>.

Giorgi, C., Marchi, S., and Pinton, P. (2018). The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 713–730. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8>.

Glennon, R.A. (2005). Pharmacophore identification for sigma-1 (sigma1) receptor binding: application of the “deconstruction-reconstruction-elaboration” approach. *Mini Rev Med Chem* 5, 927–940. <https://doi.org/10.2174/138955705774329519>.

Glennon, R.A., Ablordeppey, S.Y., Ismaiel, A.M., el-Ashmawy, M.B., Fischer, J.B., and Howie, K.B. (1994). Structural features important for sigma 1 receptor binding. *J Med Chem* 37, 1214–1219. <https://doi.org/10.1021/jm00034a020>.

Gogvadze, N., Zhuravliova, E., Morin, D., Mikeladze, D., and Maurice, T. (2019). Sigma-1 Receptor Agonists Induce Oxidative Stress in Mitochondria and Enhance Complex I Activity in Physiological Condition but Protect Against Pathological Oxidative Stress. *Neurotox Res* 35, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9838-2>.

Gomez, M., De Castro, E., Guarin, E., Sasakura, H., Kuhara, A., Mori, I., Bartfai, T., Bargmann, C.I., and Nef, P. (2001). Ca²⁺ Signaling via the Neuronal Calcium Sensor-1 Regulates Associative Learning and Memory in *C. elegans*. *Neuron* 30, 241–248. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00276-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00276-8).

Gomez-Suaga, P., Paillusson, S., Stoica, R., Noble, W., Hanger, D.P., and Miller, C.C.J. (2017). The ER-Mitochondria Tethering Complex VAPB-PTPIP51 Regulates Autophagy. *Current Biology* 27, 371–385. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.12.038>.

Gómez-Zaera, M., Strom, T.M., Rodríguez, B., Estivill, X., Meitinger, T., and Nunes, V. (2001). Presence of a Major WFS1 Mutation in Spanish Wolfram Syndrome Pedigrees. *Molecular Genetics and Metabolism* 72, 72–81. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3107>.

Gonçalves, A.C., Matos, T.D., Simões-Teixeira, H.R., Pimenta Machado, M., Simão, M., Dias, O.P., Andrea, M., Fialho, G., and Caria, H. (2014). WFS1 and non-syndromic low-frequency sensorineural hearing loss: a novel mutation in a Portuguese case. *Gene* 538, 288–291. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.01.040>.

Gris, G., Merlos, M., Vela, J.M., Zamanillo, D., and Portillo-Salido, E. (2014). S1RA, a selective sigma-1 receptor antagonist, inhibits inflammatory pain in the carrageenan and complete Freund's adjuvant models in mice. *Behav Pharmacol* 25, 226–235. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000038>.

Gromada, J., Bark, C., Smidt, K., Efanov, A.M., Janson, J., Mandic, S.A., Webb, D.-L., Zhang, W., Meister, B., Jeromin, A., et al. (2005). Neuronal calcium sensor-1 potentiates glucose-dependent exocytosis in pancreatic β cells through activation of phosphatidylinositol 4-kinase β . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 10303–10308. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504487102>.

Gromek, K.A., Suchy, F.P., Meddaugh, H.R., Wrobel, R.L., LaPointe, L.M., Chu, U.B., Primm, J.G., Ruoho, A.E., Senes, A., and Fox, B.G. (2014). The oligomeric states of the purified sigma-1 receptor are stabilized by ligands. *J Biol Chem* 289, 20333–20344. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.537993>.

Guenifi, A., Simonsson, E., Karlsson, S., Ahrén, B., and Abdel-Halim, S.M. (2001). Carbachol restores insulin release in diabetic GK rat islets by mechanisms largely involving hydrolysis of diacylglycerol and direct interaction with the exocytotic machinery. *Pancreas* 22, 164–171. <https://doi.org/10.1097/00006676-200103000-00009>.

Guo, L., Zhao, J., Jin, G., Zhao, B., Wang, G., Zhang, A., and Zhen, X. (2013). SKF83959 is a potent allosteric modulator of sigma-1 receptor. *Mol Pharmacol* 83, 577–586. <https://doi.org/10.1124/mol.112.083840>.

Guo, L., Chen, Y., Zhao, R., Wang, G., Friedman, E., Zhang, A., and Zhen, X. (2015).

Allosteric modulation of sigma-1 receptors elicits anti-seizure activities. *Br J Pharmacol* 172, 4052–4065. <https://doi.org/10.1111/bph.13195>.

Guo, W., Malin, S.A., Johns, D.C., Jeromin, A., and Nerbonne, J.M. (2002). Modulation of Kv4-encoded K⁺ Currents in the Mammalian Myocardium by Neuronal Calcium Sensor-1*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 26436–26443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201431200>.

Gürtler, N., Kim, Y., Mhatre, A., Schlegel, C., Mathis, A., Daniels, R., Shelton, C., and Lalwani, A.K. (2005). Two families with nonsyndromic low-frequency hearing loss harbor novel mutations in Wolfram syndrome gene 1. *J Mol Med (Berl)* 83, 553–560. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0665-1>.

H

Ha, Y., Saul, A., Tawfik, A., Williams, C., Bollinger, K., Smith, R., Tachikawa, M., Zorrilla, E., Ganapathy, V., and Smith, S.B. (2011a). Late-onset inner retinal dysfunction in mice lacking sigma receptor 1 (σ R1). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 7749–7760. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8169>.

Ha, Y., Dun, Y., Thangaraju, M., Duplantier, J., Dong, Z., Liu, K., Ganapathy, V., and Smith, S.B. (2011b). Sigma receptor 1 modulates endoplasmic reticulum stress in retinal neurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 527–540. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5731>.

Ha, Y., Saul, A., Tawfik, A., Zorrilla, E.P., Ganapathy, V., and Smith, S.B. (2012). Diabetes accelerates retinal ganglion cell dysfunction in mice lacking sigma receptor 1. *Mol Vis* 18, 2860–2870. .

Haase, G., Kennel, P., Pettmann, B., Vigne, E., Akli, S., Revah, F., Schmalbruch, H., and Kahn, A. (1997). Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. *Nat Med* 3, 429–436. <https://doi.org/10.1038/nm0497-429>.

Hajnóczky, G., Csordás, G., Das, S., Garcia-Perez, C., Saotome, M., Sinha Roy, S., and Yi, M. (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium* 40, 553–560. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.016>.

Hall, H., Iulita, M.F., Gubert, P., Flores Aguilar, L., Ducatenzeiler, A., Fisher, A., and Cuello, A.C. (2018). AF710B, an M1/sigma-1 receptor agonist with long-lasting disease-modifying properties in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 14, 811–823. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.11.009>.

Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013). Autophagosomes form at ER–mitochondria contact sites. *Nature* 495, 389–393. <https://doi.org/10.1038/nature11910>.

Hamasaki-Katagiri, N., Molchanova, T., Takeda, K., and Ames, J.B. (2004). Fission yeast homolog of neuronal calcium sensor-1 (Ncs1p) regulates sporulation and confers calcium tolerance. *J Biol Chem* 279, 12744–12754. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311895200>.

Han, D., Lerner, A.G., Vande Walle, L., Upton, J.-P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B.J., Oakes, S.A., and Papa, F.R. (2009). IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* 138, 562–575. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.017>.

Handley, M.T.W., Lian, L.-Y., Haynes, L.P., and Burgoyne, R.D. (2010). Structural and functional deficits in a neuronal calcium sensor-1 mutant identified in a case of autistic spectrum disorder. *PLoS One* 5, e10534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010534>.

Hanner, M., Moebius, F.F., Flandorfer, A., Knaus, H.G., Striessnig, J., Kempner, E., and Glossmann, H. (1996). Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8072–8077. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.8072>.

Hansford, R.G. (1994). Physiological role of mitochondrial Ca²⁺ transport. *J Bioenerg Biomembr* 26, 495–508. <https://doi.org/10.1007/BF00762734>.

Hara, T., Mahadevan, J., Kanekura, K., Hara, M., Lu, S., and Urano, F. (2014). Calcium Efflux From the Endoplasmic Reticulum Leads to β -Cell Death. *Endocrinology* 155, 758–768. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1519>.

Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Molecular Cell* 11, 619–633. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00105-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00105-9).

Harding, H.P., Zhang, Y., Scheuner, D., Chen, J.-J., Kaufman, R.J., and Ron, D. (2009). Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2alpha) dephosphorylation in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1832–1837. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809632106>.

Hardy, C., Khanim, F., Torres, R., Scott-Brown, M., Seller, A., Poulton, J., Collier, D., Kirk, J., Polymeropoulos, M., Latif, F., et al. (1999). Clinical and molecular genetic analysis of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in WFS1. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 1279–1290. <https://doi.org/10.1086/302609>.

Hasan, M.A., Hazza, I., and Najada, A. (2000). Wolfram's (DIDMOAD) Syndrome and Chronic Renal Failure. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 11, 53–58. .

Hashimoto, K. (2009). Sigma-1 receptors and selective serotonin reuptake inhibitors: clinical implications of their relationship. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 9, 197–204. <https://doi.org/10.2174/1871524910909030197>.

Hatanaka, M., Tanabe, K., Yanai, A., Ohta, Y., Kondo, M., Akiyama, M., Shinoda, K., Oka, Y., and Tanizawa, Y. (2011). Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product localizes to secretory granules and determines granule acidification in pancreatic β -cells. *Hum Mol Genet* 20, 1274–1284. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq568>.

Hauswirth, W.W., Aleman, T.S., Kaushal, S., Cideciyan, A.V., Schwartz, S.B., Wang, L., Conlon, T.J., Boye, S.L., Flotte, T.R., Byrne, B.J., et al. (2008). Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 19, 979–990. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.107>.

Hayashi, T., and Su, T.P. (2001). Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 491–496. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.491>.

Hayashi, T., and Su, T.-P. (2007). Sigma-1 Receptor Chaperones at the ER-Mitochondrion Interface Regulate Ca²⁺ Signaling and Cell Survival. *Cell* 131, 596–610. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.036>.

Hayashi, T., Maurice, T., and Su, T.P. (2000). Ca(2+) signaling via sigma(1)-receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca(2+) concentration. *J Pharmacol Exp Ther* 293, 788–798. .

Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., and Su, T.-P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends in Cell Biology* 19, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.12.002>.

Hayashi, T., Justinova, Z., Hayashi, E., Cormaci, G., Mori, T., Tsai, S.-Y., Barnes, C., Goldberg, S.R., and Su, T.-P. (2010). Regulation of sigma-1 receptors and endoplasmic reticulum chaperones in the brain of methamphetamine self-administering rats. *J Pharmacol Exp Ther* 332, 1054–1063. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.159244>.

Hayashi, T., Hayashi, E., Fujimoto, M., Sprong, H., and Su, T.-P. (2012). The lifetime of UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase is controlled by a distinct endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) regulated by sigma-1 receptor chaperones. *J Biol Chem* 287, 43156–43169. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.380444>.

Haynes, L.P., Fitzgerald, D.J., Wareing, B., O’Callaghan, D.W., Morgan, A., and Burgoyne, R.D. (2006). Analysis of the interacting partners of the neuronal calcium-binding proteins L-CaBP1, hippocalcin, NCS-1 and neurocalcin δ . *PROTEOMICS* 6, 1822–1832. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500489>.

Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10, 3787–3799. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3787>.

He, C., Bartholomew, C.R., Zhou, W., and Klionsky, D.J. (2009). Assaying autophagic activity in transgenic GFP-Lc3 and GFP-Gabarap zebrafish embryos. *Autophagy* 5, 520–526. .

Heidarsson, P.O., Bjerrum-Bohr, I.J., Jensen, G.A., Pongs, O., Finn, B.E., Poulsen, F.M., and Kragelund, B.B. (2012). The C-terminal tail of human neuronal calcium sensor 1 regulates the conformational stability of the Ca²⁺-activated state. *J Mol Biol* 417, 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.12.049>.

Hellewell, S.B., Bruce, A., Feinstein, G., Orringer, J., Williams, W., and Bowen, W.D. (1994). Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. *Eur J Pharmacol* 268, 9–18. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(94\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0922-4106(94)90115-5).

de Heredia, M.L., Clèries, R., and Nunes, V. (2013). Genotypic classification of patients with Wolfram syndrome: insights into the natural history of the disease and correlation with phenotype. *Genetics in Medicine* 15, 497–506.

<https://doi.org/10.1038/gim.2012.180>.

Hershey, T., Lugar, H.M., Shimony, J.S., Rutlin, J., Koller, J.M., Perantie, D.C., Paciorkowski, A.R., Eisenstein, S.A., Permutt, M.A., and Washington University Wolfram Study Group (2012). Early brain vulnerability in Wolfram syndrome. *PLoS One* 7, e40604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040604>.

Higashi, K. (1991). Otologic findings of DIDMOAD syndrome. *Am J Otol* 12, 57–60. .

Hilson, J.B., Merchant, S.N., Adams, J.C., and Joseph, J.T. (2009). Wolfram syndrome: a clinicopathologic correlation. *Acta Neuropathol* 118, 415–428. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0546-8>.

Hindmarch, I., and Hashimoto, K. (2010). Cognition and depression: the effects of fluvoxamine, a sigma-1 receptor agonist, reconsidered. *Hum Psychopharmacol* 25, 193–200. <https://doi.org/10.1002/hup.1106>.

Hoekel, J., Chisholm, S.A., Al-Lozi, A., Hershey, T., and Tychsen, L. (2014). Ophthalmologic correlates of disease severity in children and adolescents with Wolfram syndrome. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus* 18, 461-465.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaapos.2014.07.162>.

Hofmann, S., Philbrook, C., Gerbitz, K.-D., and Bauer, M.F. (2003). Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2003–2012. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg214>.

Hogewind, B.F.T., Pennings, R.J.E., Hol, F.A., Kunst, H.P.M., Hoefsloot, E.H., Cruysberg, J.R.M., and Cremers, C.W.R.J. (2010). Autosomal dominant optic neuropathy and sensorineural hearing loss associated with a novel mutation of WFS1. *Mol Vis* 16, 26–35. .

Homan, M.R., and MacKay, B.R. (1987). Primary hypogonadism in two siblings with Wolfram syndrome. *Diabetes Care* 10, 664–665. <https://doi.org/10.2337/diacare.10.5.664>.

Hong, J., Sha, S., Zhou, L., Wang, C., Yin, J., and Chen, L. (2015). Sigma-1 receptor deficiency reduces MPTP-induced parkinsonism and death of dopaminergic neurons. *Cell Death Dis* 6, e1832. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.194>.

Hong, J., Wang, L., Zhang, T., Zhang, B., and Chen, L. (2017). Sigma-1 receptor knockout increases α -synuclein aggregation and phosphorylation with loss of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Neurobiol Aging* 59, 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.08.007>.

Horner, S.M., Liu, H.M., Park, H.S., Briley, J., and Gale, M. (2011). Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 14590–14595. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110133108>.

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>.

Hu, K., Zatyka, M., Astuti, D., Beer, N., Dias, R., Kulkarni, A., Ainsworth, J., Wright, B., Majander, A., Yu Wai Man, P., et al. (2021). WFS1 protein expression correlates with

clinical progression of optic atrophy in patients with Wolfram syndrome. *Journal of Medical Genetics* 59, jmedgenet-2020. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2020-107257>.

Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2001). Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annu Rev Neurosci* 24, 677–736. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>.

Huang, C.-Y., Chiang, S.-F., Lin, T.-Y., Chiou, S.-H., and Chow, K.-C. (2012). HIV-1 Vpr Triggers Mitochondrial Destruction by Impairing Mfn2-Mediated ER-Mitochondria Interaction. *PLOS ONE* 7, e33657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033657>.

Hui, K., Fei, G.-H., Saab, B.J., Su, J., Roder, J.C., and Feng, Z.-P. (2007). Neuronal calcium sensor-1 modulation of optimal calcium level for neurite outgrowth. *Development* 134, 4479–4489. <https://doi.org/10.1242/dev.008979>.

Hyrskyluoto, A., Pulli, I., Törnqvist, K., Huu Ho, T., Korhonen, L., and Lindholm, D. (2013). Sigma-1 receptor agonist PRE084 is protective against mutant huntingtin-induced cell degeneration: involvement of calpastatin and the NF-κB pathway. *Cell Death Dis* 4, e646–e646. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.170>.

Iketani, M., Imaizumi, C., Nakamura, F., Jeromin, A., Mikoshiba, K., Goshima, Y., and Takei, K. (2009). Regulation of neurite outgrowth mediated by neuronal calcium sensor-1 and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in nerve growth cones. *Neuroscience* 161, 743–752. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.019>.

Ikkos, D.G., Fraser, G.R., Matsouki-Gavra, E., and Petrochilos, M. (1970). Association of juvenile diabetes mellitus, primary optic atrophy and perceptive hearing loss in three sibs, with additional idiopathic diabetes mellitus insipidus in one case. *Acta Endocrinol* 65, 95–102. .

Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., Behn, P., Kalidas, K., Bernal-Mizrachi, E., Mueckler, M., Marshall, H., Donis-Keller, H., Crock, P., et al. (1998). A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat. Genet.* 20, 143–148. <https://doi.org/10.1038/2441>.

Ionescu, A., Gradus, T., Altman, T., Maimon, R., Saraf Avraham, N., Geva, M., Hayden, M., and Perlson, E. (2019). Targeting the Sigma-1 Receptor via Pridopidine Ameliorates Central Features of ALS Pathology in a SOD1G93A Model. *Cell Death Dis* 10, 210. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1451-2>.

Isgrò, A., Gaziev, J., Sodani, P., and Lucarelli, G. (2010). Progress in hematopoietic stem cell transplantation as allogeneic cellular gene therapy in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 1202, 149–154. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05543.x>.

Ishigaki, S., Fonseca, S.G., Oslowski, C.M., Jurczyk, A., Shearstone, J.R., Zhu, L.J., Permutt, M.A., Greiner, D.L., Bortell, R., and Urano, F. (2010). AATF mediates anti-apoptotic effect of the unfolded protein response through transcriptional regulation of AKT1. *Cell Death Differ* 17, 774–786. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.175>.

Ishihara, H., Takeda, S., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Yamada, T., Inoue, H., Soga, H., Katagiri, H., et al. (2004). Disruption of the WFS1

gene in mice causes progressive β -cell loss and impaired stimulus–secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet* 13, 1159–1170. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh125>.

Israelson, A., Arbel, N., Da Cruz, S., Ilieva, H., Yamanaka, K., Shoshan-Barmatz, V., and Cleveland, D.W. (2010). Misfolded Mutant SOD1 Directly Inhibits VDAC1 Conductance in a Mouse Model of Inherited ALS. *Neuron* 67, 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.019>.

Ito, S., Sakakibara, R., and Hattori, T. (2007). Wolfram syndrome presenting marked brain MR imaging abnormalities with few neurologic abnormalities. *AJNR Am J Neuroradiol* 28, 305–306. .

Ivanova, A.A., East, M.P., Yi, S.L., and Kahn, R.A. (2014). Characterization of Recombinant ELMOD (Cell Engulfment and Motility Domain) Proteins as GTPase-activating Proteins (GAPs) for ARF Family GTPases. *J Biol Chem* 289, 11111–11121. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.548529>.

Iwasawa, R., Mahul-Mellier, A.-L., Datler, C., Pazarentzos, E., and Grimm, S. (2011). Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J* 30, 556–568. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.346>.

J

Jackisch, L., Murphy, A.M., Kumar, S., Randeva, H., Tripathi, G., and McTernan, P.G. (2020). Tunicamycin-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Mediates Mitochondrial Dysfunction in Human Adipocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 105, 2905–2918. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa258>.

Jagodzinska, J.M., Bonnet-Wersinger, D., Koks, S., Delprat, B., Hamel, C.P., and Delettre-Cirballet, C. (2016). Wolfram Syndrome murine models: phenotyping and gene therapy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 4040–4040. .

Jansen, K.L., Elliot, M., and Leslie, R.A. (1992). sigma receptors in rat brain and testes show similar reductions in response to chronic haloperidol. *Eur J Pharmacol* 214, 281–283. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90131-m](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90131-m).

Jaworek, T.J., Richard, E.M., Ivanova, A.A., Giese, A.P.J., Choo, D.I., Khan, S.N., Riazuddin, S., Kahn, R.A., and Riazuddin, S. (2013). An Alteration in ELMOD3, an Arl2 GTPase-Activating Protein, Is Associated with Hearing Impairment in Humans. *PLoS Genet* 9, e1003774. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003774>.

Jeromin, A., Shayan, A.J., Msghina, M., Roder, J., and Atwood, H.L. (1999). Crustacean frequenins: molecular cloning and differential localization at neuromuscular junctions. *J Neurobiol* 41, 165–175. .

Jiang, G., Mysona, B., Dun, Y., Gnana-Prakasam, J.P., Pabla, N., Li, W., Dong, Z., Ganapathy, V., and Smith, S.B. (2006). Expression, subcellular localization, and regulation of sigma receptor in retinal muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 5576–5582. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0608>.

Johannessen, C.U. (2000). Mechanisms of action of valproate: a commentary. *Neurochem Int* 37, 103–110. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(00\)00013-9](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(00)00013-9).

Johannessen, C.U., and Johannessen, S.I. (2003). Valproate: past, present, and

future. *CNS Drug Rev* 9, 199–216. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2003.tb00249.x>.

Johannessen, M., Ramachandran, S., Riemer, L., Ramos-Serrano, A., Ruoho, A.E., and Jackson, M.B. (2009). Voltage-gated sodium channel modulation by σ -receptors in cardiac myocytes and heterologous systems. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 296, C1049–C1057. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00431.2008>.

John, C.S., Vilner, B.J., Geyer, B.C., Moody, T., and Bowen, W.D. (1999). Targeting sigma receptor-binding benzamides as in vivo diagnostic and therapeutic agents for human prostate tumors. *Cancer Res* 59, 4578–4583. .

Johnson, K.R., Longo-Guess, C.M., and Gagnon, L.H. (2012). Mutations of the mouse ELMO domain containing 1 gene (*Elmod1*) link small GTPase signaling to actin cytoskeleton dynamics in hair cell stereocilia. *PLoS One* 7, e36074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036074>.

Joshi, A.U., Kornfeld, O.S., and Mochly-Rosen, D. (2016). The Entangled ER-Mitochondrial axis as a potential therapeutic strategy in Neurodegeneration: A Tangled Duo Unchained. *Cell Calcium* 60, 218–234. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.04.010>.

K

Ka, M., Kook, Y.-H., Liao, K., Buch, S., and Kim, W.-Y. (2016). Transactivation of TrkB by Sigma-1 receptor mediates cocaine-induced changes in dendritic spine density and morphology in hippocampal and cortical neurons. *Cell Death Dis* 7, e2414–e2414. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.319>.

Kabbani, N., Negyessy, L., Lin, R., Goldman-Rakic, P., and Levenson, R. (2002). Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J Neurosci* 22, 8476–8486. .

Kabbani, N., Woll, M.P., Nordman, J.C., and Levenson, R. (2012). Dopamine receptor interacting proteins: targeting neuronal calcium sensor-1/D2 dopamine receptor interaction for antipsychotic drug development. *Curr Drug Targets* 13, 72–79. <https://doi.org/10.2174/138945012798868515>.

Kakiuchi, C., Ishiwata, M., Hayashi, A., and Kato, T. (2006). XBP1 induces WFS1 through an endoplasmic reticulum stress response element-like motif in SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* 97, 545–555. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03772.x>.

Kakiuchi, C., Ishigaki, S., Osowski, C.M., Fonseca, S.G., Kato, T., and Urano, F. (2009). Valproate, a Mood Stabilizer, Induces WFS1 Expression and Modulates Its Interaction with ER Stress Protein GRP94. *PLOS ONE* 4, e4134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004134>.

Karasik, A., O'Hara, C., Srikanta, S., Swift, M., Soeldner, J.S., Kahn, C.R., and Herskowitz, R.D. (1989). Genetically programmed selective islet beta-cell loss in diabetic subjects with Wolfram's syndrome. *Diabetes Care* 12, 135–138. <https://doi.org/10.2337/diacare.12.2.135>.

Kato, K., Hayako, H., Ishihara, Y., Marui, S., Iwane, M., and Miyamoto, M. (1999). TAK-147, an acetylcholinesterase inhibitor, increases choline acetyltransferase activity in

cultured rat septal cholinergic neurons. *Neurosci Lett* 260, 5–8. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(98\)00943-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(98)00943-4).

Kato, T., Ishiwata, M., Yamada, K., Kasahara, T., Kakiuchi, C., Iwamoto, K., Kawamura, K., Ishihara, H., and Oka, Y. (2008). Behavioral and gene expression analyses of *Wfs1* knockout mice as a possible animal model of mood disorder. *Neurosci. Res.* 61, 143–158. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.02.002>.

Kawasaki, A., Hoshino, K., Osaki, R., Mizushima, Y., and Yano, S. (1992). Effect of Ibudilast: A Novel Antiasthmatic Agent, on Airway Hypersensitivity in Bronchial Asthma. *Journal of Asthma* 29, 245–252. <https://doi.org/10.3109/02770909209048938>.

Kekuda, R., Prasad, P.D., Fei, Y.J., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (1996). Cloning and functional expression of the human type 1 sigma receptor (hSigmaR1). *Biochem Biophys Res Commun* 229, 553–558. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1842>.

Khacho, M., Harris, R., and Slack, R.S. (2019). Mitochondria as central regulators of neural stem cell fate and cognitive function. *Nat Rev Neurosci* 20, 34–48. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0091-3>.

Khanim, F., Kirk, J., Latif, F., and Barrett, T.G. (2001). WFS1/wolframin mutations, Wolfram syndrome, and associated diseases. *Hum Mutat* 17, 357–367. <https://doi.org/10.1002/humu.1110>.

Khersonsky, S.M., Jung, D.-W., Kang, T.-W., Walsh, D.P., Moon, H.-S., Jo, H., Jacobson, E.M., Shetty, V., Neubert, T.A., and Chang, Y.-T. (2003). Facilitated forward chemical genetics using a tagged triazine library and zebrafish embryo screening. *J Am Chem Soc* 125, 11804–11805. <https://doi.org/10.1021/ja035334d>.

Kibaly, C., Meyer, L., Patte-Mensah, C., and Mensah-Nyagan, A.G. (2008). Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanisms by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spinal cord. *FASEB J* 22, 93–104. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8930com>.

Kikuchi-Utsumi, K., and Nakaki, T. (2008). Chronic treatment with a selective ligand for the sigma-1 receptor chaperone, SA4503, up-regulates BDNF protein levels in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 440, 19–22. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.055>.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203, 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>.

Kimura, Y., Fujita, Y., Shibata, K., Mori, M., and Yamashita, T. (2013). Sigma-1 Receptor Enhances Neurite Elongation of Cerebellar Granule Neurons via TrkB Signaling. *PLOS ONE* 8, e75760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075760>.

Kinsley, B.T., Swift, M., Dumont, R.H., and Swift, R.G. (1995). Morbidity and mortality in the Wolfram syndrome. *Diabetes Care* 18, 1566–1570. <https://doi.org/10.2337/diacare.18.12.1566>.

Kinsora, J.J., Corbin, A.E., Snyder, B.J., Wiley, J.N., Meltzer, L.T., and Heffner, T.G. (1998). Effects of igmesine in preclinical anti-depressant tests. *Soc. Neurosci. Abstr.* 291.3. .

Kitamura, M. (2013). The unfolded protein response triggered by environmental

factors. *Semin Immunopathol* 35, 259–275. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0371-y>.

Koh, P.O., Undie, A.S., Kabbani, N., Levenson, R., Goldman-Rakic, P.S., and Lidow, M.S. (2003). Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 313–317. <https://doi.org/10.1073/pnas.232693499>.

Koido, K., Kõks, S., Nikopensius, T., Maron, E., Altmäe, S., Heinaste, E., Vabrit, K., Tammekivi, V., Hallast, P., Kurg, A., et al. (2005). Polymorphisms in wolframin (WFS1) gene are possibly related to increased risk for mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* 8, 235–244. <https://doi.org/10.1017/S1461145704004791>.

Kõks, S., Soomets, U., Paya-Cano, J.L., Fernandes, C., Luuk, H., Plaas, M., Terasmaa, A., Tillmann, V., Noormets, K., Vasar, E., et al. (2009). Wfs1 gene deletion causes growth retardation in mice and interferes with the growth hormone pathway. *Physiological Genomics* 37, 249–259. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90407.2008>.

Kondo, M., Tanabe, K., Amo-Shiinoki, K., Hatanaka, M., Morii, T., Takahashi, H., Seino, S., Yamada, Y., and Tanizawa, Y. (2018). Activation of GLP-1 receptor signalling alleviates cellular stresses and improves beta cell function in a mouse model of Wolfram syndrome. *Diabetologia* 61, 2189–2201. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4679-y>.

Korkmaz, H.A. (2018). A case of Wolfram syndrome with chronic renal failure. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 23, 166–167. <https://doi.org/10.6065/apem.2018.23.3.166>.

Koshenov, Z., Oflaz, F.E., Hirtl, M., Pilic, J., Bachkoenig, O.A., Gottschalk, B., Madreiter-Sokolowski, C.T., Rost, R., Malli, R., and Graier, W.F. (2021). Sigma-1 Receptor Promotes Mitochondrial Bioenergetics by Orchestrating ER Ca²⁺ Leak during Early ER Stress. *Metabolites* 11, 422. <https://doi.org/10.3390/metabo11070422>.

Kotitschke, A., Sadie-Van Gijzen, H., Avenant, C., Fernandes, S., and Hapgood, J.P. (2009). Genomic and nongenomic cross talk between the gonadotropin-releasing hormone receptor and glucocorticoid receptor signaling pathways. *Mol Endocrinol* 23, 1726–1745. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0462>.

Kourrich, S., Hayashi, T., Chuang, J.-Y., Tsai, S.-Y., Su, T.-P., and Bonci, A. (2013). Dynamic Interaction between Sigma-1 Receptor and Kv1.2 Shapes Neuronal and Behavioral Responses to Cocaine. *Cell* 152, 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.004>.

Krause, T., Gerbershagen, M.U., Fiege, M., Weisshorn, R., and Wappler, F. (2004). Dantrolene--a review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia* 59, 364–373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2044.2004.03658.x>.

Krols, M., van Isterdael, G., Asselbergh, B., Kremer, A., Lippens, S., Timmerman, V., and Janssens, S. (2016). Mitochondria-associated membranes as hubs for neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 131, 505–523. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1528-7>.

Kuether, E.L., Schroeder, J.A., Fahs, S.A., Cooley, B.C., Chen, Y., Montgomery, R.R., Wilcox, D.A., and Shi, Q. (2012). Lentivirus-mediated platelet gene therapy of murine hemophilia A with pre-existing anti-factor VIII immunity. *J Thromb Haemost* 10, 1570–

1580. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04791.x>.

Kumar, S. (2010). Wolfram syndrome: important implications for pediatricians and pediatric endocrinologists. *Pediatr Diabetes* 11, 28–37. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2009.00518.x>.

Kunz, J., Marquez-Klaka, B., Uebe, S., Volz-Peters, A., Berger, R., and Rausch, P. (2003). Identification of a novel mutation in WFS1 in a family affected by low-frequency hearing impairment. *Mutat Res* 525, 121–124. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(02\)00265-8](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(02)00265-8).

Kusko, R., Dreyman, J., Ross, J., Cha, Y., Escalante-Chong, R., Garcia-Miralles, M., Tan, L.J., Burczynski, M.E., Zeskind, B., Laifenfeld, D., et al. (2018). Large-scale transcriptomic analysis reveals that pridopidine reverses aberrant gene expression and activates neuroprotective pathways in the YAC128 HD mouse. *Molecular Neurodegeneration* 13, 25. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0259-3>.

L

La Spada, A., Ntai, A., Genovese, S., Rondinelli, M., De Blasio, P., and Biunno, I. (2018). Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells from Wolfram Syndrome Type 2 Patients Bearing the c.103 + 1G>A CISD2 Mutation for Disease Modeling. *Stem Cells Dev* 27, 287–295. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0158>.

Laffay, G., and Lestradet, H. (1974). [Juvenile diabetes and primary optic atrophy]. *Sem Hop* 50, 127–141. .

Laird, A.S., Mackovski, N., Rinkwitz, S., Becker, T.S., and Giacomotto, J. (2016). Tissue-specific models of spinal muscular atrophy confirm a critical role of SMN in motor neurons from embryonic to adult stages. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1728–1738. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw044>.

Landa, L.R., Harbeck, M., Kaihara, K., Chepurny, O., Kitiphongspattana, K., Graf, O., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., Holz, G.G., and Roe, M.W. (2005). Interplay of Ca²⁺ and cAMP signaling in the insulin-secreting MIN6 beta-cell line. *J Biol Chem* 280, 31294–31302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505657200>.

Langa, F., Codony, X., Tovar, V., Lavado, A., Giménez, E., Cozar, P., Cantero, M., Dordal, A., Hernández, E., Pérez, R., et al. (2003). Generation and phenotypic analysis of sigma receptor type I (σ 1) knockout mice. *European Journal of Neuroscience* 18, 2188–2196. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02950.x>.

Larcher, T., Lafoux, A., Tesson, L., Remy, S., Thepenier, V., François, V., Le Guiner, C., Goubin, H., Dutilleul, M., Guigand, L., et al. (2014). Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 9, e110371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110371>.

Laurini, E., Marson, D., Fermiglia, M., and Pricl, S. (2017). 3D Homology Model of Sigma1 Receptor. *Handb Exp Pharmacol* 244, 27–50. https://doi.org/10.1007/164_2017_35.

Leadbetter, R., Pande, A., Slomkowski, M., and Smith, F. (1999). Igmesine: a novel antidepressant. In *Biological Psychiatry*, (Elsevier Science), pp. 76S-76S.

Lee, P.-T., Liévens, J.-C., Wang, S.-M., Chuang, J.-Y., Khalil, B., Wu, H., Chang, W.-

C., Maurice, T., and Su, T.-P. (2020). Sigma-1 receptor chaperones rescue nucleocytoplasmic transport deficit seen in cellular and *Drosophila* ALS/FTD models. *Nat Commun* 11, 5580. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19396-3>.

Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168–176. <https://doi.org/10.1038/nature05453>.

Lema, S.C., Washburn, E.H., Crowley, M.E., Carvalho, P.G., Egelston, J.N., and McCormick, S.D. (2019). Evidence for a role of arginine vasotocin receptors in the gill during salinity acclimation by a euryhaline teleost fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 316, R735–R750. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00328.2018>.

Lesperance, M.M., Hall, J.W., San Agustin, T.B., and Leal, S.M. (2003). Mutations in the Wolfram syndrome type 1 gene (WFS1) define a clinical entity of dominant low-frequency sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129, 411–420. <https://doi.org/10.1001/archotol.129.4.411>.

Lev, S. (2012). Nonvesicular lipid transfer from the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a013300. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013300>.

Lewis, J.D., Ferrara, A., Peng, T., Hedderson, M., Bilker, W.B., Quesenberry, C.P., Vaughn, D.J., Nessel, L., Selby, J., and Strom, B.L. (2011). Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care* 34, 916–922. <https://doi.org/10.2337/dc10-1068>.

Lewis, R., Li, J., McCormick, P.J., L-H Huang, C., and Jeevaratnam, K. (2020). Is the sigma-1 receptor a potential pharmacological target for cardiac pathologies? A systematic review. *IJC Heart & Vasculature* 26, 100449. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2019.100449>.

Li, Z., Wu, F., Zhang, X., Chai, Y., Chen, D., Yang, Y., Xu, K., Yin, J., Li, R., Shi, H., et al. (2017). Valproate Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells via the AKT/GSK3 β Signaling Pathway. *Int J Mol Sci* 18, E315. <https://doi.org/10.3390/ijms18020315>.

Lieschke, G.J., and Currie, P.D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8, 353–367. <https://doi.org/10.1038/nrg2091>.

Lim, M.C., and Thai, A.C. (1990). A Chinese family with Wolfram syndrome presenting with rapidly progressing diabetic retinopathy and renal failure. *Ann Acad Med Singap* 19, 548–555. .

Lim, S., Strahl, T., Thorner, J., and Ames, J.B. (2011). Structure of a Ca²⁺-myristoyl switch protein that controls activation of a phosphatidylinositol 4-kinase in fission yeast. *J Biol Chem* 286, 12565–12577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.208868>.

Lindahl, M., Danilova, T., Palm, E., Lindholm, P., Vöikar, V., Hakonen, E., Ustinov, J., Andressoo, J.-O., Harvey, B.K., Otonkoski, T., et al. (2014). MANF is indispensable for the proliferation and survival of pancreatic β cells. *Cell Rep* 7, 366–375. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.023>.

Lipson, K.L., Fonseca, S.G., Ishigaki, S., Nguyen, L.X., Foss, E., Bortell, R., Rossini, A.A., and Urano, F. (2006). Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab* 4, 245–254.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.007>.

Liu, J., and Baraban, S.C. (2019). Network Properties Revealed during Multi-Scale Calcium Imaging of Seizure Activity in Zebrafish. *ENeuro* 6, ENEURO.0041-19.2019. <https://doi.org/10.1523/ENeuro.0041-19.2019>.

Liu, J., Tang, T.-S., Tu, H., Nelson, O., Herndon, E., Huynh, D.P., Pulst, S.M., and Bezprozvanny, I. (2009). Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 2. *J Neurosci* 29, 9148–9162. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0660-09.2009>.

Liu, L., Xia, M., Wang, J., Zhang, W., Zhang, Y., and He, M. (2014). CISD2 expression is a novel marker correlating with pelvic lymph node metastasis and prognosis in patients with early-stage cervical cancer. *Med Oncol* 31, 183. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0183-5>.

Liu, L.L., Wang, L., Zhong, Y.M., and Yang, X.L. (2010). Expression of sigma receptor 1 mRNA and protein in rat retina. *Neuroscience* 167, 1151–1159. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.006>.

Liu, Z., Li, S., Liang, Z., Zhao, Y., Zhang, Y., Yang, Y., Wang, M., and Li, F. (2013). Targeting β -secretase with RNAi in neural stem cells for Alzheimer's disease therapy. *Neural Regen Res* 8, 3095–3106. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.33.003>.

Lombardo, F., Salzano, G., Di Bella, C., Aversa, T., Pugliatti, F., Cara, S., Valenzise, M., De Luca, F., and Rigoli, L. (2014). Phenotypical and genotypical expression of Wolfram syndrome in 12 patients from a Sicilian district where this syndrome might not be so infrequent as generally expected. *J. Endocrinol. Invest.* 37, 195–202. <https://doi.org/10.1007/s40618-013-0039-4>.

de Lores Arnaiz, G.R., and Ordieres, M.G.L. (2014). Brain Na(+), K(+)-ATPase Activity In Aging and Disease. *Int J Biomed Sci* 10, 85–102. .

Lorincz, R., Emfinger, C.H., Walcher, A., Giolai, M., Krautgasser, C., Remedi, M.S., Nichols, C.G., and Meyer, D. (2018). In vivo monitoring of intracellular Ca²⁺ dynamics in the pancreatic β -cells of zebrafish embryos. *Islets* 10, 221–238. <https://doi.org/10.1080/19382014.2018.1540234>.

Lou Frances, G., Soto de Ruiz, S., López-Madrado Hernández, M.J., Macipe Costa, R., and Rodríguez Rigual, M. (2008). [Wolfram syndrome. Clinical and genetic study in two families]. *An Pediatr (Barc)* 68, 54–57. <https://doi.org/10.1157/13114472>.

Lu, P.D., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* 167, 27–33. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408003>.

Lu, S., Kanekura, K., Hara, T., Mahadevan, J., Spears, L.D., Oslowski, C.M., Martinez, R., Yamazaki-Inoue, M., Toyoda, M., Neilson, A., et al. (2014). A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E5292–E5301. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421055111>.

Luciani, D.S., Gwiazda, K.S., Yang, T.-L.B., Kalynyak, T.B., Bychkivska, Y., Frey, M.H.Z., Jeffrey, K.D., Sampaio, A.V., Underhill, T.M., and Johnson, J.D. (2009). Roles of IP3R and RyR Ca²⁺ channels in endoplasmic reticulum stress and beta-cell death. *Diabetes* 58, 422–432. <https://doi.org/10.2337/db07-1762>.

Lugar, H.M., Koller, J.M., Rutlin, J., Marshall, B.A., Kanekura, K., Urano, F., Bischoff, A.N., Shimony, J.S., and Hershey, T. (2016). Neuroimaging evidence of deficient axon myelination in Wolfram syndrome. *Sci Rep* 6, 21167. <https://doi.org/10.1038/srep21167>.

Luuk, H., Koks, S., Plaas, M., Hannibal, J., Rehfeld, J.F., and Vasar, E. (2008). Distribution of *Wfs1* protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *J. Comp. Neurol.* 509, 642–660. <https://doi.org/10.1002/cne.21777>.

Luuk, H., Plaas, M., Raud, S., Innos, J., Sütt, S., Lasner, H., Abramov, U., Kurrikoff, K., Kõks, S., and Vasar, E. (2009). *Wfs1*-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment. *Behav. Brain Res.* 198, 334–345. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.11.007>.

M

Mackay, J.P., and Crossley, M. (1998). Zinc fingers are sticking together. *Trends Biochem Sci* 23, 1–4. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(97\)01168-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(97)01168-7).

Maguire, A.M., Simonelli, F., Pierce, E.A., Pugh, E.N., Mingozzi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K.A., Testa, F., Surace, E.M., et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358, 2240–2248. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802315>.

Mancuso, R., Oliván, S., Rando, A., Casas, C., Osta, R., and Navarro, X. (2012). Sigma-1R Agonist Improves Motor Function and Motoneuron Survival in ALS Mice. *Neurotherapeutics* 9, 814–826. <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0140-y>.

Mannick, J.B., Del Giudice, G., Lattanzi, M., Valiante, N.M., Praestgaard, J., Huang, B., Lonetto, M.A., Maecker, H.T., Kovarik, J., Carson, S., et al. (2014). mTOR inhibition improves immune function in the elderly. *Sci Transl Med* 6, 268ra179. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009892>.

Mansilla, A., Chaves-Sanjuan, A., Campillo, N.E., Semelidou, O., Martínez-González, L., Infantes, L., González-Rubio, J.M., Gil, C., Conde, S., Skoulakis, E.M.C., et al. (2017). Interference of the complex between NCS-1 and *Ric8a* with phenothiazines regulates synaptic function and is an approach for fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E999–E1008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611089114>.

Marquardt, J.L. (1974). Diabetes Mellitus and Optic Atrophy: With Associated Findings of Diabetes Insipidus and Neurosensory Hearing Loss in Two Siblings. *Arch Intern Med* 134, 32. <https://doi.org/10.1001/archinte.1974.00320190034003>.

Marrazzo, A., Caraci, F., Salinaro, E.T., Su, T.-P., Copani, A., and Ronsisvalle, G. (2005). Neuroprotective effects of sigma-1 receptor agonists against beta-amyloid-induced toxicity. *Neuroreport* 16, 1223–1226. <https://doi.org/10.1097/00001756-200508010-00018>.

Martin, P., de Witte, P.A.M., Maurice, T., Gammaitoni, A., Farfel, G., and Galer, B. (2020). Fenfluramine acts as a positive modulator of sigma-1 receptors. *Epilepsy & Behavior* 105, 106989. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.106989>.

Martin, P., Maurice, T., Gammaitoni, A., Farfel, G., Boyd, B., and Galer, B. (2022).

Fenfluramine modulates the anti-amnesic effects induced by sigma-1 receptor agonists and neuro(active)steroids in vivo. *Epilepsy & Behavior* 127, 108526. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.108526>.

Martin, P.M., Ola, M.S., Agarwal, N., Ganapathy, V., and Smith, S.B. (2004). The sigma receptor ligand (+)-pentazocine prevents apoptotic retinal ganglion cell death induced in vitro by homocysteine and glutamate. *Brain Res Mol Brain Res* 123, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2003.12.019>.

Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E., and Gilbert, P.E. (1976). The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 197, 517–532. .

Martindale, J.J., Fernandez, R., Thuerauf, D., Whittaker, R., Gude, N., Sussman, M.A., and Glembotski, C.C. (2006). Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. *Circ. Res.* 98, 1186–1193. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000220643.65941.8d>.

Martone, M.E., Edelman, V.M., Ellisman, M.H., and Nef, P. (1999). Cellular and subcellular distribution of the calcium-binding protein NCS-1 in the central nervous system of the rat. *Cell Tissue Res.* 295, 395–407. <https://doi.org/10.1007/s004410051246>.

Mathew, L.K., Sengupta, S., Kawakami, A., Andreasen, E.A., Löhr, C.V., Loynes, C.A., Renshaw, S.A., Peterson, R.T., and Tanguay, R.L. (2007). Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics. *J Biol Chem* 282, 35202–35210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706640200>.

Matsumoto, R.R., Bowen, W.D., Tom, M.A., Vo, V.N., Truong, D.D., and De Costa, B.R. (1995). Characterization of two novel sigma receptor ligands: antidystonic effects in rats suggest sigma receptor antagonism. *Eur J Pharmacol* 280, 301–310. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00208-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00208-3).

Matsunaga, K., Tanabe, K., Inoue, H., Okuya, S., Ohta, Y., Akiyama, M., Taguchi, A., Kora, Y., Okayama, N., Yamada, Y., et al. (2014). Wolfram syndrome in the Japanese population; molecular analysis of WFS1 gene and characterization of clinical features. *PLoS ONE* 9, e106906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106906>.

Matto, V., Terasmaa, A., Vasar, E., and Kõks, S. (2011). Impaired striatal dopamine output of homozygous Wfs1 mutant mice in response to [K+] challenge. *J. Physiol. Biochem.* 67, 53–60. <https://doi.org/10.1007/s13105-010-0048-0>.

Maurice, T., and Gogvadze, N. (2017). Sigma-1 (σ 1) Receptor in Memory and Neurodegenerative Diseases. In *Sigma Proteins: Evolution of the Concept of Sigma Receptors*, F.J. Kim, and G.W. Pasternak, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 81–108.

Maurice, T., and Privat, A. (1997). SA4503, a novel cognitive enhancer with sigma1 receptor agonist properties, facilitates NMDA receptor-dependent learning in mice. *Eur J Pharmacol* 328, 9–18. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(97\)83020-8](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)83020-8).

Maurice, T., Hiramatsu, M., Itoh, J., Kameyama, T., Hasegawa, T., and Nabeshima, T. (1994a). Behavioral evidence for a modulating role of sigma ligands in memory processes. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)-induced amnesia. *Brain Res* 647,

44–56. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91397-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91397-8).

Maurice, T., Su, T.P., Parish, D.W., Nabeshima, T., and Privat, A. (1994b). PRE-084, a sigma selective PCP derivative, attenuates MK-801-induced impairment of learning in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 49, 859–869. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90235-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90235-6).

Maurice, T., Su, T.-P., Parish, D.W., and Privat, A. (1995). Prevention of nimodipine-induced impairment of learning by the selective σ ligand PRE-084. *J. Neural Transmission* 102, 1–18. <https://doi.org/10.1007/BF01276561>.

Maurice, T., Roman, F.J., and Privat, A. (1996). Modulation by neurosteroids of the in vivo (+)-[3H]SKF-10,047 binding to sigma 1 receptors in the mouse forebrain. *J Neurosci Res* 46, 734–743. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19961215\)46:6<734::AID-JNR10>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19961215)46:6<734::AID-JNR10>3.0.CO;2-U).

Maurice, T., Su, T.-P., and Privat, A. (1998). Sigma1 (σ 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate β 25–35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. *Neuroscience* 83, 413–428. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00405-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00405-3).

Maurice, T., Urani, A., Phan, V.L., and Romieu, P. (2001). The interaction between neuroactive steroids and the sigma1 receptor function: behavioral consequences and therapeutic opportunities. *Brain Res Brain Res Rev* 37, 116–132. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(01\)00112-6](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(01)00112-6).

Maurice, T., Casalino, M., Lacroix, M., and Romieu, P. (2003). Involvement of the sigma1 receptor in the motivational effects of ethanol in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 74, 869–876. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(03\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(03)00002-9).

Maurice, T., Volle, J.-N., Strehaiano, M., Crouzier, L., Pereira, C., Kaloyanov, N., Virieux, D., and Pirat, J.-L. (2019). Neuroprotection in non-transgenic and transgenic mouse models of Alzheimer's disease by positive modulation of σ 1 receptors. *Pharmacological Research* 144, 315–330. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.04.026>.

Mavlyutov, T.A., Epstein, M.L., Andersen, K.A., Ziskind-Conhaim, L., and Ruoho, A.E. (2010). The sigma-1 receptor is enriched in postsynaptic sites of C-terminals in mouse motoneurons. An anatomical and behavioral study. *Neuroscience* 167, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.022>.

Mavlyutov, T.A., Nickells, R.W., and Guo, L.-W. (2011). Accelerated retinal ganglion cell death in mice deficient in the Sigma-1 receptor. *Mol Vis* 17, 1034–1043. .

Mavlyutov, T.A., Epstein, M.L., Verbny, Y.I., Huerta, M.S., Zaitoun, I., Ziskind-Conhaim, L., and Ruoho, A.E. (2013). Lack of sigma-1 receptor exacerbates ALS progression in mice. *Neuroscience* 240, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.035>.

Mavlyutov, T.A., Epstein, M., and Guo, L.-W. (2015). Subcellular Localization of the Sigma-1 Receptor in Retinal Neurons — an Electron Microscopy Study. *Sci Rep* 5, 10689. <https://doi.org/10.1038/srep10689>.

Mavlyutov, T., Chen, X., Guo, L., and Yang, J. (2018). APEX2- tagging of Sigma 1- receptor indicates subcellular protein topology with cytosolic N-terminus and ER luminal C-terminus. *Protein Cell* 9, 733–737. <https://doi.org/10.1007/s13238-017->

0468-5.

Mayer, M.L., and Westbrook, G.L. (1987). The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 28, 197–276. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(87\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0301-0082(87)90011-6).

McBain, C.J., and Mayer, M.L. (1994). N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* 74, 723–760. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.3.723>.

McFadzean, I., and Gibson, A. (2002). The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 135, 1–13. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704468>.

McFerran, B.W., Graham, M.E., and Burgoyne, R.D. (1998). Neuronal Ca²⁺ Sensor 1, the Mammalian Homologue of Frequentin, Is Expressed in Chromaffin and PC12 Cells and Regulates Neurosecretion from Dense-core Granules. *Journal of Biological Chemistry* 273, 22768–22772. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.35.22768>.

McFerran, B.W., Weiss, J.L., and Burgoyne, R.D. (1999). Neuronal Ca(2+) sensor 1. Characterization of the myristoylated protein, its cellular effects in permeabilized adrenal chromaffin cells, Ca(2+)-independent membrane association, and interaction with binding proteins, suggesting a role in rapid Ca(2+) signal transduction. *J Biol Chem* 274, 30258–30265. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.30258>.

McLean, S., and Weber, E. (1988). Autoradiographic visualization of haloperidol-sensitive sigma receptors in guinea-pig brain. *Neuroscience* 25, 259–269. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90024-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90024-3).

Mearini, G., Stimpel, D., Geertz, B., Weinberger, F., Krämer, E., Schlossarek, S., Mourot-Filiatre, J., Stoehr, A., Dutsch, A., Wijnker, P.J.M., et al. (2014). Mybpc3 gene therapy for neonatal cardiomyopathy enables long-term disease prevention in mice. *Nat Commun* 5, 5515. <https://doi.org/10.1038/ncomms6515>.

Medlej, R., Wasson, J., Baz, P., Azar, S., Salti, I., Loiselet, J., Permutt, A., and Halaby, G. (2004). Diabetes mellitus and optic atrophy: a study of Wolfram syndrome in the Lebanese population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 1656–1661. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-030015>.

Mei, J., and Pasternak, G.W. (2001). Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma1 receptor. *Biochem Pharmacol* 62, 349–355. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(01\)00666-9](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(01)00666-9).

Mei, J., and Pasternak, G.W. (2002). Sigma1 receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 1070–1074. <https://doi.org/10.1124/jpet.300.3.1070>.

Mei, J., and Pasternak, G.W. (2007). Modulation of brainstem opiate analgesia in the rat by sigma 1 receptors: a microinjection study. *J Pharmacol Exp Ther* 322, 1278–1285. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.121137>.

Meldolesi, J., and Pozzan, T. (1987). Pathways of Ca²⁺ influx at the plasma membrane: Voltage-, receptor-, and second messenger-operated channels. *Experimental Cell Research* 171, 271–283. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(87\)90161-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(87)90161-3).

Meunier, J., and Hayashi, T. (2010). Sigma-1 receptors regulate Bcl-2 expression by reactive oxygen species-dependent transcriptional regulation of nuclear factor kappaB.

J Pharmacol Exp Ther 332, 388–397. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.160960>.

Meunier, J., Ieni, J., and Maurice, T. (2006). The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid beta₂₅₋₃₅ peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma₁ receptor. *Br J Pharmacol* 149, 998–1012. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706927>.

Milan, D.J., Peterson, T.A., Ruskin, J.N., Peterson, R.T., and MacRae, C.A. (2003). Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish. *Circulation* 107, 1355–1358. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000061912.88753.87>.

Miniarikova, J., Evers, M.M., and Konstantinova, P. (2018). Translation of MicroRNA-Based Huntington-Lowering Therapies from Preclinical Studies to the Clinic. *Mol Ther* 26, 947–962. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.02.002>.

Mir, S.A., S, B.A., Shah, P.A., Hameed, I., and Ali, I. (2016). Cardiac abnormalities and Wolfram (DIDMOAD) syndrome: a case report. *Int J Diabetes Dev Ctries* 36, 136–138. <https://doi.org/10.1007/s13410-015-0445-6>.

Mishra, A.K., Mavlyutov, T., Singh, D.R., Biener, G., Yang, J., Oliver, J.A., Ruoho, A., and Raicu, V. (2015). The sigma-1 receptors are present in monomeric and oligomeric forms in living cells in the presence and absence of ligands. *Biochem J* 466, 263–271. <https://doi.org/10.1042/BJ20141321>.

Mitsuda, T., Omi, T., Tanimukai, H., Sakagami, Y., Tagami, S., Okochi, M., Kudo, T., and Takeda, M. (2011). Sigma-1Rs are upregulated via PERK/eIF2 α /ATF4 pathway and execute protective function in ER stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 415, 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.113>.

Mo, W., Chen, F., Nechiporuk, A., and Nicolson, T. (2010). Quantification of vestibular-induced eye movements in zebrafish larvae. *BMC Neuroscience* 11, 110. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-110>.

Mody, I., and MacDonald, J.F. (1995). NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends Pharmacol Sci* 16, 356–359. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)89070-7](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)89070-7).

Molina, J., Rodriguez-Diaz, R., Fachado, A., Jacques-Silva, M.C., Berggren, P.-O., and Caicedo, A. (2014). Control of insulin secretion by cholinergic signaling in the human pancreatic islet. *Diabetes* 63, 2714–2726. <https://doi.org/10.2337/db13-1371>.

Moon, H.-S., Jacobson, E.M., Khersonsky, S.M., Luzung, M.R., Walsh, D.P., Xiong, W., Lee, J.W., Parikh, P.B., Lam, J.C., Kang, T.-W., et al. (2002). A novel microtubule destabilizing entity from orthogonal synthesis of triazine library and zebrafish embryo screening. *J Am Chem Soc* 124, 11608–11609. <https://doi.org/10.1021/ja026720i>.

Moore, J. (1971). Juvenile diabetes mellitus, diabetes insipidus and neurological abnormalities. *Proc R Soc Med* 64. .

Mori, T., Hayashi, T., and Su, T.-P. (2012). Compromising σ -1 receptors at the endoplasmic reticulum render cytotoxicity to physiologically relevant concentrations of dopamine in a nuclear factor- κ B/Bcl-2-dependent mechanism: potential relevance to Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 341, 663–671. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.190868>.

Mori, T., Hayashi, T., Hayashi, E., and Su, T.-P. (2013). Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling

for cellular survival. *PLoS One* 8, e76941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076941>.

Morihara, R., Yamashita, T., Liu, X., Nakano, Y., Fukui, Y., Sato, K., Ohta, Y., Hishikawa, N., Shang, J., and Abe, K. (2018). Protective effect of a novel sigma-1 receptor agonist is associated with reduced endoplasmic reticulum stress in stroke male mice. *J Neurosci Res* 96, 1707–1716. <https://doi.org/10.1002/jnr.24270>.

Morikawa, S., Tajima, T., Nakamura, A., Ishizu, K., and Ariga, T. (2017). A novel heterozygous mutation of the WFS1 gene leading to constitutive endoplasmic reticulum stress is the cause of Wolfram syndrome. *Pediatr Diabetes* 18, 934–941. <https://doi.org/10.1111/pedi.12513>.

Morin-Surun, M.P., Collin, T., Denavit-Saubié, M., Baulieu, E.E., and Monnet, F.P. (1999). Intracellular sigma1 receptor modulates phospholipase C and protein kinase C activities in the brainstem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8196–8199. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8196>.

Morishita, T., Tsutsui, M., Shimokawa, H., Sabanai, K., Tasaki, H., Suda, O., Nakata, S., Tanimoto, A., Wang, K.-Y., Ueta, Y., et al. (2005). Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10616–10621. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502236102>.

Morris, S., Cholan, P.M., Britton, W.J., and Oehlers, S.H. (2021). Glucose inhibits haemostasis and accelerates diet-induced hyperlipidaemia in zebrafish larvae. *Sci Rep* 11, 19049. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98566-9>.

Motawe, Z.Y., Abdelmaboud, S.S., Cuevas, J., and Breslin, J.W. (2020). PRE-084 as a tool to uncover potential therapeutic applications for selective sigma-1 receptor activation. *Int J Biochem Cell Biol* 126, 105803. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105803>.

Mozzillo, E., Delvecchio, M., Carella, M., Grandone, E., Palumbo, P., Salina, A., Aloï, C., Buono, P., Izzo, A., D'Annunzio, G., et al. (2014). A novel CISD2 intragenic deletion, optic neuropathy and platelet aggregation defect in Wolfram syndrome type 2. *BMC Med Genet* 15, 88. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-15-88>.

Multani, P.K., Clarke, T.-K., Narasimhan, S., Ambrose-Lanci, L., Kampman, K.M., Pettinati, H.M., Oslin, D.W., O'Brien, C.P., Berrettini, W.H., and Lohoff, F.W. (2012). Neuronal calcium sensor-1 and cocaine addiction: a genetic association study in African-Americans and European Americans. *Neurosci Lett* 531, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.09.014>.

Mun, H.-S., Saab, B.J., Ng, E., McGirr, A., Lipina, T.V., Gondo, Y., Georgiou, J., and Roder, J.C. (2015). Self-directed exploration provides a Ncs1-dependent learning bonus. *Sci Rep* 5, 17697. <https://doi.org/10.1038/srep17697>.

Muñoz-Sánchez, S., van der Vaart, M., and Meijer, A.H. (2020). Autophagy and Lc3-Associated Phagocytosis in Zebrafish Models of Bacterial Infections. *Cells* 9, 2372. <https://doi.org/10.3390/cells9112372>.

Murphy, M.P., and Hartley, R.C. (2018). Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nat Rev Drug Discov* 17, 865–886. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.174>.

Muto, A., and Kawakami, K. (2011). Imaging functional neural circuits in zebrafish with

a new GCaMP and the Gal4FF-UAS system. *Communicative & Integrative Biology* 4, 566–568. <https://doi.org/10.4161/cib.15848>.

Muto, A., Ohkura, M., Kotani, T., Higashijima, S. -i., Nakai, J., and Kawakami, K. (2011). Genetic visualization with an improved GCaMP calcium indicator reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 5425–5430. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000887108>.

Mysona, B.A., Zhao, J., Smith, S., and Bollinger, K.E. (2018). Relationship between Sigma-1 receptor and BDNF in the visual system. *Exp Eye Res* 167, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.10.012>.

N

Najjar, S., and Mahmud, J. (1968). Diabetes insipidus and diabetes mellitus in a six-year-old girl. *J Pediatr* 2. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(68\)80079-4](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(68)80079-4).

Najjar, S.S., Saikaly, M.G., Zaytoun, G.M., and Abdelnoor, A. (1985). Association of diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, and deafness. The Wolfram or DIDMOAD syndrome. *Arch Dis Child* 60, 823–828. .

Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19, 137–141. <https://doi.org/10.1038/84397>.

Nakamura, T.Y., Sturm, E., Pountney, D.J., Orenzoff, B., Artman, M., and Coetzee, W.A. (2003). Developmental expression of NCS-1 (frequenin), a regulator of Kv4 K⁺ channels, in mouse heart. *Pediatr Res* 53, 554–557. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000057203.72435.C9>.

Nakamura, T.Y., Jeromin, A., Smith, G., Kurushima, H., Koga, H., Nakabeppu, Y., Wakabayashi, S., and Nabekura, J. (2006). Novel role of neuronal Ca²⁺ sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. *J. Cell Biol.* 172, 1081–1091. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508156>.

Nakamura, T.Y., Nakao, S., and Wakabayashi, S. (2016). Neuronal Ca²⁺ sensor-1 contributes to stress tolerance in cardiomyocytes via activation of mitochondrial detoxification pathways. *J Mol Cell Cardiol* 99, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.08.013>.

Nakamura, T.Y., Nakao, S., Nakajo, Y., Takahashi, J.C., Wakabayashi, S., and Yanamoto, H. (2017). Possible Signaling Pathways Mediating Neuronal Calcium Sensor-1-Dependent Spatial Learning and Memory in Mice. *PLoS One* 12, e0170829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170829>.

Nakamura, T.Y., Nakao, S., and Wakabayashi, S. (2019). Emerging Roles of Neuronal Ca²⁺ Sensor-1 in Cardiac and Neuronal Tissues: A Mini Review. *Front Mol Neurosci* 12, 56. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00056>.

Nakao, S., Wakabayashi, S., and Nakamura, T.Y. (2015). Stimulus-Dependent Regulation of Nuclear Ca²⁺ Signaling in Cardiomyocytes: A Role of Neuronal Calcium Sensor-1. *PLoS ONE* 10, e0125050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125050>.

Narita, N., Hashimoto, K., Tomitaka, S., and Minabe, Y. (1996). Interactions of

selective serotonin reuptake inhibitors with subtypes of sigma receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol* 307, 117–119. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00254-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00254-3).

Nault, J.-C., Paradis, V., Cherqui, D., Vilgrain, V., and Zucman-Rossi, J. (2017). Molecular classification of hepatocellular adenoma in clinical practice. *Journal of Hepatology* 67, 1074–1083. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.07.009>.

Navarro, G., Moreno, E., Aymerich, M., Marcellino, D., McCormick, P.J., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Canela, E.I., Ortiz, J., et al. (2010). Direct involvement of σ -1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18676–18681. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008911107>.

Navarro, G., Moreno, E., Bonaventura, J., Brugarolas, M., Farré, D., Aguinaga, D., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Lluís, C., et al. (2013). Cocaine inhibits dopamine D2 receptor signaling via sigma-1-D2 receptor heteromers. *PLoS One* 8, e61245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061245>.

Nef, S., Fiumelli, H., de Castro, E., Raes, M.B., and Nef, P. (1995). Identification of neuronal calcium sensor (NCS-1) possibly involved in the regulation of receptor phosphorylation. *J Recept Signal Transduct Res* 15, 365–378. <https://doi.org/10.3109/10799899509045227>.

Negre, O., Bartholomae, C., Beuzard, Y., Cavazzana, M., Christiansen, L., Courne, C., Deichmann, A., Denaro, M., de Dreuzy, E., Finer, M., et al. (2015). Preclinical evaluation of efficacy and safety of an improved lentiviral vector for the treatment of β -thalassemia and sickle cell disease. *Curr Gene Ther* 15, 64–81. <https://doi.org/10.2174/1566523214666141127095336>.

Ng, E., Varaschin, R.K., Su, P., Browne, C.J., Hermainski, J., Le Foll, B., Pongs, O., Liu, F., Trudeau, L.-E., Roder, J.C., et al. (2016). Neuronal calcium sensor-1 deletion in the mouse decreases motivation and dopamine release in the nucleus accumbens. *Behav Brain Res* 301, 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.12.037>.

Ng, E., Georgiou, J., Avila, A., Trought, K., Mun, H.-S., Hodgson, M., Servinis, P., Roder, J.C., Collingridge, G.L., and Wong, A.H.C. (2020). Mice lacking neuronal calcium sensor-1 show social and cognitive deficits. *Behav Brain Res* 381, 112420. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112420>.

Nguyen, L.D., Fischer, T.T., Abreu, D., Arroyo, A., Urano, F., and Ehrlich, B.E. (2020). Calpain inhibitor and ibudilast rescue β cell functions in a cellular model of Wolfram syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 17389–17398. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007136117>.

Nicolson, T. (2005). The genetics of hearing and balance in zebrafish. *Annu. Rev. Genet.* 39, 9–22. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.105049>.

Nissen, S.E., and Wolski, K. (2010). Rosiglitazone Revisited: An Updated Meta-analysis of Risk for Myocardial Infarction and Cardiovascular Mortality. *Archives of Internal Medicine* 170, 1191–1201. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2010.207>.

Noguchi, Y., Yashima, T., Hatanaka, A., Uzawa, M., Yasunami, M., Kimura, A., and Kitamura, K. (2005). A mutation in Wolfram syndrome type 1 gene in a Japanese family with autosomal dominant low-frequency sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol* 125, 1189–1194. <https://doi.org/10.1080/00016480510044232>.

Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., and Ron, D. (2001). Feedback inhibition of the

unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* 153, 1011–1022. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.5.1011>.

O

Oakes, S.A., and Papa, F.R. (2015). The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 10, 173–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104649>.

Okuyama, S., and Nakazato, A. (2006). NE-100: A Novel Sigma Receptor Antagonist. *CNS Drug Reviews* 2, 226–237. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.1996.tb00299.x>.

Okuyama, S., Ogawa, S., Nakazato, A., and Tomizawa, K. (1995). Effect of NE-100, a novel sigma receptor ligand, on phencyclidine- induced delayed cognitive dysfunction in rats. *Neurosci Lett* 189, 60–62. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11440-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11440-8).

Ola, M.S., Moore, P., El-Sherbeny, A., Roon, P., Agarwal, N., Sarthy, V.P., Casellas, P., Ganapathy, V., and Smith, S.B. (2001). Expression pattern of sigma receptor 1 mRNA and protein in mammalian retina. *Brain Res Mol Brain Res* 95, 86–95. .

Ola, M.S., Moore, P., Maddox, D., El-Sherbeny, A., Huang, W., Roon, P., Agarwal, N., Ganapathy, V., and Smith, S.B. (2002). Analysis of sigma receptor (sigmaR1) expression in retinal ganglion cells cultured under hyperglycemic conditions and in diabetic mice. *Brain Res Mol Brain Res* 107, 97–107. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(02\)00444-8](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(02)00444-8).

Olafsson, P., Wang, T., and Lu, B. (1995). Molecular cloning and functional characterization of the *Xenopus* Ca(2+)-binding protein frequenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8001–8005. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.8001>.

Olafsson, P., Soares, H.D., Herzog, K.H., Wang, T., Morgan, J.I., and Lu, B. (1997). The Ca²⁺ binding protein, frequenin is a nervous system-specific protein in mouse preferentially localized in neurites. *Brain Res Mol Brain Res* 44, 73–82. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(96\)00188-x](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(96)00188-x).

Omi, T., Tanimukai, H., Kanayama, D., Sakagami, Y., Tagami, S., Okochi, M., Morihara, T., Sato, M., Yanagida, K., Kitasyoji, A., et al. (2014). Fluvoxamine alleviates ER stress via induction of Sigma-1 receptor. *Cell Death Dis* 5, e1332–e1332. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.301>.

Ono, Y., Tanaka, H., Takata, M., Nagahara, Y., Noda, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hozumi, I., and Hara, H. (2014). SA4503, a sigma-1 receptor agonist, suppresses motor neuron damage in in vitro and in vivo amyotrophic lateral sclerosis models. *Neurosci Lett* 559, 174–178. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.005>.

Ortega-Roldan, J.L., Ossa, F., Amin, N.T., and Schnell, J.R. (2015). Solution NMR studies reveal the location of the second transmembrane domain of the human sigma-1 receptor. *FEBS Lett* 589, 659–665. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.01.033>.

Oslowski, C.M., and Urano, F. (2011). The binary switch that controls the life and death decisions of ER stressed beta cells. *Curr Opin Cell Biol* 23, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.11.005>.

Osman, A.A., Saito, M., Makepeace, C., Permutt, M.A., Schlesinger, P., and Mueckler, M. (2003). Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic

reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J. Biol. Chem.* 278, 52755–52762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310331200>.

Oxombre, B., Lee-Chang, C., Duhamel, A., Toussaint, M., Giroux, M., Donnier-Maréchal, M., Carato, P., Lefranc, D., Zéphir, H., Prin, L., et al. (2015). High-affinity $\sigma 1$ protein agonist reduces clinical and pathological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Br J Pharmacol* 172, 1769–1782. <https://doi.org/10.1111/bph.13037>.

P

Paillusson, S., Stoica, R., Gomez-Suaga, P., Lau, D.H.W., Mueller, S., Miller, T., and Miller, C.C.J. (2016). There's Something Wrong with my MAM; the ER-Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases. *Trends Neurosci.* 39, 146–157. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.01.008>.

Pakdemirli, E., Karabulut, N., Bir, L.S., and Sermez, Y. (2005). Cranial magnetic resonance imaging of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Australas Radiol* 49, 189–191. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1673.2005.01420.x>.

Pal, A., Hajipour, A.R., Fontanilla, D., Ramachandran, S., Chu, U.B., Mavlyutov, T., and Ruoho, A.E. (2007). Identification of Regions of the σ -1 Receptor Ligand Binding Site Using a Novel Photoprobe. *Mol Pharmacol* 72, 921–933. <https://doi.org/10.1124/mol.107.038307>.

Pal, A., Fontanilla, D., Gopalakrishnan, A., Chae, Y.-K., Markley, J.L., and Ruoho, A.E. (2012). The sigma-1 receptor protects against cellular oxidative stress and activates antioxidant response elements. *Eur J Pharmacol* 682, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.01.030>.

Palmer, C.P., Mahen, R., Schnell, E., Djamgoz, M.B.A., and Aydar, E. (2007). Sigma-1 Receptors Bind Cholesterol and Remodel Lipid Rafts in Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Res* 67, 11166–11175. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1771>.

Pan, Y.X., Mei, J., Xu, J., Wan, B.L., Zuckerman, A., and Pasternak, G.W. (1998). Cloning and characterization of a mouse sigma1 receptor. *J Neurochem* 70, 2279–2285. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70062279.x>.

Pande, A.C., Geneve, J., and Scherrer, B. (1998). Igmesine, a novel ligand, has antidepressant properties. (Glasgow).

Parakh, S., and Atkin, J.D. (2021). The Mitochondrial-associated ER membrane (MAM) compartment and its dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Semin Cell Dev Biol* 112, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.02.002>.

Pasinelli, P., Belford, M.E., Lennon, N., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., Trotti, D., and Brown, R.H. (2004). Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated SOD1 Mutant Proteins Bind and Aggregate with Bcl-2 in Spinal Cord Mitochondria. *Neuron* 43, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.021>.

Patergnani, S., Marchi, S., Rimessi, A., Bonora, M., Giorgi, C., Mehta, K.D., and Pinton, P. (2013). PRKCB/protein kinase C, beta and the mitochondrial axis as key regulators of autophagy. *Autophagy* 9, 1367–1385. <https://doi.org/10.4161/auto.25239>.

Paterlini, M., Revilla, V., Grant, A.L., and Wisden, W. (2000). Expression of the neuronal calcium sensor protein family in the rat brain. *Neuroscience* 99, 205–216. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00201-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00201-3).

Paul-Pletzer, K., Palnitkar, S.S., Jimenez, L.S., Morimoto, H., and Parness, J. (2001). The skeletal muscle ryanodine receptor identified as a molecular target of [3H]azidodantrolene by photoaffinity labeling. *Biochemistry* 40, 531–542. <https://doi.org/10.1021/bi001502s>.

Peden, N.R., GAY, J.D.L., JUNG, R.T., and KUWAYTI, K. (1986). Wolfram (DIDMOAD) Syndrome: A Complex Long-term Problem in Management. *QJM: An International Journal of Medicine* 58, 167–180. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.qjmed.a067948>.

Pedrini, S., Sau, D., Guareschi, S., Bogush, M., Brown, R.H., Jr, Naniche, N., Kia, A., Trotti, D., and Pasinelli, P. (2010). ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Human Molecular Genetics* 19, 2974–2986. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq202>.

Peeters, M., Romieu, P., Maurice, T., Su, T.-P., Maloteaux, J.-M., and Hermans, E. (2004). Involvement of the sigma1 receptor in the modulation of dopaminergic transmission by amantadine. *European Journal of Neuroscience* 19, 2212–2220. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03297.x>.

Peng, X., Lin, J., Zhu, Y., Liu, X., Zhang, Y., Ji, Y., Yang, X., Zhang, Y., Guo, N., and Li, Q. (2016). Anxiety-related behavioral responses of pentylentetrazole-treated zebrafish larvae to light-dark transitions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 145, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.03.010>.

Pennings, R.J.E., Huygen, P.L.M., van den Ouweland, J.M.W., Cryns, K., Dikkeschei, L.D., Van Camp, G., and Cremers, C.W.R.J. (2004). Sex-related hearing impairment in Wolfram syndrome patients identified by inactivating WFS1 mutations. *Audiol Neurootol* 9, 51–62. <https://doi.org/10.1159/000074187>.

Peterson, R.T., Link, B.A., Dowling, J.E., and Schreiber, S.L. (2000). Small molecule developmental screens reveal the logic and timing of vertebrate development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 12965–12969. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.24.12965>.

Petrova, P., Raibekas, A., Pevsner, J., Vigo, N., Anafi, M., Moore, M.K., Peaire, A.E., Shridhar, V., Smith, D.I., Kelly, J., et al. (2003). MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. *J Mol Neurosci* 20, 173–188. <https://doi.org/10.1385/jmn:20:2:173>.

Peviani, M., Salvaneschi, E., Bontempi, L., Petese, A., Manzo, A., Rossi, D., Salmona, M., Collina, S., Bigini, P., and Curti, D. (2014). Neuroprotective effects of the Sigma-1 receptor (S1R) agonist PRE-084, in a mouse model of motor neuron disease not linked to SOD1 mutation. *Neurobiology of Disease* 62, 218–232. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.10.010>.

Phan, V.L., Su, T.P., Privat, A., and Maurice, T. (1999). Modulation of steroidal levels by adrenalectomy/castration and inhibition of neurosteroid synthesis enzymes affect sigma1 receptor-mediated behaviour in mice. *Eur J Neurosci* 11, 2385–2396. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00656.x>.

Phan, V.-L., Urani, A., Romieu, P., and Maurice, T. (2002). Strain differences in sigma(1) receptor-mediated behaviours are related to neurosteroid levels. *Eur J Neurosci* 15, 1523–1534. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.01989.x>.

Phillips, J.B., and Westerfield, M. (2014). Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. *Dis Model Mech* 7, 739–743. <https://doi.org/10.1242/dmm.015545>.

Pilley, S.F., and Thompson, H.S. (1976). Familial syndrome of diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, and deafness (didmoad) in childhood. *Br J Ophthalmol* 60, 294–298. <https://doi.org/10.1136/bjo.60.4.294>.

Plaas, M., Seppa, K., Reimets, R., Jagomäe, T., Toots, M., Koppel, T., Vallisoo, T., Nigul, M., Heinla, I., Meier, R., et al. (2017). Wfs1- deficient rats develop primary symptoms of Wolfram syndrome: insulin-dependent diabetes, optic nerve atrophy and medullary degeneration. *Sci Rep* 7, 10220. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09392-x>.

Polymeropoulos, M.H., Swift, R.G., and Swift, M. (1994). Linkage of the gene for Wolfram syndrome to markers on the short arm of chromosome 4. *Nat. Genet* 95–97. .

Pongs, O., Lindemeier, J., Zhu, X.R., Theil, T., Engelkamp, D., Krah-Jentgens, I., Lambrecht, H.G., Koch, K.W., Schwemer, J., and Rivosecchi, R. (1993). Frequentin--a novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the Drosophila nervous system. *Neuron* 11, 15–28. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90267-u](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90267-u).

Poston, C.N., Krishnan, S.C., and Bazemore-Walker, C.R. (2013). In-depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM). *J Proteomics* 79, 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.018>.

Pourtoy-Brasselet, S., Sciauvaud, A., Boza-Moran, M.-G., Cailleret, M., Jarrige, M., Polvèche, H., Polentes, J., Chevet, E., Martinat, C., Peschanski, M., et al. (2021). Human iPSC-derived neurons reveal early developmental alteration of neurite outgrowth in the late-occurring neurodegenerative Wolfram syndrome. *Am J Hum Genet* 108, 2171–2185. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.10.001>.

Prasad, P.D., Li, H.W., Fei, Y.J., Ganapathy, M.E., Fujita, T., Plumley, L.H., Yang-Feng, T.L., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (1998). Exon-intron structure, analysis of promoter region, and chromosomal localization of the human type 1 sigma receptor gene. *J Neurochem* 70, 443–451. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70020443.x>.

Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Muthane, U., Jiang, H., Ferreira, M., Naini, A.B., and Fahn, S. (1993). Chronic levodopa administration alters cerebral mitochondrial respiratory chain activity. *Ann Neurol* 34, 715–723. <https://doi.org/10.1002/ana.410340515>.

Puca, A.A., Daly, M.J., Brewster, S.J., Matise, T.C., Barrett, J., Shea-Drinkwater, M., Kang, S., Joyce, E., Nicoli, J., Benson, E., et al. (2001). A genome-wide scan for linkage to human exceptional longevity identifies a locus on chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10505–10508. <https://doi.org/10.1073/pnas.181337598>.

Putney, J.W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1–12. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0143-4160(86)90026-6).

R

- Raiti, S., and Newns, G.H. (1963). Diabetes melitus and insipidus in two sisters. *Br Med J* 2, 1625–1629. .
- Ramalingam, M., Huh, Y.-J., and Lee, Y.-I. (2019). The Impairments of α -Synuclein and Mechanistic Target of Rapamycin in Rotenone-Induced SH-SY5Y Cells and Mice Model of Parkinson's Disease. *Front Neurosci* 13, 1028. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01028>.
- Rando, T.A., Horton, J.C., and Layzer, R.B. (1992). Wolfram syndrome: evidence of a diffuse neurodegenerative disease by magnetic resonance imaging. *Neurology* 42, 1220–1224. <https://doi.org/10.1212/wnl.42.6.1220>.
- Raturi, A., and Simmen, T. (2013). Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta* 1833, 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.013>.
- Rendtorff, N.D., Lodahl, M., Boulahbel, H., Johansen, I.R., Pandya, A., Welch, K.O., Norris, V.W., Arnos, K.S., Bitner-Glindzicz, M., Emery, S.B., et al. (2011). Identification of p.A684V missense mutation in the WFS1 gene as a frequent cause of autosomal dominant optic atrophy and hearing impairment. *American Journal of Medical Genetics Part A* 155, 1298–1313. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33970>.
- Rennekamp, A.J., Huang, X.-P., Wang, Y., Patel, S., Lorello, P.J., Cade, L., Gonzales, A.P.W., Yeh, J.-R.J., Caldarone, B.J., Roth, B.L., et al. (2016). Sigma-1 receptor ligands control a switch between passive and active threat responses. *Nat Chem Biol* 12, 552–558. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2089>.
- Reynolds, A.J., Bartlett, S.E., and Morgans, C. (2001). The distribution of neuronal calcium sensor-1 protein in the developing and adult rat retina. *Neuroreport* 12, 725–728. <https://doi.org/10.1097/00001756-200103260-00022>.
- de Rezende, V.B., Rosa, D.V., Comim, C.M., Magno, L.A.V., Rodrigues, A.L.S., Vidigal, P., Jeromin, A., Quevedo, J., and Romano-Silva, M.A. (2014). NCS-1 deficiency causes anxiety and depressive-like behavior with impaired non-aversive memory in mice. *Physiol Behav* 130, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.03.005>.
- Riahi, Y., Israeli, T., Cerasi, E., and Leibowitz, G. (2018). Effects of proinsulin misfolding on β -cell dynamics, differentiation and function in diabetes. *Diabetes Obes Metab* 20 Suppl 2, 95–103. <https://doi.org/10.1111/dom.13379>.
- Riggs, A.C., Bernal-Mizrachi, E., Ohsugi, M., Wasson, J., Fatrai, S., Welling, C., Murray, J., Schmidt, R.E., Herrera, P.L., and Permutt, M.A. (2005). Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia* 48, 2313–2321. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1947-4>.
- Rigoli, L., and Di Bella, C. (2012). Wolfram syndrome 1 and Wolfram syndrome 2. *Curr Opin. Pediatr.* 24, 512–517. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e328354ccdf>.
- Rigoli, L., Caruso, V., Salzano, G., and Lombardo, F. (2004). Wolfram Syndrome 1: From Genetics to Therapy. *IJERPH* 1, 1–2. <https://doi.org/10.3390/ijerph2004010001>.
- Rigoli, L., Bramanti, P., Di Bella, C., and De Luca, F. (2018). Genetic and clinical

aspects of Wolfram syndrome 1, a severe neurodegenerative disease. *Pediatr. Res.* 83, 921–929. <https://doi.org/10.1038/pr.2018.17>.

Rigoli, L., Aloï, C., Salina, A., Di Bella, C., Salzano, G., Caruso, R., Mazzon, E., Maghnie, M., Patti, G., D'Annunzio, G., et al. (2020). Wolfram syndrome 1 in the Italian population: genotype–phenotype correlations. *Pediatr Res* 87, 456–462. <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0487-4>.

Riley, B.B., and Moorman, S.J. (2000). Development of utricular otoliths, but not saccular otoliths, is necessary for vestibular function and survival in zebrafish. *J. Neurobiol.* 43, 329–337. [https://doi.org/10.1002/1097-4695\(20000615\)43:4<329::aid-neu2>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-4695(20000615)43:4<329::aid-neu2>3.0.co;2-h).

Rivosecchi, R., Pongs, O., Theil, T., and Mallart, A. (1994). Implication of frequenin in the facilitation of transmitter release in *Drosophila*. *J Physiol* 474, 223–232. .

Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280, 1763–1766. <https://doi.org/10.1126/science.280.5370.1763>.

Rizzuto, R., Duchen, M.R., and Pozzan, T. (2004). Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison. *Sci STKE* 2004, re1. <https://doi.org/10.1126/stke.2152004re1>.

Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 566–578. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>.

Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., Herrero-Labrador, R., Martínez-Murillo, R., Merlos, M., Vela, J.M., and Garzón, J. (2015). The σ 1 Receptor Engages the Redox-Regulated HINT1 Protein to Bring Opioid Analgesia Under NMDA Receptor Negative Control. *Antioxid Redox Signal* 22, 799–818. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5993>.

Rohayem, J., Ehlers, C., Wiedemann, B., Holl, R., Oexle, K., Kordonouri, O., Salzano, G., Meissner, T., Burger, W., Schober, E., et al. (2011). Diabetes and Neurodegeneration in Wolfram Syndrome. *Diabetes Care* 34, 1503–1510. <https://doi.org/10.2337/dc10-1937>.

Roman, F.J., Pascaud, X., Martin, B., Vauché, D., and Junien, J.L. (1990). JO 1784, a potent and selective ligand for rat and mouse brain sigma-sites. *J Pharm Pharmacol* 42, 439–440. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1990.tb06588.x>.

Romero-Pozuelo, J., Dason, J.S., Atwood, H.L., and Ferrús, A. (2007). Chronic and acute alterations in the functional levels of Frequenins 1 and 2 reveal their roles in synaptic transmission and axon terminal morphology: Frequenins on neurotransmission. *European Journal of Neuroscience* 26, 2428–2443. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05877.x>.

Rondinelli, M., Novara, F., Calcaterra, V., Zuffardi, O., and Genovese, S. (2015). Wolfram syndrome 2: a novel CISD2 mutation identified in Italian siblings. *Acta Diabetol* 52, 175–178. <https://doi.org/10.1007/s00592-014-0648-1>.

Rosen, J.N., Sweeney, M.F., and Mably, J.D. (2009). Microinjection of Zebrafish Embryos to Analyze Gene Function. *JoVE* 1115. <https://doi.org/10.3791/1115>.

Rosenberg, G. (2007). The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2090–2103. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7079-x>.

Rossi, A., Pizzo, P., and Filadi, R. (2019). Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1866, 1068–1078. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.016>.

Rötig, A., Cormier, V., Chatelain, P., Francois, R., Saudubray, J.M., Rustin, P., and Munnich, A. (1993). Deletion of mitochondrial DNA in a case of early-onset diabetes mellitus, optic atrophy, and deafness (Wolfram syndrome, MIM 222300). *J. Clin. Invest.* 91, 1095–1098. <https://doi.org/10.1172/JCI116267>.

Rouzier, C., Moore, D., Delorme, C., Lacas-Gervais, S., Ait-El-Mkadem, S., Fragaki, K., Burté, F., Serre, V., Bannwarth, S., Chaussenot, A., et al. (2017). A novel CISD2 mutation associated with a classical Wolfram syndrome phenotype alters Ca²⁺ homeostasis and ER-mitochondria interactions. *Hum Mol Genet* 26, 1599–1611. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx060>.

Rove, K.O., Vricella, G.J., Hershey, T., Thu, M.H., Lugar, H.M., Vetter, J., Marshall, B.A., and Austin, P.F. (2018). Lower Urinary Tract Dysfunction and Associated Pons Volume in Patients with Wolfram Syndrome. *The Journal of Urology* <https://doi.org/10.1016/j.juro.2018.06.002>.

Ruby, J.R., Dyer, R.F., and Skalko, R.G. (1969). Continuities between mitochondria and endoplasmic reticulum in the mammalian ovary. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 97, 30–37. <https://doi.org/10.1007/BF00331868>.

Ruscher, K., Shamloo, M., Rickhag, M., Ladunga, I., Soriano, L., Gisselsson, L., Toresson, H., Ruslim-Litrus, L., Oksenberg, D., Urfer, R., et al. (2011). The sigma-1 receptor enhances brain plasticity and functional recovery after experimental stroke. *Brain* 134, 732–746. <https://doi.org/10.1093/brain/awq367>.

Ruscher, K., Inácio, A.R., Valind, K., Rowshan Ravan, A., Kuric, E., and Wieloch, T. (2012). Effects of the sigma-1 receptor agonist 1-(3,4-dimethoxyphenethyl)-4-(3-phenylpropyl)-piperazine dihydro-chloride on inflammation after stroke. *PLoS One* 7, e45118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045118>.

Rutkowski, D.T., and Kaufman, R.J. (2007). That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem. Sci.* 32, 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.09.003>.

Ryskamp, D., Wu, J., Geva, M., Kusko, R., Grossman, I., Hayden, M., and Bezprozvanny, I. (2017). The sigma-1 receptor mediates the beneficial effects of pridopidine in a mouse model of Huntington disease. *Neurobiol Dis* 97, 46–59. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.10.006>.

Ryskamp, D., Wu, L., Wu, J., Kim, D., Rammes, G., Geva, M., Hayden, M., and Bezprozvanny, I. (2019). Pridopidine stabilizes mushroom spines in mouse models of Alzheimer's disease by acting on the sigma-1 receptor. *Neurobiol Dis* 124, 489–504. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.12.022>.

S

- S. Bretschger, L. Deng, E. Caine, B. Boden-Albala, R. Sacco, R. L. Leibel, and W. K. Chung (2002). Mutational Analysis of the Wolfram Syndrome Gene (WFS1) in Greek and Dominican Patients. *International Journal on Disability and Human Development* 3, 13–20. <https://doi.org/10.1515/IJDHD.2002.3.1.13>.
- Saab, B.J., Georgiou, J., Nath, A., Lee, F.J.S., Wang, M., Michalon, A., Liu, F., Mansuy, I.M., and Roder, J.C. (2009). NCS-1 in the dentate gyrus promotes exploration, synaptic plasticity, and rapid acquisition of spatial memory. *Neuron* 63, 643–656. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.014>.
- Sabino, V., Cottone, P., Parylak, S.L., Steardo, L., and Zorrilla, E.P. (2009). Sigma-1 receptor knockout mice display a depressive-like phenotype. *Behav Brain Res* 198, 472–476. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.11.036>.
- Sage, C., Ventéo, S., Jeromin, A., Roder, J., and Dechesne, C.J. (2000). Distribution of frequenin in the mouse inner ear during development, comparison with other calcium-binding proteins and synaptophysin. *Hear Res* 150, 70–82. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(00\)00183-0](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(00)00183-0).
- Sakakibara, Y., Sekiya, M., Fujisaki, N., Quan, X., and Iijima, K.M. (2018). Knockdown of *wfs1*, a fly homolog of Wolfram syndrome 1, in the nervous system increases susceptibility to age- and stress-induced neuronal dysfunction and degeneration in *Drosophila*. *PLoS Genet* 14, e1007196. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007196>.
- Samara, A., Rahn, R., Neyman, O., Park, K.Y., Samara, A., Marshall, B., Dougherty, J., and Hershey, T. (2019). Developmental hypomyelination in Wolfram syndrome: new insights from neuroimaging and gene expression analyses. *Orphanet J Rare Dis* 14, 279. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1260-9>.
- Samoilova, N.N., and Vinogradov, V.A. (1992). Subcellular distribution of (+)-[3H]SKF 10,047 binding sites in rat liver. *Eur J Pharmacol* 225, 69–74. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(92\)90041-s](https://doi.org/10.1016/0922-4106(92)90041-s).
- Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., Herrero-Labrador, R., Burgueño, J., Zamanillo, D., and Garzón, J. (2014). The calcium-sensitive Sigma-1 receptor prevents cannabinoids from provoking glutamate NMDA receptor hypofunction: implications in antinociception and psychotic diseases. *Int J Neuropsychopharmacol* 17, 1943–1955. <https://doi.org/10.1017/S1461145714000029>.
- Scaramuzzi, M., Kumar, P., Peachey, N., Nucci, P., and Traboulsi, E.I. (2019). Evidence of retinal degeneration in Wolfram syndrome. *Ophthalmic Genet* 40, 34–38. <https://doi.org/10.1080/13816810.2018.1551494>.
- Schaad, N.C., De Castro, E., Nef, S., Hegi, S., Hinrichsen, R., Martone, M.E., Ellisman, M.H., Sikkink, R., Rusnak, F., Sygush, J., et al. (1996). Direct modulation of calmodulin targets by the neuronal calcium sensor NCS-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9253–9258. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9253>.
- Schmidt, H.R., Zheng, S., Gurpinar, E., Koehl, A., Manglik, A., and Kruse, A.C. (2016). Crystal structure of the human σ_1 receptor. *Nature* 532, 527–530. <https://doi.org/10.1038/nature17391>.
- Schmidt, H.R., Betz, R.M., Dror, R.O., and Kruse, A.C. (2018). Structural basis for σ_1

receptor ligand recognition. *Nat Struct Mol Biol* 25, 981–987. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0137-2>.

Schmidt-Kastner, R., Kreczmanski, P., Preising, M., Diederer, R., Schmitz, C., Reis, D., Blanks, J., and Dorey, C.K. (2009). Expression of the diabetes risk gene wolframin (WFS1) in the human retina. *Exp Eye Res* 89, 568–574. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.05.007>.

Schnörr, S.J., Steenbergen, P.J., Richardson, M.K., and Champagne, D.L. (2012). Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behav Brain Res* 228, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.016>.

Schoenwald, R.D., Barfknecht, C.F., Xia, E., and Newton, R.E. (1993). The presence of sigma-receptors in the lacrimal gland. *J Ocul Pharmacol* 9, 125–139. <https://doi.org/10.1089/jop.1993.9.125>.

Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* 569, 29–63. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.056>.

Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2006). *Divergent Roles of IRE1 and PERK in the Unfolded Protein Response* (Bentham Science Publishers).

Schuknecht, H.F., and Montandon, P. (1993). Pathology of the ear. *Arch. Klin. Exp. Ohr.-, Nas.- U. Kehlk. Heilk.* 195, 207–225. <https://doi.org/10.1007/BF00302950>.

Schutze, M.P., Peterson, P.A., and Jackson, M.R. (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 13, 1696–1705. .

Schwarz, D.S., and Blower, M.D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 73, 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>.

Scolding, N.J., Kellar-Wood, H.F., Shaw, C., Shneerson, J.M., and Antoun, N. (1996). Wolfram syndrome: hereditary diabetes mellitus with brainstem and optic atrophy. *Ann Neurol* 39, 352–360. <https://doi.org/10.1002/ana.410390312>.

Senda, T., Matsuno, K., and Mita, S. (1997). The presence of sigma receptor subtypes in bovine retinal membranes. *Exp Eye Res* 64, 857–860. <https://doi.org/10.1006/exer.1996.0272>.

Sengupta, S., Nechushtai, R., Jennings, P.A., Onuchic, J.N., Padilla, P.A., Azad, R.K., and Mittler, R. (2018). Phylogenetic analysis of the CDGSH iron-sulfur binding domain reveals its ancient origin. *Sci Rep* 8, 4840. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23305-6>.

Seppa, K., Toots, M., Reimets, R., Jagomäe, T., Koppel, T., Pallase, M., Hasselholt, S., Krogsbæk Mikkelsen, M., Randel Nyengaard, J., Vasar, E., et al. (2019). GLP-1 receptor agonist liraglutide has a neuroprotective effect on an aged rat model of Wolfram syndrome. *Sci Rep* 9, 15742. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52295-2>.

Sequeira, A., Kim, C., Seguin, M., Lesage, A., Chawky, N., Desautels, A., Tousignant, M., Vanier, C., Lipp, O., Benkelfat, C., et al. (2003). Wolfram syndrome and suicide: Evidence for a role of WFS1 in suicidal and impulsive behavior. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 119B, 108–113. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.20011>.

Seredenin, S.B., Antipova, T.A., Voronin, M.V., Kurchashova, S.Y., and Kuimov, A.N. (2009). Interaction of Afobazole with σ_1 -Receptors. *Bulletin of Experimental Biology*

and Medicine.

Seth, P., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (1997). Cloning and structural analysis of the cDNA and the gene encoding the murine type 1 sigma receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 241, 535–540. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7840>.

Seth, P., Fei, Y.-J., Li, H.W., Huang, W., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (1998). Cloning and Functional Characterization of a σ Receptor from Rat Brain. *Journal of Neurochemistry* 70, 922–931. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70030922.x>.

Sha, S., Qu, W.-J., Li, L., Lu, Z.-H., Chen, L., Yu, W.-F., and Chen, L. (2013). Sigma-1 receptor knockout impairs neurogenesis in dentate gyrus of adult hippocampus via down-regulation of NMDA receptors. *CNS Neurosci Ther* 19, 705–713. <https://doi.org/10.1111/cns.12129>.

Sha, S., Hong, J., Qu, W.-J., Lu, Z.-H., Li, L., Yu, W.-F., and Chen, L. (2015). Sex-related neurogenesis decrease in hippocampal dentate gyrus with depressive-like behaviors in sigma-1 receptor knockout mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 25, 1275–1286. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.04.021>.

Shafizadeh, E., Peterson, R.T., and Lin, S. (2004). Induction of reversible hemolytic anemia in living zebrafish using a novel small molecule. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 138, 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.05.003>.

Shamu, C.E., and Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J* 15, 3028–3039. .

Shang, L., Hua, H., Foo, K., Martinez, H., Watanabe, K., Zimmer, M., Kahler, D.J., Freeby, M., Chung, W., LeDuc, C., et al. (2014). β -Cell Dysfunction Due to Increased ER Stress in a Stem Cell Model of Wolfram Syndrome. *Diabetes* 63, 923–933. <https://doi.org/10.2337/db13-0717>.

Shannon, P., Becker, L., and Deck, J. (1999). Evidence of widespread axonal pathology in Wolfram syndrome. *Acta Neuropathol* 98, 304–308. <https://doi.org/10.1007/s004010051084>.

Shaw, D.A., and Duncan, L.J.P. (1958). OPTIC ATROPHY AND NERVE DEAFNESS IN DIABETES MELLITUS. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 21, 47–49. <https://doi.org/10.1136/jnnp.21.1.47>.

Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *Developmental Cell* 3, 99–111. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00203-4](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00203-4).

Shen, Z.-Q., Chen, Y.-F., Chen, J.-R., Jou, Y.-S., Wu, P.-C., Kao, C.-H., Wang, C.-H., Huang, Y.-L., Chen, C.-F., Huang, T.-S., et al. (2017). CISD2 Haploinsufficiency Disrupts Calcium Homeostasis, Causes Nonalcoholic Fatty Liver Disease, and Promotes Hepatocellular Carcinoma. *Cell Reports* 21, 2198–2211. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.099>.

Shen, Z.-Q., Huang, Y.-L., Teng, Y.-C., Wang, T.-W., Kao, C.-H., Yeh, C.-H., and Tsai, T.-F. (2021). CISD2 maintains cellular homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1868, 118954. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.118954>.

Shenkman, M., Geva, M., Gershoni-Emek, N., Hayden, M.R., and Lederkremer, G.Z. (2021). Pridopidine reduces mutant huntingtin-induced endoplasmic reticulum stress by modulation of the Sigma-1 receptor. *J Neurochem* 158, 467–481. <https://doi.org/10.1111/jnc.15366>.

Shi, Y., Wang, Y., and Wei, H. (2019). Dantrolene : From Malignant Hyperthermia to Alzheimer's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 18, 668–676. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180619162649>.

Simsek, E., Simsek, T., Tekgüt, S., Hosal, S., Seyrantepe, V., and Aktan, G. (2003). Wolfram (DIDMOAD) syndrome: a multidisciplinary clinical study in nine Turkish patients and review of the literature. *Acta Paediatrica* 92, 55–61. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2003.tb00469.x>.

Singh, A., Castillo, H.A., Brown, J., Kaslin, J., Dwyer, K.M., and Gibert, Y. (2019). High glucose levels affect retinal patterning during zebrafish embryogenesis. *Sci Rep* 9, 4121. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41009-3>.

Smith, S.B., Duplantier, J., Dun, Y., Mysona, B., Roon, P., Martin, P.M., and Ganapathy, V. (2008). In vivo protection against retinal neurodegeneration by sigma receptor 1 ligand (+)-pentazocine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 4154–4161. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-1824>.

Sohn, Y.-S., Tamir, S., Song, L., Michaeli, D., Matouk, I., Conlan, A., Harir, Y., Holt, S., Shulaev, V., Paddock, M., et al. (2013). NAF-1 and mitoNEET are central to human breast cancer proliferation by maintaining mitochondrial homeostasis and promoting tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313198110>.

Sourbron, J., Partoens, M., Scheldeman, C., Zhang, Y., Lagae, L., and Witte, P. (2019). Drug repurposing for Dravet syndrome in scn1Lab^{-/-} mutant zebrafish. *Epilepsia* 60, e8–e13. <https://doi.org/10.1111/epi.14647>.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., and Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc* 83, 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>.

Spring, D.R., Krishnan, S., Blackwell, H.E., and Schreiber, S.L. (2002). Diversity-oriented synthesis of biaryl-containing medium rings using a one bead/one stock solution platform. *J Am Chem Soc* 124, 1354–1363. <https://doi.org/10.1021/ja017248o>.

Squitieri, F., Di Pardo, A., Favellato, M., Amico, E., Maglione, V., and Frati, L. (2015). Pridopidine, a dopamine stabilizer, improves motor performance and shows neuroprotective effects in Huntington disease R6/2 mouse model. *J Cell Mol Med* 19, 2540–2548. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12604>.

Stern, H.M., Murphey, R.D., Shepard, J.L., Amatruda, J.F., Straub, C.T., Pfaff, K.L., Weber, G., Tallarico, J.A., King, R.W., and Zon, L.I. (2005). Small molecules that delay S phase suppress a zebrafish bmyb mutant. *Nat Chem Biol* 1, 366–370. <https://doi.org/10.1038/nchembio749>.

Sternson, S.M., Louca, J.B., Wong, J.C., and Schreiber, S.L. (2001). Split-pool synthesis of 1,3-dioxanes leading to arrayed stock solutions of single compounds sufficient for multiple phenotypic and protein-binding assays. *J Am Chem Soc* 123,

1740–1747. <https://doi.org/10.1021/ja0036108>.

Stoppoloni, G., Pierantoni, G., and Pacelli, V. (1969). Two children with diabetes insipidus and diabetes mellitus. *The Lancet* 294, 1425. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(69\)90966-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(69)90966-0).

Strom, T.M., Hörtnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K.D., and Meitinger, T. (1998). Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum. Mol. Genet.* 7, 2021–2028. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.13.2021>.

Su, T.P., London, E.D., and Jaffe, J.H. (1988). Steroid binding at sigma receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune systems. *Science* 240, 219–221. <https://doi.org/10.1126/science.2832949>.

Su, T.P., Wu, X.Z., Cone, E.J., Shukla, K., Gund, T.M., Dodge, A.L., and Parish, D.W. (1991). Sigma compounds derived from phencyclidine: identification of PRE-084, a new, selective sigma ligand. *J Pharmacol Exp Ther* 259, 543–550. .

Su, T.-P., Hayashi, T., Maurice, T., Buch, S., and Ruoho, A.E. (2010). The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends in Pharmacological Sciences* 31, 557–566. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.08.007>.

Su, T.-P., Su, T.-C., Nakamura, Y., and Tsai, S.-Y. (2016). The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems. *Trends in Pharmacological Sciences* 37, 262–278. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.01.003>.

Sun, P., Zhang, Y., Zhao, F., Wu, J.-P., Pun, S.H., Peng, C., Du, M., Vai, M.I., Liu, D., and Chen, F. (2018). An Assay for Systematically Quantifying the Vestibulo-Ocular Reflex to Assess Vestibular Function in Zebrafish Larvae. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12. .

Sun, Y., Cheng, J., Lu, Y., Li, J., Lu, Y., Jin, Z., Dai, P., Wang, R., and Yuan, H. (2011). Identification of two novel missense WFS1 mutations, H696Y and R703H, in patients with non-syndromic low-frequency sensorineural hearing loss. *J Genet Genomics* 38, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.jcg.2011.01.001>.

Sunder, J.H., Danowski, T.S., Kenny, F.M., Khurana, R.C., Sun, A., Nolan, S., and Stephan, T. (1972). Pedigrees with diabetes insipidus, diabetes mellitus, and optic atrophy. *Journal of Medical Genetics* 9, 408–412. <https://doi.org/10.1136/jmg.9.4.408>.

Sutterwala, F.S., Haasken, S., and Cassel, S.L. (2014). Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci* 1319, 82–95. <https://doi.org/10.1111/nyas.12458>.

Swift, M., and Swift, R.G. (2005). Wolframin mutations and hospitalization for psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 10, 799–803. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001681>.

Swift, R.G., Sadler, D.B., and Swift, M. (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet* 336, 667–669. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92157-d](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)92157-d).

Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M.R., Cavagna, D., Nagy, A.I., Balla, T., and Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J. Cell Biol.* 175, 901–911.

<https://doi.org/10.1083/jcb.200608073>.

Szot, G.L., Koudria, P., and Bluestone, J.A. (2007). Transplantation of Pancreatic Islets Into the Kidney Capsule of Diabetic Mice. *J Vis Exp* 404. <https://doi.org/10.3791/404>.

T

Tagashira, H., Bhuiyan, S., Shioda, N., Hasegawa, H., Kanai, H., and Fukunaga, K. (2010). Sigma1-receptor stimulation with fluvoxamine ameliorates transverse aortic constriction-induced myocardial hypertrophy and dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H1535-1545. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00198.2010>.

Tagashira, H., Zhang, C., Lu, Y., Hasegawa, H., Kanai, H., Han, F., and Fukunaga, K. (2013). Stimulation of σ_1 -receptor restores abnormal mitochondrial Ca^{2+} mobilization and ATP production following cardiac hypertrophy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830, 3082–3094. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.12.029>.

Takeda, K., Inoue, H., Tanizawa, Y., Matsuzaki, Y., Oba, J., Watanabe, Y., Shinoda, K., and Oka, Y. (2001). WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum. Mol. Genet.* 10, 477–484. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.5.477>.

Takei, D., Ishihara, H., Yamaguchi, S., Yamada, T., Tamura, A., Katagiri, H., Maruyama, Y., and Oka, Y. (2006). WFS1 protein modulates the free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 580, 5635–5640. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.007>.

Tamir, S., Paddock, M.L., Darash-Yahana-Baram, M., Holt, S.H., Sohn, Y.S., Agranat, L., Michaeli, D., Stoffleth, J.T., Lipper, C.H., Morcos, F., et al. (2015). Structure-function analysis of NEET proteins uncovers their role as key regulators of iron and ROS homeostasis in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1853, 1294–1315. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.10.014>.

Taylor, K.L., Grant, N.J., Temperley, N.D., and Patton, E.E. (2010). Small molecule screening in zebrafish: an in vivo approach to identifying new chemical tools and drug leads. *Cell Commun Signal* 8, 11. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-11>.

Tekgöl, S., Oge, O., Simşek, E., Yordam, N., and Kendi, S. (1999). Urological manifestations of the Wolfram syndrome: observations in 14 patients. *J. Urol.* 161, 616–617. .

Thompson, C.J., Charlton, J., Walford, S., Baird, J., Hearnshaw, J., McCulloch, A., Kelly, W., and Baylis, P.H. (1989). Vasopressin secretion in the DIDMOAD (Wolfram) syndrome. *Q J Med* 71, 333–345. .

Tong, S.-K., Lee, H.-L., Lee, Y.-C., Wu, L.-C., Tsou, Y.-L., Lu, S.-W., Shih, S.-W., Hwang, P.-P., and Chou, M.-Y. (2020). Arginine Vasopressin Modulates Ion and Acid/Base Balance by Regulating Cell Numbers of Sodium Chloride Cotransporter and H^+ -ATPase Rich Ionocytes. *Int J Mol Sci* 21, 3957. <https://doi.org/10.3390/ijms21113957>.

Toots, M., Seppa, K., Jagomäe, T., Koppel, T., Pallase, M., Heinla, I., Terasmaa, A.,

- Plaas, M., and Vasar, E. (2018). Preventive treatment with liraglutide protects against development of glucose intolerance in a rat model of Wolfram syndrome. *Sci Rep* 8, 10183. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28314-z>.
- Toots, M., Reimets, R., Plaas, M., and Vasar, E. (2019). Muscarinic Agonist Ameliorates Insulin Secretion in *Wfs1*-Deficient Mice. *Canadian Journal of Diabetes* 43, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2018.06.007>.
- Toppings, N.B., McMillan, J.M., Au, P.Y.B., Suchowersky, O., and Donovan, L.E. (2018). Wolfram Syndrome: A Case Report and Review of Clinical Manifestations, Genetics Pathophysiology, and Potential Therapies. *Case Reports in Endocrinology* 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/9412676>.
- Tranebjærg, L., Barrett, T., and Rendtorff, N.D. (1993). WFS1 Wolfram Syndrome Spectrum Disorder. In *GeneReviews®*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K.W. Gripp, G.M. Mirzaa, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
- Treloar, H.B., Uboha, U., Jeromin, A., and Greer, C.A. (2005). Expression of the neuronal calcium sensor protein NCS-1 in the developing mouse olfactory pathway. *J Comp Neurol* 482, 201–216. <https://doi.org/10.1002/cne.20431>.
- Tsai, S.-Y., Hayashi, T., Harvey, B.K., Wang, Y., Wu, W.W., Shen, R.-F., Zhang, Y., Becker, K.G., Hoffer, B.J., and Su, T.-P. (2009). Sigma-1 receptors regulate hippocampal dendritic spine formation via a free radical-sensitive mechanism involving Rac1xGTP pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 22468–22473. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909089106>.
- Tsai, S.-Y.A., Chuang, J.-Y., Tsai, M.-S., Wang, X.-F., Xi, Z.-X., Hung, J.-J., Chang, W.-C., Bonci, A., and Su, T.-P. (2015). Sigma-1 receptor mediates cocaine-induced transcriptional regulation by recruiting chromatin-remodeling factors at the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E6562-6570. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518894112>.
- Tubbs, E., Theurey, P., Vial, G., Bendridi, N., Bravard, A., Chauvin, M.-A., Ji-Cao, J., Zoulim, F., Bartosch, B., Ovize, M., et al. (2014). Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane (MAM) Integrity Is Required for Insulin Signaling and Is Implicated in Hepatic Insulin Resistance. *Diabetes* 63, 3279–3294. <https://doi.org/10.2337/db13-1751>.
- Tuggle, K.L., Birket, S.E., Cui, X., Hong, J., Warren, J., Reid, L., Chambers, A., Ji, D., Gamber, K., Chu, K.K., et al. (2014). Characterization of defects in ion transport and tissue development in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-knockout rats. *PLoS One* 9, e91253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091253>.
- Tunbridge, R.E., and Paley, R.G. (1956). Primary Optic Atrophy in Diabetes Mellitus. *Diabetes* 5, 295–296. <https://doi.org/10.2337/diab.5.4.295>.

U

- Ueda, K., Kawano, J., Takeda, K., Yujiri, T., Tanabe, K., Anno, T., Akiyama, M., Nozaki, J., Yoshinaga, T., Koizumi, A., et al. (2005). Endoplasmic reticulum stress induces *Wfs1* gene expression in pancreatic beta-cells via transcriptional activation. *Eur. J.*

Endocrinol. 153, 167–176. <https://doi.org/10.1530/eje.1.01945>.

Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., et al. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>.

University of Birmingham (2020). A Pivotal, International, Randomised, Double-blind, Efficacy and Safety Trial of Sodium Valproate, in Paediatric and Adult Patients With Wolfram Syndrome (clinicaltrials.gov).

Urani, A., Roman, F.J., Phan, V.L., Su, T.P., and Maurice, T. (2001). The antidepressant-like effect induced by sigma(1)-receptor agonists and neuroactive steroids in mice submitted to the forced swimming test. *J Pharmacol Exp Ther* 298, 1269–1279. .

Urano, F. (2014). Wolfram syndrome iPSC cells: the first human cell model of endoplasmic reticulum disease. *Diabetes* 63, 844–846. <https://doi.org/10.2337/db13-1809>.

Urano, F. (2016). Wolfram Syndrome: Diagnosis, Management, and Treatment. *Curr Diab Rep* 16, 6. <https://doi.org/10.1007/s11892-015-0702-6>.

Urfer, R., Moebius, H.J., Skoloudik, D., Santamarina, E., Sato, W., Mita, S., Muir, K.W., and Cutamesine Stroke Recovery Study Group (2014). Phase II trial of the Sigma-1 receptor agonist cutamesine (SA4503) for recovery enhancement after acute ischemic stroke. *Stroke* 45, 3304–3310. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.005835>.

V

Valéro, R., Bannwarth, S., Roman, S., Paquis-Flucklinger, V., and Vialettes, B. (2008). Autosomal dominant transmission of diabetes and congenital hearing impairment secondary to a missense mutation in the WFS1 gene. *Diabet Med* 25, 657–661. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2008.02448.x>.

Van Ussel, E., and Hoet, J. (1966). Heredo-Familiaal syndroom met atrofie van de nervus opticus, diabetes mellitus, diabetes insipidus en andere congenitale afwijkingen. *Verh Vlaamse Acad Geneskd Belg* 18. .

Vance, J.E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem* 265, 7248–7256. .

Vaupel, D.B. (1983). Naltrexone fails to antagonize the sigma effects of PCP and SKF 10,047 in the dog. *Eur J Pharmacol* 92, 269–274. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(83\)90297-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(83)90297-2).

Vavers, E., Zvejniece, L., Maurice, T., and Dambrova, M. (2019). Allosteric Modulators of Sigma-1 Receptor: A Review. *Frontiers in Pharmacology* 10. .

Villard, V., Espallergues, J., Keller, E., Alkam, T., Nitta, A., Yamada, K., Nabeshima, T., Vamvakides, A., and Maurice, T. (2009). Antiamnesic and Neuroprotective Effects of the Aminotetrahydrofuran Derivative ANAVEX1-41 Against Amyloid β 25–35-Induced Toxicity in Mice. *Neuropsychopharmacol* 34, 1552–1566. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.212>.

Villard, V., Espallergues, J., Keller, E., Vamvakides, A., and Maurice, T. (2011). Anti-

amnesic and neuroprotective potentials of the mixed muscarinic receptor/sigma 1 (σ 1) ligand ANAVEX2-73, a novel aminotetrahydrofuran derivative. *J Psychopharmacol* 25, 1101–1117. <https://doi.org/10.1177/0269881110379286>.

Villemain, L., Prigent, S., Abou-Lovergne, A., Pelletier, L., Chiral, M., Pontoglio, M., Fougelle, F., Caruso, S., Pineau, R., Rebouissou, S., et al. (2020). Sigma 1 Receptor is Overexpressed in Hepatocellular Adenoma: Involvement of ER α and HNF1 α . *Cancers* 12, 2213. <https://doi.org/10.3390/cancers12082213>.

Vilner, B.J., John, C.S., and Bowen, W.D. (1995). Sigma-1 and Sigma-2 Receptors Are Expressed in a Wide Variety of Human and Rodent Tumor Cell Lines. *Cancer Research* 55, 408–413. .

Visnapuu, T., Plaas, M., Reimets, R., Raud, S., Terasmaa, A., Kõks, S., Sütt, S., Luuk, H., Hundahl, C.A., Eskla, K.-L., et al. (2013). Evidence for impaired function of dopaminergic system in *Wfs1*-deficient mice. *Behav. Brain Res.* 244, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.046>.

Volonté, M., Ceci, A., and Borsini, F. (1992). Effect of haloperidol and clozapine on (+)SKF 10,047-induced dopamine release: role of 5-HT₃ receptors. *Eur J Pharmacol* 213, 163–164. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90250-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90250-8).

Volonté, M., Ceci, A., and Borsini, F. (1995). Effect of the 5-hydroxytryptamine₃ receptor antagonist itasetron (DAU 6215) on (+)-N-allylnormetazocine-induced dopamine release in the nucleus accumbens and in the corpus striatum of the rat: an in vivo microdialysis study. *J Pharmacol Exp Ther* 275, 358–367. .

Vullo, S., and Kellenberger, S. (2020). A molecular view of the function and pharmacology of acid-sensing ion channels. *Pharmacological Research* 154, 104166. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.02.005>.

W

Walter, L., and Hajnóczky, G. (2005). Mitochondria and endoplasmic reticulum: the lethal interorganelle cross-talk. *J Bioenerg Biomembr* 37, 191–206. <https://doi.org/10.1007/s10863-005-6600-x>.

Wang, M., and Kaufman, R.J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer* 14, 581–597. <https://doi.org/10.1038/nrc3800>.

Wang, C.-H., Kao, C.-H., Chen, Y.-F., Wei, Y.-H., and Tsai, T.-F. (2014). *Cisd2* mediates lifespan: is there an interconnection among Ca²⁺ homeostasis, autophagy, and lifespan? *Free Radic Res* 48, 1109–1114. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.936431>.

Wang, J., Shanmugam, A., Markand, S., Zorrilla, E., Ganapathy, V., and Smith, S.B. (2015). Sigma 1 receptor regulates the oxidative stress response in primary retinal Müller glial cells via NRF2 signaling and system xc(-), the Na(+)-independent glutamate-cystine exchanger. *Free Radic Biol Med* 86, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.009>.

Wang, L., Ouyang, F., Liu, X., Wu, S., Wu, H.-M., Xu, Y., Wang, B., Zhu, J., Xu, X., and Zhang, L. (2016). Overexpressed *CISD2* has prognostic value in human gastric

cancer and promotes gastric cancer cell proliferation and tumorigenesis via AKT signaling pathway. *Oncotarget* 7, 3791–3805. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6302>.

Wang, S.-M., Wu, H.-E., Yasui, Y., Geva, M., Hayden, M., Maurice, T., Cozzolino, M., and Su, T.-P. (2022). Nucleoporin POM121 signals TFEB-mediated autophagy via activation of SIGMAR1/sigma-1 receptor chaperone by pridopidine. *Autophagy* 1–26. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2063003>.

Wang, W., Upshaw, L., Strong, D.M., Robertson, R.P., and Reems, J. (2005). Increased oxygen consumption rates in response to high glucose detected by a novel oxygen biosensor system in non-human primate and human islets. *Journal of Endocrinology* 185, 445. .

Wang, Y., Kim, M.B., and Palmer, M.R. (1987). Interactions of metaphit with phencyclidine and sigma agonist actions in rat cerebellum: determination of specificity and selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* 241, 321–327. .

Wang, Y., Shi, Y., and Wei, H. (2017). Calcium Dysregulation in Alzheimer’s Disease: A Target for New Drug Development. *J Alzheimers Dis Parkinsonism* 7, 374. <https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000374>.

Wang, Y.-F., Tseng, Y.-C., Yan, J.-J., Hiroi, J., and Hwang, P.-P. (2009). Role of SLC12A10.2, a Na-Cl cotransporter-like protein, in a Cl uptake mechanism in zebrafish (*Danio rerio*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R1650-1660. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00119.2009>.

Washington University School of Medicine (2022). A Phase 1b/2a Trial of Dantrolene Sodium in Pediatric and Adult Patients With Wolfram Syndrome (clinicaltrials.gov).

Waszczykowska, A., Zmysłowska, A., Bartosiewicz, K., Studzian, M., Pułaski, Ł., Braun, M., Ivask, M., Koks, S., Jurowski, P., and Młynarski, W. (2022). Reduced Corneal Sensitivity With Neuronal Degeneration is a Novel Clinical Feature in Wolfram Syndrome. *American Journal of Ophthalmology* 236, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2021.09.030>.

Wei, H., and Perry, D.C. (1996). Dantrolene is cytoprotective in two models of neuronal cell death. *J Neurochem* 67, 2390–2398. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67062390.x>.

Weiss, J.L., Hui, H., and Burgoyne, R.D. (2010). Neuronal calcium sensor-1 regulation of calcium channels, secretion, and neuronal outgrowth. *Cell Mol Neurobiol* 30, 1283–1292. <https://doi.org/10.1007/s10571-010-9588-7>.

Weisz, O.A., Gibson, G.A., Leung, S.M., Roder, J., and Jeromin, A. (2000). Overexpression of frequenin, a modulator of phosphatidylinositol 4-kinase, inhibits biosynthetic delivery of an apical protein in polarized madin-darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 275, 24341–24347. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000671200>.

Wemmie, J.A., Chen, J., Askwith, C.C., Hruska-Hageman, A.M., Price, M.P., Nolan, B.C., Yoder, P.G., Lamani, E., Hoshi, T., Freeman, J.H., et al. (2002). The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* 34, 463–477. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00661-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00661-x).

Wemmie, J.A., Askwith, C.C., Lamani, E., Cassell, M.D., Freeman, J.H., and Welsh, M.J. (2003). Acid-Sensing Ion Channel 1 Is Localized in Brain Regions with High

Synaptic Density and Contributes to Fear Conditioning. *J. Neurosci.* 23, 5496–5502. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05496.2003>.

Wemmie, J.A., Coryell, M.W., Askwith, C.C., Lamani, E., Leonard, A.S., Sigmund, C.D., and Welsh, M.J. (2004). Overexpression of acid-sensing ion channel 1a in transgenic mice increases acquired fear-related behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 3621–3626. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308753101>.

Wersinger, D.B., Benkafadar, N., Jagodzinska, J., Hamel, C., Tanizawa, Y., Lenaers, G., and Delettre, C. (2014). Impairment of Visual Function and Retinal ER Stress Activation in Wfs1-Deficient Mice. *PLOS ONE* 9, e97222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097222>.

White, R.M. (2015). Cross-species oncogenomics using zebrafish models of cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 30, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.04.006>.

Wolfram, D., and Wagener, H. (1938). Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings. *Mayo Clin Proc* 13, 715–718. .

Wong, J.C., Sternson, S.M., Louca, J.B., Hong, R., and Schreiber, S.L. (2004). Modular Synthesis and Preliminary Biological Evaluation of Stereochemically Diverse 1,3-Dioxanes. *Chemistry & Biology* 11, 1279–1291. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.07.012>.

Wu, C.-Y., Chen, Y.-F., Wang, C.-H., Kao, C.-H., Zhuang, H.-W., Chen, C.-C., Chen, L.-K., Kirby, R., Wei, Y.-H., Tsai, S.-F., et al. (2012). A persistent level of Cisd2 extends healthy lifespan and delays aging in mice. *Hum Mol Genet* 21, 3956–3968. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds210>.

Wu, H., Carvalho, P., and Voeltz, G.K. (2018). Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. *Science* 361, eaan5835. <https://doi.org/10.1126/science.aan5835>.

X

Xiong, C., Baker, D., and Pietrantonio, P.V. (2021). A random small molecule library screen identifies novel antagonists of the kinin receptor from the cattle fever tick, *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pest Manag Sci* 77, 2238–2251. <https://doi.org/10.1002/ps.6249>.

Xiong, J., Jin, J., Gao, L., Hao, C., Liu, X., Liu, B.-F., Chen, Y., and Zhang, G. (2020). Piperidine propionamide as a scaffold for potent sigma-1 receptor antagonists and mu opioid receptor agonists for treating neuropathic pain. *European Journal of Medicinal Chemistry* 191, 112144. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112144>.

Xiong, Z.-G., Zhu, X.-M., Chu, X.-P., Minami, M., Hey, J., Wei, W.-L., MacDonald, J.F., Wemmie, J.A., Price, M.P., Welsh, M.J., et al. (2004). Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell* 118, 687–698. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.026>.

Xu, Q., Ji, X.-F., Chi, T.-Y., Liu, P., Jin, G., Chen, L., and Zou, L.-B. (2017). Sigma-1 receptor in brain ischemia/reperfusion: Possible role in the NR2A-induced pathway to regulate brain-derived neurotrophic factor. *J Neurol Sci* 376, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.03.027>.

Y

- Yagasaki, Y., Numakawa, T., Kumamaru, E., Hayashi, T., Su, T.-P., and Kunugi, H. (2006). Chronic Antidepressants Potentiate via Sigma-1 Receptors the Brain-derived Neurotrophic Factor-induced Signaling for Glutamate Release*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 12941–12949. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508157200>.
- Yagi, T., Asada, R., Kanekura, K., Eesmaa, A., Lindahl, M., Saarma, M., and Urano, F. (2020). Neuroplastin Modulates Anti-inflammatory Effects of MANF. *IScience* 23, 101810. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101810>.
- Yamada, T., Ishihara, H., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Tokita, A., Satake, C., Tashiro, F., Katagiri, H., et al. (2006). WFS1-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1600–1609. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl081>.
- Yamamoto, H., Hofmann, S., Hamasaki, D.I., Yamamoto, H., Kreczmanski, P., Schmitz, C., Parel, J.-M., and Schmidt-Kastner, R. (2006). Wolfram syndrome 1 (WFS1) protein expression in retinal ganglion cells and optic nerve glia of the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res* 83, 1303–1306. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.06.010>.
- Yang, L., Hong, S., Wang, Y., He, Z., Liang, S., Chen, H., He, S., Wu, S., Song, L., and Chen, Y. (2016). A novel prognostic score model incorporating CDGSH iron sulfur domain2 (CISD2) predicts risk of disease progression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7, 22720–22732. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8150>.
- Yang, S., Bhardwaj, A., Cheng, J., Alkayed, N.J., Hurn, P.D., and Kirsch, J.R. (2007). Sigma Receptor Agonists Provide Neuroprotection In Vitro by Preserving bcl-2. *Anesth Analg* 104, 1179-contents. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000260267.71185.73>.
- Yano, H., Bonifazi, A., Xu, M., Guthrie, D.A., Schneck, S.N., Abramyan, A.M., Fant, A.D., Hong, W.C., Newman, A.H., and Shi, L. (2018). Pharmacological profiling of sigma 1 receptor ligands by novel receptor homomer assays. *Neuropharmacology* 133, 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.042>.
- Yao, H., Duan, M., and Buch, S. (2011). Cocaine-mediated induction of platelet-derived growth factor: implication for increased vascular permeability. *Blood* 117, 2538–2547. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-313593>.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* 6, 1355–1364. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00133-7).
- Yeh, C.-H., Shen, Z.-Q., Hsiung, S.-Y., Wu, P.-C., Teng, Y.-C., Chou, Y.-J., Fang, S.-W., Chen, C.-F., Yan, Y.-T., Kao, L.-S., et al. (2019). Cisd2 is essential to delaying cardiac aging and to maintaining heart functions. *PLOS Biology* 17, e3000508. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000508>.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2000). ATF6 Activated by Proteolysis Binds in the Presence of NF-Y (CBF) Directly to the cis-Acting Element Responsible for the Mammalian Unfolded Protein Response. *Mol. Cell*.

Biol. 20, 6755–6767. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.18.6755-6767.2000>.

Young, T.L., Ives, E., Lynch, E., Person, R., Snook, S., MacLaren, L., Cater, T., Griffin, A., Fernandez, B., Lee, M.K., et al. (2001). Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the Wolfram syndrome gene WFS1. *Hum Mol Genet* 10, 2509–2514. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.22.2509>.

Yuca, S.A., Rendtorff, N.D., Boulahbel, H., Lodahl, M., Tranebjærg, L., Cesur, Y., Dogan, M., Yilmaz, C., Akgun, C., and Acikgoz, M. (2012). Rapidly progressive renal disease as part of Wolfram syndrome in a large inbred Turkish family due to a novel WFS1 mutation (p.Leu511Pro). *Eur J Med Genet* 55, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2011.08.005>.

Z

Zatyka, M., Ricketts, C., da Silva Xavier, G., Minton, J., Fenton, S., Hofmann-Thiel, S., Rutter, G.A., and Barrett, T.G. (2008). Sodium-potassium ATPase 1 subunit is a molecular partner of Wolframin, an endoplasmic reticulum protein involved in ER stress. *Hum Mol Genet* 17, 190–200. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm296>.

Zhang, H., and Cuevas, J. (2002). Sigma receptors inhibit high-voltage-activated calcium channels in rat sympathetic and parasympathetic neurons. *J Neurophysiol* 87, 2867–2879. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.87.6.2867>.

Zhang, A., Williamson, C.D., Wong, D.S., Bullough, M.D., Brown, K.J., Hathout, Y., and Colberg-Poley, A.M. (2011). Quantitative Proteomic Analyses of Human Cytomegalovirus-Induced Restructuring of Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Contacts at Late Times of Infection. *Molecular & Cellular Proteomics* 10, M111.009936. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009936>.

Zhang, B., Wang, L., Chen, T., Hong, J., Sha, S., Wang, J., Xiao, H., and Chen, L. (2017). Sigma-1 receptor deficiency reduces GABAergic inhibition in the basolateral amygdala leading to LTD impairment and depressive-like behaviors. *Neuropharmacology* 116, 387–398. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.01.014>.

Zhang, K., Donnelly, C.J., Haeusler, A.R., Grima, J.C., Machamer, J.B., Steinwald, P., Daley, E.L., Miller, S.J., Cunningham, K.M., Vidensky, S., et al. (2015a). The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature* 525, 56–61. <https://doi.org/10.1038/nature14973>.

Zhang, L., Hedjran, F., Larson, C., Perez, G.L., and Reid, T. (2015b). A novel immunocompetent murine model for replicating oncolytic adenoviral therapy. *Cancer Gene Ther* 22, 17–22. <https://doi.org/10.1038/cgt.2014.64>.

Zhao, L., Chen, G., Li, J., Fu, Y., Mavlyutov, T.A., Yao, A., Nickells, R.W., Gong, S., and Guo, L.-W. (2017). An intraocular drug delivery system using targeted nanocarriers attenuates retinal ganglion cell degeneration. *J Control Release* 247, 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.038>.

Zhemkov, V., Ditlev, J.A., Lee, W.-R., Wilson, M., Liou, J., Rosen, M.K., and Bezprozvanny, I. (2021). The role of sigma 1 receptor in organization of endoplasmic reticulum signaling microdomains. *ELife* 10, e65192.

<https://doi.org/10.7554/eLife.65192>.

Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature09663>.

Zmysłowska, A., Borowiec, M., Fichna, P., Iwaniszewska, B., Majkowska, L., Pietrzak, I., Szalecki, M., Szypowska, A., and Młynarski, W. (2014). Delayed Recognition of Wolfram Syndrome Frequently Misdiagnosed as Type 1 Diabetes with Early Chronic Complications. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 122, 35–38. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1357160>.

Zmysłowska, A., Fendler, W., Niwald, A., Ludwikowska-Pawłowska, M., Borowiec, M., Antosik, K., Szadkowska, A., and Młynarski, W. (2015). Retinal Thinning as a Marker of Disease Progression in Patients With Wolfram Syndrome. *Diabetes Care* 38, e36–e37. <https://doi.org/10.2337/dc14-1898>.

Zvejniece, L., Vavers, E., Svalbe, B., Vilskersts, R., Domracheva, I., Vorona, M., Veinberg, G., Misane, I., Stonans, I., Kalvinsh, I., et al. (2014). The cognition-enhancing activity of E1R, a novel positive allosteric modulator of sigma-1 receptors. *Br J Pharmacol* 171, 761–771. <https://doi.org/10.1111/bph.12506>.

PUBLICATIONS

1. **Lucie Crouzier**, Gilabert Damien, Rossel Mireille, Trousse Françoise, Maurice Tangui. Topographical memory analyzed in mice using the Hamlet Test, a novel complex maze. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2018.
2. **Lucie Crouzier**, Maurice Tangui. Assessment of Topographic Memory in Mice in a Complex Environment using the Hamlet Test. *Current Protocols in Mouse Biology*, 2018.
3. Benjamin Delprat, **Lucie Crouzier**, Tsung-Ping Su, Tangui Maurice. At the crossing of ER stress and MAMs: A key role of Sigma-1 receptor? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2018.
4. Maurice Tangui, Volle Jean-Noël, Strehaiano Manon, **Crouzier Lucie**, Pereira Claire, Kaloyanov Nikolay, Virieux David, Pirat Jean-Luc. Neuroprotection in non-transgenic and transgenic mouse models of Alzheimer's disease by positive modulation of σ_1 receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2019.
5. Françoise Trousse, Achraf Jemli, Michelle Silhol, Elisabeth Garrido, **Lucie Crouzier**, Gaëlle Naert, Tangui Maurice, Mireille Rossel. Knockdown of CXCL12 /CXCR7 chemokine pathway results in learning deficits and neural progenitors maturation failure in mice. *Brain Behavior and Immunity*, 2019.
6. **Lucie Crouzier**, Simon Couly, Chloé Roques, Coralie Peter, Rislen Belkhiter, Maëva Arguel Jacquemin, Anna Bonetto, Benjamin Delprat, Tangui Maurice. Sigma-1 (σ_1) receptor activity is necessary for physiological brain plasticity in mice. *European Neuropsychopharmacology*, 2020.
7. **Lucie Crouzier**, Nicolas Cubedo, Mireille Rossel, Tangui Maurice, Benjamin Delprat. Loss of Pde6a Induces Rod Outer Segment Shrinkage and Visual Alterations in *pde6a^{Q70X}* Mutant Zebrafish, a Relevant Model of Retinal Dystrophy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021.
8. **Lucie Crouzier**, Morgane Denus, Elodie M Richard, Amaranthe Tavernier, Camille Diez, Nicolas Cubedo, Tangui Maurice, Benjamin Delprat. Sigma-1 Receptor Is Critical for Mitochondrial Activity and Unfolded Protein Response in Larval Zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021.
9. **Lucie Crouzier**, Alberto Danese, Yuko Yasui, Jean-Charles Liévens, Simone Patergnani, Simon Couly, Camille Diez, Morgane Denus, Nicolas Cubedo, Mireille Rossel, Tsung-Ping Su, Paolo Pinton, Tangui Maurice, Benjamin Delprat. Activation of the sigma-1 receptor chaperone alleviates symptoms of Wolfram syndrome in preclinical models. *Science Translational Medicine*, 2021.
10. **Lucie Crouzier**, Elodie M Richard, Joe Sourbron, Lieven Lagae, Tangui Maurice, Benjamin Delprat. Use of zebrafish models to boost research in rare genetic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021.
11. **Lucie Crouzier**, Elodie M Richard, Camille Diez, Hala Alzaeem, Morgane Denus, Nicolas Cubedo, Thomas Delaunay, Emily Glendenning, Sarah Baxendale, Jean-Charles Liévens, Tanya T Whitfield, Tangui Maurice, Benjamin Delprat.

Morphological, behavioral and cellular analyses revealed different phenotypes in Wolfram syndrome *wfs1a* and *wfs1b* zebrafish mutant lines. *Human Molecular Genetics*, 2022.

12. Christelle Lasbleiz, Amandine Peyrel, Pauline Tarot, Jérôme Sarniguet, **Lucie Crouzier**, Nicolas Cubedo, Benjamin Delprat, Mireille Rossel, Tangui Maurice, Jean-Charles Liévens. Sigma-1 receptor agonist PRE-084 confers protection against TAR DNA-binding protein-43 toxicity through NRF2 signalling. *Redox Biology*, 2022.

POSTERS

Crouzier Lucie, Gilabert Damien, Rossel Mireille, Trousse Françoise, Maurice Tangui. Analysis of topographical memory and hippocampal neurogenesis in mice using the Hamlet Test. *46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, San Diego, CA, USA, XI 2016

Maurice Tangui, Gilabert Damien, Crouzier Lucie. Topographical memory impairments in the Hamlet Test. *46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, San Diego, CA, USA, XI 2016

Crouzier Lucie, Teuf Olivier, Rivière Anaïs, Maurice Tangui. Blockade of the σ_1 chaperone impairs brain plasticity induced in mice by habituation to a complex environment, the Hamlet test. *Physiopathology of Sigma-1 (σ_1) Receptors, An European Symposium*, Barcelona, Spain, V 2017

Maurice Tangui, Gilabert Damien, Rossel Mireille, Trousse Françoise, **Crouzier Lucie**. Analysis of topographic memory and hippocampal neurogenesis in mice using the Hamlet Test. *26th Annual Meeting of the International Behavioral Neuroscience Society*, Hiroshima, Japan, VI 2017

Crouzier Lucie, Teuf Olivier, Rivière Anaïs, Maurice Tangui. Blockade of the σ_1 chaperone impairs brain plasticity induced in mice by habituation to a complex environment, the Hamlet test. *26th Annual Meeting of the International Behavioral Neuroscience Society*, Hiroshima, Japan, VI 2017

Crouzier Lucie, Roques Chloé, Peter Coralie, Maurice Tangui. Blockade of the σ_1 chaperone receptor prevents brain plasticity induced in mice by habituation to a complex environment, the Hamlet test. *47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, Washington, DC, USA, XI 2017

Crouzier Lucie, Gilabert Damien, Mendez-David Indira, Gardier Alain M., David Denis J., Maurice Tangui. Training in an enriched and complex environment, the Hamlet test, alleviates chronic corticosterone-induced depressive status in mice. *48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, San Diego, CA, USA, XI 2018

Delprat Benjamin, **Crouzier Lucie**, Delettre Cécile, Maurice Tangui. Behavioral phenotyping of a Wolfram syndrome transgenic mouse model showed cognitive

alteration and anxiety disorder. *48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, San Diego, CA, USA, XI 2018

Delprat Benjamin, **Crouzier Lucie**, Diez Camille, Maurice Tangui. Behavioral phenotyping of a novel Wolfram syndrome zebrafish model. *49th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, Chicago, IL, USA, XI 2019

Crouzier Lucie, Diez Camille, Barbereau Clément, Sarniguet Jérôme, Cubedo Nicolas, Maurice Tangui, Rossel Mireille, Delprat Benjamin. ZebraSens platform. *RAM/ANEXPLO day*, Montpellier, France, 2020

Crouzier Lucie, Denus Morgane, Richard Elodie M., Tavernier Amarande, Diez Camille, Cubedo Nicolas, Maurice Tangui, Delprat Benjamin. Sigma-1 receptor is critical for mitochondrial activity and unfolded protein response in larval zebrafish. *3rd European Symposium of Sigma-1 receptors physiopathology*, Bari, Italia, 2021

Crouzier Lucie, Richard Elodie M., Diez Camille, Alzaeem Hala, Denus Morgane, Peyrel Amandine, Cubedo Nicolas, Maurice Tangui, Delprat Benjamin. Phenotypic characterization of a novel zebrafish model of Wolfram syndrome, a rare genetic disease. *50th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, Chicago, IL, USA, XI 2021

García-Pupo Laura, **Crouzier Lucie**, Meunier Johann, Delprat Benjamin, Bencomo Martinez Alberto, Sablón Carrazana Marquiza, Menendez Soto del Valle Roberto, Orta Salazar Erika, Diaz Cintra Sofia, Rodriguez-Tanty Chryslaine, Maurice Tangui. Amylovis-201, a novel and potent sigma-1 protein agonist with anti-amyloidogenic activity, is a potential compound for the treatment of Alzheimer's disease. *Protein Aggregation Meeting*, Leuven, Belgium, 2022

TALKS

“Identification of therapeutic molecules in zebrafish model to treat the wolfram syndrome”. Meeting of patient families. *Rare diseases platform*, Paris, France, 2019

“Role of Sigma-1 receptor on brain plasticity induced by a complex environment : the Hamlet test[®]”. *2nd European Symposium of Sigma-1 receptors physiopathology*, Riga, Latvia, 2019

“Characterization of a new mutant model Pde6a in zebrafish”. General meeting of *SOS Retinite* association, Montpellier, France, 2019

“Identification of therapeutic molecules in zebrafish model to treat the wolfram syndrome”. *La semaine du cerveau. Society of Neurosciences*, Montpellier, France, 2021

“Activation of the Sigma-1 receptor chaperone alleviates Wolfram syndrome disorders by restoring ER-mitochondrion signaling”. *3rd European Symposium of Sigma-1 receptors physiopathology*, Bari, Italia, 2021

“NCS1: a new relevant therapeutic target to treat Wolfram syndrome”. *Seminar organized by Zebraclub*, Montpellier, France, 2022