



HAL
open science

Dégénérescence musculaire chez *Caenorhabditis elegans* : caractérisation morphologique et étude de supresseurs

Nicolas Brouilly

► To cite this version:

Nicolas Brouilly. Dégénérescence musculaire chez *Caenorhabditis elegans* : caractérisation morphologique et étude de supresseurs. Anatomie, Histologie, Anatomopathologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10143 . tel-01165141

HAL Id: tel-01165141

<https://theses.hal.science/tel-01165141>

Submitted on 18 Jun 2015

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.

Thèse de l'Université de Lyon

Délivrée par

L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale BMIC

Diplôme de Doctorat
(arrêté du 7 août 2006)

Dégénérescence musculaire chez
Caenorhabditis elegans :
Caractérisation morphologique
et étude de suppresseurs

Soutenue publiquement le 23 septembre 2013

par

Nicolas Brouilly

Membres du jury :

Jean-Louis BESSEREAU, Professeur
Gillian BUTLER-BROWNE, Directrice de Recherche
Kathrin GIESELER, Professeure
Laurent MESSONNIER, Directeur de Recherche
Grégoire MICHAUX, Chargé de Recherche

Président
Rapporteur
Directrice de thèse
Examineur
Rapporteur

A Juliette,

Remerciements

Je souhaite adresser mes premiers remerciements à Kathrin Gieseler, ma directrice de thèse. Je la remercie pour sa présence, pour tout le temps qu'elle m'a consacré, pour avoir toujours tout fait en son pouvoir pour que ma thèse se déroule dans les meilleures conditions et pour sa passion de la recherche qu'elle m'a transmise.

Je tiens à remercier Nicole Mounier qui a également beaucoup œuvré pour le bon déroulement de ma thèse. Je remercie aussi Laurent Ségalat qui m'a permis de débiter dans cette équipe.

Je remercie Pierre Couble et Guy Mouchiroud, les deux directeurs successifs du CG(ϕ)MC, pour m'avoir permis de travailler dans l'institut pendant ces quatre années, l'Université Claude Bernard Lyon 1, le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour m'avoir financé et l'Ecole Doctorale BMIC pour m'avoir attribué cette bourse.

Je remercie chaleureusement tous les membres actuels et anciens de l'équipe qui m'ont apporté leur aide inestimable, notamment Claire Lecroisey, Edwige Martin, Jean Giacomotto, Florence Solari, Laura Pierson, Laure Granger, Caroline Borrel, Adeline Mergoud-dit-Lamarche, Laurent Molin, Jessica Cisek, Elodie Vallin, Marie-Christine Mariol, Maïté Carre-Pierrat, Ludivine Walter, Stéphanie Bellemin et Loïc Fort.

Je remercie également les autres locataires du 5^{ème} étage, notamment l'équipe Kretz, Noufissa Latif, l'équipe de DTAMB/Biofidal et les deux équipes de l'unité d'Ecologie Microbienne qui ont toujours toutes assuré une ambiance chaleureuse et conviviale. J'en profite pour souhaiter la bienvenue à l'équipe de Jean-Louis Bessereau au 5^{ème} et j'espère qu'ils s'intégreront rapidement dans cette bonne ambiance.

Je remercie les membres de l'équipe pédagogique de génétique qui ont participé à ma découverte de l'enseignement et notamment Ingrid Masse, Sandrine Gonin-Giraud, Joëlle Thomas, Frédéric Moret et Stéphanie Gobert-Gosse.

Je remercie chaleureusement tous les membres du CG(ϕ)MC que j'ai côtoyé pendant ces quatre années et en particulier Yohan Chaix, Francis Ramond, Nicolas « NJT » Joly Tonetti, Anh-Thu Nguyen, Camille Enjolras, Manale El Kharbili, Laure Sapey-Triomphe, Matias Melendez, Romain Lefebvre, Gaëlle Robin, Sabine Lotteau, Elise Arbeille, Fabien Soulavie,

Pascal Trempat, Maëlle Jospin, Viviane Lainé, Julien Falk, Jhony « *The Voice* » El Maalouf, Clément Robert, Jean-Luc Duteyrat et Odile Berthier-Vergnes.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu collaboré sur les plateformes de microscopies : Michel Labouesse, Yannick Schwab et Coralie Spiegelhalter à l'IGBMC, Béatrice Burdin et Constantin Matei au CTμ, Nathalie Streichenberger au CECIL.

Je souhaite remercier les personnes qui par leur enseignement passionné et passionnant, ou leur encadrement, m'ont mené professionnellement où je suis. Merci à Christel Praillet, Stéphanie Darmochod, Christian Vélot, Nathalie Bonnefoy-Bérard, Flavia Tisserant...

Je tiens également à remercier les personnes qui ont fait qui je suis aujourd'hui, ma famille, et en particulier mes parents Gisèle et René, mon frère Patrick, Emilie et ma filleule Juliette. Je remercie également toute ma famille Saint-Clémentaise et en particulier Marie-Odile Brouilly ma marraine, Gilles son mari et leurs enfants ; et toute ma famille bretonne en particulier Serge Poupon, mon parrain, Chantal sa femme et leurs enfants.

J'ai bien sûr une pensée pour tous mes amis qui m'ont soutenu pendant ces quatre années, à qui je dois tant et qui ont dû subir mon humeur, mon emploi du temps... DâDâ et Sanjana, Radi et Franz, Damien et Camille, Michou, Seb et BlanBlan, Jo, Matthew, Tifenn, GiGi, JP et Chloé, Clairette, Flo, Ben, Tom et Clémence, Mégot, Lolo, Sybille, Céline et Pascal, la troupe de théâtre de Saint Germain au Mont d'Or et Eric Schietse son metteur en scène, la troupe de théâtre de Curis au Mont d'Or et Monique Bailly sa metteur en scène, Anne-Laure, Lise, David et Vicky, Jane et toutes les autres personnes qui en croisant mon chemin m'ont permis d'arriver là.

Je terminerai avec de tendres et infinis remerciements à ma compagne, ma concubine, ma titine, Julie qui partage ma vie dans le rose et le gris.

Sommaire

Abbréviations	1
Introduction Générale	3
Chapitre 1er: Le muscle strié chez les vertébrés	5
<u>I. Développement du muscle strié squelettique chez les vertébrés</u>	5
I.1. Développement des somites	5
I.2. Implication des molécules de signalisation	6
I.3. Développement du myotome	7
I.4. Les « <i>Myogenic Regulatory Factors</i> » ou MRFs	7
I.5. Les cellules satellites	7
I.6. Mise en place des sarcomères et de l'innervation	8
<u>II. Anatomie et physiologie du muscle strié squelettique chez les vertébrés</u>	10
II.1. Organisation du muscle	10
II.2. Les types de fibres musculaires	10
II.3. Les mitochondries dans le tissu musculaire	11
II.4. L'unité contractile du muscle : le sarcomère	12
<u>III. L'unité motrice chez les mammifères : du système nerveux central à la contraction musculaire</u>	14
III.1. Le potentiel d'action et la libération d'acétylcholine	14
III.2. Le potentiel de membrane et la libération de calcium	14
III.3. La contraction des sarcomères	16
III.4. Le relâchement des sarcomères	17
III.5. La transmission de la force contractile	18
III.5.1 Les disques Z	18
III.5.2. Les lignes M	20
III.5.3. Les costamères	22
<u>IV. Exercice, sarcopénie et pathologies</u>	23
IV.1. Exercice, entraînement physique et fatigue	23
IV.2. Amyotrophie et Sarcopénie	24
IV.3. Autres maladies du muscle	25

Chapitre 2ème: La Dystrophie Musculaire de Duchenne	27
<u>I. Découverte et symptômes</u>	27
I.1. Historique	27
I.2. Symptômes	28
<u>II. Origine génétique de la DMD</u>	30
II.1. La découverte du gène responsable de la DMD	30
II.2. Le gène DMD et ses produits	30
II.3. Les domaines protéiques des isoformes longues	32
II.4. Les « <i>Dystrophin Related Proteins</i> »	33
II.5. Les mutations à l'origine de la DMD	34
<u>III. La dystrophine et le DGC</u>	35
III.1. La composition du « <i>Dystrophin Glycoprotein Complex</i> » (DGC)	35
III.2. Les fonctions du DGC	38
III.3. Les fonctions supposées de la dystrophine	38
<u>IV. Etat des connaissances de la physiopathologie de la DMD</u>	39
IV.1. L'hypothèse mécanique	39
IV.2. L'hypothèse calcique	40
IV.3. L'hypothèse inflammatoire	40
IV.4. L'hypothèse vasculaire	41
<u>V. Diagnostic, prise en charge, traitements actuels et pistes de traitements</u>	42
V.1. Méthodes de diagnostic	42
V.2. Prise en charge	42
V.3. La thérapie pharmacologique	44
V.3.1. Les glucocorticostéroïdes	44
V.3.2. L'utrophine	45
V.3.3. La translecture de codons stop	45
V.3.4. Le saut d'exon	46
V.3.5. Autres pistes	47
V.4. La thérapie génique	47
V.5. La thérapie cellulaire	48
V.6. Conclusion	49
<u>VI. Modèles d'étude de la DMD</u>	49
VI.1. Le modèle murin <i>mdx</i>	49
VI.2. Le modèle canin <i>cxmd</i>	50
VI.3. Les lignées cellulaires	51
VI.4. Le modèle félin <i>hfmd</i>	51
VI.5. Le modèle chez le poisson zèbre <i>Danio rerio</i>	52
VI.6. Le modèle chez le nématode <i>C. elegans</i>	53
VI.7. Le modèle chez la drosophile <i>Drosophila melanogaster</i>	53
VI.8. Le modèle porcin	53
VI.9. Conclusion	54

Chapitre 3ème : <i>C. elegans</i> comme modèle d'étude	55
<u>I. Historique</u>	55
<u>II. Anatomie générale</u>	55
<u>III. Cycle de vie</u>	58
III.1. Le développement embryonnaire	58
III.2. Le développement post-embryonnaire	58
<u>IV. Le génome de <i>C. elegans</i></u>	60
<u>V. Outils pour l'étude de la biologie de <i>C. elegans</i></u>	60
V.1. L'ARN interférence	60
V.2. Transgénése	61
V.3. Microscopies optique et électronique	62
<u>VI. Récompenses obtenues liées à <i>C. elegans</i></u>	63
Chapitre 4ème: Les muscles de <i>C. elegans</i> et le modèle DMD	64
<u>I. Introduction</u>	64
<u>II. La structure des muscles striés chez <i>C. elegans</i></u>	64
II.1. La morphologie des « <i>body wall muscles</i> »	64
II.2. Le développement des « <i>body wall muscles</i> »	65
II.2.1 La migration cellulaire	66
II.2.2 La polymérisation des filaments contractiles	66
II.2.3 L'attachement des cellules à l'hypoderme	67
II.2.4 Les bras musculaires	68
<u>III. L'unité motrice chez <i>C. elegans</i></u>	68
III.1. L'innervation	68
III.2. Le couplage excitation-contraction	68
III.3. La production de la force contractile	69
III.4. La transmission de la force contractile	69
III.4.1. Les corps denses	70
III.4.2. Les lignes M	72
III.4.3. Les plaques d'attachement	73
III.4.4. Les organites fibreux	73
<u>IV. La locomotion de <i>C. elegans</i></u>	74
<u>V. Le modèle de la DMD chez <i>C. elegans</i></u>	74
V.1. Le gène <i>dys-1</i> et la protéine DYS-1	75
V.2. Le mutant <i>dys-1(cx18)</i>	75
V.3. Le double mutant <i>dys-1(cx18); hlh-1(cc561)</i>	76

Chapitre 5ème: Résultats	77
<u>I. Article N°1: ZYX-1, the unique zyxin protein of <i>Caenorhabditis elegans</i>, is involved in dystrophin-dependent muscle degeneration</u>	77
<u>II. Article N°2: Chemical genetics unveils a key role of mitochondrial dynamics, cytochrome c release and IP3R activity in muscular dystrophy</u>	105
<u>III. Article n°3 (en préparation): The ultrastructural and chronological study of muscle degeneration and its recovery highlights a crucial role for exercise and plasma membrane repair</u>	139
Chapitre 6ème: Discussion Générale et Perspectives	181
<u>I. Physiopathologie chez le modèle DMD</u>	181
1.1. Les défauts précoces en absence de DYS-1	181
1.2. Les conséquences de ces défauts précoces	182
1.3. Le type de mort cellulaire	182
<u>II. Exercice et réparation membranaire dans la physiopathologie</u>	183
II.1. Exercice dans la physiopathologie	183
II.2. Protection et réparation membranaire dans la physiopathologie	184
II.3. Phases de léthargie chez <i>C. elegans</i>	185
<u>III. Analyse systémique de la dégénérescence musculaire chez <i>C. elegans</i></u>	187
<u>IV. Le mutant <i>dys-1(cx18)</i> et implication de la mutation <i>hlh-1(cc561)</i></u>	189
<u>V. La dégénérescence dystrophine-dépendante : un vieillissement du muscle accéléré ?</u>	191
Références bibliographiques	195

Abbréviations

aa : acides aminés

AAV : « Adeno-Associated Viruses »

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADNcomplémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARNi : ARNinterférence

ATP : adénosine triphosphate

BMD : « Becker Muscular Dystrophy »

BMP : « Bone Morphogenic Proteins »

C. elegans : Caenorhabditis elegans

CC : « Coiled-Coil »

DAPC : « Dystrophin-associated Protein Complex »

DGC : « Dystrophin-associated Glycoprotein Complex »

DHPR : « Dihydropyridine Receptor »

DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne

DRP1 : « Dystrophin Related Protein 1 »

GFP : « Green Fluorescent Protein »

GRMD : « Golden Retriever Muscular Dystrophy »

HFMD : « Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy »

HLH-1 : « Helix Loop Helix 1 »

IP3 : Inositol Trisphosphate

IP3R : « IP3Receptor »

kb : kilobases

kDa : kilodalton

LIM : « Lin-1, Isl-1 and Mec-3 »

mdx : « muscular dystrophy X-linked »

miR : « microRNA »

MLP : « Muscle LIM Protein »

MosSCI : « MosSingle Copy InSertion »

MRF : « Myogenic Regulatory Factors »

N2 : souche sauvage de référence de *C. elegans*

NES : « Nuclear Export Signal »

NMD :« Nonsense-mediated mRNA decay »

nNOS : « neuronal Nitric Oxide Synthase »

NO :« Nitric Oxide »

pb :paires de bases

PAT :« Paralyzed at two-fold »

PCR :« Polymerase Chain Reaction »

QI : Quotient Intellectuel

ROS :« Reactive Oxxygen Species »

RYR :« Ryanodin-sensitive Ca²⁺Release »

SERCA :« Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase »

siRNA :« small interfering RNA »

UV :ultraviolet

Introduction Générale

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est la myopathie la plus sévère et la plus fréquente en touchant une naissance masculine sur 3500. La maladie est due à l'absence de dystrophine fonctionnelle causée par une mutation dans le gène codant la protéine. Les patients perdent progressivement l'usage de la marche entre 8 et 12 ans et décèdent entre 20 et 30 ans. Aucun traitement ne permet aujourd'hui d'empêcher l'évolution de la maladie.

En absence de dystrophine, la fibre musculaire meurt par un processus appelé dégénérescence musculaire dont les étapes ne sont pas encore clairement connues. La compréhension du processus de dégénérescence musculaire permet d'identifier les mécanismes cellulaires impliqués et potentiellement pertinents comme cibles thérapeutiques.

Les différents modèles animaux à disposition de la communauté scientifique permettent d'identifier ces mécanismes cellulaires. L'équipe dans laquelle j'ai travaillé a mis au point un modèle de la DMD chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Mes travaux de thèse portent sur la caractérisation morphologique de la dégénérescence musculaire dystrophine-dépendante de ce modèle et sur l'étude de suppresseurs génétiques et pharmacologiques.

Dans le premier chapitre de l'introduction, j'aborde le développement du muscle et la fonction musculaire pour bien appréhender les structures et fonctions qui peuvent être altérées dans la DMD. Je développe également les pathologies du muscle – autres que les myopathies – dans le but d'établir une comparaison entre DMD et sarcopénie dans la discussion générale.

Dans un second chapitre, une introduction sur la DMD traite de l'historique de la maladie, de l'état des connaissances actuelles, du diagnostic, de la prise en charge ainsi que des traitements actuels et futurs et des différents organismes modèles à disposition de la communauté scientifique.

Enfin dans les Chapitres 3^{ème} et 4^{ème}, je présente l'organisme modèle *C. elegans*, le muscle du nématode et le modèle DMD. Je présente brièvement la locomotion chez *C. elegans* pour aider le lecteur à comprendre l'importance des forces et de l'exercice dans le processus de dégénérescence musculaire qui fait l'objet d'une partie de la discussion générale.

Dans le Chapitre 5^{ème} je présente les résultats de mes travaux de thèse. J'ai notamment caractérisé la morphologie du tissu musculaire chez le modèle DMD du

nématode par microscopie électronique durant le processus de dégénérescence (Article N°3, en préparation). Les cellules en dégénérescence présentent une perturbation progressive de leurs structures sarcomériques et de leurs organites. J'ai également mis en évidence la perte d'intégrité du sarcolemme, la membrane plasmique des cellules musculaires. Enfin, j'ai observé l'apparition de vésicules uni-membranées et multi-membranées et proposé un lien avec la voie autophagique et la réparation membranaire. Mes résultats suggèrent que deux molécules pharmacologiques, la prednisone et le muscimol, qui réduisent significativement la dégénérescence du muscle, améliorent directement l'intégrité du sarcolemme. De plus, j'ai pu mettre en évidence que la force exercée par le muscle influence le taux de dégénérescence musculaire chez le modèle DMD du nématode.

Dans le cadre de l'étude de la protéine ZYX-1, j'ai caractérisé son rôle de suppresseur génétique de la dégénérescence musculaire dystrophine-dépendante (Article N°1). J'ai d'abord caractérisé la localisation de ZYX-1 au niveau des structures d'ancrage des filaments contractiles et dans le noyau. Nos résultats ont également montré une dynamique importante de la protéine dans la cellule musculaire suggérant un rôle dans la transduction du signal des structures sarcomériques vers le noyau. ZYX-1 pourrait donc jouer un rôle de détecteur de l'état du muscle et contribuer ainsi à la dystrophie.

J'ai également contribué à une étude s'intéressant au rôle des mitochondries dans la dégénérescence musculaire dystrophine-dépendante chez le nématode (Article N°2). Cette étude a notamment permis d'apporter la première indication pour l'existence d'un pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) chez le nématode, et de mettre en évidence un rôle du cytochrome c dans la mort des cellules musculaires. Notre hypothèse de travail, est que la perte d'intégrité du sarcolemme induit une augmentation des concentrations calciques intracellulaires. Cette augmentation serait à l'origine de l'ouverture du mPTP et de la libération du cytochrome c dans le cytoplasme. Via son interaction avec la protéine ITR-1, un canal calcique orthologue du récepteur du inositol triphosphate (IP3R), que nous avons pu mettre en évidence, le cytochrome c contribuerait – par un mécanisme encore inconnu – à la mort des cellules musculaires.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse, suggèrent que la perte de fonction de la dystrophine affecte chez le nématode l'intégrité du sarcolemme et des structures d'ancrage des sarcomères et déclenche ainsi une cascade d'évènements intracellulaires conduisant *in fine* à la mort de la cellule musculaire. Ainsi, mes travaux de thèse mettent en évidence de nouveaux mécanismes cellulaires impliqués dans la dégénérescence musculaire et ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement de thérapies visant à cibler les défauts primaires ou secondaires induits par la perte de fonction de la dystrophine.

Chapitre 1^{er} :

Le muscle strié chez les vertébrés

Chez l'homme, les muscles représentent 40 à 50% de la masse corporelle et composent ainsi le tissu le plus abondant du corps humain. Il s'agit d'un tissu mou dont la propriété principale est de pouvoir se contracter et se relâcher sous le contrôle du système nerveux et ainsi produire des forces et du mouvement.

Il y a trois classes de muscles chez les vertébrés :

- les muscles striés squelettiques ont pour fonction la motricité, le maintien de la posture, la stabilisation des articulations, le soutien des autres tissus mous, la gestion de l'ouverture/fermeture des organes et la régulation thermique corporelle ;

- le muscle strié cardiaque a pour fonction de faire circuler le sang dans le corps en le propulsant dans les artères et en l'aspirant par les veines ;

- les muscles lisses, localisés dans les parois de certains organes internes, permettent notamment la circulation des aliments dans l'estomac et l'intestin, de l'air dans les bronchioles et du sang dans les vaisseaux.

Dans les paragraphes suivants, la formation et l'anatomie des muscles striés squelettiques seront abordées. La connaissance des étapes de la myogénèse lors du développement embryonnaire puis foetal est importante pour pouvoir apprécier l'anatomie du muscle et comprendre comment se développe une pathologie.

I. Développement du muscle strié squelettique chez les vertébrés

I.1. Développement des somites

Dans les premières étapes du développement embryonnaire, la fonction principale de la gastrulation est de créer la couche de mésoderme entre l'ectoderme et l'endoderme. Le mésoderme forme le sang, les vaisseaux sanguins, les os, le cartilage, le tissu conjonctif et les muscles. De part et d'autre du tube neural, le mésoderme est divisé en mésoderme axial (chorde dorsale), le mésoderme intermédiaire, le mésoderme paraxial et le mésoderme latéral.

A l'exception des muscles cranio-faciaux et œsophagiques, tous les muscles squelettiques embryonnaires dérivent des deux bandes de mésoderme paraxial que l'on retrouve de part et d'autre du tube neural. Chaque bande de mésoderme paraxial se divise d'abord en condensations de cellules appelées somites en commençant dans la région

antérieure et en s'ajoutant séquentiellement en région postérieure (Figure 1). Ensuite, les cellules de la partie ventrale des somites adoptent une transition épithélio-mésenchymateuse formant ainsi le sclérotome ventral qui donnera le cartilage, les vertèbres et les côtes. A l'échelle moléculaire, ce processus est caractérisé par la baisse du niveau d'expression des gènes Pax3 et Pax7, codant des facteurs de transcription (Figure 2). Les cellules de la partie dorsale des somites forment le dermo-myotome dorsal et maintiennent l'expression de Pax3 et Pax7. Celui-ci formera par la suite le derme et les muscles du tronc et des membres (Tajbakhsh et Buckingham, 2000).

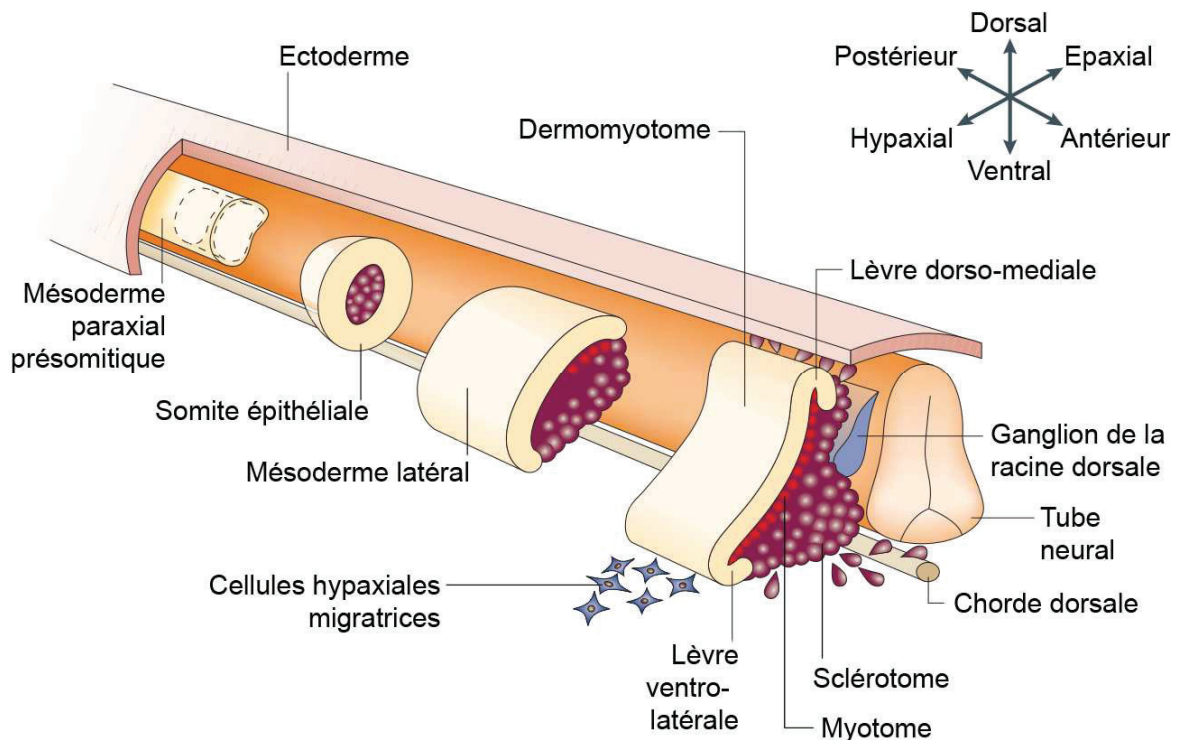


Figure 1 : Schéma représentant le développement des somites et du myotome (adaptée de Parker *et al.*, 2003).

1.2. Implication des molécules de signalisation

A cette étape, les cellules du dermo-myotome sont multipotentes et peuvent former une grande variété de tissus. L'environnement des cellules et notamment la présence de protéines de signalisation comme Notch, Sonic Hedgehog (Shh), Wnt ou les « Bone Morphogenic Proteins » (BMPs) va guider la poursuite de la myogénèse en orientant la spécification des cellules vers un tissu ou un autre. Par exemple, les BMPs favorisent la différenciation en cellules endothéliales alors que la signalisation Shh ou Wnt favorise la spécification en cellules musculaires (Ben-Yair et Kalcheim, 2008 ; Cairns *et al.*, 2008).

I.3. Développement du myotome

Trois populations de cellules en prolifération vont quitter le dermo-myotome afin de former le myotome. Les cellules progénitrices des lèvres dorso-médiane (LDM) et ventro-latérale (LVL) vont s'étendre sous le dermo-myotome pour former les régions épaxiale et hypaxiale du myotome respectivement (Kahane *et al.*, 2002). Plus tard, ces régions formeront les muscles du dos et les muscles latéraux du tronc. D'autres cellules de la LVL vont élever leurs niveaux d'expression de Pax3 et c-Met afin de s'isoler du dermo-myotome et adopter à leur tour une transition épithélio-mésenchymateuse pour pouvoir migrer ventralement et former les bourgeons de membres (Dietrich *et al.*, 1999).

I.4. Les « Myogenic Regulatory Factors » ou MRFs

Ensuite, les cellules vont poursuivre leur différenciation en myoblastes sous l'action des « Myogenic Regulatory Factors » (MRFs) codés par plusieurs gènes : Myf5, Mrf4, MyoD et MyoG. Il s'agit d'une famille de facteurs de transcription à domaines « *helix-loop-helix* » qui peuvent donc interagir entre eux et avec d'autres facteurs de transcription pour se fixer sur l'ADN au niveau d'une séquence E-box (CANNTG) et activer l'expression de gènes impliqués dans la myogénèse. Bien qu'ils présentent une redondance partielle au niveau de leur structures et de leurs fonctions, ces facteurs de transcription sont complémentaires et exprimés de façon séquentielle pour permettre la différenciation des cellules du myotome (Figure 2). Les niveaux d'expression de Myf5 et MyoD augmentent pour initier l'entrée des myoblastes en différenciation terminale (Kassar-Duchossoy *et al.*, 2004 ; Rudnicki *et al.*, 1993) puis ceux-ci se différencient en myocytes par l'action de MyoG, Mrf4 et MyoD vers la troisième semaine de développement chez la souris (Tajbakhsh et Buckingham, 2000). Les myocytes peuvent ensuite fusionner pour former des myotubes multi-nucléés.

La myogénèse est aussi guidée par des micro-ARNs. Par exemple, MyoD induit la régulation positive de miR-1 et miR-206 ciblant l'ARNm de Pax3 régulant ainsi l'apoptose des myoblastes et la progression vers la différenciation terminale (Hirai *et al.*, 2010).

I.5. Les cellules satellites

Une partie des cellules du dermo-myotome exprimant Pax3 et Pax7 ne se sont pas différenciées et restent à l'état de progéniteurs. Ces cellules seront à l'origine des cellules satellites qui se retrouveront dans le muscle squelettique post-natal pour assurer sa régénération en cas de dommages (Figure 2 ; Schienda *et al.*, 2006). Cependant, la population des cellules satellites n'est pas homogène. En effet, ces progéniteurs n'expriment

pas tous les mêmes facteurs myogéniques (Sacco *et al.*, 2008) et ils pourraient se différencier en muscle, en os ou en tissu adipeux (Asakura *et al.*, 2001).

Les cellules satellites sont localisées en périphérie des fibres musculaires, elles restent quiescentes jusqu'à ce qu'elles soient réactivées en cas de dommage du muscle. Les cellules satellites activées prolifèrent et une fois engagées, celles-ci se différencient pour fusionner avec les fibres endommagées. Après l'étape de prolifération, certaines cellules ne s'engagent pas dans la différenciation et retournent à l'état quiescent afin de renouveler le stock de cellules satellites (pour revue voir Yin *et al.*, 2013).

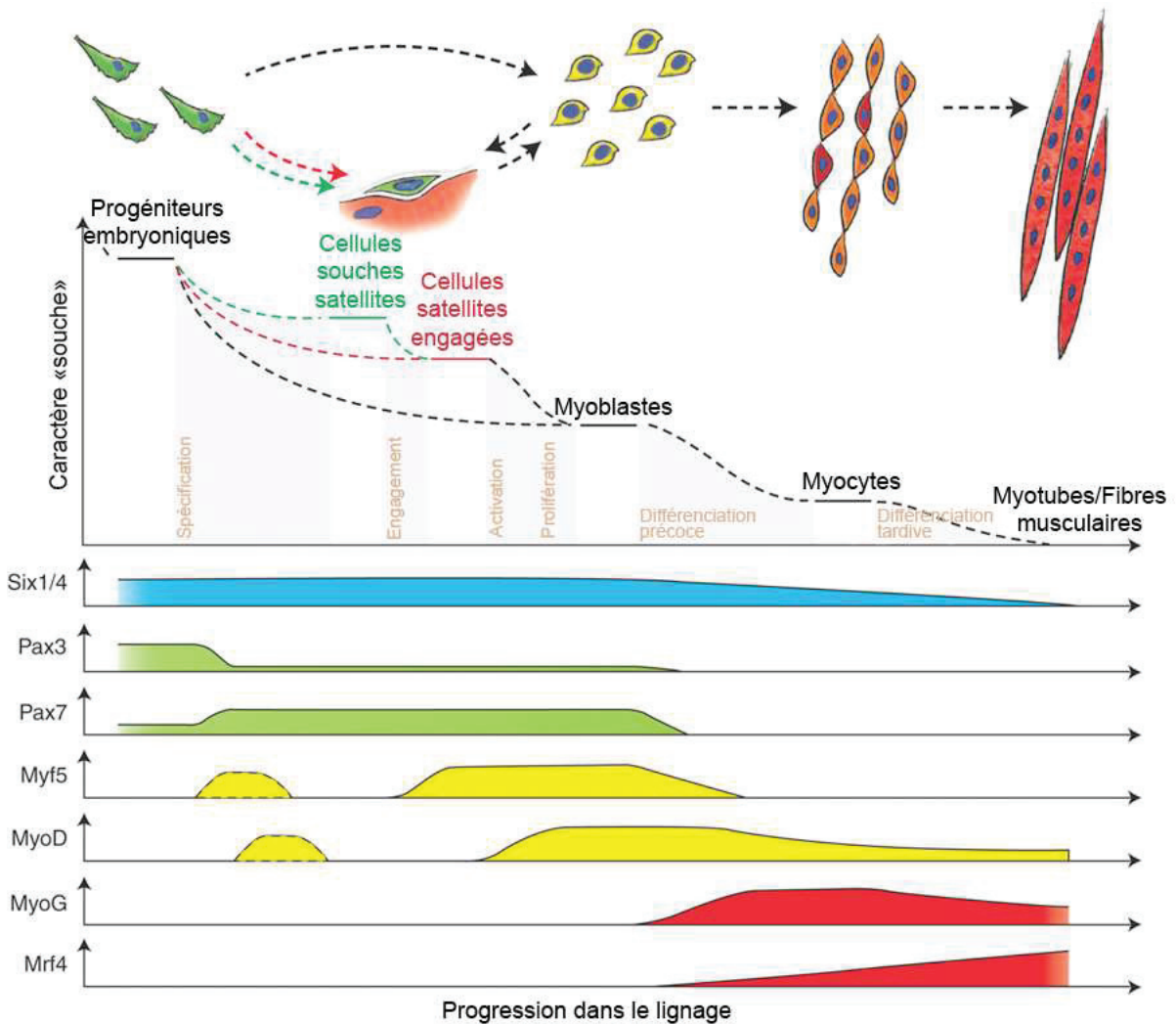


Figure 2 : Schéma représentant la myogénèse présentant le rôle des facteurs de transcription myogéniques (adaptée de Betzinger *et al.*, 2012).

1.6. Mise en place des sarcomères et de l'innervation

Après la fusion des myocytes, les myotubes commencent à mettre en place des myofilaments à l'origine des premières unités contractiles du muscle : les sarcomères. Des

études menées chez l'embryon de poulet et dans des myotubes de rat en culture montrent que la contraction précoce de ces myofilaments est nécessaire à l'établissement des structures du muscle et à son développement (Bandman et Strohman, 1982 ; De Deyne, 2000). Lors de leur différenciation terminale, les myotubes accumulent les sarcomères, leurs structures d'ancrage et sont convertis en fibres musculaires.

L'innervation de ces fibres dépend de mécanismes basés sur la localisation des récepteurs d'acétylcholine sous forme de cluster à la surface du sarcolemme et sur la composition particulière de la matrice extracellulaire au niveau du futur bouton synaptique (pour revue voir Singhal et Martin, 2011). Le rôle des protéines telles que l'agrine, MuSK (MUScle Specific Kinase), la Rapsyne et la cortactine est particulièrement important dans la formation et la maturation de la synapse (Falls *et al.*, 1993; Jennings *et al.*, 1993 ; Noakes *et al.*, 1993 ; Madhavan *et al.*, 2009 ; Bolliger *et al.*, 2010). L'activité neuronale est aussi impliquée dans la formation des jonctions neuromusculaires acétylcholine-dépendantes. En effet, lorsqu'elle est perturbée, ce sont des jonctions musculaires non-cholinergiques qui sont mises en place (Borodinsky et Spitzer, 2006).

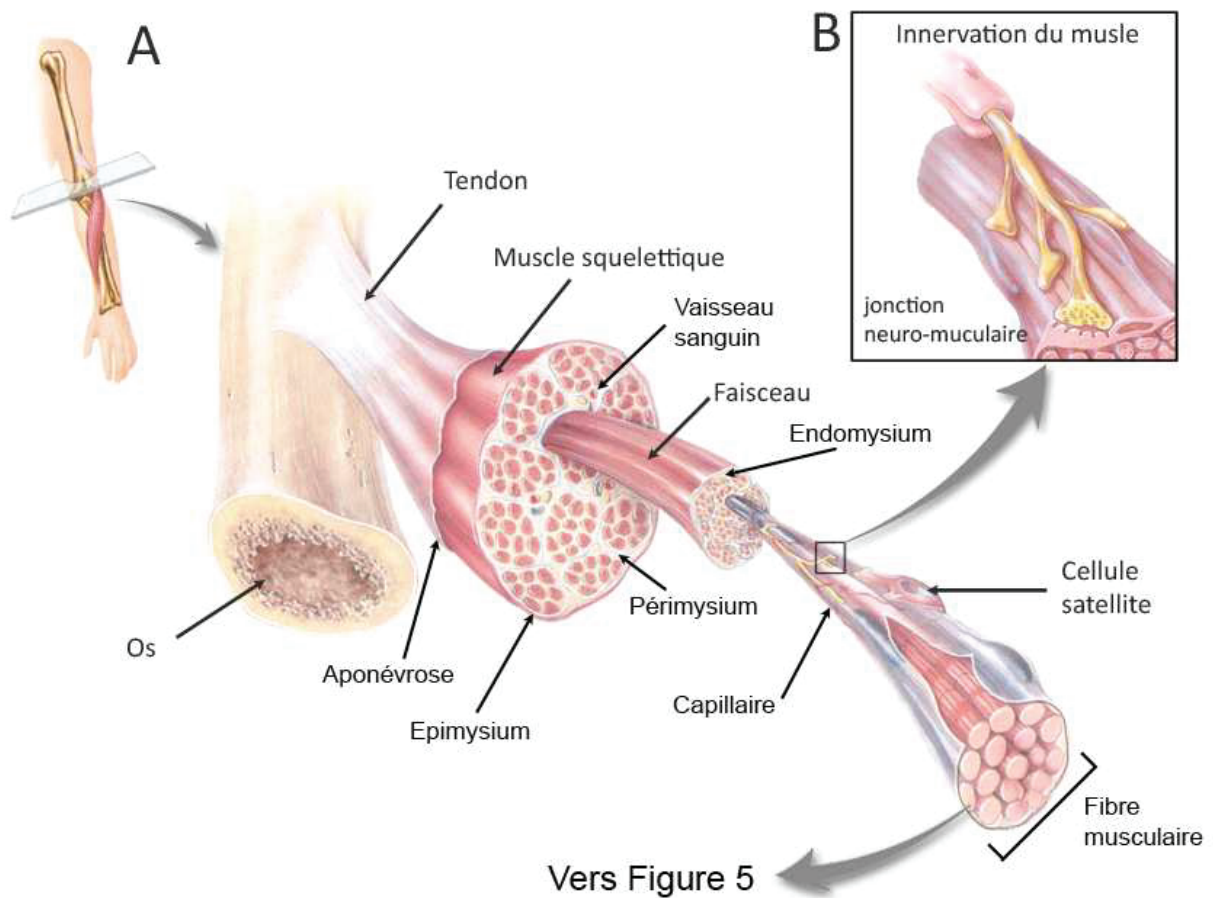


Figure 3 : Illustration de l'organisation musculaire du muscle à la fibre musculaire (adaptée de Tortora *et al.*, 2007).

II. Anatomie et physiologie du muscle strié squelettique chez les vertébrés

II.1. Organisation du muscle

Suite à la fusion des myoblastes en myotubes et à leur maturation en fibres musculaires, celles-ci contiennent plusieurs noyaux retrouvés à la périphérie de la fibre sous la membrane plasmique. Dans le tissu musculaire, la combinaison de la membrane plasmique et de la lame basale est appelée sarcolemme. Chaque fibre, mesurant de 10 à 100 µm de diamètre et jusqu'à plusieurs dizaines de centimètres de long, est enveloppée dans un tissu conjonctif interstitiel appelé endomysium (Figure 3). Plusieurs dizaines de fibres, les axones les innervant et les capillaires les irrigants sont regroupés en faisceaux par la présence du périnysium, une autre enveloppe de tissu conjonctif riche en collagène. Enfin, plusieurs faisceaux musculaires et leurs vaisseaux sanguins sont entourés par l'épimysium délimitant ainsi le muscle. L'aponévrose est la membrane fibreuse qui isole le muscle des tissus voisins (Tortora *et al.*, 2007).

II.2. Les types de fibres musculaires

Il existe trois types de fibres musculaires composant les muscles squelettiques. En coupes histologiques, celles-ci apparaissent plus ou moins rouges en fonction de leur concentration en myoglobine, une protéine permettant d'emmagasiner l'oxygène dans le muscle. En effet, les différentes fibres musculaires ne produisent pas toutes leur énergie à partir des mêmes voies métaboliques (oxydative aérobie ou glycolytique anaérobie). Ces trois types de fibres diffèrent également par leur vitesse de contraction, leur endurance et la force qu'elles développent (Figure 4):

- Les fibres à contraction lente ou fibres de type I (fibres « rouges ») sont des fibres oxydatives aérobies, endurantes et qui développent une force faible. Elles contiennent beaucoup de myoglobine, de mitochondries et leur réseau capillaire est dense.

- Les fibres à contraction rapide de type IIB (fibres « blanches ») sont des fibres glycolytiques anaérobies et peu endurantes. Elles développent une force élevée car elles sont de plus gros diamètre.

- Les fibres à contraction rapide de type IIA sont des fibres oxydatives et résistantes à la fatigue. Elles développent une force intermédiaire à celle des fibres I et IIB et se contractent aussi vite que les fibres de type IIB.

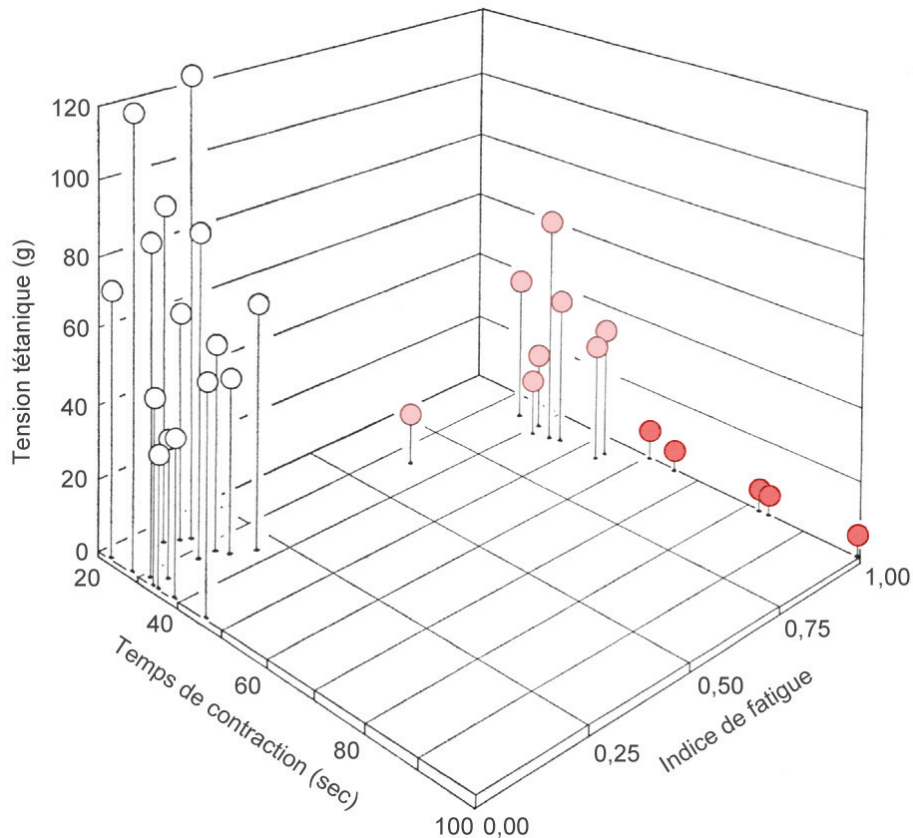


Figure 4 : Représentation en trois dimensions des profils physiologiques de 28 muscles de chats enrichis en fibres de type I (rouge), IIA (rose) et IIB (blanc) (adaptée de Burke *et al.*, 1973).

L'absence de continuité mise en évidence par la Figure 4 entre la population de fibres IIA et IIB a été comblée plus tardivement avec la découverte d'un quatrième type de fibre : les fibres IIX (Schiaffino *et al.*, 1989). Ce sont des fibres à contraction rapide, à force et à fatiguabilité intermédiaires aux fibres IIA et IIB (Larsson *et al.*, 1991).

Ces quatre types de fibres constituent donc un spectre dans lequel les fibres peuvent subir des transitions pour passer d'un type à un autre (voir Chapitre 1^{er} §IV.1.).

II.3. Les mitochondries dans le tissu musculaire

Parmi les organelles des cellules eucaryotes, le réseau mitochondrial et le réticulum sarcoplasmique jouent un rôle primordial dans la fonction musculaire. La fonction la plus importante pour les mitochondries dans le muscle sain est la production d'énergie. L'ATP nécessaire à la contraction musculaire (voir Chapitre 1^{er} §III.3.) est à 10% produit par le cycle glycolytique anaérobie où une molécule de glucose est catabolisée en 2 molécules de pyruvate (ou acide pyruvique) et 2 molécules d'ATP. Les 90% restants sont produits dans la chaîne respiratoire mitochondriale où, par exemple, la consommation de deux molécules de pyruvate permet la production de 34 molécules d'ATP.

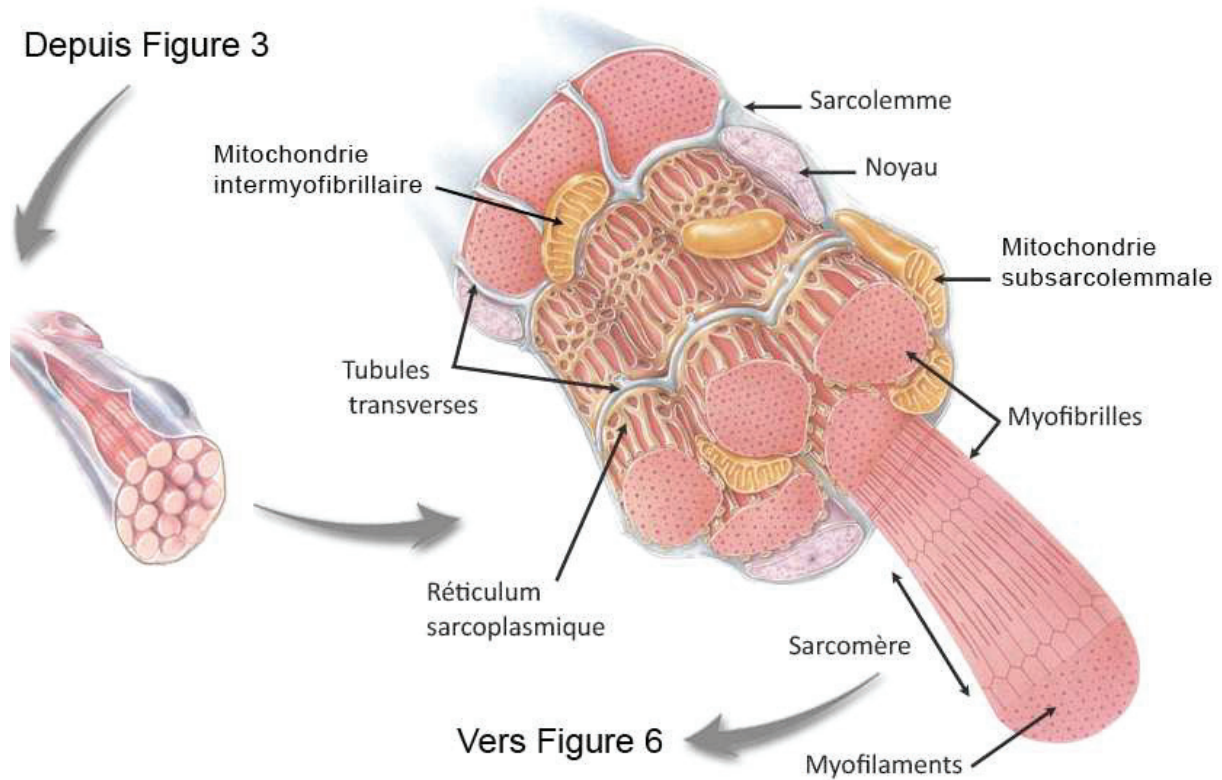


Figure 5 : Illustration de l'organisation musculaire de l'échelle de la fibre musculaire à l'échelle du sarcomère (adapté de Tortora *et al.*, 2007).

Dans le muscle, le réseau mitochondrial présente deux types de mitochondries : les mitochondries subsarcolemmal (SS) et les mitochondries intermyofibrillaires (IMF) (Figure 5). Ces deux réseaux se distinguent par leur localisation mais aussi par leur profil métabolique (importation de protéines, synthèse ou dégradation protéique, cycle respiratoire), leur profil protéomique (Ferreira *et al.*, 2010) et leurs réponses à l'activité physique (Koves *et al.*, 2005). Les mitochondries IMF ont un meilleur taux de respiration que les mitochondries SS et sont donc principalement impliquées dans la production d'énergie nécessaire à la contraction musculaire. Les mitochondries SS fournissent, quant à elles, l'énergie nécessaire aux autres fonctions cellulaires (transports membranaires, réactions enzymatiques).

II.4. L'unité contractile du muscle : le sarcomère

Les sarcomères sont les éléments responsables de la contraction musculaire. Leur composition est à l'origine de l'apparence striée des fibres musculaires dans les muscles squelettiques et cardiaques. Dans les fibres musculaires, ceux-ci sont regroupés sous forme de myofibrilles cylindriques entre lesquelles se trouvent les mitochondries IMF et le réticulum sarcoplasmique (Figure 5). En microscopie électronique, la disposition des myofilaments crée une alternance de bandes claires (bandes I pour Isotropes) et de bandes sombres (bandes A

pour Anisotropes). La bande I est formée par les filaments fins composés d'actine ancrés au niveau du disque Z (de l'allemand « *Zwischen* », qui signifie « entre ») (Figure 6). Les filaments épais composés de myosine forment la bande A et sont ancrés au niveau de la ligne M (de l'allemand « *Mittel* » qui signifie « centre »). Le sarcomère est défini comme la région cylindrique d'une myofibrille comprise entre deux disques Z successifs.

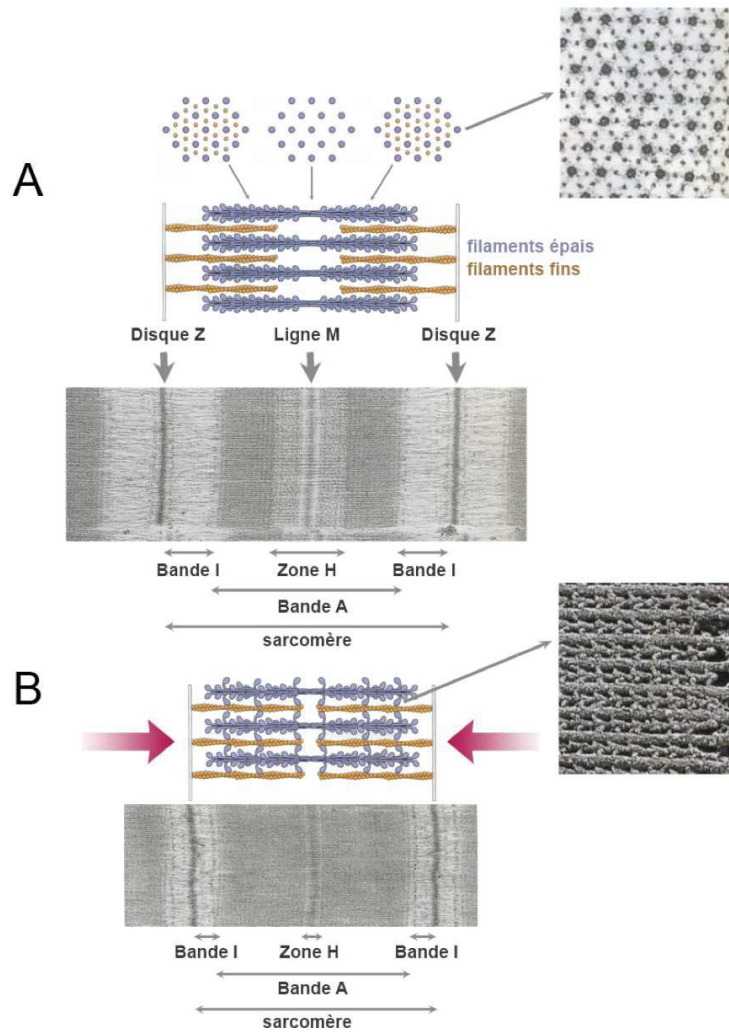


Figure 6 : Schéma du sarcomère lors de la contraction musculaire. Le muscle strié est caractérisé par l'alternance de bandes claires et foncées (bandes A). La bande A est la zone de recouvrement des filaments fins et épais, elle contient une bande plus claire en son milieu – appelée zone H (pour « *Heller* » qui signifie « plus claire ») – qui correspond à la zone composée exclusivement de filaments épais. A. Organisation d'un sarcomère relâché. B. Organisation d'un sarcomère contracté. Lors de la contraction, les filaments fins sont tirés dans la bande A, la zone H diminue jusqu'à disparaître lorsque le muscle atteint le niveau de contraction tétanique (adaptée de Karp, 2010).

L'interaction physique entre les filaments de myosine et d'actine à l'origine de la contraction sera développée dans un paragraphe ultérieur (voir Chapitre 1^{er}§III.3.).

III. L'unité motrice chez les mammifères : du système nerveux central à la contraction musculaire

Une unité motrice est constituée d'un motoneurone, d'une jonction neuromusculaire et d'un muscle. Le motoneurone possède un axone qui se projette en terminaisons nerveuses entrant en contact avec les fibres musculaires au niveau de boutons synaptiques.

III.1. Le potentiel d'action et la libération d'acétylcholine

Pour provoquer un mouvement, un influx nerveux, provenant du système nerveux central, vient stimuler le motoneurone. Un potentiel d'action (dépolérisation membranaire) est alors généré et se propage le long de l'axone du motoneurone en direction du muscle. Ce potentiel d'action parvient dans les terminaisons nerveuses, et entraîne l'ouverture de canaux calciques voltage dépendants. Suite à ce signal, par un phénomène d'exocytose, des vésicules renfermant le neurotransmetteur acétylcholine fusionnent alors avec la membrane pré-synaptique pour le libérer dans la fente synaptique. Le signal électrique se transforme alors en signal chimique.

III.2. Le potentiel de membrane et la libération de calcium

L'acétylcholine, une fois dans la fente synaptique, se fixe sur ses récepteurs situés sur la membrane des cellules musculaires (le sarcolemme, membrane post-synaptique). Cette fixation provoque un changement de conformation de ces récepteurs qui deviennent perméables aux ions sodium et potassium. L'entrée brutale de sodium et la sortie de potassium génèrent un potentiel de membrane qui se propagera jusqu'à des invaginations membranaires du sarcolemme appelées tubules T (pour « tubules transverses »).

L'arrivée du potentiel au niveau des tubules T provoque un changement de conformation de canaux voltage-dépendants à leur surface : les DHPRs (pour « *Dihydropyridine Receptor* »). Ce changement de conformation des DHPR provoquera une légère entrée de calcium extracellulaire dans la cellule, mais il provoquera surtout l'ouverture de canaux calciques qui leur sont couplés à la surface du réticulum sarcoplasmique : les canaux RYR (pour « *Ryanodin-sensitive Ca²⁺Release* »). Cette ouverture provoque le relargage massif de calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique.

Un deuxième mécanisme conduisant à la libération de calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique implique les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3R). Bien que les structures des canaux RYR et IP3R se ressemblent, les différences biophysiques entre les deux types de canaux se traduisent par un niveau de relargage du calcium par les IP3R

beaucoup plus lent (Somlyo *et al.*, 1985 ; Shirokova *et al.*, 1999 ; Boittin *et al.*, 2000). Cette fonction de relargage lent de calcium a été démontrée dans le muscle lisse (Narayanan *et al.*, 2012) alors qu'elle est encore débattue pour le muscle strié squelettique (Blaauw *et al.*, 2012).

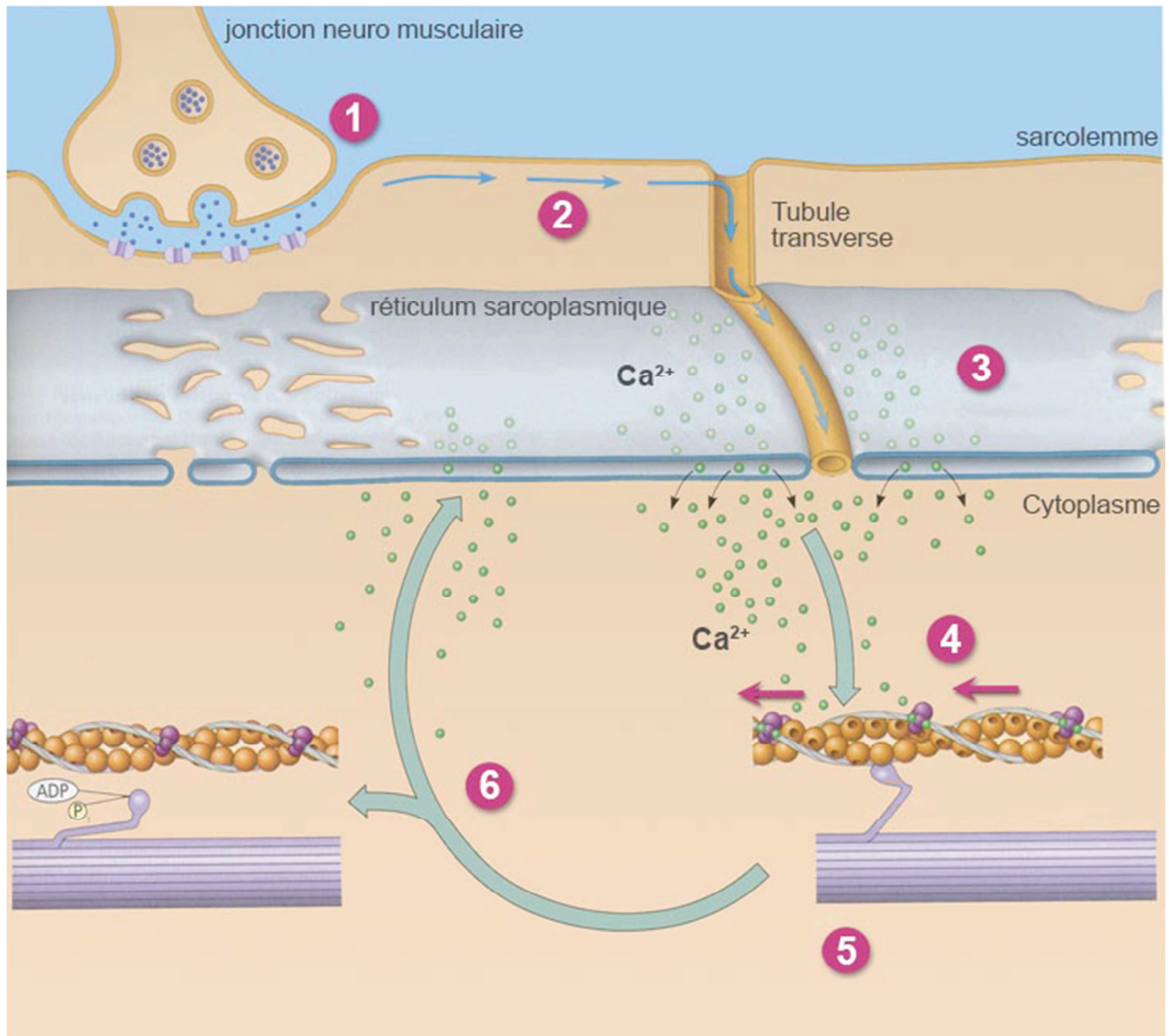


Figure 7 : Schéma du couplage excitation-contraction dans le muscle vertébré. 1. L'acétylcholine est relâché dans la fente synaptique et se fixe sur son récepteur de l'autre côté de la synapse. 2. Cette fixation provoque la propagation d'une dépolarisation de la membrane jusque dans les tubules T. 3. Cette dépolarisation entraîne l'ouverture des canaux DHPR et RYR (non représentés sur le schéma). 4. Cette ouverture provoque la sortie de calcium du réticulum sarcoplasmique et donc l'augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol. 5. Le complexe des troponines et de la tropomyosine libère les sites d'interaction entre les filaments d'actine et les filaments de myosine. 6. L'hydrolyse d'une molécule d'ATP en ADP+Pi permet l'« activation » des têtes de myosine. La suite du mécanisme de contraction est présentée en Figure 8 (adaptée de Campbell, 2007).

III.3. La contraction des sarcomères

Le raccourcissement du muscle repose sur la contraction des sarcomères. Celle-ci est basée sur le déplacement des filaments épais de myosine sur les filaments fins d'actine. Ce déplacement sera à l'origine du rapprochement des disques Z et donc du raccourcissement des sarcomères.

La contraction des sarcomères peut être résumée en deux phases : 1. le déverrouillage des sites d'interaction entre les filaments de myosine et les filaments d'actine et 2. le déplacement des filaments de myosine sur les filaments d'actine (Figure 7).

1. «*Déverrouiller les sites d'interaction entre les filaments de myosine et les filaments d'actine*». Pour former un filament fin du sarcomère, des sous-unités d'actine polymérisent en une structure de double hélice de façon à ce que les sites d'interaction avec la myosine se trouvent sur les faces externes de l'hélice. Cette interaction fait intervenir l'extrémité N-terminale de la myosine (appelée la « tête ») alors que le reste de la protéine forme les filaments épais. La tropomyosine est un hétérodimère qui s'enroule autour des filaments fins d'actine pour les stabiliser, masquant ainsi leurs sites d'interaction avec la myosine. La troponine C possède quatre sites de fixation du calcium et forme un complexe qui se lie à la tropomyosine avec les troponines T et I. Après le relargage de calcium du réticulum sarcoplasmique, la troponine C fixe quatre cations calcium et subit un changement de conformation. Ce dernier provoque le déplacement du complexe et de la tropomyosine dans les sillons de la double-hélice d'actine entraînant la libération des sites d'interaction entre l'actine et la myosine.

2. «*Déplacer la myosine sur l'actine*». La myosine connaît deux états conformationnels dépendant de son niveau d'énergie. Un état de « repos » où la tête de myosine est repliée (elle fait un angle d'environ 45° avec le filament de myosine), et un état « activé » où la tête de myosine est relevée (l'angle est alors de 90°) (Figure 8).

2.1. La catabolise d'une molécule d'ATP par les domaines ATPase de la tête de myosine lui permet de passer de l'état de « repos » à l'état « activé ». L'énergie est ainsi stockée sous la forme d'une conformation particulière de la protéine verrouillée par la présence des molécules d'ADP et du phosphate inorganique.

2.2. La libération du site d'interaction entre la tête de myosine et le filament d'actine permet l'interaction entre les deux protéines

2.3. Cette interaction provoque le départ de l'ADP et du phosphate inorganique et le passage de la tête de myosine de l'état « activé » à l'état de « repos ». Le repliement de la tête de myosine alors qu'elle interagit avec le filament fin d'actine va provoquer une force de traction sur le filament fin.

2.4. Les filaments épais de myosine étant ancrés au niveau de la ligne M et les filaments fin d'actines étant ancrés au niveau du disque Z, cette force de traction provoque le rapprochement de ces deux structures et le raccourcissement du sarcomère.

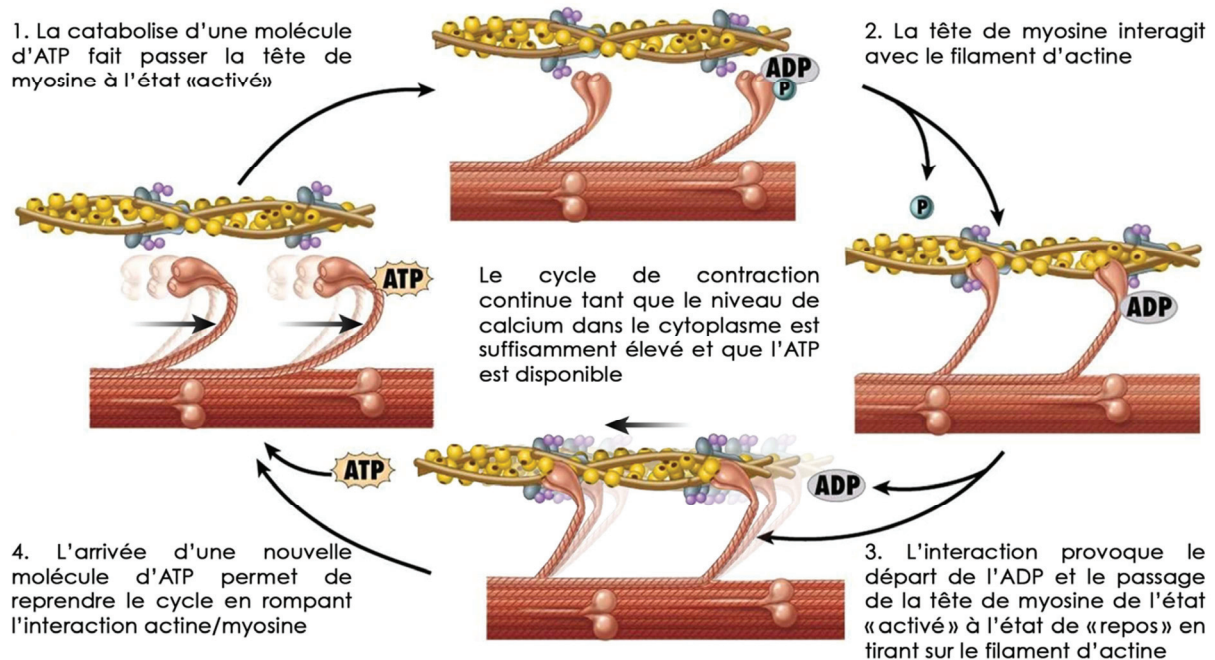


Figure 8 : Cycle de glissement de la myosine sur les filaments d'actine. En présence d'ATP, la tête de myosine passe en position « activé » en hydrolysant l'ATP en ADP+Pi. Pendant l'interaction entre la tête de myosine et l'actine, l'ADP+Pi est libéré, provoquant le retour de la tête de myosine à son état de « repos » ceci provoquant la force de traction sur le filament fin. Adaptée de Principes d'Anatomie et de Physiologie, 2006, John Wiley & Sons.

Les étapes 2.1 à 2.4 se répèteront tant que le niveau de calcium intracellulaire permettra la libération des sites d'interaction entre la myosine et l'actine et tant que la concentration en ATP sera suffisante pour faire passer les têtes de myosine de la conformation de « repos » à la conformation « activée ». Avec la répétition de ces étapes, les têtes de myosines vont progresser sur les filaments fins et les sarcomères vont se raccourcir de plus en plus jusqu'à leur état tétanique de raccourcissement maximum. La vitesse de ce cycle dépendra de l'isoforme de la chaîne lourde de myosine qui constitue les filaments épais de la fibre en question : fibre rapide (IIA, IIB, IIX) ou lente (I) (voir Chapitre 1^{er} II.2.).

III.4. Le relâchement des sarcomères

Les protéines de la famille SERCA (pour « *Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase* ») assurent le repompement continu du calcium dans le réticulum sarcoplasmique. La relaxation du muscle se produit donc dès lors qu'il n'y a plus de potentiel d'action provoquant la sortie de calcium du réticulum sarcoplasmique. En effet, la concentration de calcium cytosolique

diminue alors par l'action des pompes SERCA, les sites de fixation de calcium de la troponine C sont libérés, le complexe tropomyosine/troponines masque à nouveau les sites d'interaction entre les têtes de myosine et les filaments d'actine et le pont mécanique entre les deux filaments est rompu.

Enfin, par l'action de la titine, une protéine « élastique » géante (3800 kDa), le sarcomère retrouve progressivement son état relâché. Les extrémités N-terminales de deux molécules de titine se chevauchent au niveau des disques Z où elles interagissent avec les filaments d'actine (Pyle et Solaro, 2004). Les molécules de titine s'étendent jusqu'aux lignes M formant des « ressorts » permettant la retraction passive des filaments contractiles après la contraction (Granzier et Labeit, 2004). La taille normale des filaments fins d'actine pourrait dépendre d'une autre protéine géante : la nébuline. Cette protéine ancre son extrémité C-terminale dans le disque Z en interagissant avec la titine et d'autres protéines de cette structure. Le reste de la protéine s'alignerait le long des filaments fins et servirait de « règle » afin d'en déterminer la longueur (Millevoi *et al.*, 1998 ; Witt *et al.*, 2006 ; Pappas *et al.*, 2008). Il a également été proposé que la nébuline favoriserait la sensibilité du muscle au calcium permettant ainsi une contraction plus efficace (Chandra *et al.*, 2009).

III.5. La transmission de la force contractile

Pour exporter la force générée par la contraction des sarcomères à la cellule et au muscle entier, les sarcomères présentent des structures d'ancrage mécanique à plusieurs niveaux. Les disques Z et les lignes M assurent l'uniformité des contractions à l'échelle des myofibrilles et transmettent la force contractile à la membrane cellulaire. Les costamères transmettent ensuite la force contractile de la membrane cellulaire à la matrice extracellulaire.

III.5.1 Les disques Z

Les disques Z sont les structures qui définissent les extrémités latérales des sarcomères des myofibrilles du muscle strié squelettique. Chaque disque Z ancre et aligne trois molécules majeures de ses deux sarcomères adjacents : les filaments fins d'actine, la titine et la nébuline. L'ancrage de ces molécules repose sur la complexe composition des disques Z faisant intervenir une centaine de protéines dont l'alpha-actinine, CapZ, la téléthonine, MLP (pour « Muscle Z Protein »)...

L'alpha-actinine présente quatre domaines spectrine en son centre, elle fait donc partie de la famille des spectrines et est impliquée dans l'organisation du

cytosquelette d'actine (Otey et Carpen, 2004). Elle possède également un domaine ABD (pour « *Actin-binding Domain* ») à son extrémité N-terminale et deux domaines CaM (pour « *CalModulin-like* ») à son extrémité C-terminale. Deux molécules d'alpha-actinine peuvent s'homodimériser de façon antiparallèle (Ylanne *et al.*, 2001) et seront ainsi capable d'ancrer deux filaments fin de polarités inversées faisant partie de deux sarcomères adjacents (Pyle et Solaro, 2004). En accord avec cette fonction d'ancrage des filaments contractiles, l'absence d'une des deux isoformes musculaires de l'alpha-actinine induit une vulnérabilité du muscle aux contractions forcées et répétées (Seto *et al.*, 2011). Les domaines CaM interagissent avec la titine suggérant un rôle pour l'alpha-actinine dans l'ancrage de la titine au disque Z (Atkinson *et al.*, 2001).

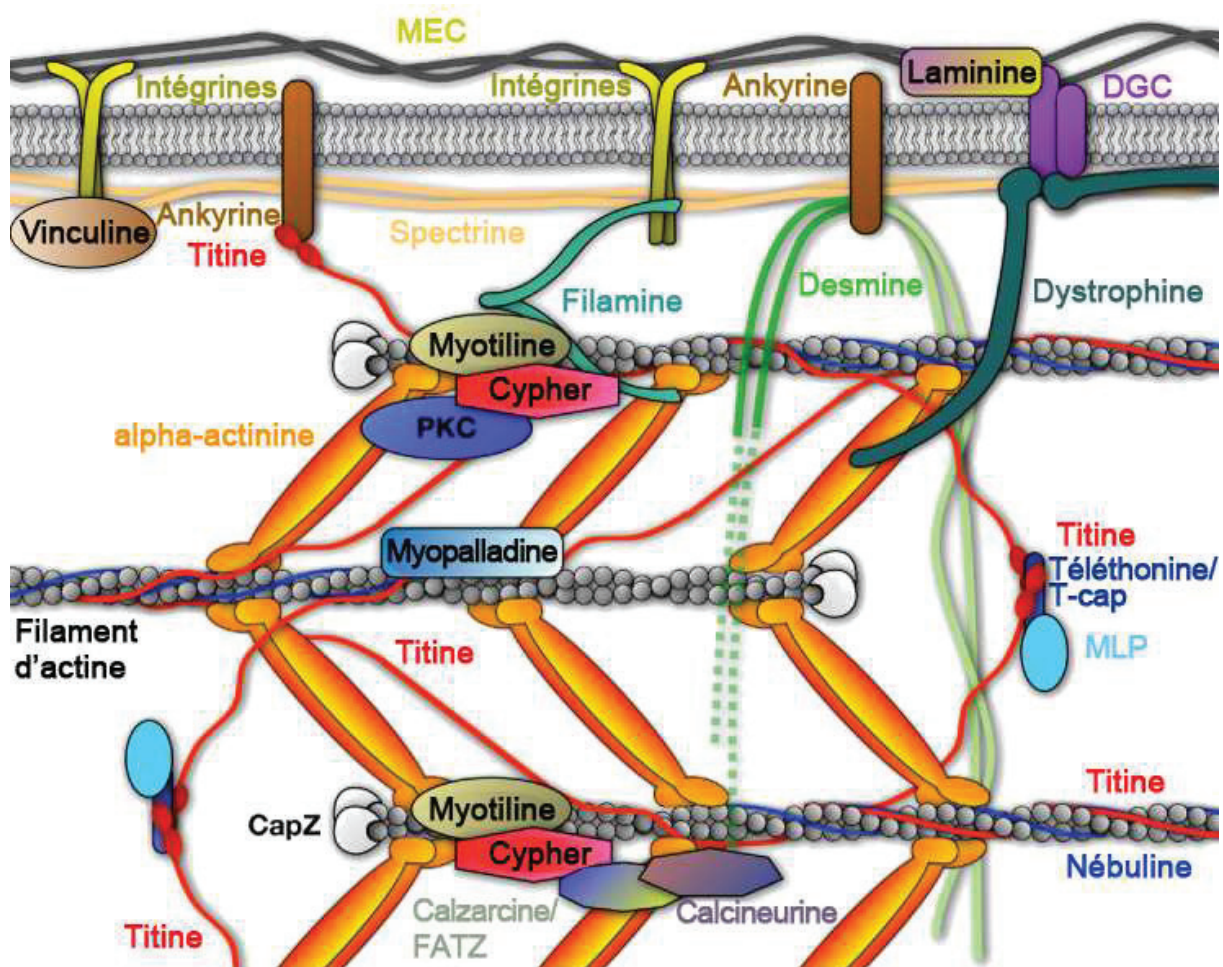


Figure 9 : Schéma du disque Z et de son ancrage au sarcolemme via un costamère dans le muscle squelettique vertébré (adapté de Sheikh *et al.*, 2007).

CapZ (ou bêta-actinine) est une autre protéine hétérodimérique composée des sous-unités alpha et bêta qui sont exprimées dans de nombreux tissus. La protéine CapZ est un élément clé qui régule les propriétés dynamiques et l'organisation des filaments

d'actine. Un filament d'actine est polarisé avec une extrémité barbée (« *barbed* ») à dynamique rapide et une extrémité pointue (« *pointed* ») à dynamique lente. Le rôle de la protéine CapZ est de lier l'extrémité barbée avec une haute affinité afin de réguler l'ajout et la perte de molécules d'actine à cette extrémité (Caldwell *et al.*, 1989 ; Littlefield *et al.*, 2001). CapZ interagit aussi avec la nébuline pour réguler, avec l'alpha-actinine, l'architecture des filaments fins au niveau du disque Z (Pappas *et al.*, 2008).

Avec l'alpha-actinine, la téléthonine est l'autre responsable de l'ancrage de la titine au disque Z. La téléthonine (ou Tcap) permet de « verrouiller » l'interaction entre les extrémités N-terminales de deux molécules de titine au niveau du disque Z. Pour l'anecdote, l'interaction téléthonine/titine est l'interaction protéine/protéine la plus forte qui ait été mesurée à ce jour (Bertz *et al.*, 2009). Au delà de son rôle mécanique, la téléthonine pourrait également être impliquée dans la régulation de la balance entre atrophie et hypertrophie du fait de ses interactions avec la myostatine et BMP10, deux protéines régulatrices de l'hypertrophie (Nicholas *et al.*, 2002 ; Nakano *et al.*, 2007). La téléthonine interagit également avec des protéines des tubules T et son rôle dans la régulation de la structure et la fonction de ces invaginations membranaires a récemment été démontrée dans le myocarde (Ibrahim *et al.*, 2013).

MLP (pour « Muscle LIM Protein » ou CRP3 pour « Cystein-Rich Protein 3 ») est une protéine à domaines LIM (pour « Lin11, Isl 1, and Mec 3 ») localisée aux disques Z où elle interagit probablement avec l'alpha-actinine et la téléthonine (Louis *et al.*, 1997 ; Knöll *et al.*, 2010). MLP est également localisée aux costamères où elle interagit avec d'autres protéines à domaines LIM (Louis *et al.*, 1997) et dans le noyau où elle peut interagir avec les facteurs myogéniques (Kong *et al.*, 1997). Ces localisations aux structures musculaires et au noyau suggèrent une fonction mécano-transductrice pour la protéine (Buyandelger *et al.*, 2011).

Par la diversité des protéines qui les composent, les disques Z peuvent donc être considérés comme des structures bivalentes avec un rôle mécanique d'ancrage et d'organisation des filaments fins et un rôle dans la mécano-transduction du muscle.

III.5.2. Les lignes M

Les lignes M sont les structures en forme de disque qui ancrent les filaments de myosine au centre du sarcomère au niveau de la ligne A. Au cours de la contraction musculaire, le rôle des lignes M est d'amortir les différences de longueur de contraction au sein d'un même sarcomère. En effet, en dépit de la présence de la nébuline pour normaliser la longueur des filaments fins d'actine (voir Chapitre 1^{er}§III.4.), les filaments d'actine n'ont pas tous la même longueur au sein d'un même sarcomère. En reliant les filaments épais de

myosine les uns aux autres, la ligne M permet d'atténuer ces différences (Figure 10 ; Agarkova *et al.*, 2003).

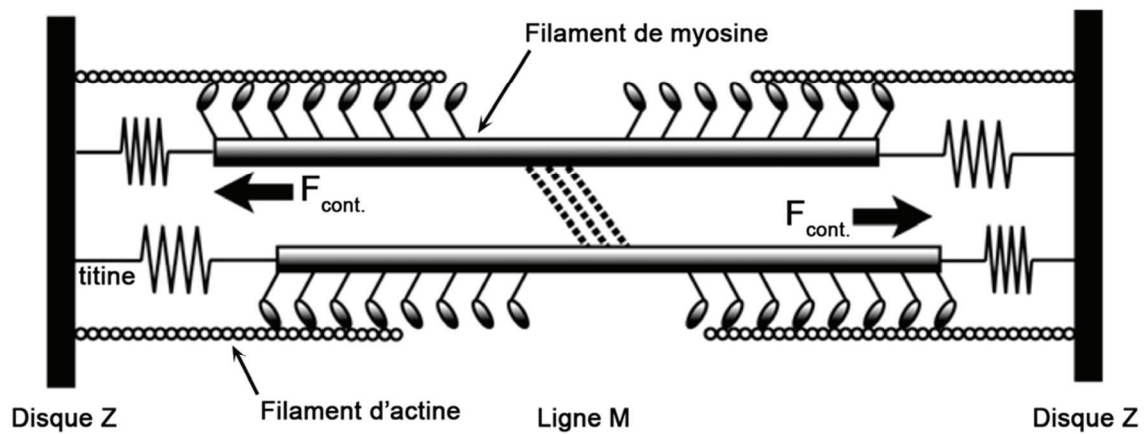


Figure 10 : Schéma d'un sarcomère à quatre filaments d'actine dont les longueurs ne sont pas homogènes (adapté de Agarkova *et al.*, 2003).

Contrairement à la composition du disque Z, celle des lignes M ferait intervenir moins de protéines différentes. En effet, l'ancrage des filaments épais de myosine à la ligne M dépend de trois protéines, les myomésines MYOM1, MYOM2 (ou « *M-protein* ») et MYOM3. Ces trois protéines sont nécessaires à l'organisation particulière des filaments de myosine (Figure 6A) car elles forment des « ponts » protéiques afin de maintenir une distance régulière entre deux filaments épais. La structure tertiaire des myomésines leur confère une élasticité particulière permettant une certaine souplesse de la ligne M lors des contractions musculaires (Pinotsis *et al.*, 2012).

Les myomésines ancrent également la titine à la ligne M par son extrémité C-terminale. Les molécules de titine s'étendent donc des lignes M aux disques Z où sont ancrées leurs extrémités N-terminale (voir Chapitre 1^{er}§III.5.1 et §III.4.).

L'obscurine est une autre protéine géante du sarcomère identifiée pour la première fois chez *C. elegans* (Benian *et al.*, 1996). Elle est localisée à la périphérie des myofibrilles et particulièrement au niveau des lignes M (Fukuzawa *et al.*, 2008). L'obscurine est requise pour l'ajout de filaments de myosine à la ligne M, elle contrôle la symétrie et le maintien des lignes M et la polarité des filaments fins d'actine (Katzemich *et al.*, 2012). Elle est reliée au réticulum sarcoplasmique via son interaction avec l'ankyrine suggérant un rôle dans la signalisation calcique du muscle en régulant la distribution des récepteurs à la ryanodine (voir Chapitre 1^{er}§III.2. ; Bagnato *et al.*, 2003).

III.5.3. Les costamères

Les costamères forment des anneaux répétés et alignés perpendiculairement à l'axe des fibres musculaires. L'aspect répété de ces anneaux vient du fait que la localisation des costamères suit celui des sarcomères sous-jacents dans la fibre musculaire. Les costamères colocalisent parfaitement avec les disques Z (Pardo *et al.*, 1983) et partiellement avec les lignes M (Porter *et al.*, 1992) (Figure 11). En reliant physiquement la périphérie des myofibrilles au sarcolemme, les costamères permettent de maintenir une distance uniforme entre les unités contractiles adjacentes. Ils transmettent donc la force contractile latéralement depuis les sarcomères jusqu'à la membrane basale et jusqu'aux fibres musculaires voisines. Ainsi, ces structures permettent de minimiser le stress physique imposé au sarcolemme lors des cycles de contraction-relaxation (Danowski *et al.*, 1992 ; Ervasti, 2003).

Les costamères sont des structures composées de deux complexes multiprotéiques ancrés à la membrane plasmique (Figure 9) :

- Une adhésion focale : il s'agit d'un complexe d'attachement permettant de relier le cytosquelette à la matrice extracellulaire. Elles sont ancrées à la membrane par un hétérodimère d'intégrines alpha et beta transmembranaires. La partie extracellulaire des intégrines interagit directement avec des composants de la matrice extracellulaire (Adams et Watt, 1993) alors que la partie intracellulaire de la beta-intégrine interagit avec des protéines cytoplasmiques comme la taline, l'alpha-actinine (voir Figure 11B), la filamine ou la tensine qui permettent un lien avec le cytosquelette d'actine (Bershadsky *et al.*, 2003). Les adhésions focales peuvent « sentir » le stress mécanique, réguler les protéines associées aux voies de signalisation modifiant l'expression de gènes et ainsi déclencher la réorganisation du cytosquelette en réponse au stress (Shyy et Chien, 1997). Elles sont donc des structures essentielles à la mécano-transduction.

- Le complexe protéique associé à la dystrophine : ce complexe est appelé DGC (pour « Dystrophin-Glycoprotein Complex ») ou DAPC (pour « Dystrophin-Associated Protein Complex »). Dans son association avec les glycoprotéines transmembranaires du DGC, la dystrophine est localisée en périphérie des fibres musculaires, sur la face cytoplasmique du sarcolemme. La composition et les fonctions du DGC seront développées ultérieurement (voir Chapitre 2^{ème} § III.1.).

Par le biais des disques Z, des lignes M et des costamères, les fibres musculaires parviennent donc à transmettre la force contractile générée à l'échelle moléculaire par le déplacement des filaments épais de myosine sur les filaments fins d'actine à la matrice extracellulaire afin de permettre la contraction à l'échelle tissulaire du muscle

entier. Au delà de cette « simple » fonction mécanique, ces différentes structures ont un rôle majeur dans la signalisation intracellulaire du muscle.

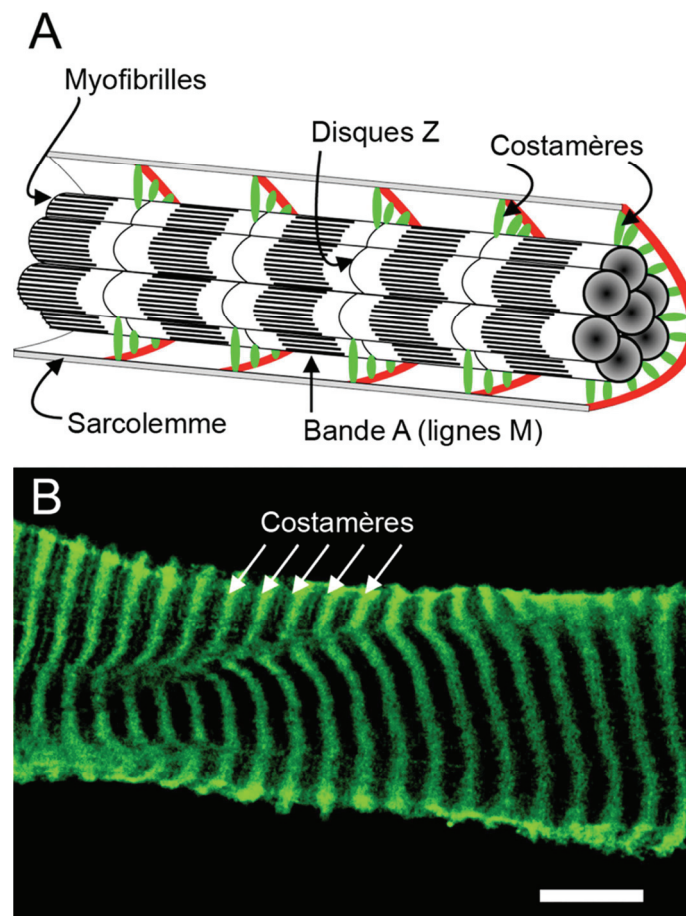


Figure 11 : A. Schéma d'une fibre musculaire composée de sept myofibrilles et longue de 5 sarcomères. Les costamères ancrent les disques Z des myofibrilles périphériques dans le sarcolemme. B. Marquage par immuno-fluorescence d'une fibre musculaire à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'alpha-actinine (barre d'échelle 10µm) (adaptée de Ervasti, 2003).

IV. Exercice, sarcopénie et pathologies

IV.1. Exercice, entraînement physique et fatigue

Le muscle est un tissu très dynamique qui s'adapte aux efforts qu'on lui demande : endurance, force ou repos. Dans le cas d'un entraînement d'endurance, le muscle pourra augmenter sa densité en capillaires (Brodal *et al.*, 1977 ; Green *et al.*, 1999 ; Messonnier *et al.*, 2001) en mitochondries (Holloszy, 1967) et ainsi améliorer son métabolisme oxydatif. L'entraînement physique de force pourrait, quant à lui, provoquer l'augmentation de la taille des fibres (Gonyea, 1980 ; Green *et al.*, 1999) et leur nombre (Green *et al.*, 1979). En fonction de la nature de l'exercice physique réalisé (endurance ou force), celui-ci

pourrait donc modifier les proportions des différents types de fibres (Röckl *et al.*, 2007; Gehlert *et al.*, 2012).

La nature de l'exercice est également importante dans l'origine de la fatigue musculaire. Lors d'un effort d'endurance, la demande en ATP par mesure de temps est faible. Le métabolisme aérobie parvient à produire l'ATP en flux tendu, la fatigue arrivera lorsque les réserves en glycogène, lipides et acides aminés seront épuisées. De plus, un effort dans la longueur finira par perturber physiquement le réseau de réticulum sarcoplasmique interférant ainsi avec la régulation de la concentration en calcium. En revanche, lors d'un effort intense et court, la demande en ATP est élevée. La production d'ATP doit se faire rapidement par la glycolyse anaérobie, mais elle provoque l'accumulation de lactate (après la catabolise du pyruvate). Cette accumulation provoque une chute du pH intra-cellulaire à l'origine de la fatigue (voir pour revue Allen *et al.*, 2008).

IV.2. Amyotrophie et Sarcopénie

L'amyotrophie (ou atrophie musculaire) est définie par la baisse de la masse, de la force et de la fonction musculaire. Elle est observée dans de nombreuses conditions incluant la dénervation, l'inactivité, la microgravité, le jeûne et elle est aussi associée à de nombreuses pathologies chroniques telles que le cancer, le SIDA, le diabète, l'insuffisance cardiaque ou rénale (Lecker *et al.* 2006). Les processus cellulaires impliqués dans ce phénomène sont multiples. Le récepteur à l'insuline (IGF-1) est un point clé précoce dans le déclenchement de l'amyotrophie. Il est responsable de l'inactivation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR ce qui provoquera l'activation des mécanismes de dégradation protéique tels que le système ubiquitine-protéasome (UPS) ou l'autophagie. L'atrophie musculaire s'accompagne aussi d'un remodelage extensif des mitochondries incluant la modification de leur nombre, leur forme et leur fonction. En effet, il a été montré que la fission mitochondriale est un prérequis pour l'atrophie musculaire en réponse à la privation de nourriture ou après surexpression du facteur de transcription FoxO3 (Romanello *et al.*, 2010) ; la voie autophagie/lysosome apparaît d'ailleurs comme une voie majeure d'élimination des mitochondries altérées dans ces conditions (Mammucari *et al.*, 2007, Cell Metab). Certains auteurs avancent l'idée que l'élimination des mitochondries pourrait prévenir le relargage de facteurs pro-apoptotiques et ainsi protéger les cellules en inhibant l'apoptose (Wirawan *et al.*, 2010)

Lorsquela perte de masse musculaire est liée à l'âge, on parle de sarcopénie. Celle-ci conduit à une perte de force musculaire, une augmentation de la fatigabilité, du risque de chute, une perte d'autonomie et à la dépendance des personnes âgées. La perte de masse musculaire observée avec l'âge repose principalement sur la

diminution du diamètre des fibres de type II (Charette *et al.*, 1991 ; Proctor *et al.*, 1995 ; Nilwik *et al.*, 2013). Ces modifications s'accompagnent d'apparition de graisse intramusculaire, de fibrose, et d'une décroissance des capacités de régénération par les cellules satellites (Kent-Braun *et al.*, 2000 ; Kadi *et al.*, 2004). Les causes de ces phénomènes ne sont pas très claires mais plusieurs hypothèses commencent à émerger depuis une quinzaine d'années en lien étroit avec les découvertes faites sur l'atrophie musculaire. Tout d'abord, la diminution de l'activité physique accélère la perte de masse musculaire (Rolland et Pillard, 2009). La diminution de l'activité mitochondriale associée à l'âge serait à l'origine de l'augmentation de la fatigabilité (Boffoli *et al.*, 1994 ; Marzetti *et al.*, 2013). De plus, une diminution de la disponibilité des acides aminés est observée dans le muscle avec l'âge (Jourdan *et al.*, 2008). Les hormones anaboliques voient leur concentration diminuer dans la circulation ainsi que la sensibilité du muscle à leurs effets (Guillet et Boirie, 2005 ; Perrini *et al.*, 2010). La circulation de facteurs pro-inflammatoires dans le sang favorise également la sarcopénie (Cesari *et al.*, 2005). Enfin, une dénervation à l'origine de la perte de la fonctionnalité des unités motrices est observée au cours du vieillissement et pourrait être à l'origine de la perte de force musculaire (Jang et Van Remmen, 2011).

Pour limiter la perte de masse musculaire associée à l'âge, l'exercice – accompagné d'une alimentation adaptée – semble être la meilleure solution. Qu'il s'agisse d'un exercice de force ou d'endurance, il permet d'élever le niveau de transcription des gènes musculaires, d'augmenter les capacités de régénération des cellules satellites et d'augmenter la taille moyenne des fibres musculaires (Verdijk *et al.*, 2009 ; Raue *et al.*, 2012).

IV.3. Autres maladies du muscle

Alors qu'étymologiquement myopathie signifie « maladie du muscle », ce terme n'est en réalité utilisé que pour les maladies génétiques du muscle. En effet, les atteintes du tissu musculaire peuvent être d'origines très variées :

- tumorale : une tumeur des tissus mous (cartilage, tendons, graisse, vaisseaux sanguins, nerfs...) appelée myome (bénigne) ou sarcome (maligne) peut aussi se développer à partir du tissu musculaire squelettique. Un sarcome dans ce cas précis est nommé rhabdomyosarcome en raison du nom donné aux cellules embryonnaires à l'origine des tumeurs d'origine musculaires : les rhabdomyoblastes. En effet, le tissu musculaire étant « protégé » de l'environnement par rapport aux tissus tels que la peau, les poumons ou le foie, les tumeurs d'origine musculaire apparaissent généralement chez l'enfant et sont la conséquence de mutations apparaissant spontanément au cours du développement embryonnaire. C'est un phénomène très rare et peu investigué (Helman et Meltzer, 2003). Cependant, les cellules satellites pourraient aussi jouer un rôle majeur dans ce processus

(Rubin *et al.*, 2011). Quel que soit le tissu d'origine du sarcome, le traitement consiste généralement en une chirurgie pour retirer la masse tumorale, suivie d'un traitement par radiothérapie.

- inflammatoire : appelée myosite (ou myopathie inflammatoire), l'inflammation du muscle peut être d'origine infectieuse, ou auto-immune. Elle est caractérisée par une faiblesse musculaire généralisée et s'accompagne parfois d'une dégénérescence du muscle (Rayavarapu *et al.*, 2013). Dans le cas d'une myosite d'origine infectieuse, l'agent responsable peut être bactérien, viral, mycosique ou parasitaire (Crum-Cianflone, 2008). Dans le cas d'une myosite auto-immune, le système immunitaire s'attaque au muscle et peut provoquer sa dégénérescence. Les myosites auto-immunes s'accompagnent souvent d'autres maladies inflammatoires comme le lupus, l'arthrite rhumatoïde ou le syndrome de Sjogren. Le traitement prescrit au patient repose principalement sur la prise d'anti-inflammatoires et de corticostéroïdes.

- génétique : les anomalies génétiques à l'origine de symptômes musculaires peuvent altérer la fonction du muscle de façon structurelle ou métabolique mais aussi la fonction neuronale. Les myopathies structurales peuvent être dues à un problème de mise en place du muscle (myopathies congénitales) ou bien à une dégénérescence progressive. Les myopathies métaboliques quant à elles, touchent les protéines impliquées dans le métabolisme des cellules musculaires (myopathies mitochondriales, lipidoses et glycogénoses musculaires). Enfin, par le biais d'une neuro-dégénérescence, des mutations affectant des gènes codant des protéines neuronales peuvent *in fine* provoquer une dénervation et l'atrophie du muscle (voir Chapitre 1^{er} §IV.2.).

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) fait partie des myopathies à origine génétique où le gène impliqué code une protéine structurale : la dystrophine. Elle fait également partie du groupe des dystrophies musculaires caractérisées par une dégénérescence progressive des fibres musculaires. La description de cette myopathie fait l'objet du 2^{ème} chapitre de ce manuscrit.

Chapitre 2^{ème} :

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)

I. Découverte et symptômes

I.1. Historique

A plusieurs reprises au 19^{ème} siècle des médecins se sont intéressés à des frères touchés par les mêmes symptômes musculaires. Ainsi, Gaetano Conte en 1836, Richard Partridge en 1847, Edward Meryon en 1852 et William J. Little en 1853 sont les premiers à publier leurs observations de frères atteints de la maladie que l'on nommera plus tard la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). A l'époque, les médecins attribuent la cause de la maladie à une carence en éléments nutritionnels.

En 1861, le médecin physiologiste Guillaume Duchenne de Boulogne (1806-1875) caractérise de façon plus complète cette maladie dans le chapitre *Paraplégie hypertrophique de l'enfance de cause cérébrale* de son livre *De l'électrisation localisée et de son application à la physiologie, à la pathologie et à la thérapeutique : Deuxième édition*, ce qui lui vaudra l'attribution de son nom à la maladie (Figure 12).

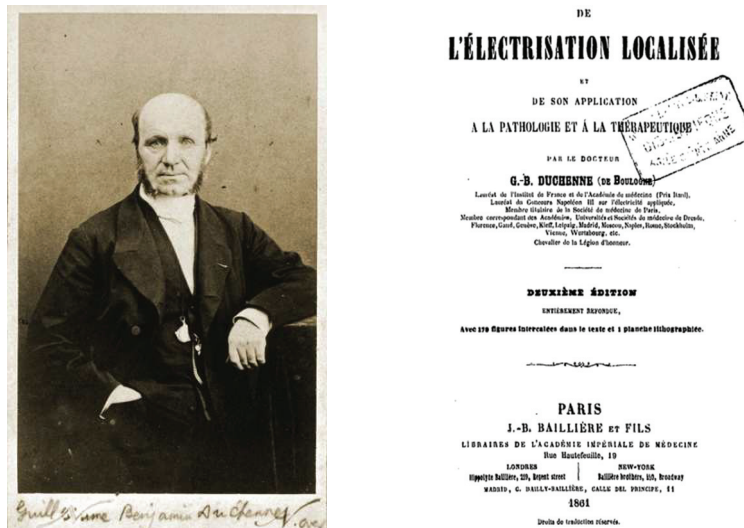


Figure 12: Photographie de Guillaume Duchenne de Boulogne et page de couverture du livre *De l'Électrisation localisée et de son application à la physiologie, à la pathologie et à la thérapeutique : Deuxième édition* (Librairie de l'Académie Impériale de médecine, Paris 1881) dans lequel il décrit son premier patient atteint de dystrophie musculaire (<http://upload.wikimedia.org>; <http://gallica.bnf.fr>).

Alors que Duchenne propose d'abord une origine cérébrale à la maladie, il attribue ensuite la cause de la maladie à un trouble musculaire. Il est le premier à décrire la prédominance de la maladie chez les jeunes garçons, la perte progressive de la force

musculaire, la pseudo-hypertrophie et la mort prématurée des patients. Il observe également l'effet bénéfique de l'hydrothérapie, des massages et des stimulations électriques sur la condition physique des patients au début de la maladie.

William R. Gowers, neurologue anglais, s'est intéressé à l'aspect génétique de la maladie en étudiant les familles d'une vingtaine de patients et plus de 100 cas décrits dans la littérature. Il a mis en évidence la modalité de l'hérédité de la maladie ainsi que la transmission par la mère en observant qu'une même femme avait eu des enfants dystrophiques de pères différents. Gowers décrit en 1886 la manœuvre typique que les patients atteints de dystrophie musculaire utilisent pour passer d'une position allongée à la position debout (Figure 13).



Figure 13: Dessins de William R. Gowers représentant la manœuvre utilisée par un patient atteint de dystrophie musculaire pour se relever (Engel, 1994).

En 1955, le généticien allemand Peter E. Becker décrit une forme de dystrophie musculaire elle aussi liée au chromosome X mais avec une étiologie moins sévère (âge de détection plus tardif, progression plus lente). Ce type de dystrophie musculaire est maintenant connu sous le nom de Dystrophie Musculaire de Becker (BMD), elle est causée par un variant allélique de la DMD. Il est important de préciser qu'il existe de rares patients aux troubles musculaires intermédiaires où le diagnostic manichéen DMD versus BMD n'est pas possible.

1.2. Symptômes

La DMD touche les trois grandes classes de muscles de l'organisme (muscles squelettiques, cardiaques et lisses). Il s'agit de la dystrophie musculaire la plus répandue en affectant une naissance masculine sur 3300 (www.orpha.net).

Les premiers symptômes de la Dystrophie Musculaire de Duchenne apparaissent rarement avant l'âge de trois ans. Cependant les garçons présentent parfois un retard dans l'apprentissage de la marche, tombent souvent et ont des difficultés à se relever (Desguerre *et al.*, 2009a ; Bushby *et al.*, 2010a). Entre 6 et 8 ans, ils souffrent de pseudo-hypertrophie

provenant de l'accumulation de tissu fibro-adipeux particulièrement visible au niveau des membres inférieurs (Figure 14). La faiblesse musculaire qui en résulte conduit l'enfant à adopter une démarche chancelante et une posture cambrée pour garder son équilibre puis à l'utilisation de la chaise roulante vers l'âge de 10 ans. Il est primordial de prolonger leurs capacités ambulatoires, car en position assise à longue durée, les patients développent rapidement contractures et scoliose (Yiu et Kornberg 2008 ; Hsu et Quinlivan, 2013). La DMD est aussi associée à des troubles cognitifs. Environ 35% des patients DMD ont un quotient intellectuel (QI) inférieur à 70 contre 2% seulement de la population générale (Cotton *et al.*, 2001).

Les atteintes du diaphragme et des autres muscles respiratoires se font sentir dès l'âge de 10 ans, deviennent critiques vers l'âge de 15 ans et sont à l'origine d'anoxémie (faible taux d'oxygène sanguin) et d'infections respiratoires multiples (Yiu et Kornberg 2008). L'atteinte du muscle cardiaque se caractérise par une réduction de la souplesse et de l'efficacité du myocarde à propulser le sang dans tout le corps. Les patients décèdent d'insuffisance respiratoire ou cardiaque entre 20 et 30 ans selon l'âge du diagnostic et du traitement utilisé avec une espérance de vie de 25 ans en 2002 (Eagle *et al.*, 2002).

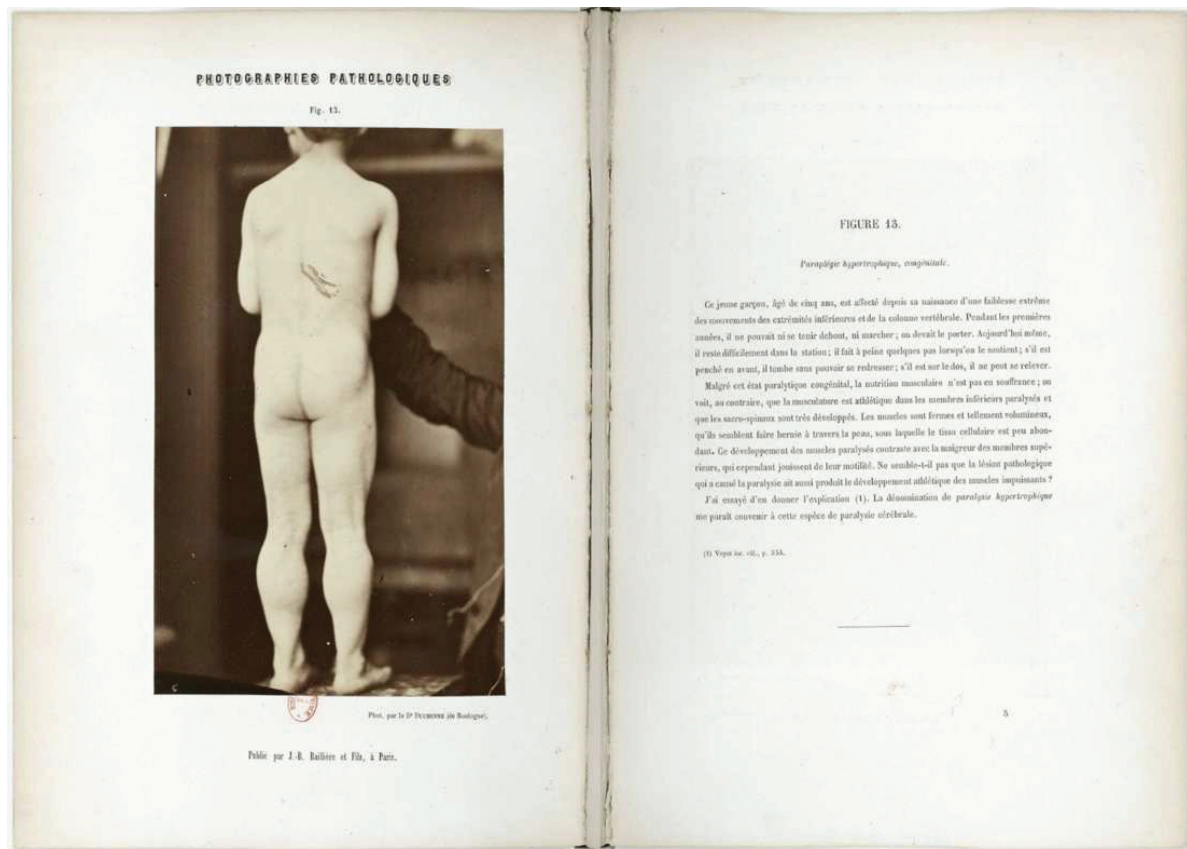


Figure 14: Photographie du premier patient de Guillaume Duchenne de Boulogne âgé de cinq ans extraite du livre Album de photographies pathologiques (1862) montrant la pseudo-hypertrophie des muscles du mollet (<http://gallica.bnf.fr>).

II. Origine génétique de la DMD

II.1. La découverte du gène responsable de la DMD

William R. Gowers avait établi le lien entre la prévalence de la DMD chez les garçons dès le 19^{ème} siècle, mais ce n'est qu'une centaine d'années plus tard avec la théorie chromosomique de l'hérédité que la maladie a été liée au chromosome X (Morton et Chung, 1959). C'est en 1985 que le gène DMD a été cartographié sur le chromosome X (Monaco *et al.*, 1985). En déterminant la position exacte du gène DMD sur le chromosome X dans la région Xp21.2, Anthony Monaco et Louis Kunkel sont les premiers à localiser un gène responsable d'une maladie génétique humaine (Koenig *et al.*, 1987 ; Hoffman *et al.*, 1987).

Le gène DMD est l'un des plus grands du génome humain. Avec 2,4 millions de paires de bases et 79 exons il représente à lui seul 1,5% du chromosome X et 0,1% de notre génome (Kunkel et Hoffman, 1989 ; Mandel, 1989). La localisation du gène DMD sur le chromosome X explique donc la prévalence de la maladie chez les garçons qui ne possèdent qu'une copie de ce chromosome. Cependant, environ 10% des femmes hétérozygotes pour un allèle muté du gène présentent des symptômes tels que des crampes et une fatigue musculaire (Politano *et al.*, 1996, Hoogerwaard *et al.*, 1999). Quelques rares cas de DMD chez des femmes ont été reportés. Ces cas exceptionnels sont expliqués par l'inactivation du gène DMD sur le chromosome X sain (Avner et Heard, 2001), par une translocation chromosomique (Jacobs *et al.*, 1981 ; Nevin *et al.*, 1986) ou encore par le syndrome de Turner (45, XO ; Chelly *et al.*, 1986).

II.2. Le gène DMD et ses produits

Le gène DMD code neuf isoformes, quatre longues et cinq courtes (Figure 15). Leurs noms commencent par Dp (pour « *D*ystrophin *p*rotein »), puis la taille en kDa est indiquée, et une lettre précise éventuellement le tissu d'expression de l'isoforme (pour revue voir Blake *et al.*, 2002, *Physiol. Rev.*).

Les quatre longues isoformes – ne différant que par leur premier exon – sont exprimées dans quatre tissus différents :

- Dp427(M) : dystrophine de 427 kDa que l'on retrouve exprimée principalement dans le muscle squelettique et cardiaque (M : « *m*uscle ») et faiblement dans les cellules gliales (Sironi *et al.*, 2001) ;

- Dp427(B) : dystrophine exprimée dans les neurones du cortex et de l'hippocampe (B : « *b*rain » ; Chelly *et al.*, 1988) ;

- Dp427(P) : isoforme spécifique des cellules de Purkinje du cortex cérébelleux (P : « Purkinje » ; Gorecki *et al.*, 1992) ;

- Dp427(L) : produit de l'expression du gène DMD dans les lymphocytes (L : « lymphocytes » ; Nishio *et al.*, 1994). Cette expression n'a été reportée qu'une fois et Dp427(L) ne fait donc pas partie des isoformes reconnues (absente de la Figure 15).

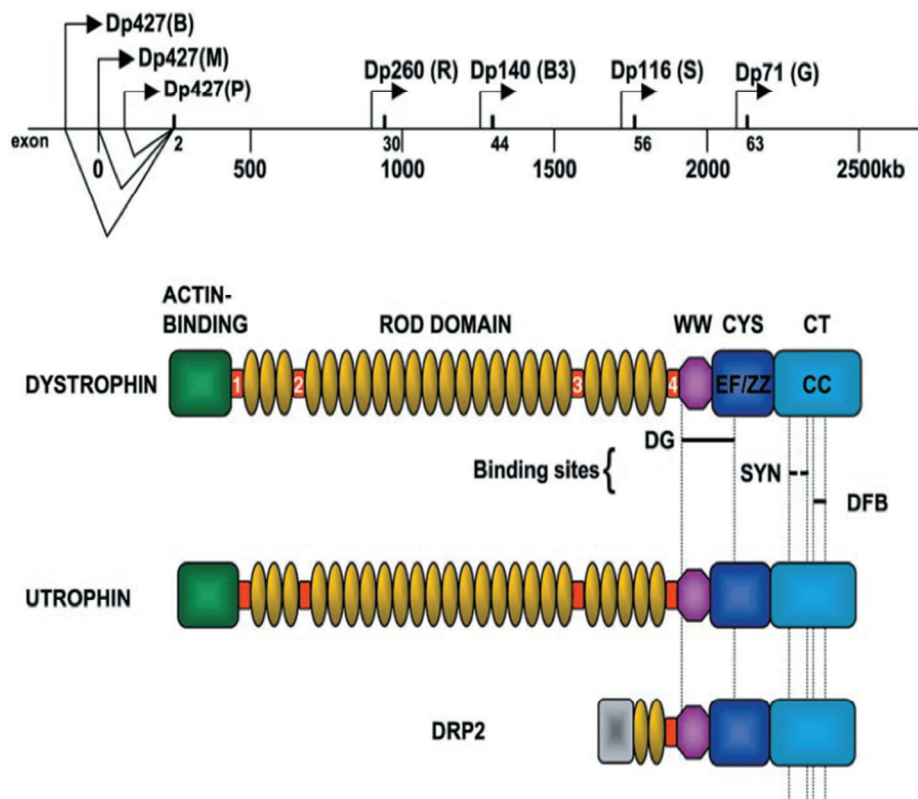


Figure 15 : Schéma représentant le gène DMD, ses différents promoteurs, les protéines produites et les « Dystrophin-Related Proteins ». Les sites d'interaction entre la dystrophine et le beta-dystroglycan (DG), la syntrophine (SYN) sont indiqués par un trait noir (Blake *et al.*, 2002).

Des promoteurs internes au gène DMD permettent la production d'isoformes plus courtes : Dp71, Dp116, Dp140 et Dp260 (Muntoni *et al.*, 2003). Ces isoformes présentent des expressions spatio-temporelles différentes. Par exemple, l'isoforme Dp116 est exprimée au cours du développement (Tinsley, 1993 ; Matsumura, 1993) alors que les autres isoformes ne le seront que plus tardivement. Les tissus exprimant ces isoformes courtes peuvent également exprimer l'isoforme longue Dp427. Ainsi, la Dp71 et la Dp140 sont, entre autres tissus, exprimées dans le muscle (Howard *et al.*, 1999 ; Tokarz *et al.*, 1999). Les autres tissus qui expriment des isoformes courtes sont le cerveau, la rétine, l'estomac, le foie, les intestins, les reins, les poumons (Tokarz *et al.*, 1999).

II.3. Les domaines protéiques des isoformes longues

Les quatre isoformes longues présentent une composition similaire organisée en quatre domaines (Koenig et al, 1987) (Figure 15) :

- Le domaine amino-terminal (acides aminés 1-240, rectangle vert dans la Figure 15) varie de quelques acides aminés en fonction de l'isoforme étudiée mais, quelle que soit l'isoforme, il présente une région de forte identité avec le domaine de liaison à l'actine retrouvé dans les protéines alpha-actinine et bêta-spectrine (Hammonds et al., 1987). Il contient également des répétitions de domaines pouvant lier la calmoduline (Bonet-Kerrache et al., 1994) ;

- Le domaine central (acides aminés 241-3040) est principalement composé de vingt-cinq régions répétées de 109 acides aminés (formes jaunes dans la Figure 15). Ces domaines appelés « *spectrin-like domains* » sont similaires aux éléments alpha-hélicoïdaux de la bêta-spectrine et de l'alpha-actinine (Koenig et al., 1990). Ce bloc de vingt-cinq répétitions est encadré et interrompu en deux points par quatre régions charnières riches en proline conférant ainsi sa flexibilité à la protéine (Davison et al., 1988, rectangles rouges dans la Figure 15). Le domaine central de la dystrophine permettrait également son homodimérisation antiparallèle et son interaction directe avec les lipides du sarcolemme (Le Rumeur et al., 2003 ; Le Rumeur et al., 2012) ;

- Le domaine WW (acides aminés 3041-3080, polygone violet dans la Figure 15) est impliqué dans les interactions avec les domaines protéiques riches en proline. Il participe à l'interaction de la dystrophine avec le beta-dystroglycan.

- Les acides aminés 3081 à 3360 constituent une région riche en cystéines (15 résidus cystéines pour 280 acides aminés, rectangle bleu marine dans la Figure 15). Cette région contient des domaines d'interaction protéique, de liaison au calcium et de fixation de zinc. Cette région est également impliquée dans l'interaction de la dystrophine avec le bêta-dystroglycan appartenant au Dystrophin Glycoprotein Complex (DGC, voir Chapitre 2^{ème} §III.1.) (Michele et Campbell, 2003).

- L'extrémité carboxy-terminal (acides aminés 3361-3685, rectangle bleu clair dans la Figure 15) également appelée région CC (« Coiled-Coil ») permet également l'interaction de la protéine avec le DGC en interagissant avec la dystrobrevine et les syntrophines (Sadoulet-Puccio et al., 1997 ; Peters et al., 1997).

Les quatre isoformes courtes sont dépourvues du domaine N-terminal de la protéine, mais elles possèdent la partie C-terminale d'interaction avec les protéines du DGC. Cette région fait état d'une forte identité avec la région C-terminale de l'utrophine, une

protéine à expression ubiquitaire de la famille des dystrophines mais codée par un gène autosomique (Love *et al.*, 1993).

II.4. Les « *Dystrophin Related Proteins* »

Quatre protéines présentant une forte ressemblance dans leur composition avec celle des dystrophines ont été regroupées pour former la famille des protéines reliées aux dystrophines.

L'utrophine (ou DRP1 pour « *Dystrophin Related Protein 1* ») est une protéine de 376 kDa codée par un gène localisé sur le chromosome 6. Elle présente 80% de similarité avec la Dp427 en particulier au niveau des domaines amino et carboxy-terminaux. L'utrophine est trouvée de façon ubiquitaire avec un enrichissement dans le muscle lisse (Nguyen *et al.*, 1991). L'utrophine est également considérée comme l'homologue embryonnaire de la dystrophine car, au cours de son développement, le muscle exprime d'abord le gène de l'utrophine avant d'activer progressivement l'expression du gène codant la dystrophine. L'utrophine fait l'objet d'un intérêt particulier dans la recherche de pistes thérapeutiques pour traiter la DMD (voir Chapitre 2^{ème} §V.III.2.).

DRP2 (« *Dystrophin Related Protein 2* ») est une protéine de 105 kDa codée par un gène localisé sur le chromosome X. Elle est présente dans le cerveau, la rétine, les testicules ou les ovaires mais pas dans le muscle (Dixon *et al.*, 1997). DRP2 comporte une région riche en résidus proline à son extrémité N-terminale suivie d'une région homologue aux deux derniers domaines « *spectrine-like* » et à l'extrémité C-terminale de la dystrophine (Roberts *et al.*, 1996). De ce fait, DRP2 interagit aussi avec la dystrobrevine et les syntrophines (Blake, 2002).

L'alpha-dystrobrevine (ou DTNA pour « *Dystrobrevin-alpha* ») est une protéine de 78 kDa codée par un gène localisé sur le chromosome 18. Elle est principalement observée dans le muscle squelettique, le cerveau, le cœur et les poumons (Blake *et al.*, 1996 ; Sadoulet-Puccio *et al.*, 1996). Elle possède une forte similarité avec le domaine riche en cystéines et l'extrémité C-terminale de la dystrophine auxquels sont ajoutés 148 acides aminés contenant quatre sites de phosphorylation (Ambrose *et al.*, 1997, rectangle gris foncé dans la Figure 15). Elle interagit avec la dystrophine, les syntrophines et le complexe des sarcoglycans (Sadoulet-Puccio *et al.*, 1997 ; Roberts, 2001).

La bêta-dystrobrevine (ou DTNB) présente 76% de similarité avec l'alpha-dystrobrevine. Elle a été identifiée comme étant l'équivalent de l'alpha-dystrobrevine dans le cerveau, les reins, le foie et les poumons (Peters *et al.*, 1997 ; Blake *et al.*, 1998).

Contrairement aux mutations dans le gène DMD, aucune mutation dans les gènes codant ces quatre protéines n'a été identifié à ce jour comme responsable de maladie génétique.

II.5. Les mutations à l'origine de la DMD

Dans deux tiers des cas de DMD, la mutation à l'origine de la maladie dans le gène codant la dystrophine est transmise par la mère. Dans le dernier tiers, la mutation apparaît *de novo* chez l'individu atteint (Aartsma-Rus *et al.*, 2006). La taille exceptionnelle du gène explique ce taux de mutations *de novo* particulièrement élevé.

Les mutations à l'origine de la DMD sont principalement des réarrangements importants (60% de délétions et 15% de duplications ; Truffery-Giraud *et al.*, 2009 ; Nakamura *et al.*, 2013). Ces réarrangements ne sont pas répartis aléatoirement sur toute la longueur du gène DMD. Par exemple, 90% des délétions sont concentrées en deux régions sensibles (appelées « hotspots ») au niveau des exons 2-20 et 45-55 (domaine central, Figure 16). De tels réarrangements provoquent généralement l'apparition d'un codon stop prématuré entraînant un arrêt prématuré de la traduction et la production d'une protéine tronquée de son extrémité C-terminale. Par ailleurs, l'ARNm peut être dégradé par le système de reconnaissance de codons stop prématurés (NMD pour « *Nonsense-mediated mRNA decay* » ; Nicholson *et al.*, 2010). Les mutations ponctuelles sont retrouvées tout au long de la séquence codante et concernent environ un quart des patients.

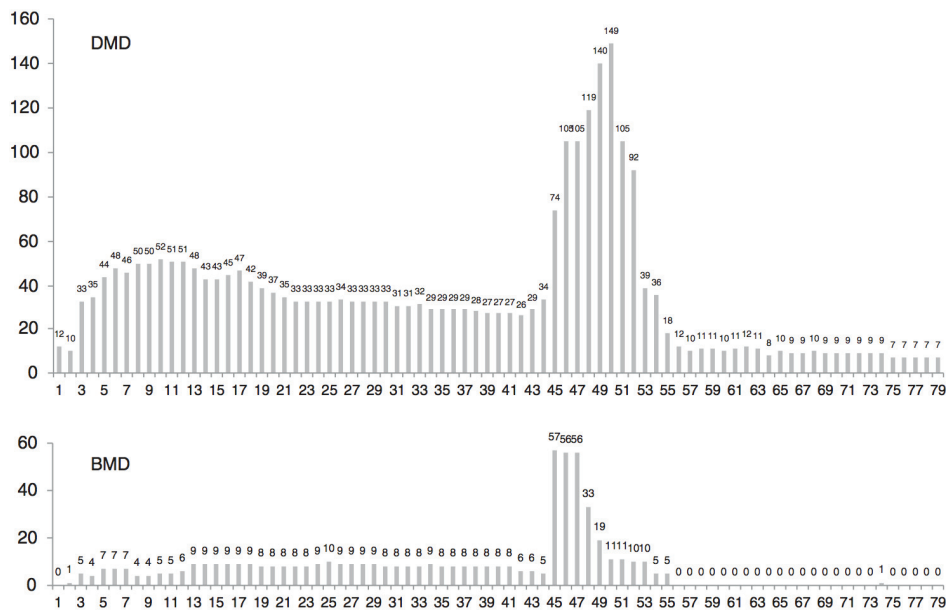


Figure 16 : Distribution des délétions (par nombre de patients) le long du gène DMD observées chez des patients DMD ou BMD du Japon (Nakamura *et al.*, 2013)

Dans le cas de la Dystrophie Musculaire de Becker (DMB), les proportions de mutations et leur distribution sont proches de celles impliquées dans la DMD (Nakamura *et al.*, 2013). En revanche, les mutations présentes chez les patients BMD sont des réarrangements qui maintiennent généralement un cadre ouvert de lecture dans l'ARNm permettant la synthèse d'une protéine tronquée dans une région interne mais fonctionnelle. L'effet de la mutation sur le phénotype DMD ou BMD dépend donc peu de sa localisation dans le gène ou de son étendue (délétion/duplication), mais davantage du fait qu'elle perturbe ou pas le cadre de lecture. Cette généralisation est connue sous le nom de « règle de Monaco » (Monaco *et al.*, 1988).

III. La dystrophine et le DGC

La dystrophine est une protéine principalement exprimée dans le muscle (squelettique, cardiaque et lisse), mais aussi dans le cerveau et les lymphocytes (voir Chapitre 2^{ème}§II.2.). Dans le tissu musculaire, elle est localisée sous le sarcolemme des fibres et plus fortement au niveau des jonctions neuromusculaires et myotendineuses (Arahata *et al.*, 1988, Figure 6).

Cette localisation particulière suggéra un rôle pour la dystrophine comme pont mécanique entre le cytoplasme et le sarcolemme, la membrane plasmique du muscle (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992). Les répétitions de domaines spectrine dans la dystrophine ont une fonction présumée dans l'accumulation de la protéine à la membrane ce qui indiquerait un rôle pour la protéine dans la stabilisation du sarcolemme (Beck et Nelson, 1996). L'isolement de la dystrophine à partir d'extraits musculaires démontra son lien étroit avec un complexe protéique : le DGC pour « *D*ystrophin *G*lycoprotein *C*omplex » (Suzuki *et al.*, 1992).

III.1. La composition du « *D*ystrophin *G*lycoprotein *C*omplex » (DGC)

Chez l'homme, le DGC se compose d'une quinzaine de protéines que l'on peut rassembler en deux groupes :

- le groupe transmembranaire et glycoprotéique composé des dystroglycans (alpha et bêta), des sarcoglycans (alpha, bêta, delta, eta, gamma et epsilon) et de la sarcospane) ;
- le groupe intra-cellulaire composé de l'alpha-dystrobrevine (ou DTNA), des syntrophines (alpha1, bêta1 et bêta2) et de la synthase d'oxyde nitrique (nNOS)

Les dystroglycans interagissent avec le domaine riche en cystéine de la dystrophine par leur sous-unité bêta, et avec la laminine-alpha2 par leur sous-unité alpha (Rentschler *et al.*, 1999). Ces deux protéines établissent ainsi le lien entre la dystrophine et la matrice extra-cellulaire. Ces interactions reposent sur des modifications post-traductionnelles

telles que des glycosylations (Moore et Winder, 2012). Des mutations dans les gènes codant les dystroglycanes sont à l'origine d'une myopathie aux symptômes proches des dystrophies musculaires des ceintures (Salih *et al.*, 1996 ; Dinçer *et al.*, 2003).

Les sarcoglycanes forment un complexe trans-membranaire qui interagit avec les dystroglycanes et qui pourrait ainsi stabiliser l'interaction dystroglycane-béta/dystrophine (Straub *et al.*, 1998). L'absence d'un seul des sarcoglycanes bloque la formation du complexe et sa localisation au sarcolemme (Holt et Campbell, 1998) et est à l'origine de la myopathie des ceintures (Hack *et al.*, 2000). Dans un modèle murin de cette myopathie, la sarcoglycane-béta assure la stabilisation du récepteur à la ryanodine et évite ainsi la fuite de calcium (Andersson *et al.*, 2012). Le complexe des sarcoglycanes est également responsable de la localisation du sarcospane au sarcolemme (Crosbie *et al.*, 1999). Le sarcospane pourrait être impliquée dans une fonction de signalisation du DGC via la cascade Akt (Marshall et Crosbie-Watson, 2013). Son absence n'entraîne pas de maladie musculaire décrite à ce jour.

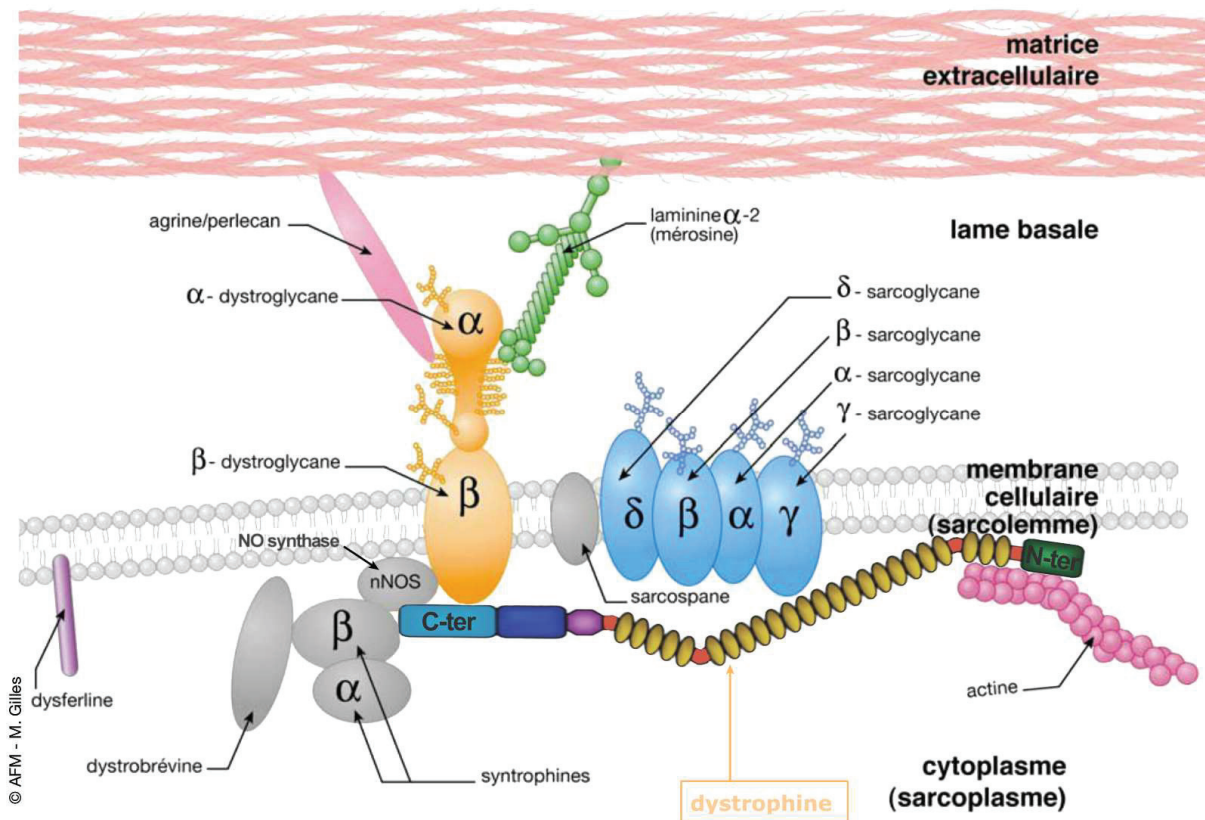


Figure 17 : Représentation schématique du complexe associé à la dystrophine dans le muscle squelettique vertébré (adapté de [www.http://www.afm-telethon.fr](http://www.afm-telethon.fr) et de Blake *et al.*, 2002). Cette représentation ne fait pas état de l'interaction entre le complexe des sarcoglycanes et la beta-dystroglycane (Straub *et al.*, 1998).

Les syntrophines-alpha et bêta sont des protéines cytoplasmiques qui interagissent avec la dystrophine et l'alpha-dystrobrevine via leur extrémité C-terminale (Newey *et al.*, 2000). Elles sont impliquées dans la localisation de certaines protéines au sarcolemme et dans la signalisation intra-cellulaire. Elles interagissent notamment avec des protéines impliquées dans les phénomènes de transduction du signal comme nNOS (« neuronal Nitric Oxide Synthase » ; Miyagoe-Suzuki et Takeda, 2001).

nNOS est l'enzyme responsable de la synthèse du monoxyde d'azote (NO). Cette molécule a d'abord été décrite comme vaso-dilatateur (Quyyumi *et al.*, 1995), neurotransmetteur (Rand et Li, 1995) et agent cytotoxique (Hibbs *et al.*, 1988) selon son lieu d'action. Elle est également impliquée dans la signalisation intracellulaire de proximité (Brenman *et al.*, 1996 ; Brenman *et al.*, 1995). Sa fonction musculaire reste incomprise même si, plus récemment, des liens avec la vascularisation des muscles (Sander *et al.*, 2000), la chaîne respiratoire mitochondriale (Brown et Borutaite, 2007) et la cascade de l'insuline dans le muscle (Hinchee-Rodriguez *et al.*, 2013) ont été démontrés.

L'alpha-dystrobrevine (ou DTNA) présente une forte similarité avec la partie C-terminale de la dystrophine (voir Chapitre 2^{ème}§II.4.) et interagit avec la dystrophine, les syntrophines et le complexe des sarcoglycanes (Blake *et al.*, 2002 ; Grady *et al.*, 1999 ; Roberts, 2001). Elle est impliquée dans le maintien de l'intégrité structurale du muscle et dans la signalisation. En particulier, elle interagit avec les protéines des filaments intermédiaires assurant la stabilité mécanique du muscle (Mizuno *et al.*, 2001) et elle connecte le DGC à la signalisation Protein Kinase A (PKA)-dépendante (Ceccarini *et al.*, 2007). L'alpha-dystrobrevine est également impliquée dans la localisation des récepteurs à l'acétylcholine à la jonction neuromusculaire (Grady *et al.*, 2000, Neuron). Une mutation dans le gène codant l'alpha-dystrobrevine est à l'origine d'une cardiomyopathie appelée syndrome de Barth (Ichida *et al.*, 2001, Circulation).

Le DGC est ancré dans la matrice extracellulaire via l'interaction entre l'alpha-dystroglycane et trois protéines sécrétées :

- la laminine-alpha2, qui se lie aux intégrines de la matrice extracellulaire. Son absence provoque une dystrophie musculaire congénitale nommée CMD (merosin-deficient Congenital Muscular Dystrophy ; Miyagoe-Suzuki *et al.*, 2000) ;

- le perlecan (ou HSPG2), qui interagit également avec les intégrines. Des mutations dans le gène codant cette protéine sont à l'origine du syndrome myotonique de Schwarz-Jampel (Nicole *et al.*, 2000 ; Arikawa-Hirasawa *et al.*, 2002) ;

- les agrines, qui se lient aux laminines-gamma et sont des protéines sécrétées. Elles sont par ailleurs impliquées dans la localisation des récepteurs à l'acétylcholine pendant la formation des jonctions neuromusculaires (Lin *et al.*, 2001).

La matrice extracellulaire correspondant à la lame basale du muscle est principalement composée de collagène, de laminine et de nidogène. Des mutations dans le gène codant le collagène VI sont à l'origine de la myopathie de Bethlem et de la myopathie congénitale d'Ullrich (Lampe et Bushby, 2005).

III.2. Les fonctions du DGC

Des mutations dans certains des gènes codant les protéines du DGC conduisent, comme indiqué ci-dessus, à des myopathies dont les symptômes sont proches bien que moins sévères que ceux de la DMD (revues dans Deconinck et Dan, 2007).

Avec les costamères, le DGC et la dystrophine permettent la transmission de la force contractile générée par les sarcomères vers la membrane plasmique et la matrice extra-cellulaire (Ehmsen *et al.*, 2002). Tous les deux jouent également un rôle important dans le maintien de l'intégrité membranaire et de la résistance des fibres durant les cycles répétés de contraction musculaire (Deconinck *et al.*, 1996).

De plus, la description des différents membres du DGC a pu mettre en évidence un rôle de la dystrophine et du DGC dans la signalisation musculaire. Il a été démontré que la dystrophine elle-même facilite la localisation des molécules de signalisation à la membrane (Rando, 2001). Des membres du DGC tels que la dystroglycane-béata et la syntrophine sont impliqués dans des cascades de signalisation et peuvent être modifiés par des molécules de signalisation.

III.3. Les fonctions supposées de la dystrophine

Etudiées par de nombreux laboratoires depuis près de trois décennies, trois fonctions de la dystrophine commencent à émerger : une fonction mécanique ou structurale, une fonction d'échafaudage du DGC et une fonction de transduction de signal.

Il apparaît clairement que la dystrophine fait le lien entre le cytosquelette d'actine sub-sarcolemmal et le DGC. Ce lien est essentiel au premier rôle du DGC dans la transmission de la force contractile vers la matrice extra-cellulaire.

La dystrophine est aussi décrite comme « *scaffolding protein* » (protéine d'échafaudage) du DGC. En effet, en son absence, le DGC est délocalisé de la membrane

plasmique et s'agrège, ce qui l'empêche de remplir ces deux fonctions structurelle et de signalisation (Le Rumeuret *et al.*, 2012).

Un rôle intrinsèque de transduction du stimulus mécanique qui pourrait mener à des changements dans l'expression de gènes a été proposé pour la dystrophine (Goldspink, 1999). Bien que le rôle de la dystrophine dans la régulation de l'expression génique n'ait pas encore été démontré, une dérégulation de certains gènes a été observée dans un modèle murin de dégénérescence musculaire dystrophine/utrophine-dépendant (Nakamura *et al.*, 2001).

IV. Etat des connaissances de la physiopathologie de la DMD

La DMD se caractérise par une faiblesse musculaire généralisée dont l'origine est la perte de fibres musculaires. Les biopsies de patients montrent la présence de fibres musculaires de petite taille à noyaux centrés démontrant ainsi l'activation de la réponse régénérative par les cellules satellites (voir Chapitre 1^{er} §1.5. ; Schmalbruch, 1984). Tous les types de fibres musculaires sont touchés dans la DMD, mais ce sont les fibres de type IIB (glycolytiques à contraction rapide et peu durables ; voir Chapitre 1^{er} §II.2.) qui sont atteintes les premières (Webster *et al.*, 1988). Dans un premier temps, le remplacement des fibres nécrotiques par des myocytes nouvellement formés à partir des cellules satellites permet d'équilibrer la balance dégénérescence/régénérescence. Avec l'avancée de la maladie, ce mécanisme perd en efficacité et le muscle accumule du tissu adipeux et du tissu conjonctif (Laguens, 1963 ; Schmalbruch, 1984).

Plusieurs hypothèses coexistent quant à l'origine de la perte des fibres musculaires en absence de dystrophine chez les patients atteints de DMD.

IV.1. L'hypothèse mécanique

La dystrophine a un rôle majeur à proximité des costamères qui sont les structures d'ancrage des sarcomères au sarcolemme et à la matrice extracellulaire (voir Chapitre 1^{er} §II.5.3.). Ce sont des structures transversales responsables de l'exportation de la force contractile aux fibres musculaires voisines et aux autres tissus. L'absence de dystrophine rompt ainsi la connexion mécanique entre les fibres musculaires et provoque l'instabilité du sarcolemme. Le découplage entre sarcomère et le sarcolemme pourrait mener à la dissociation des fibres et au déchirement de la membrane cellulaire (Rybakova *et al.*, 2000 ; Ozawa, 2010 ; Allen *et al.*, 2010b).

Chez les patients et le modèle murin de la DMD, il y a effectivement une rupture de la membrane traduite par la fuite membranaire qui a été montrée expérimentalement en

utilisant le colorant « Procion yellow » (Bradley & Fulthorpe, 1978). L'observation de biopsies de patients par microscopie électronique a confirmé cette rupture par l'apparition de trous dans la membrane plasmique des fibres musculaires (Carpenter *et al.*, 1990). Cette perte de l'intégrité membranaire est aggravée par l'activité musculaire et le mouvement dans le modèle murin de la DMD, suggérant que l'exercice physique pourrait aggraver l'intégrité musculaire au lieu de l'améliorer (Mizuno, 1992 ; Mokhtarian *et al.*, 1999).

IV.2. L'hypothèse calcique

La régulation de l'homéostasie calcique est cruciale pour le fonctionnement du muscle (voir Chapitre 1^{er}§III.2., III.3. et III.4.). L'accumulation anormale de calcium intracellulaire dans les muscles striés de patients a été démontrée par Bodensteiner & Engel (1978). Cependant, il faut préciser que d'autres groupes de recherche réfutent l'élévation du niveau global de calcium cytosolique au repos dans les cellules musculaires (Gailly, 2002 ; Collet *et al.* 1999).

L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium serait principalement due à la perte de l'intégrité membranaire car le milieu extracellulaire présente une concentration 10000 fois supérieure en Ca^{2+} à celle du cytosol (1 mM versus 0,1 μ M). Cependant, l'activation de canaux calciques ou la fuite par des canaux membranaires peuvent également contribuer à la perturbation de l'homéostasie calcique dans le muscle dystrophique (Imbert *et al.*, 1996 ; Vandebrouck *et al.*, 2002 ; voir pour revue Allard, 2006).

L'augmentation de la concentration cytosolique de calcium serait néfaste au muscle strié en activant les protéases telles que les calpaïnes dont l'activation est calcium-dépendante. D'ailleurs, le traitement par la Calpastatin, un inhibiteur de calpaïnes, diminue la perte musculaire dans un modèle murin (Spencer et Mellgren, 2002). En revanche, le traitement par un dérivé de la Leupeptine, un autre inhibiteur de calpaïnes n'a montré aucun effets chez un modèle canin (Childers *et al.*, 2011).

IV.3. L'hypothèse inflammatoire

Les fibres musculaires nécrotiques présentent fréquemment des infiltrations de macrophages et une augmentation du niveau d'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et la réaction inflammatoire (Haslett *et al.*, 2002 ; Pescatori *et al.*, 2007). Le croisement génétique du modèle de la DMD chez la souris avec la souche *nude* qui ne produit pas de lymphocytes T a montré une diminution de la fibrose se développant à la suite de la mort des fibres musculaires (Morrison *et al.*, 2000). L'utilisation d'anti-inflammatoires tels que les corticostéroïdes ralentit la progression de la maladie et améliore la faculté

ambulatoire (Merlini *et al.*, 2003) ce qui est en accord avec le rôle de la réaction inflammatoire dans la dégénérescence du muscle.

En lien avec la perturbation de l'homéostasie calcique et la réaction inflammatoire, les symptômes de la DMD sont également aggravée par le stress oxydatif. En effet, l'augmentation de la concentration en calcium dans le cytoplasme provoque une adaptation de la mitochondrie et peut mener à l'accumulation de « Reactive Oxygen Species » (ROS) (Brookes *et al.*, 2004). Les macrophages infiltrant les fibres musculaires produisent eux aussi des ROS pendant la phagocytose (Tidball, 2005).

Le traitement par des anti-oxydants a permis d'améliorer l'état des muscles en réduisant la nécrose chez le modèle murin de la DMD (Buetler *et al.*, 2002 ; Hori *et al.*, 2011). Malheureusement, l'utilisation d'anti-oxydants comme traitement chez les patients atteints de DMD n'a pas encore été démontrée comme étant efficace (Bjelakovic *et al.*, 2012).

IV.4. L'hypothèse vasculaire

Le DGC (« Dystrophin Glycoprotein Complex») ancre la dystrophine à la membrane de la cellule musculaire. Il contient une protéine impliquée dans la dilatation locale des vaisseaux sanguins : la protéine nNOS (« neuronal Nitric Oxide Synthase » ; voir Chapitre 2^{ème}§III.1.). Cette enzyme produit l'oxyde nitrique, une molécule vasodilatatrice. La vasodilatation locale des vaisseaux sanguins assure l'apport en oxygène et en nutriments nécessaires aux muscles lors d'un effort.

En absence de dystrophine, le DGC est absent du sarcolemme et nNOS n'est pas localisée normalement (Brennan *et al.*, 1995). Il est possible que l'état du muscle dystrophique soit aggravé par l'ischémie et la privation en éléments qu'un défaut en apport sanguin pourrait causer (Sander *et al.*, 2000).

Lorsque les souris du modèle murin de la DMD sont traitées par un donneur d'oxyde nitrique, la progression de la dégénérescence et l'inflammation sont réduites et la régénérescence est améliorée (Brunelli *et al.*, 2007 ; Zordan *et al.*, 2013). Depuis, il a été démontré que l'HCT1026, le donneur d'oxyde nitrique utilisé dans cette première étude de 2007 agit directement sur le flux sanguin dans le muscle et améliore l'ischémie (Thomas *et al.*, 2012).

A ce jour, ces quatre hypothèses co-existent sans que l'une d'entre elles ne prédomine clairement sur les autres. Il est donc probable que la dégénérescence de la fibre musculaire résulte de la combinaison de plusieurs de ces hypothèses en l'absence de dystrophine, concourant à la mort cellulaire par nécrose.

V. Diagnostic, prise en charge, traitements actuels et pistes de traitements

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif pour la Dystrophie Musculaire de Duchenne. Plus tôt sera établi le diagnostic de la Dystrophie Musculaire de Duchenne chez le patient, plus tôt sa prise en charge sera mise en place et d'autant plus efficace le traitement palliatif sera contre l'évolution de la maladie.

V.1. Méthodes de diagnostic

A partir de l'étude de l'historique familial et d'un examen physique, le praticien en charge d'un patient présentant une faiblesse musculaire généralisée peut prescrire des examens avancés additionnels. Il existe trois principales méthodes de diagnostic principales qui coexistent et sont complémentaires :

- le taux des enzymes musculaire dans le sang : la créatine kinase (CK) et certaines transaminases sont des enzymes musculaires qui s'échappent lorsque la fibre est endommagée. Face à une maladie neuro-musculaire, la mesure de la concentration de CK dans le sang permet de déterminer s'il s'agit d'une maladie d'origine neuronale ou musculaire. Bien que cette concentration soit la plus élevée dans les cas de DMD, cette mesure doit être combinée aux autres méthodes de diagnostic pour préciser le type de dystrophie musculaire dont le patient souffre.

- la biopsie musculaire : un échantillon de muscle du patient peut être prélevé au niveau du biceps, du deltoïde ou du quadriceps. Cet échantillon est ensuite traité pour être conservé et permettre son étude biochimique et histologique. Par exemple, la biopsie musculaire permet de déterminer la quantité de dystrophine dans le muscle et sa taille (Figure 18). Ainsi l'absence de dystrophine indiquerait une DMD alors que sa présence en faible quantité indiquerait une BMD.

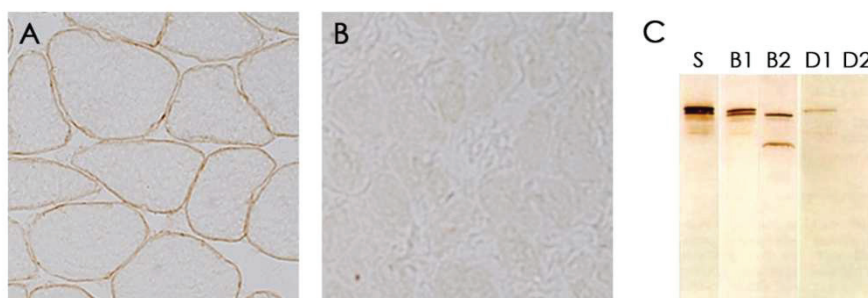


Figure 18 : A-B. Photographies du marquage anti-dystrophine de biopsies musculaires. Le marquage anti-dystrophine sous le sarcolemme chez l'individu sain (A) est absent chez le patient atteint de DMD (B). C. Photographie du marquage anti-dystrophine d'un western blot sur des extraits musculaires d'un individu sain (ligne S), de deux patients atteints de BMD (B1 et B2), de deux patients atteints de DMD (D1 et D2). Chez les patients BMD, la dystrophine présente une quantité et/ou une taille réduite, chez les patients DMD, le niveau de production de la dystrophine est très faible voir indécelable. (<http://neuromuscular.wustl.edu/pathol/dmdpath.htm#dystrophin>).

- le test génétique : un premier test génétique est réalisé par PCR multiplex pour déceler les grandes délétions/duplications dans le gène DMD qui concernent environ trois quarts des patients (voir Chapitre 2^{ème}§II.5.). Dans le cas où ce test se révèle négatif, le séquençage du gène DMD du patient est réalisé afin de détecter les petites délétions/duplications ou les mutations ponctuelles. Il est primordial d'établir précisément l'origine génétique de la maladie afin de déterminer éventuellement la corrélation entre génotype et phénotype et afin de tester l'éligibilité du patient aux traitements mutation-spécifique en cours de développement. Depuis quelques années, il est possible de procéder à un diagnostic prénatal par amniocentèse pour tester un fœtus à naître dans une famille à risques.

Le coût du séquençage d'un gène étant de plus en plus faible, le test génétique sera sans doute utilisé de plus en plus précocement. De plus, il permettra d'identifier la nature de la mutation afin de guider le praticien dans la prévision de la sévérité possible de la dystrophie. L'état précis d'avancement de la maladie nécessitera l'appel aux deux autres tests.

V.2. Prise en charge

Une fois le diagnostic de la DMD établi, le praticien peut prescrire une prise en charge du patient qui s'oriente selon l'état d'avancement de la maladie autour de trois axes :

- la prise en charge orthopédique a pour but de diminuer l'atteinte à l'extensibilité du muscle et aux contractures articulaires observées chez les patients. Elle fait intervenir physiothérapeutes et kinésithérapeutes. Ces soins et l'utilisation d'orthèses permettent d'allonger la phase ambulatoire de la maladie afin de retarder l'usage du fauteuil roulant qui entraîne de graves déformations à long terme telles que les scoliose (voir Chapitre 2^{ème}§II.1.).

- la prise en charge chirurgicale est plus rare, elle intervient généralement plus tardivement mais avant la perte de la marche. Les articulations des membres inférieurs peuvent subir une intervention chirurgicale afin de traiter les contractures en rallongeant les tendons ou en retirant le matériel s'accumulant au niveau des articulations. Plus tard, une intervention chirurgicale peut également être prescrite afin de stabiliser la scoliose.

- la mobilité assistée correspond à l'utilisation de déambulateurs, de fauteuils roulants manuels et électriques. Un effort important doit être apporté à l'ajout de mousses afin de maintenir le torse droit pour retarder l'apparition de scoliose et d'une façon générale pour éviter la formation d'escarres.

- la respiration assistée est mise en place lorsque le patient montre une faiblesse des muscles respiratoires entraînant d'abord une toux inefficace, puis une hypoventilation nocturne et finalement une respiration altérée la nuit comme le jour. Ces altérations entraînent un risque élevé de développer une infection pulmonaire et accélèrent l'évolution de la maladie. La ventilation nocturne assistée à l'aide d'un moniteur permet de retarder l'apparition de ces symptômes et allonge la durée de vie des patients (Eagle *et al.*, 2002).

- la fonction cardiaque est souvent atteinte de façon précoce dans l'évolution de la DMD mais sans que le patient ne le ressent (James *et al.*, 2011). Un suivi de la fonction cardiaque par électrocardiogramme et échographie est donc recommandé dès l'âge de 6 ans. En fonction des altérations observées, le praticien pourra prescrire un traitement à base de molécules telles que des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), des diurétiques ou des bêtabloquants. Avec l'amélioration de la forme et de la santé des patients, la transplantation cardiaque devient de plus en plus pertinente et pourra être envisagée.

V.3. La thérapie pharmacologique

V.3.1. Les gluco-corticostéroïdes

Les gluco-corticostéroïdes sont des hormones stéroïdiennes aux propriétés anti-inflammatoires et agissant sur le métabolisme protidique et glucidique. La prednisone, la prednisolone ou le deflazacort sont les principaux traitements pharmacologiques contre la DMD à l'heure actuelle. Ils ont été utilisés depuis plus de 30 ans et leurs effets positifs sur les symptômes ont été démontrés (Drachman *et al.*, 1974 ; Angelini *et al.*, 1994). Ce sont les seuls traitements, à ce jour, qui permettent d'augmenter la force musculaire et de retarder l'usage du fauteuil roulant d'une période allant de 2 à 5 ans (Moxley *et al.*, 2010). Ils réduisent également le besoin de chirurgie de la scoliose et améliorent les fonctions musculaires cardiaques et respiratoires (Houde *et al.*, 2008). En revanche, ces traitements sont accompagnés d'effets secondaires tels que le ralentissement de la croissance, la prise de poids, une fragilité des os, un plus grand risque de développer des cataractes et d'autres désordres psychiques et métaboliques. Cependant, ces observations sont soumises à controverse selon les études (Merlini *et al.*, 2003).

Le mode d'action des stéroïdes dans le ralentissement de l'évolution de la maladie n'est pas clair. Il est proposé que l'effet bénéfique du traitement à base de corticostéroïdes serait à attribuer à l'effet immunosuppresseur de ces molécules (Spuler et Engel, 1998). En se fixant à leurs récepteurs, ils pourraient augmenter la transcription de gènes anti-inflammatoires et inhiber des facteurs pro-inflammatoires comme NF-kappaB. Deux essais cliniques ont donc été menés utilisant l'azathioprine et la cyclosporine A en

combinaison avec la prednisone et n'ont démontré aucun effet significatif par rapport au groupe contrôle traité par la prednisone et un placebo (Griggs *et al.*, 1993 ; Kirschner *et al.*, 2010). Les glucocorticoïdes pourraient également ralentir le déchirement du sarcolemme (Rifai *et al.*, 1995), stimuler la réparation myogénique (Anderson *et al.*, 2000). Le deflazacort pourrait agir *via* la transduction du signal en activant la voie calcineurine/NF-AT (St-Pierre, 2004). La prednisolone pourrait agir *via* l'augmentation de la production d'utrophine (Baltgalvis *et al.*, 2009). Il est primordial de comprendre le mode d'action de ces molécules afin de pouvoir adapter les thérapies en fonction de ces découvertes (variations dans la posologie, combinaison de molécules...).

V.3.2. L'utrophine

L'avenir de la thérapie pharmacologique peut venir de la piste de l'utrophine. Cette protéine est l'homologue embryonnaire de la dystrophine (voir Chapitre 2^{ème}§II.4.). Dans le modèle murin de la DMD, la production forcée d'utrophine permet de restaurer la localisation du DGC au sarcolemme et d'atténuer la pathologie dystrophique (Tinsley *et al.*, 1996). Depuis, lors d'un crible, la molécule BMN195 a été identifiée pour son potentiel dans la stimulation de l'expression du gène de l'utrophine. Un essai clinique de phase I est en cours ainsi que des recherches en formulation pour améliorer la biodisponibilité de la molécule.

V.3.3. La translecture de codons stop

Une autre piste prometteuse consiste à traiter les patients par une molécule permettant la translecture de codons stop. 10 à 15% des patients atteints par la DMD présentent une mutation ponctuelle provoquant l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'ARNm. La première molécule à avoir été testée pour permettre la translecture de ce codon stop est la gentamycine, un antibiotique qui interagit avec la sous-unité 40S des ribosomes permettant la production d'une protéine non-tronquée fonctionnelle. Bien que les résultats furent faibles avec une augmentation du niveau de dystrophine de seulement 15% chez trois patients sur seize (Malik *et al.*, 2010), cet essai a agit comme preuve de concept et des recherches d'autres molécules agissant de la même façon ont pu être isolées à partir d'un crible *in vitro*.

Parmi ces molécules, l'Ataluren interagit, quant à elle, avec la sous-unité 60S du ribosome pour assurer la translecture des codons stop. Un essai pré-clinique a démontré l'effet de l'Ataluren sur l'augmentation du niveau de dystrophine de 20 à 25% ainsi qu'une diminution de la concentration en créatine kinase dans le sang démontrant la fonctionnalité de la protéine produite (Welch *et al.*, 2007). Depuis, des essais cliniques de

phase II et III ont démontré l'effet bénéfique du traitement sur la fonction motrice chez les patients (NCT00592553, NCT01247207 et NCT01557400 sur <http://clinicaltrials.gov>). L'intérêt de cette molécule va au-delà du traitement seul de la DMD, car cette stratégie peut être applicable à toutes les maladies génétiques dont l'origine est un codon stop prématuré.

V.3.4. Le saut d'exon

Contrairement à la BMD, la DMD apparaît généralement quand le patient présente une mutation qui perturbe le cadre de lecture du gène DMD et mène à l'apparition d'un codon stop prématuré (voir Chapitre 2^{ème}§II.5.). L'objectif du saut d'exon est de rétablir le cadre de lecture de la protéine en forçant l'épissage de l'exon à l'origine du codon stop. Par conséquent, une forme raccourcie mais fonctionnelle de la protéine devrait être produite et pourrait au moins ré-orienter la maladie vers un phénotype BMD (voir Chapitre 2^{ème}§II.5.).

La modification de l'épissage repose sur l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens qui pourront forcer la formation d'un lasso d'épissage contenant l'exon présentant le codon stop prématuré.

Comme indiqué précédemment, la distribution des mutations à l'origine de la DMD n'est pas aléatoire au long du gène DMD. L'exon 51 est atteint dans environ 13% des patients et représente ainsi l'exon cible le plus intéressant en terme de patients concernés pour mettre au point une stratégie. De plus, lors de délétions de cet exon sans décalage du cadre de lecture, la sévérité de la maladie associée oriente vers un diagnostic de type BMD.

Divers essais cliniques ont été menés pour analyser l'effet d'un tel traitement. L'une des molécules les plus prometteuses est le PRO051 (ou drisapersen), un oligonucléotide anti-sens de 20 bases composées de nucléotides modifiés (van Deutekom *et al.*, 2007). Son administration par injection a donné des résultats probants sur le niveau de production de la protéine et sur les capacités motrices (Goemans *et al.*, 2011). Un essai clinique de phase III enrôlant 180 patients est en cours (NCT01254019 sur <http://clinicaltrials.gov>).

Des essais cliniques sont en cours sur les effets de l'AVI-4658, un autre oligonucléotide anti-sens permettant le saut de l'exon 51. Cette molécule présente un meilleur taux de pénétration dans les fibres musculaire que le PRO051 (Heemskerk *et al.*, 2009). Un essai clinique de phase II a démontré l'efficacité de cette molécule dans le retour du niveau de production de dystrophine (20% environ), résultant au retour de protéines du DGC au sarcolemme (NCT00844597 sur <http://clinicaltrials.gov>).

Les stratégies thérapeutiques basées sur le saut d'exon sont prometteuses mais requièrent, dans l'état actuel des choses, une mise au point « à façon » pour chaque exon à l'origine de l'apparition d'un codon stop prématuré. Cependant, des approches de saut d'exon multiples ont été envisagées et ont démontré un effet intéressant chez le modèle murin de la DMD (Aoki *et al.*, 2012).

V.3.5. Autres pistes

D'autres pistes pharmacologiques sont suivies mais ne font pas encore l'objet d'essais cliniques. Afin de restaurer le DGC, certains groupes proposent l'utilisation d'inhibiteurs de protéases (Gazzerro *et al.*, 2010). Pour forcer l'expression du gène codant l'utrophine, d'autres molécules telles que le biglycan (Amenta *et al.*, 2011), le resveratrol (Gordon *et al.*, 2013) ou le nabumetone (Moorwood *et al.*, 2011) sont particulièrement prometteuses.

V.4. La thérapie génique

De nombreuses stratégies de thérapie génique ont été développées pour délivrer un nouveau gène DMD dans le tissu musculaire dystrophique par l'utilisation de vecteurs viraux ou non-viraux. Cependant, en raison de la taille de la région codante du gène (11 kb), les pistes actuelles sont basées sur l'expression de constructions codant des mini- voire micro-dystrophine. En effet, des patients avec de grandes délétions de la séquence codante montre des phénotypes BMD légers démontrant ainsi la fonctionnalité partielle de ces protéines réduites.

Les vecteurs les mieux appropriés pour le transfert de la région codante d'une mini-dystrophine semblent être les AAV (« *Adeno-associated viruses* »). Ils présentent un meilleur taux de distribution de la construction que les lentivirus et sont moins immunogènes. Ce sont les seuls vecteurs viraux ayant été utilisés dans le cadre d'essais cliniques à l'heure actuelle.

Cependant, un traitement de ce type a provoqué une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T contre la protéine dystrophine (précédemment absente et donc « étrangère » à l'organisme) et le vecteur viral (Mendell *et al.*, 2010 ; Flanigan *et al.*, 2013). Par conséquent, une stratégie alternative utilisant des constructions codant pour une micro-utrophine qui ne provoque pas de réponse immunitaire du fait de son expression endogène a vu le jour (Odom *et al.*, 2008). Les souris traitées ont montré une localisation de la micro-utrophine au sarcolemme dans tous les muscles testés, une restauration du DGC, une

augmentation de la taille des fibres musculaires, et une amélioration considérable des performances physiologiques.

V.5. La thérapie cellulaire

L'objectif de la thérapie cellulaire est l'introduction de cellules musculaires saines dans le muscle dystrophique. Ces cellules pourraient fusionner avec les cellules du patient transférant ainsi leur noyau contenant l'allèle sain du gène DMD ou entre elles afin de former de nouvelles fibres. Deux origines pour les cellules musculaires saines sont possibles : l'allogreffe et l'autogreffe. L'allogreffe implique l'isolation de progéniteurs musculaires sains à partir d'une biopsie réalisée sur un individu histocompatible. L'autogreffe implique l'isolation de progéniteurs musculaires du patient et leur traitement *in vivo* afin de rétablir la production de la dystrophine.

Les résultats obtenus par thérapie cellulaire lors d'essais cliniques sur des patients DMD sont mitigés. Un essai de transplantation de myoblastes entre jumelles a montré un effet léger sur la fonction musculaire (Tremblay *et al.*, 1993). En revanche, deux autres essais cliniques de transplantation de myoblastes n'ont pas réussi à élever de façon significative la quantité de dystrophine dans les muscles (Mendell *et al.*, 1995 ; Miller *et al.*, 1997). Ces résultats décevants peuvent être dus au faible pouvoir migratoire de ces cellules et à leur faible capacité à fusionner avec les cellules de l'hôte. Cette première explication est d'autant plus probable que la transplantation de myoblastes a montré des résultats intéressants dans le traitement de la dystrophie musculaire oculo-pharyngée où les muscles atteints sont de petite taille (Périé *et al.*, 2013).

Dans le traitement de la DMD, l'avenir de la thérapie cellulaire pourrait résider dans l'utilisation d'autres types cellulaires présentant de meilleures capacités migratoires. Par exemple, la distribution de cellules mésenchymateuses ou de mésoangioblastes par voie sanguine a été investiguée (Desawa *et al.*, 2005 ; Torrente *et al.*, 2007). Ces études ont respectivement démontré l'augmentation du nombre de fibres musculaires positives à la dystrophine chez la souris *mdx* et l'innocuité de cette transplantation chez l'homme. Des recherches sont également en cours sur l'utilisation de cellules ES (pour « Embryonic Stem cells »), d'iPS (pour « induced Pluripotent Stem cells ») ou de cellules MuStem (pour « Muscle Stem cells ») qui présentent les caractéristiques phénotypiques des progéniteurs myogéniques dont un pouvoir réplicatif important (Sakurai *et al.*, 2008 ; Takahashi *et al.*, 2007 ; Rouger *et al.*, 2011).

V.6. Conclusion

Dans le traitement de la DMD, ces stratégies thérapeutiques ne sont pas toutes au même niveau d'avancement. Les stratégies basées sur les thérapies géniques et cellulaires ont déjà démontré leur efficacité dans le traitement d'autres maladies génétiques mais semblent évoluer plus lentement dans le traitement de la DMD en raison des particularités anatomique du muscle squelettique (taille, accès...).

Les stratégies basées sur la translecture des codons stop et sur le saut d'exon font partie des plus prometteuses et des plus avancées. Pour chacune d'entre elles des essais cliniques de phase III sont en cours.

En dépit des espoirs qui reposent sur ces thérapies, aucune ne semble être universelle pour les patients DMD. La stratégie de translecture des codons stop ne concerne que 15% des patients (mutation ponctuelle) et la stratégie de saut d'exon doit être développée « à façon » pour l'épissage de chaque exon qui portera un codon stop prématuré.

Dans le développement de ces stratégies thérapeutiques, les différents modèles d'études de la DMD ont permis des avancées inestimables et continueront à l'avenir à apporter d'importantes informations concernant la physiopathologie de la DMD.

VI. Modèles d'étude de la DMD

Différents modèles d'étude de la DMD ont été développés afin de déceler les mécanismes physiopathologiques de la maladie et de mettre au point des stratégies thérapeutiques. Seuls les modèles canins, félins et murins sont des modèles spontanés où des mutations dans le gène orthologue au gène DMD sont apparues naturellement. Les autres modèles qui seront présentés ont été développés par mutagenèse ou clonage. Les différents modèles seront présentés par ordre chronologique croissant de leur description dans la littérature.

VI.1. Le modèle murin *mdx*

Le premier modèle animal de la DMD à être décrit dans la littérature est le modèle murin. Le mutant original présente un codon stop prématuré dans l'exon 23 (Bulfield *et al.*, 1984 ; Sicinski *et al.*, 1989). Depuis, quatre autres mutants ont été développés et présentent tous une perte de l'expression musculaire du gène orthologue au gène DMD et une perte de la localisation de la dystrophine et du DGC au sarcolemme (Ohlendieck et Campbell, 1991). Les différents muscles ne sont pas touchés équitablement et c'est le

diaphragme de la souris *mdx* qui présente le phénotype dystrophique le plus aigu. Ces souris présentent une dystrophie moins sévère que celle observée chez les patients (Bulfield *et al.*, 1984). Une contraction musculaire forcée est souvent utilisée pour amplifier le phénotype dystrophique au niveau du muscle *tibialis anterior* de la patte (De Luca *et al.*, 2003).

Bien que présentant une dégénérescence beaucoup plus faible quantitativement, les modèles murins récapitulent qualitativement les phénotypes ayant conduit aux quatre hypothèses d'explication de la physiopathologie de la DMD (voir Chapitre 2^{ème}§IV). Le niveau de créatine kinase est élevé dans la circulation démontrant la déchirure du sarcolemme (Kobayashi *et al.*, 2012). La concentration intracellulaire de calcium est plus élevée dans les fibres *mdx* que dans les fibres sauvages (Whitehead *et al.*, 2006). L'infiltration du tissu musculaire par le système immunitaire a également été observé (Hartigan-O'Connor *et al.*, 2001) et le traitement de cette infiltration par une molécule anti-inflammatoire ralenti l'évolution de la pathologie (Gordon *et al.*, 2013). Enfin, nNOS (pour « *neuronal Nitric Oxide Synthase* ») est délocalisée du sarcolemme dans les fibres de souris *mdx* (Brenman *et al.*, 1995). Cependant, ces observations sont généralement faites dans les premiers mois de vie car la souris *mdx* adulte présente un syndrome dystrophique plus atténué dû à un niveau élevé de régénérescence (Grounds *et al.*, 1992).

Les souris *mdx* dans lesquelles on mute le gène codant le facteur de transcription myogénique MyoD (voir Chapitre 1^{er}§I.4.) présentent un niveau de régénérescence plus faible et une dystrophie plus sévère (Megeney *et al.*, 1999). De même, les souris *mdx* déficientes en MNF (pour « *Monocyte Nuclear Factor* »), sélectivement exprimé dans les cellules satellites, présentent un phénotype dystrophique exacerbé à la suite d'un dysfonctionnement des cellules satellites démontrant le rôle majeur que jouent ces cellules dans la physiopathologie de la DMD (Garry *et al.*, 2000). Plus récemment, les souris *mdx* ayant aussi une mutation dans le gène codant la glycosyltransferase Large présentent une dystrophie sévère plus proche de celle observée chez les patients DMD (Martins *et al.*, 2013).

Enfin, les souris doubles mutantes *mdx/utr^{-/-}* présentent une inhibition de l'expression du gène codant l'utrophine (voir Chapitre 2^{ème}§II.4.) en plus de la mutation dans le gène orthologue du gène DMD. Le syndrome dystrophique observé chez ces souris se rapproche de celui observé chez les patients. Elles montrent un retard de croissance, une scoliose et une mort prématurée (Deconinck *et al.*, 1996 ; Isaac *et al.*, 2013).

VI.2. Le modèle canin *cxmd*

Des mutations spontanées de l'orthologue du gène DMD ont été identifiées chez plusieurs espèces de chien comme le Rottweiler, le Braque Allemand, le Cavalier King

Charles ou le Beagle mais c'est sur le Golden Retriever que le plus d'études ont été menées depuis les années 1980 (Cooper *et al.*, 1988 ; Sharp *et al.*, 1992).

Les premières atteintes musculaires observées chez le GRMD (pour « Golden Retriever Muscular Dysrophy ») concernent les muscles de la langue (Nguyen *et al.*, 2002). Ce sont ensuite les muscles des pattes, du tronc et du cou qui sont le plus affaiblis en présentant un niveau élevé de fibres nécrotiques (Cozzi *et al.*, 2001). Le modèle GRMD reproduit assez fidèlement les observations faites chez les patients DMD : taux de créatine kinase dans le sang élevé, fibrose après les cycles de dégénérescence/régénérescence, contractures des articulations, mort par arrêt cardiaque ou respiratoire (Valentine *et al.*, 1988 ; Nguyen *et al.*, 2002). Il correspond donc à un modèle de choix pour l'évaluation préclinique de stratégies thérapeutiques. En revanche, il s'agit d'un modèle couteux, difficile d'obtention et de maintien. De plus, il présente une grande variabilité interindividuelle avec un âge de mort allant de 6 mois à 6 ans (Ambrosio *et al.*, 2008 ; Willmannet *et al.*, 2009). Cette variabilité contraint donc l'utilisation d'un nombre très important d'animaux pour l'obtention de résultats représentatifs.

VI.3. Les lignées cellulaires

Une lignée cellulaire dépourvue de dystrophine, appelée lignée SolC1(-) a été obtenue à partir de la lignée myogénique Sol8 isolée du muscle soléaire de souris sauvages de la souche C3H (Mulle *et al.*, 1988). Après plusieurs clonages successifs par dilution limite, cette lignée Sol8 a perdu l'expression de la dystrophine donnant lieu à la lignée SolC1(-) (Marchand *et al.*, 2004). Cette lignée cellulaire présente une altération de son homéostasie calcique et des signes morphologiques de mort cellulaire.

Ces phénotypes sont sauvés par la production d'une mini-dystrophine (Balghi *et al.*, 2006) faisant ainsi preuve de concept pour l'utilisation de cette lignée dans la validation pré-clinique de constructions pour la thérapie génique (voir Chapitre 2^{ème}§V.5.).

VI.4. Le modèle félin hfmd

Le chat déficient en dystrophine présente une atteinte clinique modérée. Le modèle félin de DMD est également un modèle spontané, nommé HFMD (pour « Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy »), en raison des hypertrophies musculaires que les chats atteints arborent. Le chat HFMD présente parfois des difficultés à sauter, ou une fatigue à l'effort, mais reste actif physiquement (Carpenter *et al.*, 1989, Gaschen *et al.*, 1992) et peut dépasser l'âge de 10 ans. Son atteinte cardiaque est en revanche précoce et très marquée (Chetboul *et al.*, 2006). Contrairement aux patients DMD qui souffre d'une cardiomyopathie

dégénérative, il s'agit chez le chat HFMD d'une cardiomyopathie hypertrophique. La concentration sérique en CK est très augmentée, et majorée par un stress ou un exercice physique.

L'examen histopathologique du tissu musculaire chez ces animaux met en évidence un phénotype dystrophique avec nécroses et régénérations, mais peu de fibrose, à l'exception du diaphragme (Gaschen et Burgunder, 2001). Des foyers de calcification sont fréquemment observés, sans que leur origine ne soit réellement déterminée. La taille des fibres musculaires est significativement augmentée chez ce chat, qui présente donc une hypertrophie musculaire vraie (Gaschen *et al.*, 1992).

Bien que le modèle HFMD représente un autre exemple de réponse à l'absence de dystrophine, il n'est pas beaucoup étudié en raison de sa taille et des ressemblances limitées qu'il présente avec la physiopathologie humaine (Shelton et Engvall, 2005).

VI.5. Le modèle chez le poisson zèbre *Danio rerio*

Chez le poisson zèbre, l'absence de dystrophine est obtenue soit par l'utilisation de morpholino-nucléotides soit par mutations dans le gène orthologue du gène DMD. Le mutant historique *sap* (pour « *sapje* ») a été isolé lors d'un crible génétique pour la réduction en biréfringence du tissu musculaire, un phénotype facilement identifiable par microscopie sous lumière polarisée (Granato *et al.*, 1996 ; Berger *et al.*, 2012). Par la suite, ce mutant a été identifié comme porteur d'un allèle nul pour le gène codant la dystrophine (Bassett *et al.*, 2003) et d'autres mutants ont été isolés depuis (Guyon *et al.*, 2009 ; Berger *et al.*, 2011).

Au niveau phénotypique, les poissons zèbres déficients en dystrophine présentent des détachements et une nécrose de leurs fibres musculaires suivis d'une fibrose et d'une réponse inflammatoire. Un déficit dans la prolifération des progéniteurs musculaires ne pouvant plus assurer la régénérescence du muscle a également été observé (Berger *et al.*, 2010). Cette publication a aussi démontré l'importance de la force mécanique dans le processus de détachement des fibres.

Le modèle de la DMD chez le poisson zèbre est également d'un grand intérêt dans le test de stratégies thérapeutiques. Par exemple, il a été démontré qu'il serait suffisant de rétablir le niveau de transcrits codant la dystrophine à 30% de son niveau chez le sauvage pour réduire significativement le phénotype dystrophique (Berger *et al.*, 2011). Il est aussi largement utilisé dans des cribles pharmacologiques où il a récemment permis d'identifier une vingtaine de molécules efficaces contre l'évolution du phénotype dystrophique (Kawahara *et al.*, 2011b). En particulier, le traitement par des inhibiteurs de la phosphodiesterase-5 sont sortis de ce crible et ont montré un effet bénéfique chez la souris *mdx* (Asai *et al.*, 2007).

VI.6. Le modèle chez le nématode *C. elegans*

Le mutant *dys-1(cx18)* pour le gène orthologue au gène DMD chez *C. elegans* a d'abord été décrit par son phénotype d'hyperactivité et d'hypercontraction (Bessou *et al.*, 1998). La combinaison de cette mutation avec une mutation thermosensible dans le gène *hlh-1/CeMyoD* mène à une dégénérescence musculaire dystrophine-dépendante (Gieseler *et al.*, 2000).

La description de ce modèle fera l'objet du 4^{ème} Chapitre de ce manuscrit.

VI.7. Le modèle chez la drosophile *Drosophila melanogaster*

Le gène codant la dystrophine chez la drosophile possède 54% de similarité avec le gène DMD humain. La sous-expression du gène codant la dystrophine par ARNi provoque une dégénérescence musculaire progressive qui se traduit par des défauts de mobilité (van der Plas *et al.*, 2007) et un phénotype de cardiomyopathie dilatée (Taghli-Lamalle *et al.*, 2008).

Par ailleurs, les recherches sur ce modèle ont fait émergé une nouvelle fonction potentielle pour la dystrophine. En effet, chez la drosophile, la dystrophine serait aussi impliquée dans le maintien de l'homéostasie synaptique en régulant le contrôle rétrograde de la libération de neurotransmetteurs (van der Plas *et al.*, 2006).

VI.8. Le modèle porcin

Le dernier modèle de la DMD à avoir été publié est le modèle chez le porc (Klymiuk *et al.*, 2013). Il a été développé par délétion ciblée de l'exon 52 du gène orthologue au gène DMD dans des cellules de rein primaires puis par transfert de noyau et insémination artificielle. Les fibres musculaires des porcelets montrent une absence de dystrophine et des protéines du DGC au sarcolemme. Les porcelets présentent une faiblesse musculaire due à une dystrophie musculaire progressive caractérisée par la présence de fibres nécrotiques et l'apparition de fibres centronuclées.

Le développement ciblé de ce modèle sur la délétion de l'exon 52 n'est pas anodin. Un des moyens de traiter cette délétion chez le porc serait le saut de l'exon 51. Il figure parmi les stratégies thérapeutiques les plus avancées pour traiter la DMD chez l'homme (voir Chapitre 2^{ème} §5.3.4.). De plus, les approches par thérapie génique sont face au problème du système immunitaire humain qui est plus sensible que les systèmes immunitaires chez le chien ou la souris. Par sa proximité évolutive avec l'homme, le modèle

porcin pourrait donc être utilisé afin de tester et d'améliorer ces approches par saut d'exon ou par thérapie génique.

Il sera primordial de confirmer la validité de ce modèle par d'autres approches car il s'agit d'un modèle émergent décrit dans une seule publication.

VI.9. Conclusion

Ces différents modèles cellulaires, animaux invertébrés et vertébrés ont permis des avancées considérables dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie et dans la mise au point de stratégies thérapeutiques. Plutôt que de les mettre en concurrence, il est nécessaire d'être conscient de leur complémentarité pour pouvoir tirer le meilleur de chacun.

Chapitre 3^{ème} :

Caenorhabditis elegans comme modèle d'étude

I. Historique

Caenorhabditis elegans a été observé pour la première fois dans le sol algérien par Emile Maupas (Maupas, 1901). Ce naturaliste français est particulièrement intrigué par le mode de reproduction hermaphrodite de certains vers et il est le premier à décrire l'anatomie de ce nématode qu'il nomme *Rhabditis elegans*. En latin, *Rhabditis* signifie bâtonnet en référence à la forme de l'animal et *elegans* signifie élégant en raison de l'élégance de son mode de locomotion. L'espèce *Rhabditis* est mise en lumière par Dougherty et Calhoun en 1948 (Dougherty et Calhoun, 1948). En 1952, Osche le place dans le sous genre *Caenorhabditis* (Osche, 1952) qui par la suite est élevé au stade d'espèce générique par Dougherty (Dougherty, 1955).

Historiquement, deux souches de ce nématode ont été utilisées. La première est isolée par Victor Nigon à Bergerac, ville dont elle porte le nom (Nigon, 1949). Ce biologiste français étudie le déterminisme sexuel chez *C. elegans* et est le premier à dresser son caryotype. Il propose d'ailleurs que, chez *C. elegans*, le sexe serait déterminé par le ratio entre les autosomes et les chromosomes sexuels plutôt que par le nombre absolu de chromosomes sexuels. L'autre souche, Bristol, porte également le nom du sol dont elle est originellement isolée en Angleterre en 1959 dans un compost (Nicholas *et al.*, 1959). Cependant, à cause de l'infertilité des mâles de la souche Bergerac et la stérilité sensible à la température des hermaphrodites de cette lignée, la majorité des études génétiques sont réalisées sur un dérivé N2 de la lignée Bristol établi dans le laboratoire de Sydney Brenner en 1964.

Ce biologiste anglais a choisi *C. elegans* comme modèle d'étude pour analyser le développement et le comportement (Brenner, 1973 ; Brenner, 1974). Les travaux qu'il a initiés chez cet organisme lui ont valu le prix Nobel de Médecine ou de Physiologie en 2002 conjointement avec Robert Horvitz et John E. Sulston. Sydney Brenner est considéré comme le « père » de la biologie chez *C. elegans* en raison de ses travaux qui ont permis d'élever l'animal au rang d'organisme modèle.

II. Anatomie générale

C. elegans est un ver rond non segmenté de petite taille (1,2 mm pour un adulte) que l'on retrouve dans le sol des régions tempérées. Il se nourrit de bactéries qu'il trouve dans les matières biologiques en décomposition. *C. elegans* ingère les bactéries de son

environnement par pompage des muscles de son pharynx bilobé (Figure 19B), les digèrent dans son intestin (Figure 19C) et élimine ses excréments par l'anus (Figure 19B).

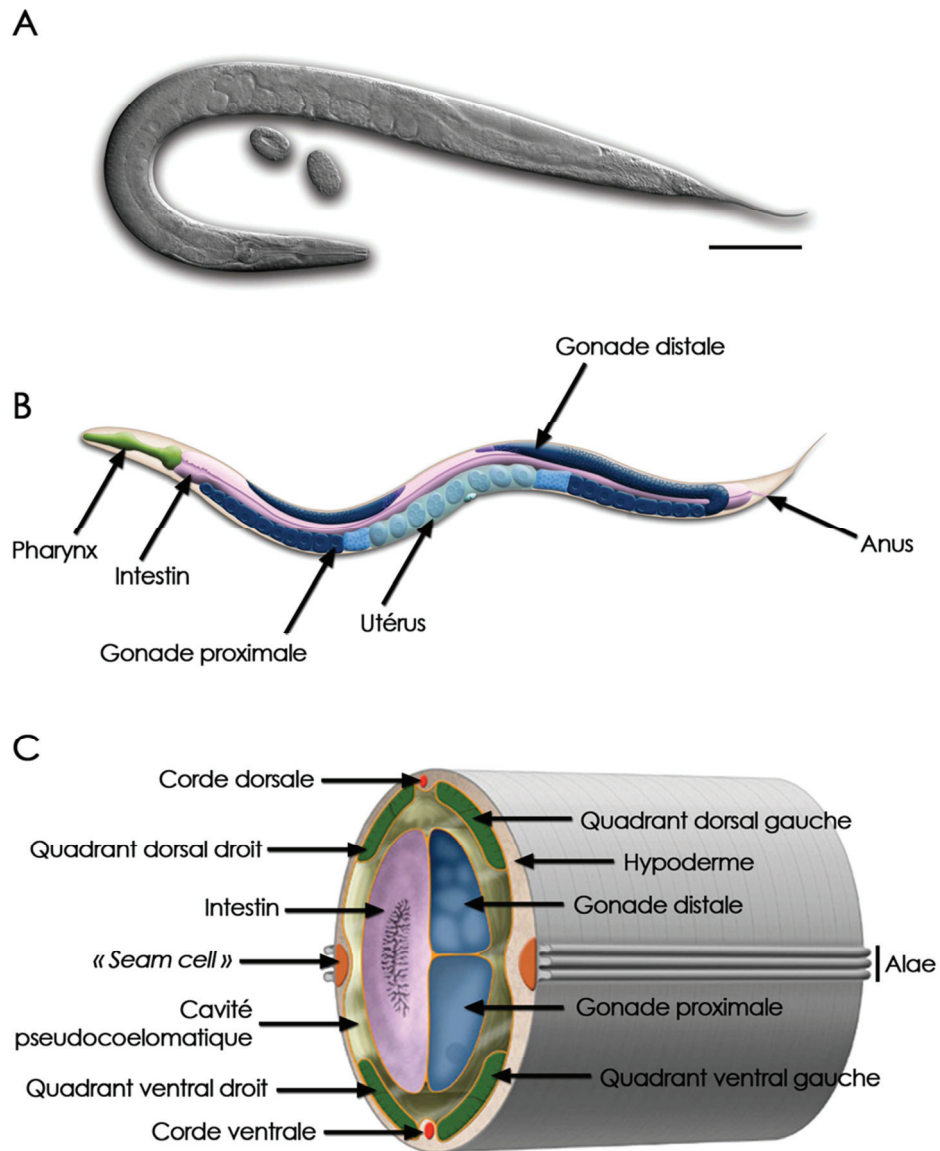


Figure 19: Photographie et schémas représentant l'anatomie de *Caenorhabditis elegans*. A. Photographie d'un nématode adulte et de deux œufs (barre d'échelle : 0,1 mm). B. Schéma d'un nématode adulte représentant l'organisation tissulaire de l'animal. C. Schéma d'une coupe transversale d'un nématode adulte représentant les différents tissus d'un ver orienté comme en B. Adapté de www.wormatlas.org

C. elegans se protège de son environnement extérieur par la présence d'un exosquelette appelé cuticule. Cette enveloppe rigide de collagène sécrétée par l'hypoderme sous-jacent est également nécessaire au maintien de la morphologie du corps et à son mouvement. Afin de permettre sa croissance, le ver mue à plusieurs reprises au cours de sa vie larvaire. Durant la mue, le pompage du pharynx cesse et l'animal entre dans une

période de courte léthargie. Entre chaque mue sa taille augmente d'environ un tiers et continue d'augmenter tout au long du stade adulte.

Le ver se déplace par contraction alternée des quatre bandes de muscles – appelées « quadrants » – qui courent le long de son corps produisant ainsi un mouvement sinusoïdal dans le plan dorso-ventral (Figure 19C). Les motoneurones à l'origine du mouvement du ver sont localisés le long de deux cordes nerveuses ventrale et dorsale (Figure 19C). La majorité des autres neurones est localisée dans la tête autour du pharynx.

C. elegans est un hermaphrodite qui peut se reproduire par autofécondation ou par fécondation entre un mâle et un hermaphrodite. Dans une population, les mâles représentent environ 0,1% assurant ainsi le brassage génétique. Le caryotype d'un hermaphrodite est composé de cinq paires d'autosomes et d'une paire de chromosomes sexuels (5 AA ; 1 XX). Les mâles sont notés 5AA ; 1X0 car ils ne présentent qu'un chromosome sexuel dû à la non-disjonction des chromosomes X lors de la gamétogénèse chez l'hermaphrodite parent. Le mâle peut être reconnu grâce à son corps fin, ses gonades, contenant le sperme, qui donnent une apparence ventrale blanche et son organe copulatoire caractéristique qui se situe au bout de la queue (Figure 20).

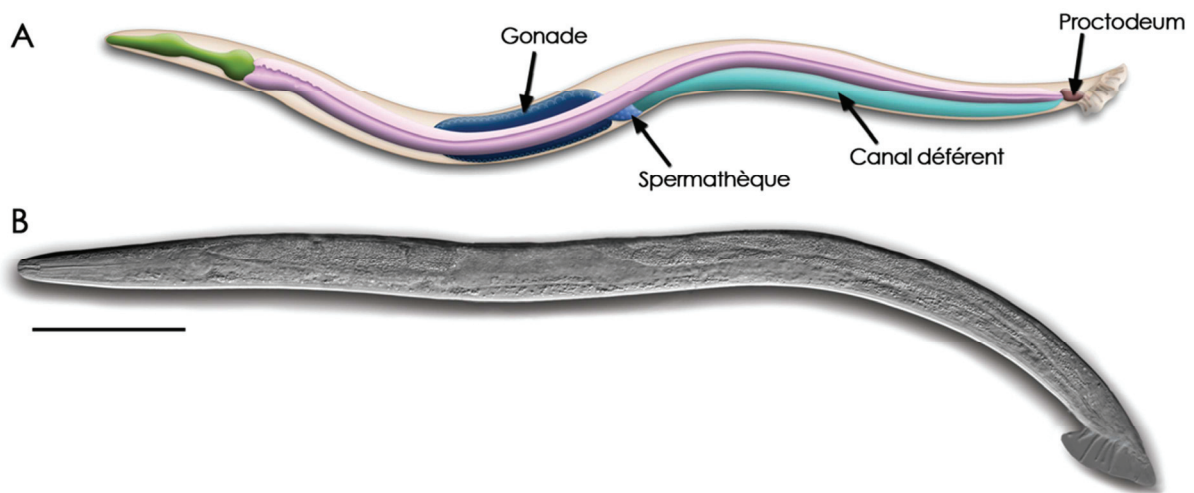


Figure 20 : Schéma et photographie représentant l'anatomie du mâle chez *C. elegans*. A. Schéma représentant l'organisation des tissus du mâle. B. Photographie d'un mâle (Barre d'échelle : 0,1 mm). C.

Chez l'hermaphrodite, le système reproducteur peut être divisé en trois parties : le syncytium gonadique, la spermathèque et l'utérus. Le futur ovocyte se développe d'abord dans le syncytium gonadique, il passe ensuite dans la spermathèque où il subit deux divisions de méiose avant d'être fécondés par un spermatozoïde. L'œuf fécondé passe ensuite dans l'utérus où il commence son développement.

III. Cycle de vie

III.1. Le développement embryonnaire

L'embryogenèse chez *C. elegans* est globalement divisée en deux stades : la prolifération et l'organogenèse. La prolifération dure environ 330 minutes après la fertilisation jusqu'à l'obtention de 550 cellules. Les premières 150 minutes du développement se déroulent dans l'utérus puis l'œuf est pondu et continue son développement (Figure 21). La ponte coïncide avec le début de la gastrulation. A la fin de la prolifération, l'embryon est composé de cellules organisées en trois couches.

La première couche est constituée de l'ectoderme qui donnera l'hypoderme et les neurones. La seconde est le mésoderme qui formera le pharynx et les muscles. Enfin l'endoderme est à l'origine de la formation de la lignée germinale et de l'intestin. A ce moment commence la deuxième phase de l'embryogenèse appelée l'organogenèse (de 5,5 à 14 heures). La différenciation terminale des cellules se déroule sans qu'il n'y se produise de divisions supplémentaires. L'embryon prend la forme d'un nématode avec des organes et des tissus pleinement différenciés. Il est capable de se mouvoir à l'intérieur de l'œuf d'une manière coordonnée en tournant autour de son axe longitudinal. Ce mouvement est nécessaire à l'élongation du ver et indique que le système moteur est pleinement développé à ce stade. Les mutations de type *pat* (pour « *Paralyzed at two-fold* ») qui affectent le développement des muscles et leur ancrage à l'hypoderme produisent un arrêt de l'élongation durant l'embryogénèse (voir Chapitre 4^{ème} §II.2.). En cas de développement normal, l'embryon commence à pomper à l'aide de son pharynx après 760 minutes et l'éclosion a lieu au bout de 800 minutes (Figure 21).

III.2. Le développement post-embryonnaire

Le développement post-embryonnaire débute après l'éclosion où le ver est composé de 558 cellules. En absence de nourriture à l'éclosion, le développement post-embryonnaire ne débute pas, le ver reste au stade larvaire 1 (L1) et peut vivre ainsi pendant 6 à 10 jours (Figure 21). Les divisions cellulaires et le programme de développement reprennent avec la prise alimentaire (Ambros, 2000).

La première mue se produit au bout de 12 heures et l'animal passe au stade larvaire 2 (L2). En cas de surpopulation, de famine ou de température élevée, les nématodes peuvent entrer dans un stade particulier appelé « *Dauer* » qui signifie « durée » en allemand (Figure 21). Ce stade commence par une phase intermédiaire L2d qui est capable de reprendre un développement normal vers le troisième stade (L3) en cas de conditions favorables. Si la pénurie continue, L2d entre dans le stade *Dauer* proprement dit. Durant ce

stade, la cavité buccale est fermée et le système locomoteur continue à propulser l'animal à la recherche d'une nouvelle source de nourriture. Le stade Dauer peut durer jusqu'à 4 mois. Lorsque les conditions sont redevenues favorables le ver quitte le stade Dauer en rejoignant le cycle classique au dernier stade larvaire L4.

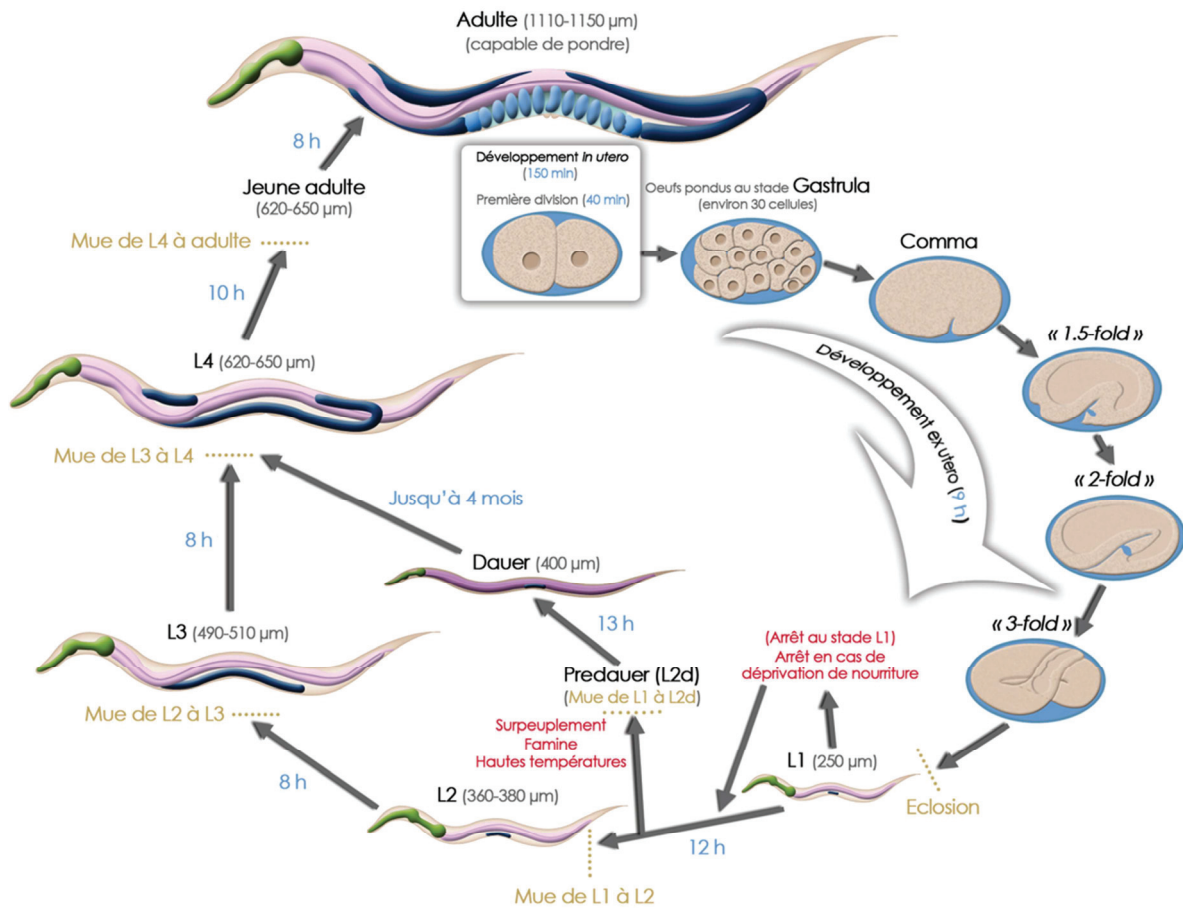


Figure 21 : Schéma représentant le cycle de vie de *C. elegans*. Adapté de www.wormatlas.org

Durant le stade L4, la formation des gonades qui a débuté à la fin du stade L3 est achevée. Les bras des gonades s'allongent en migrant vers les extrémités le long du muscle dorsal. La méiose dans la lignée germinale débute à partir de la mue L3/L4 et les cellules germinales se différencient en spermatozoïdes matures. Lors de la mue vers le stade adulte, la production de sperme s'arrête et les cellules germinales se spécialisent dans la formation exclusive des ovocytes. 45 à 50 heures après éclosion, le nématode hermaphrodite pond son premier œuf commençant ainsi sa période reproductive qui durera 4 jours (Byerly *et al.*, 1976). L'adulte hermaphrodite est capable de produire jusqu'à 300 œufs par autofécondation. Au delà de cette période fertile, il est capable de vivre encore 10 à 15 jours et éventuellement de continuer à se reproduire s'il est fécondé par un mâle.

Le développement chez l'hermaphrodite produit 1090 cellules somatiques parmi lesquelles 131 meurent par apoptose. Un hermaphrodite adulte est donc composé d'exactly 959 cellules somatiques dont 302 neurones et 95 cellules musculaires striées. Le développement et le fonctionnement du tissu neuromusculaire chez *C. elegans* fera l'objet du Chapitre 4^{ème} de ce manuscrit.

IV. Le génome de *C. elegans*

La publication de la séquence du génome entier en 1998 a augmenté la popularité de *C. elegans* comme modèle d'étude (*C. elegans* sequencing consortium, 1998). Il est le premier organisme multicellulaire dont le génome a été entièrement séquencé et à peine le deuxième eucaryote derrière *Saccharomyces cerevisiae*. Le génome de *C. elegans* est de 100×10^6 paires de bases (100Mb). On estime que le génome de *C. elegans* contient environ 20000 gènes.

V. Outils pour l'étude de la biologie de *C. elegans*

V.1. L'ARN interférence

Le mécanisme derrière le phénomène d'ARN interférence a été compris chez *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998 ; Guo et Kemphues, 1995). Ces découvertes ont été récompensées par le prix Nobel de physiologie ou médecine en 2006.

L'ARN interférence (ARNi) est un phénomène biologique par lequel des ARN double brin (ARNdb) spécifiques d'un gène entraînent l'élimination de l'ARN messager (ARNm) de ce gène. Sa fonction physiologique est de protéger la cellule contre les virus ou les transposons (Vastenhouw et Plasterk, 2004), de réguler le remodelage de la chromatine (Buscaino *et al.*, 2013) et de réguler l'expression des gènes de la cellule (Matzke et Birchler, 2005). Très rapidement après sa découverte, l'ARN interférence est utilisé de façon routinière pour réprimer transitoirement l'expression d'un gène spécifique.

Pour cela, un ARN double brin de séquence correspondant à une partie codante du gène que l'on souhaite inactiver est introduit dans le ver par le biais de diverses techniques décrites ultérieurement. Les ARN double brins sont ensuite reconnus et coupés en petits ARN double brins, appelés siRNA (pour « *small interfering RNA* »). Ces siRNA s'hybrident à l'ARN messager (ARNm) du gène de séquence correspondante, l'ARNm est alors clivé à l'endroit de l'hybridation, par des endonucléases. L'ARNm est ensuite entièrement dégradé, l'expression du gène est ainsi réprimée (Grishok, 2005). Il est important pour l'analyse des

résultats de noter que le phénomène d'ARNi est connu chez *C. elegans* pour être moins efficace sur les gènes à expression neuronale (Tavernarakis *et al.*, 2000).

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

- injection d'une solution concentrée d'ARN double brin dans un oviducte d'adulte (Fire *et al.*, 1998) ;

- immersion des vers dans une solution concentrée d'ARN double brin pendant 24 heures (Tabara *et al.*, 1998) ;

- injection d'un transgène permettant l'expression *in vivo* d'ARN double brin (Tavernarakis *et al.*, 2000) ;

- électroporation des vers dans une solution d'ARN double brin (laboratoire de Victor Ambros, communication personnelle) ;

- en nourrissant les vers avec des bactéries produisant des ARN double brin (Timmons et Fire, 1998).

Cette dernière technique permet de traiter un grand nombre de vers à la fois et ceci pendant un temps déterminé. Une séquence spécifique du gène cible est insérée dans le plasmide L4440. Ce plasmide permet l'expression d'un ARN double brin, la séquence étant insérée entre deux promoteurs du gène codant la T7 polymérase se faisant face (Timmons et Fire, 1998). Les bactéries transformées par ces vecteurs produisent les ARN double brin. Les vers pompent les bactéries, les broient dans leur pharynx et les ingèrent. Ensuite, les ARN double brin se répandent dans les cellules du ver en y induisant la répression spécifique du gène ciblé.

V.2. Transgénèse

Il existe deux méthodes complémentaires pour produire des vers transgéniques : la biolistique et la micro-injection.

La biolistique utilise des micro-billes d'or recouvertes de l'ADN d'intérêt. Lors du bombardement, les microbilles pénètrent l'animal à une échelle sub-cellulaire. Elles peuvent casser l'ADN génomique et y faire pénétrer l'ADN d'intérêt. Si la cellule touchée est une cellule de la lignée germinale, et si l'ADN d'intérêt s'intègre dans le génome, alors le transgène sera transmis à la descendance. Les avantages de cette méthode sont la stabilité et l'intégration de l'ADN dans les lignées obtenues.

La micro-injection repose sur l'injection de l'ADN d'intérêt à l'aide d'un capillaire, dans les gonades du ver. Une fois dans le syncytium gonadique, l'ADN injecté pourra, avec une faible probabilité, être englobé dans un ovocyte lors de la formation de sa membrane plasmique. L'oeuf résultant de la fécondation de cet ovocyte par un spermatozoïde

possédera donc ce transgène. Au fur et à mesure des divisions cellulaires lors du développement, l'ADN injecté sera transmis de façon aléatoire dans les cellules filles : on parle d'ADN épisomique. Toutes les cellules du ver n'auront pas l'ADN épisomique : le ver sera transgénique de façon mosaïque. De plus, ce ver ne transmettra pas l'ADN épisomique à toute sa descendance.

Il est possible d'intégrer un transgène épisomique dans un chromosome après le traitement des vers transgéniques par des rayons UV ou gamma qui vont provoquer des cassures double-brin aléatoires dans l'ADN. Lors de la réparation du chromosome, l'ADN épisomique pourra s'intégrer au niveau de ces cassures. L'insertion est donc aléatoire et le transgène est inséré de façon multiple.

Il est également possible d'intégrer un ADN épisomique de façon ciblée en utilisant la méthode du MosSCI (pour « *MosSingle Copy Insertion* » ; Frokjaer-Jensen *et al.*, 2008). En utilisant le protocole ci-dessus, des vers ayant des séquences reconnues par une transposase de drosophile dans leur génome ont été générés. L'expérimentateur peut ensuite co-injecter 1. un plasmide contenant la séquence d'intérêt bordée des mêmes séquences reconnues par la transposase avec 2. un plasmide contenant la séquence codant la transposase et 3. des plasmides marqueurs de co-injection. Une fois produite, la transposase va procéder à l'insertion de la séquence du plasmide d'intérêt au locus des séquences reconnues sur le chromosome. Une seule copie de la séquence d'intérêt sera donc insérée au niveau du locus choisi.

V.3. Microscopies optique et électronique

La transparence de *C. elegans* en fait un organisme exceptionnel pour les approches de microscopie optique. Cette transparence couplée à la petite taille du ver évite le besoin de faire des coupes histologiques pour avoir accès aux différents tissus. Les vers sont donc généralement montés *in toto* entre lame et lamelle.

En utilisant un microscope avec contraste interférentiel différentiel (CID ou « *DIC* » en anglais), les différentes cellules de l'embryon et du ver aux différents stades larvaires et adultes peuvent être identifiées et analysées. C'est à l'aide de cette méthode que John Sulston et Robert Horwitz ont décrit l'ensemble du lignage cellulaire chez *C. elegans* (Sulston et Horwitz, 1977 ; Sulston *et al.*, 1983).

La microscopie électronique, quant à elle, a notamment été utilisée dans de nombreuses études anatomiques dont l'établissement de la carte du réseau nerveux de *C. elegans* après reconstruction d'électrographies de coupes sériées (Ward *et al.*, 1975 ; White *et al.*, 1986 ; Hall et Russel, 1991).

VI. Récompenses obtenues liées à *C. elegans*

Le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine 2002 a été attribué à Sydney Brenner, Robert Horvitz et John Sulston pour leurs travaux chez *C. elegans* et leurs découvertes sur « la régulation génique du développement des organes et la mort cellulaire programmée ».

En 2006, un nouveau Prix Nobel de Physiologie ou Médecine est attribué à deux chercheurs pour leurs découvertes chez *C. elegans*. Andrew Fire et Craig Mello ont été récompensés pour leur « découverte de l'ARN interférence ».

Le Prix Nobel de Chimie 2008 a été attribué à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien pour la « découverte et le développement de la GFP » (pour « Green Fluorescent Protein »).

Chapitre 4^{ème} :

Les muscles de *Caenorhabditis elegans* et le modèle DMD

I. Introduction

Il existe deux types de cellules musculaires chez *C. elegans* :

- les cellules musculaires à sarcomère unique (non striées, ou lisses) qui sont au nombre de 40 chez l'hermaphrodite adulte. Vingt d'entre elles composent le pharynx bilobé permettant au ver de pomper les bactéries dont il a besoin pour se nourrir. Quatre cellules forment le système de défécation, et seize forment la musculature de l'utérus et de la vulve ;

- les cellules musculaires à sarcomères multiples (striées) qui sont au nombre de 95 chez l'hermaphrodite adulte. Ces cellules forment quatre bandes de cellules musculaires – les quadrants – impliquées dans la locomotion du ver. Ces cellules sont appelées « *body wall muscles* » en raison de leur localisation périphérique sous la cuticule et l'hypoderme. Chaque quadrant comporte 24 cellules mononuclées fusiformes organisées en quinconce le long de deux bandes longitudinales (le quadrant ventral gauche ne contient que 23 cellules ; Sulston & Horvitz, 1977). La locomotion de l'animal se fait par contraction des muscles ventraux et relaxation simultanée des muscles dorsaux et vice versa.

Mis à part les extrémités distales des deux bras gonadiques, le ver adulte est intégralement post-mitotique, il ne possède pas de cellules satellites, la régénération musculaire n'est donc pas possible. Ses cellules musculaires striées sont mononuclées et ne fusionnent pas contrairement aux cellules des muscles squelettiques des vertébrés mais elles présentent une structure similaire.

II. La structure des muscles striés chez *C. elegans*

II.1. La morphologie des « *body wall muscles* »

Les « *body wall muscles* » de *C. elegans* présentent trois parties distinctes : 1. le corps cellulaire qui renferme les organites cytoplasmiques et le noyau (en vert dans la Figure 22), 2. le fuseau sarcomérique (en jaune) qui contient une couche fine de myofilaments (1 à 2 µm d'épaisseur) et 3. les bras musculaires (en rouge), qui sont les structures de projection du muscle vers la corde nerveuse (en mauve). En effet, contrairement à ce que l'on observe dans le muscle des vertébrés, les motoneurones ne se projettent pas vers les cellules musculaires, mais à l'inverse ce sont les cellules musculaires qui envoient des projections qu'on appelle bras musculaires vers les axones des motoneurones.

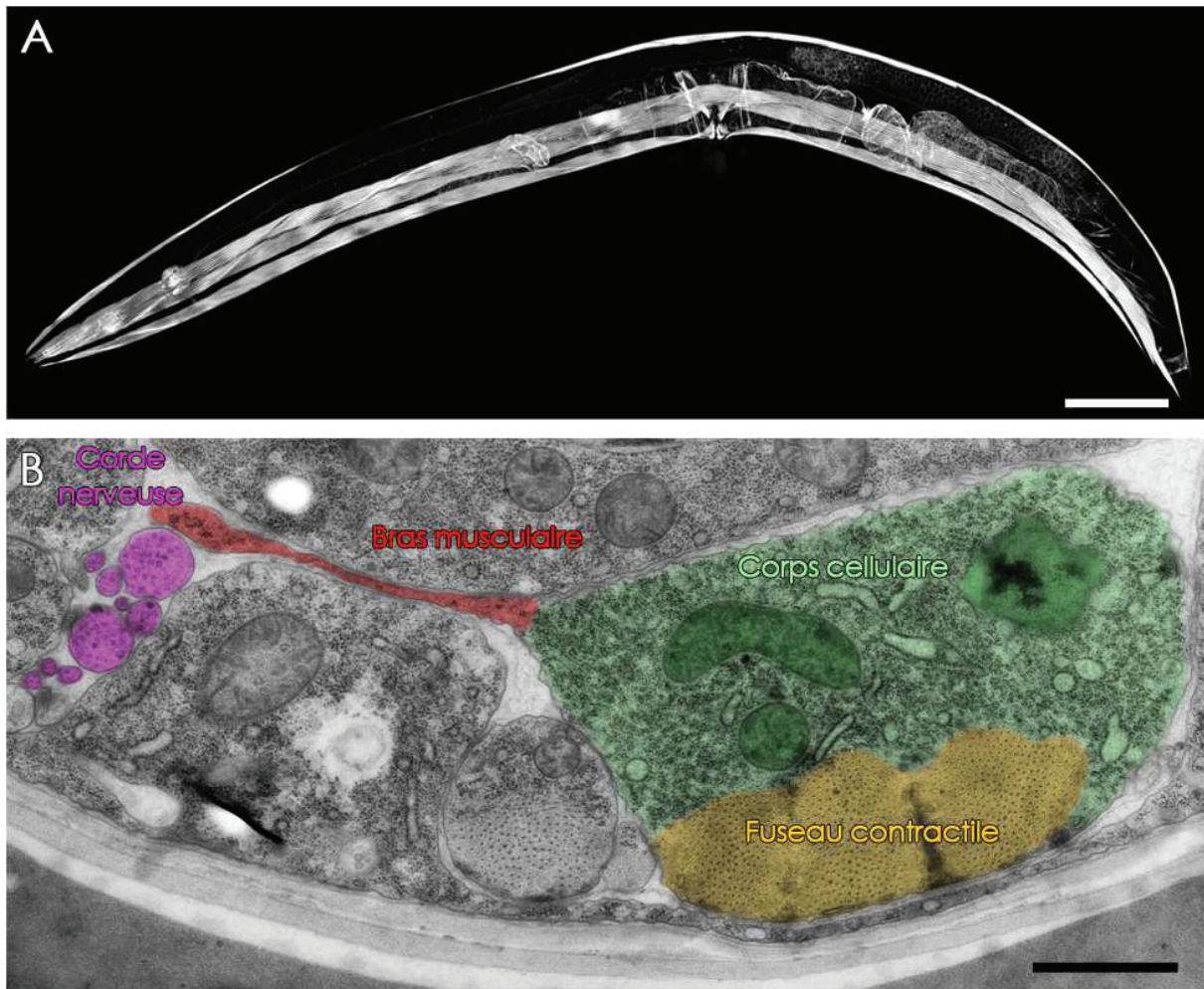


Figure 22 : A. Coloration à la rhodamine-phalloïdine d'un ver sauvage montrant un quadrant ventral (Barre d'échelle 100 μm). B. Electromicrographie pseudocolorée d'une section transversale de quadrant musculaire. Les pseudo-couleurs indiquent les différentes parties de la cellule musculaire et de la corde nerveuse (vert : le corps cellulaire avec le noyau et deux sections de mitochondries ; rouge : un bras musculaire se projetant vers la corde nerveuse en violet ; jaune : le fuseau contractile). Le bras musculaire passe au-dessus de deux autres sections de cellules musculaires et d'une section d'hypoderme pour atteindre la corde nerveuse (Image personnelle, Barre d'échelle : 1 μm).

II.2. Le développement des « *body wall muscles* »

Parmi les 95 cellules musculaires composant les « *body wall muscles* », 81 d'entre elles se développent dans l'embryon et 14 se développent seulement après l'éclosion. Chez les vertébrés le développement musculaire repose sur l'expression d'une famille de facteur myogéniques (voir Chapitre 1^{er}§1.4.). Chez *C. elegans*, un seul gène, *hlh-1*, représente cette famille. Le domaine fonctionnel nécessaire à l'activation myogénique d'HLH-1 partage une similarité de 79% avec celui de la protéine orthologue MyoD chez la souris (Krause et al., 1990 ; Amin et al., 2007).

Le gène *hlh-1* est exprimé dans les progéniteurs des « *body wall muscles* » et dans les cellules musculaires adultes. Son expression ainsi que celle de MAB-5, FOZI-1, UNC-120 et HND-1 – quatre autres facteurs de transcription à expression musculaire – sont nécessaires à une morphogenèse correcte et au bon fonctionnement des cellules musculaires (Fukushige *et al.*, 2006 ; Amin *et al.*, 2007 ; Amin *et al.*, 2009). Ces facteurs de transcription permettront l'expression des gènes impliqués dans les quatre étapes majeures du développement du muscle chez *C. elegans* : la migration cellulaire, la polymérisation des filaments contractiles, l'attachement des cellules à l'hypoderme et le développement des bras musculaires.

II.2.1 La migration cellulaire

La migration des cellules musculaires embryonnaires chez *C. elegans* est nécessaire à la mise en place des quadrants musculaires (voir Chapitre 3^{ème} §II). Cette migration dépend de l'expression des gènes codants INA-1/alpha-intégrine, VAB-2/Ephrine, VAB-1/« *Eph-Receptor* » (Tucker et Han, 2008). Ces protéines sont à l'origine de la dynamique membranaire de ces cellules à la surface desquelles s'étendent des filopodes et des lamellipodes (Viveiros *et al.*, 2011). A la fin de la migration, les deux bandes de cellules formant un quadrant vont s'aplatir à la surface de l'hypoderme et devenir jointives formant ainsi un contact cellule musculaire-cellule musculaire allant de la tête à la queue de l'animal (Hresko *et al.*, 1994).

II.2.2 La polymérisation des filaments contractiles

La polymérisation des filaments épais de myosine et des filaments fins d'actine commence dès la fin de la migration des cellules musculaires embryonnaires et fait intervenir de nombreuses protéines.

UNC-98 et UNC-96 favorisent l'incorporation de la myosine dans les filaments épais (Miller *et al.*, 2008), UNC-45 est responsable de la périodicité des molécules de myosine dans les filaments (Gazda *et al.*, 2013) et UNC-82 assure le maintien de la myosine dans ces filaments (Hoppe *et al.*, 2010). UNC-94/tropomoduline, UNC-60B/cofiline, UNC-78/AIP1, PFN-1/profiline et CAS-1 régulent la polymérisation des filaments fins d'actine du sarcomère (Yamashiro *et al.*, 2008 ; Nomura *et al.*, 2012 ; Mohri *et al.*, 2013). Les fonctions précises de ces protéines dans les étapes de formation des filaments d'actine sarcomérique restent à être définies. LEV-11/tropomyosine, UNC-87/calponine et la kettin se fixent aux filaments d'actine et les stabilisent (Ono et Ono, 2002 ; Ono *et al.*, 2006 ; Yamashiro *et al.*, 2007). CYK-1 et FHOD-1 – deux protéines de la famille des formines – seraient impliquées à la fois dans la croissance et le maintien des fuseaux contractiles (Mi-Mi *et al.*, 2012).

Les filaments de myosine et d'actine sont progressivement ancrés au niveau des corps denses et des lignes M respectivement pendant la croissance de ces derniers.

II.2.3 L'attachement des cellules à l'hypoderme

L'attachement des cellules musculaires à l'hypoderme commence dès la fin de la migration des cellules par la sécrétion de la protéine UNC-52/perlecan. Les molécules d'intégrines transmembranaires PAT-2 et PAT-3 également produites par la cellule musculaire vont interagir physiquement avec UNC-52/perlecan et se concentrer au centre du quadrant au niveau de la jonction longitudinale cellule-cellule (Rogalski *et al.*, 1993; Hresko *et al.*, 1994; Williams et Waterston, 1994; Mullen *et al.*, 1999). Par un mécanisme qui n'est pas encore clair, ces molécules vont ensuite former des points focaux afin de dessiner le profil régulier de disposition des futures structures d'ancrage des filaments contractiles : les corps denses et les lignes M. Ce motif particulier est nécessaire à l'assemblage des sarcomères et à la répartition uniforme de la transmission des forces à l'hypoderme. Deux groupes de protéines recrutées dans le cytosol vont s'ajouter à ces points focaux. Le premier groupe comprenant UNC-112/Mig-2, PAT-4/ILK, PAT-6/actopaxine et UNC-97/Pinch et le second comprenant DEB-1/vinculine et UNC-95. Le premier groupe s'ajouterait à tous les points focaux alors que l'ajout du second définirait lesquels de ces points formeront la base d'un corps dense (Moerman et Williams, 2006).

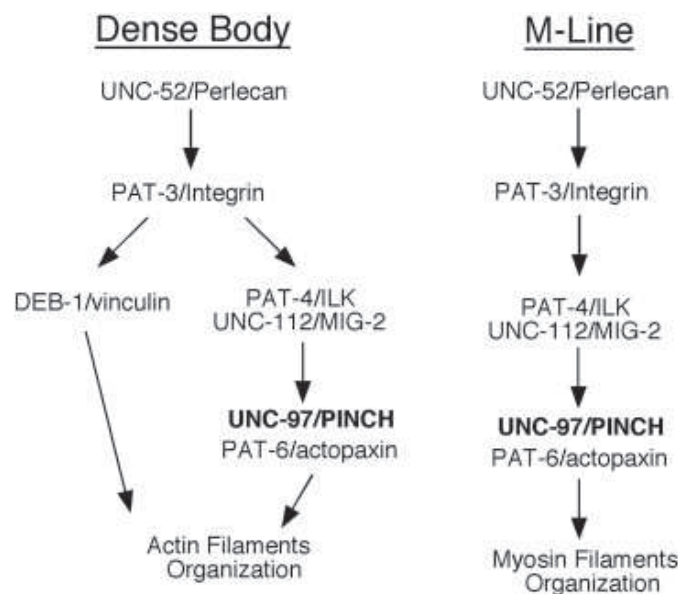


Figure 23 : Cascade d'assemblage des corps denses (« Dense Body ») des lignes M (« M-Line »). Les flèches indiquent les liens d'épistasie qui existent entre les différentes protéines. Il est important de noter le partage d'une partie de cette cascade entre les corps denses et les lignes M (Norman *et al.*, 2007)

Les corps denses et les lignes M continuent leur croissance en se projetant du sarcolemme dans le cytoplasme par l'accumulation progressive de leurs protéines spécifiques (voir Chapitre 4^{ème} §II.3). Petit à petit, ces deux structures ancrent les filaments contractiles produits dans le cytoplasme.

II.2.4 Les bras musculaires

Le développement des bras musculaires suit une dynamique en deux phases. Une première phase embryonnaire supposée être passive et une phase larvaire active (Dixon *et al.*, 2005). Lors de la phase embryonnaire, le myoblaste forme quelques contacts avec la corde nerveuse en développement. Pendant la fin de la morphogénèse des cellules musculaires, ces contacts sont maintenus et étirés formant ainsi les premiers bras musculaires. Lors de la phase larvaire, le nombre de bras musculaires est doublé, indiquant la présence d'un mécanisme de guidage d'extensions membranaires vers la corde nerveuse. Ce mécanisme repose sur une signalisation protéique proche des cascades de l'insuline et du FGF (Dixon *et al.*, 2006; Dixon *et al.*, 2008). Cette cascade fait intervenir LIN-12/Notch qui activerait UNC-40/DCC et MADD-2/MID1 (Alexander *et al.*, 2009 ; Alexander *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2013). A son tour, UNC-40/DCC serait potentialisé par MADD-2/MID-1 et permettrait le guidage du bras musculaire. UNC-73/Rho-GEF, UNC-60B/cofiline (qui sont impliquées dans la dé/polymérisation de l'actine), LEV-11/tropomyosine et UNC-54/MHC-B seraient les effectrices de la croissance de ces extensions membranaires (Dixon *et al.*, 2005) mais le lien éventuel entre UNC-40/DCC et ces effecteurs est à ce jour inconnu.

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

III.1. L'innervation

Les cellules musculaires striées de *C. elegans* présentent une double innervation au niveau de leurs bras musculaires. En effet, les cellules musculaires reçoivent 1. une innervation cholinergique excitatrice et 2. une innervation GABAergique inhibitrice (GABA pour « *Gamma AminoButyric Acid* » ; voir Chapitre 4^{ème} §III.5). Etant donné qu'on dénombre 1410 jonctions neuromusculaires (Chen *et al.*, 2006) et 95 cellules musculaires striées chez l'adulte hermaphrodite, chaque cellule musculaire dresse donc en moyenne 15 jonctions neuromusculaires avec des motoneurons excitateurs ou inhibiteurs.

III.2. Le couplage excitation-contraction

Comme chez les vertébrés, l'activation des cellules musculaires striées de *C. elegans* se fait grâce à la libération d'acétylcholine après l'arrivée d'un potentiel d'action

au niveau du bouton synaptique (voir Chapitre 1^{er} §III.1.). L'augmentation de calcium intracellulaire nécessaire à la contraction fait intervenir les canaux calciques voltage-dépendants de type L organisés autour de la sous-unité principale EGL-19 (orthologues fonctionnels des canaux DHPR vertébrés) et UNC-68 (orthologues des récepteurs à la ryanodine). En revanche, chez *C. elegans*, le couplage entre ces deux canaux ne serait pas lié à une interaction physique mais à la sensibilité d'UNC-68 à l'augmentation intracellulaire de calcium suite à l'ouverture d'EGL-19 (Jospin *et al.*, 2002). Ensuite, comme chez les vertébrés, le calcium libère les sites d'interaction entre les filaments d'actine et de myosine.

III.3. La production de la force contractile

Comme dans le muscle strié squelettique vertébré, la force contractile est générée par le déplacement des têtes de myosine sur les filaments fins d'actine (voir Chapitre 1^{er} §III.3.).

Le sarcomère dans les « *body wall muscles* » de *C. elegans* a une structure classique avec un enchaînement de filaments fins d'actine entre lesquels s'intercalent des filaments épais de myosine. MYO-3 et UNC-54 sont les orthologues des chaînes lourdes de myosine dans les « *body wall muscles* ». ACT-1 à 4 sont les actines présentes dans les cellules musculaires et qui polymérisent en filaments fins de la même façon que chez les vertébrés (Moerman et Fire, 1997).

De plus, on retrouve la majorité des protéines accessoires présentes au niveau des filaments contractiles vertébrés (voir Chapitre 1^{er} §III.), comme par exemple LEV-11/tropomyosine, les troponines (PAT-10/troponine C, MUP-2/troponine T, TNI-1 à 3/troponine I) et les protéines régulatrices de l'assemblage ou du maintien des filaments fins et épais (voir Chapitre 4^{ème} §II.2.2).

Quelques différences par comparaison avec le sarcomère des vertébrés sont à noter comme la présence de paramyosine dans les filaments épais (Waterston *et al.*, 1974) et la différence de taille des myofilaments: les filaments épais sont plus longs et plus larges au centre que ceux des vertébrés (10 µm de long et 33,4 nm de diamètre chez *C. elegans* et 1,6 µm de long et 14 nm de diamètre chez les vertébrés) tandis que les filaments fins sont plus longs (6 µm au lieu de 1µm) (Harris *et al.*, 1977).

III.4. La transmission de la force contractile

Chez *C. elegans*, l'ancrage des sarcomères au sarcolemme se fait au niveau de trois type d'attachements : les corps denses, les lignes M et les plaques d'attachement

localisées aux jonctions des cellules musculaires. La force contractile passe ensuite du muscle à l'hypoderme et de l'hypoderme à la cuticule par le biais des organites fibreux.

III.4.1. Les corps denses

Les corps denses sont les structures d'ancrage des filaments fins. Ils ont ainsi un rôle identique à celui des disques Z des vertébrés (voir Chapitre 1^{er} §III.5.1. ; Waterston *et al.*, 1980). Ils présentent une structure en forme de « doigt » qui se projette dans le cytoplasme des cellules musculaires à partir de la membrane plasmique (voir Chapitre 4^{ème} § II.2.3). Les corps denses sont aussi les homologues structuraux des costamères en ancrant la cellule musculaire dans la lame basale et en faisant le lien avec l'hypoderme (Figure 24 ; voir pour revue Lecroisey *et al.*, 2007).

Comme nous l'avons vu précédemment, la formation des corps denses repose sur l'agrégation de protéines autour de points focaux formés de UNC-52/perlecan, PAT-2/alpha-intégrine, PAT-3/beta-intégrine, PAT-4/ILK, UNC-112/Mig-2, UNC-97/PINCH, PAT-6/actopaxine et DEB-1/vinculine. Les autres éléments cytosoliques constitutifs des corps denses identifiés sont ATN-1/alpha-actinine (Francis et Waterston 1985; Barstead *et al.*, 1991), TLN-1/taline (Moulder *et al.*, 1996), UNC-98 (Mercer *et al.*, 2003), ALP-1/Enigma (McKeown *et al.*, 2006) et DYC-1 (Lecroisey *et al.*, 2008) (Figure 24). ZYX-1 une protéine localisée au corps dense a été étudiée dans le cadre de cette thèse et a fait l'objet d'une publication (Article N°1).

De plus, des protéines du corps dense ont été décrites comme étant impliquées dans la signalisation : UIG-1 (Hikata *et al.*, 2005) et RNF-5 (Broday *et al.*, 2004). Par ailleurs des protéines telles que TLN-1/taline, UNC-112/Mig-2 et ZYX-1 joueraient un rôle à la fois structural et de signalisation (Cram *et al.*, 2003 ; Hikita *et al.*, 2005 ; Lecroisey *et al.*, 2013).

Comme son orthologue structural chez les vertébrés (le couple [disque Z + costamère]), le corps dense n'assure pas uniquement un rôle mécanique d'ancrage des filaments fins d'actine et au sarcolemme, mais aussi un rôle important dans la transduction de signaux.

La recherche des gènes orthologues chez *C. elegans* codant les différentes protéines membres du DGC des vertébrés a permis l'identification génétique d'un DGC composé de DYS-1/dystrophine, DYB-1/dystrobrevine SGCA-1/sarcoglycane alpha, SGCB-1/sarcoglycane beta et de SGN-1/sarcoglycane delta/gamma, (Grisoni *et al.*, 2002). Par rapport au DGC vertébré, seuls la dystroglycane, la sarcospane et nNOS n'ont pas d'orthologue chez *C. elegans*.

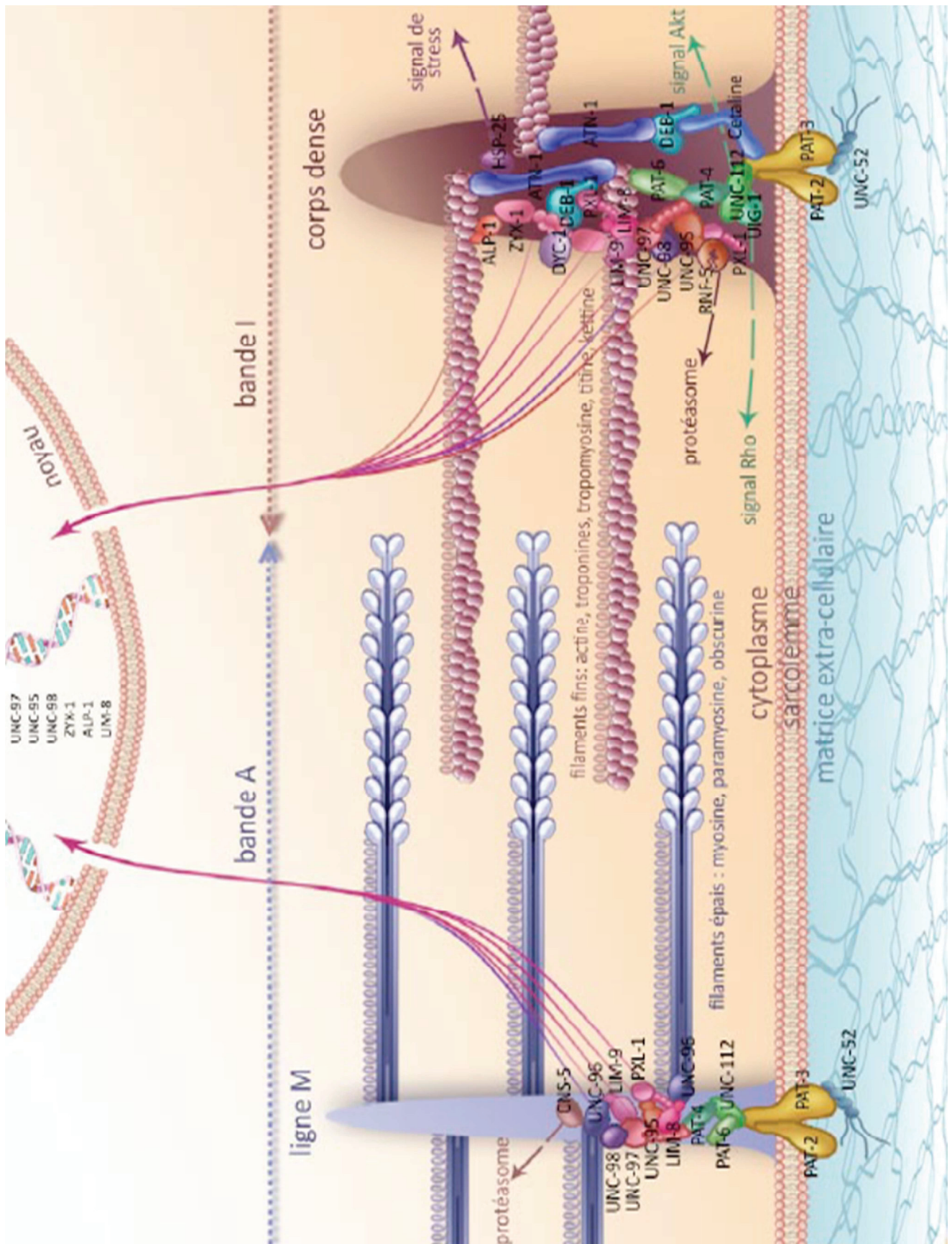


Figure 24 : Schéma représentant l'organisation du sarcomère des « body wall muscles » de *C. elegans* (Claire Lecroisey, 2011, Université Claude Bernard Lyon1).

DYS-1/dystrophine et DYB-1/dystrobrevine interagissent avec STN-1 suggérant un lien fonctionnel et physique entre ces trois protéines (Gieseler *et al.*, 1999 ; Grisoni *et al.*, 2002 ; Grisoni *et al.*, 2003). De plus, les protéines SGCA-1 et DYB-1 sont toutes les deux localisées dans l'environnement du corps dense (Kim *et al.*, 2009 ; Abraham *et al.*, 2010 ; résultats non publiés). Enfin l'interaction entre DYS-1/dystrophine et DEB-1/vinculine a été démontrée indiquant un lien entre le DGC et le corps dense (résultats non publiés).

C. elegans possède un DGC dont la composition moléculaire est plus simple que chez les vertébrés et qui participerait à la fonction du corps dense dans l'ancrage des sarcomères au sarcolemme.

III.4.2. Les lignes M

Les lignes M présentent une composition moléculaire semblable à celle des corps denses en raison de l'origine commune de ces deux structures (voir Chapitre 4^{ème} §II.2.3). Les différences avec les corps denses sont l'absence d'ATN-1/alpha-actinine et de DEB-1/vinculine et la présence de quelques protéines spécifiques (Francis & Waterston, 1985; Benian *et al.*, 1996 ; voir pour revue Qadota et Benian, 2010) (Figure 24).

UNC-98, UNC-96, LIM-8 et LIM-9/FHL, participent à l'ancrage des filaments de myosine en interagissant avec UNC-97/PINCH et CPNA-1 (Mercer *et al.*, 2003 ; Miller *et al.*, 2006 ; Qadota *et al.*, 2007 ; Warner *et al.*, 2013). UNC-15/paramyosine interagit avec UNC-96, UNC-98 et pour assurer leur maintien (Mercer *et al.*, 2006).

De plus, en interagissant avec UNC-97 qui fait partie du complexe PAT-2/PAT-3/PAT-4/PAT-6/UNC-112 à la base des lignes M, les protéines qui lient les filaments épais permettent la transmission de la force contractile vers le sarcolemme, la lame basale et l'hypoderme. Un tel ancrage des lignes M au sarcolemme et à la lame basale est toujours débattu chez les vertébrés.

En revanche, comme chez les vertébrés et comme les disques Z, les lignes M pourraient être impliquées dans des mécanismes de transduction du signal. En effet, LIM-9/FHL interagit physiquement avec SCPL-1, une protéine impliquée dans la régulation de la transcription chez les vertébrés (Xiong *et al.*, 2009, *J. Mol. Biol.*). Enfin, UNC-96 interagit avec CSN-5 une protéine impliquée dans la dégradation des protéines (Miller *et al.*, 2009).

A l'image des corps denses, les lignes M pourraient jouer cette double fonction d'ancrage mécanique des filaments de myosine et de signalisation intracellulaire.

III.4.3. Les plaques d'attachement

Les plaques d'attachement sont localisées à la jonction cellule-cellule entre les « *body wall muscles* » et sont restreintes aux frontières cellulaires non parallèles à l'axe des myofilaments. Ces plaques d'attachement prennent appui au niveau de la lame basale qui remonte légèrement entre les cellules (d'environ 0.5 μm) et qui présente une concentration forte en UNC-52/perlecan (Francis & Waterston, 1985, 1991). Au niveau de la membrane plasmique musculaire on retrouve PAT-2/intégrine alpha, PAT-3/intégrine beta, DEB-1/vinculine), UNC-112/Mig-2, PAT-4/ILK et PAT-6/actopaxine (Francis & Waterston, 1985; Rogalski *et al.*, 2000 ; Mackinnon *et al.*, 2002). Ces structures ressemblent fortement aux corps denses avec lesquels elles partagent la fonction d'ancrage des filaments fins d'actine. De par leur localisation, elles sont imaginées comme des demi corps denses, ancrant les filaments fins d'un seul sarcomère au sarcolemme.

III.4.4. Les organites fibreux

Pour que la force générée par la contraction musculaire génère le mouvement de l'animal, il est nécessaire que les structures d'ancrage des sarcomères des « *body wall muscles* » soient couplées mécaniquement à la cuticule. La continuité mécanique entre les cellules musculaires et la cuticule est assurée par des structures apparaissant très denses aux électrons, appelées organites fibreux et traversant la lame basale (20 nm d'épaisseur) et l'hypoderme (50 nm d'épaisseur) (Francis et Waterston, 1991). Les organites fibreux sont constitués de deux structures différentes:

- les plaques membranaires denses aux électrons, localisées à la fois sur la membrane hypodermale basale apposée à la lame basale et sur la membrane apicale apposée à la cuticule ;
- les faisceaux de filaments intermédiaires reliant les plaques membranaires se faisant face (Francis et Waterston, 1991).

Ces structures présentent des similarités avec les hémidesmosomes existant chez les mammifères (Hahn et Labouesse, 2001). La distribution des organites fibreux n'est pas aléatoire: elle est restreinte aux régions de l'hypoderme accolées aux muscles et aux neurones mécano-sensoriels (Francis et Waterston, 1991). De plus, leur répartition est corrélée à la présence de structures périodiques sur la cuticule: en effet la cuticule est constituée d'une succession d'anneaux séparés par des sillons (Coxet *al.*, 1981) et les organites fibreux sont exclusivement localisés au niveau de ces anneaux (Francis et Waterston, 1991).

IV. La locomotion de *C. elegans*

La locomotion sinusoïdale implique une coordination entre les muscles dorsaux et ventraux : la contraction des muscles dorsaux doit être en opposition de phase avec la contraction des muscles ventraux et inversement. Comme indiqué précédemment (Chapitre 4^{ème} §III.1.), *C. elegans* présente une particularité liée à la nature des motoneurones innervant les « *body wall muscles* ». Une partie de ces motoneurones est excitatrice et acétylcholine-dépendante, une autre partie est inhibitrice et GABA-dépendante.

Les motoneurones excitateurs forment des synapses dyadiques avec d'une part les bras musculaires des cellules musculaires striées d'un quadrant donné et d'autre part avec les motoneurones GABAergiques qui vont inhiber les cellules du quadrant contra-latéral. Ainsi, une fois activé, le motoneurone excitateur d'une cellule musculaire du quadrant ventral gauche par exemple, provoquera non seulement la contraction de cette cellule, mais également le relâchement de la cellule « opposée » dans le quadrant dorsal gauche. Ce relâchement repose sur la fixation du neurotransmetteur GABA sur son récepteur UNC-49 qui va entraîner l'entrée d'ions chlorure (Cl⁻) dans la cellule, rétablir la polarité membranaire, désactiver EGL-19 et interrompre l'augmentation de calcium cytosolique (Bamber *et al.*, 1999 ; Davis *et al.*, 2010).

La propagation progressive de la contraction des muscles d'un quadrant et de l'inhibition du quadrant contra-latéral provoque une force de propulsion du ver vers l'avant. Cette force de propulsion s'oppose aux forces de frottements du ver sur le milieu où il se déplace. L'épaisseur de la fine couche de liquide à la surface du milieu de déplacement du ver définit l'intensité de ces forces de frottement (Shen *et al.*, 2011). Plus ces forces de frottements (« *dragging forces* ») sont élevées plus les forces de courbure du ver (« *bending forces* ») devront être élevées pour qu'il puisse se déplacer.

V. Le modèle de la DMD chez *C. elegans*

Les connaissances du système neuro-musculaire de *C. elegans* et de son mode de locomotion ont mené plusieurs groupes à s'intéresser à des gènes orthologues aux gènes impliqués dans des maladies neuromusculaires humaines d'origine génétique (Parker *et al.*, 2007 ; Briese *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2010), voire à étudier la physiopathologie de modèles de myopathies (Rebolledo *et al.*, 2008 ; Mattout *et al.*, 2011 ; Giacomotto *et al.*, 2012) et de maladies neurodégénératives chez le nématode (Harrington *et al.*, 2011 ; Sleight *et al.*, 2011 ; McColl *et al.*, 2012).

Le modèle de myopathie de Duchenne chez *C. elegans* a été développé dans mon laboratoire de thèse. Sa description fait l'objet des paragraphes suivants.

V.1. Le gène *dys-1* et la protéine DYS-1

Le gène *dys-1* code la protéine orthologue à la dystrophine : la protéine DYS-1. Ce gène s'étend sur 31 kb du chromosome I, contient 46 exons (Bessou *et al.*, 1998) et coderait deux isoformes selon Wormbase d'après les ADNc analysés (DYS-1a : 3674 acides aminés ; DYS-1b : 264 acides aminés). Le gène *dys-1* est exprimé uniquement dans les muscles striés (« *body wall muscles* ») et dans les muscles lisses du pharynx et de la vulve. La localisation de la protéine DYS-1 dans les « *body wall muscles* » est décrite dans l'Article N°3.

L'analyse des domaines de DYS-1a (isoforme longue) montre une homologie structurale avec les longues isoformes de la dystrophine humaine (voir Chapitre 2^{ème} § II.3.). Les domaines structuraux reconnus dans la protéine DYS-1a sont :

- le domaine amino-terminal (acides aminés 1-234) qui possède un pourcentage d'identité de 25% avec le domaine amino-terminal de la dystrophine de vertébré responsable de l'interaction avec l'actine du cytosquelette ;
- le domaine central (acides aminés 235-3032) composé de domaines « spectrine-like » ;
- le domaine WW (acides aminés 3047-3081), impliqué dans les interactions protéiques ;
- le domaine riche en cystéines (acides aminés 3082-3353) est impliqué, chez les vertébrés, dans l'interaction avec une protéine du DGC (pour « *Dystrophin Glycoprotein Complex* », voir Chapitre 2^{ème} §III.1. et Chapitre 4^{ème} §III.4.1.) ;
- l'extrémité carboxy-terminal (acides aminés 3354-3674) est impliquée, chez les vertébrés, dans l'interaction avec d'autres protéines du DGC.

Le domaine riche en cystéines et l'extrémité carboxy-terminale ont un pourcentage d'identité de 37% avec les domaines correspondants de la dystrophine humaine. Aucun autre gène qui pourrait correspondre au gène codant l'utrophine ou DRP2 n'a été trouvé dans le génome de *C. elegans* (Grisoni *et al.*, 2002).

V.2. Le mutant *dys-1(cx18)*

L'allèle *cx18* présente une mutation ponctuelle à l'origine d'un codon stop prématuré dans l'ARNm au niveau de l'exon 33 (domaine central). Les vers *dys-1(cx18)* sont hyperactifs, hypercontractés (Bessou *et al.*, 1998). Ils montrent un phénotype de « *head bending* » se matérialisant par une courbure exagérée de la tête lors du déplacement sinusoïdal. Les mutants *dys-1(cx18)* présentent une dégénérescence musculaire caractérisée par la perturbation du réseau de filaments contractiles qui touche entre 0,1 et 0,2% des

« *body wall muscles* » (ce qui représente 2 à 4 cellules dans une population de 20 vers ; Figure 25). Par ailleurs, Zhou et Chen ont montré que les mutants *dys-1(cx18)* présentent un léger déplacement des neurones le long de la corde nerveuse ventrale et proposent une expression neuronale du gène ce qui est en désaccord avec nos résultats (Zhou et Chen, 2011).

Les phénotypes d'hyperactivité, d'hypercontraction et de « *head bending* » sont supprimés par l'expression d'un transgène contenant la séquence d'ADNc du gène DMD humain (Bessou *et al.*, 1998) indiquant la conservation au moins partielle des fonctions de DYS-1 et de la dystrophine humaine.

Dans les données supplémentaires de l'Article N°3, nous présentons des images du développement post-embryonnaire des « *body wall muscles* » dans le contexte *dys-1(cx18)* entre autres. Ces observations suggèrent un rôle de la protéine dans l'homogénéisation de la vitesse de croissance des corps denses.

V.3. Le double mutant *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)*

Chez le modèle de la DMD chez la souris (voir Chapitre 2^{ème} §VI.1.), le phénotype dégénératif est amplifié par la mutation du gène MyoD. Chez *C. elegans*, la mutation perte de fonction du gène *hlh-1* (voir Chapitre 4^{ème} § II.2.) provoque l'arrêt du développement du ver au stade embryonnaire. En revanche, il existe une mutation thermosensible du gène *hlh-1* correspondant à l'allèle *cc561* et produisant une protéine tronquée d'un tiers de sa chaîne peptidique en aval de son domaine « *Helix-Loop-Helix* ». A la température non-permissive de 23°C, les vers portants la mutation *hlh-1(cc561)* présentent de graves défauts de morphogénèse et sont incapables d'achever leur développement. A la température permissive de 15°C, ces vers suivent une morphogénèse et un développement post-embryonnaire du muscle normal mais ils présentent un niveau de dégénérescence comparable à celui observé chez les simples mutants *dys-1(cx18)* (Figure 25). Les résultats présentés dans le Chapitre 5^{ème} apportent de nouvelles données sur ces mutants *hlh-1(cc561)* qui seront discutées dans le Chapitre 6^{ème} : Discussion Générale et Perspectives.

Afin d'augmenter la fréquence de l'événement dégénératif en absence de DYS-1 chez *C. elegans*, notre équipe a généré un double mutant pour l'allèle *cx18* et l'allèle *cc561* thermosensible du gène *hlh-1/MyoD* (Gieseler *et al.*, 2000). Après culture à température permissive, le niveau de dégénérescence est augmenté d'un facteur 40 environ par rapport aux simples mutants *dys-1(cx18)* ou *hlh-1(cc561)* (Figure 25). Cette augmentation a permis à l'équipe d'étudier la dégénérescence musculaire sous divers aspects :

-l'étude morphologique du processus (Article N°3) ;

- l'identification de suppresseurs par le biais de cribles génétiques (Article N°1) ou pharmacologiques (Article N°2).

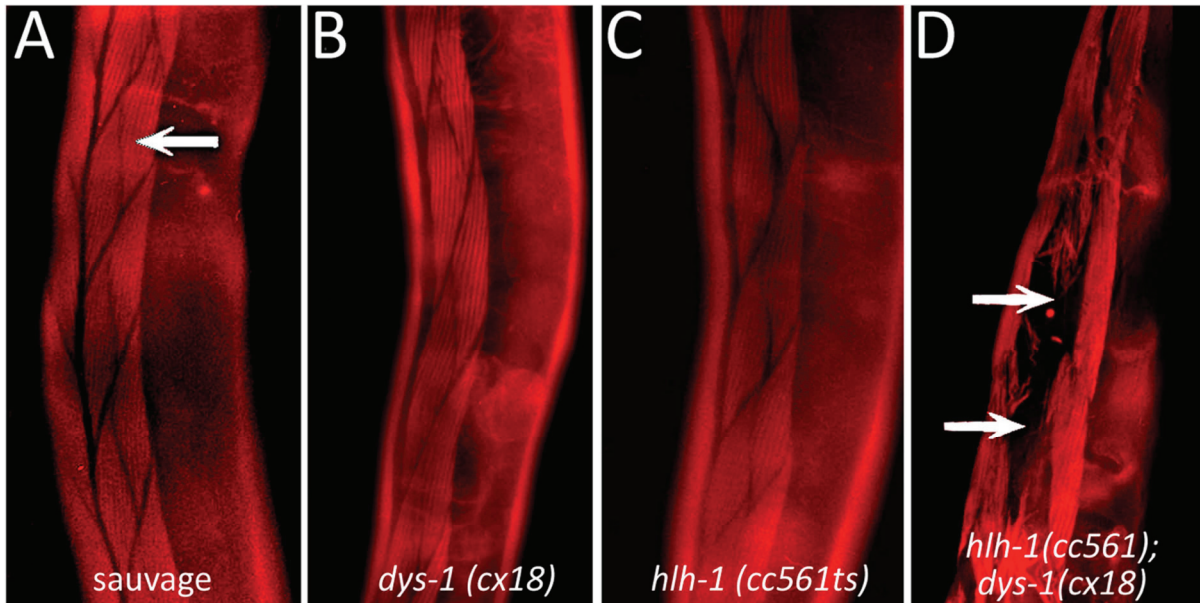


Figure 25 : Colorations à la rhodamine-phalloïdine de vers sauvages, *dys-1(cx18)*, *hlh-1(cc561)* et *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)*. Les simples mutants *dys-1(cx18)* et *hlh-1(cc561)* présentent un niveau faible de dégénérescence tel que, en moyenne, moins d'une cellule par quadrant dégénère (Gieseler *et al.*, 2000).

Cette souche double mutante *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* est le modèle de dégénérescence musculaire dystrophine-dépendante que nous étudions dans le chapitre suivant. Nous apporterons un intérêt particulier aux simples mutants *dys-1(cx18)* et *hlh-1(cc561)* utilisés comme contrôles mais également dans le but de mieux comprendre les fonctions de ces deux protéines DYS-1 et HLH-1 et le rôle synergique de leurs mutants dans le processus de la dégénérescence musculaire.

Chapitre 5^{ème} : Résultats

I. Article N°1

ZYX-1, the unique zyxin protein of *Caenorhabditis elegans*, is involved in dystrophin-dependent muscle degeneration

Claire Lecroisey*, Nicolas Brouilly*, Hiroshi Qadota, Marie Christine Mariol, Nicolas C. Rochette, Edwige Martin, Guy M. Benian, Laurent Ségalat, Nicole Mounier and Kathrin Gieseler

*les auteurs ont contribué équitablement

Publié dans *Molecular Biology of the Cell*, 2013 April 15 ; 24(8): 1232-1249

Cet article décrit la caractérisation du gène *zyx-1* chez le nématode *C. elegans*. Initialement, la protéine ZYX-1 a été identifiée par l'équipe de K. Bennett dans un crible double hybride pour son interaction avec les protéines GLH (pour «Germline RNA Helicases»). Cependant cette interaction est peu probable *in vivo* puisque le gène *zyx-1* n'est pas exprimé dans la lignée germinale (Smith *et al.*, 2002). L'inactivation génétique par mutation ou par RNAi n'a montré aucun phénotype musculaire évident mis à part un léger défaut de locomotion détecté lors d'un test de nage (Nahabedian *et al.*, 2012).

Au laboratoire, la protéine ZYX-1 a été identifiée dans un crible double-hybride en levure pour son interaction avec la protéine DYC-1. Le gène *dyc-1* lorsqu'il est muté mime le phénotype de mutants du gène *dys-1* codant la protéine DYS-1, l'orthologue de la dystrophine chez *C. elegans*. Par ailleurs, la surexpression de *dyc-1* dans le modèle de la DMD chez *C. elegans* réduit la dégénérescence musculaire (Gieseler *et al.*, 2000). Ceci suggère que les gènes *dys-1* et *dyc-1* sont fonctionnellement reliés. Cependant, d'autres expériences par double hybride en levure n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction directe entre les protéines DYS-1 et DYC-1. Nous nous sommes donc intéressés à ZYX-1 pour établir si cette protéine pourrait interagir directement ou indirectement avec DYS-1 et avoir un rôle dans la dégénérescence musculaire dystrophine-dépendante (Lecroisey *et al.*, 2008).

L'analyse bio-informatique de la séquence en acides aminés de ZYX-1 a mis en évidence la présence d'un NES (pour «Nuclear Export Signal»), de domaines riches en prolines (PRR pour «Prolin-Rich Repeats») et une succession de trois domaines LIM (pour «Lin-1, Isl1, Mec3»). Ces domaines LIM forment des tandems de doigts de zinc impliqués dans les interactions protéines-protéines.

Le consensus de séquence en acides aminés définissant les domaines LIM est très conservé au niveau des résidus formant les doigts de zinc. En revanche, entre ces résidus clés, les domaines LIM de ces protéines présentent une certaine divergence de séquence permettant une spécificité de chacune de ces protéines pour des interactions protéiques. Par la combinaison de ces domaines LIM avec d'autres domaines protéiques, les protéines à domaines LIM sont impliquées dans des processus très variés comme le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, la morphogénèse, l'oncogénèse. Dans le tissu musculaire, les protéines à domaines LIM sont essentielles à la myogénèse, l'organisation du cytosquelette, à la transduction du signal et à la méchanotransduction (Kong *et al.*, 1997 ; Stronach *et al.*, 1999 ; Barash *et al.*, 2005 ; Rafael *et al.*, 2012). Parmi les protéines à domaines LIM, nous avons montré dans cet article par des analyses phylogénétiques que, chez *C. elegans*, ZYX-1 est l'unique représentant de la famille Zyxin des vertébrés. Nos analyses ont également permis de modéliser l'évolution de la famille Zyxin depuis notre dernier ancêtre commun avec *C. elegans*.

Chez les vertébrés, cette famille de protéines à domaines LIM est composée de sept membres : ajuba, LIMD1 (pour « LIMDomain-containing protein 1 »), LPP (pour « Lipoma Preferred Partner »), migfilin, TRIP 6 (pour « Thyroid Receptor-Interacting Protein 6 »), WTIP (« Wilms Tumor Interacting Protein ») et la zyxine. Les membres de cette famille sont impliqués dans la transduction du signal entre les plaques d'adhésions focales et le noyau d'une part, et dans la détection de la tension mécanique au niveau de ces structures d'ancrage du cytosquelette d'autre part. La connaissance actuelle des fonctions individuelles de ces protéines est assez faible et la redondance de fonctions entre ces protéines semble être élevée (Hoffman *et al.*, 2003).

Dans le muscle strié, le rôle des protéines de la famille de la zyxine a été peu étudié. La zyxine interagit avec les membres de la famille CRP (pour « Cystein-Rich Proteins ») qui pourraient être impliqués dans la différenciation musculaire (Sadler *et al.*, 1992 ; Crawford *et al.*, 1994). Dans le muscle lisse, la zyxin module l'expression génique *via* sa fonction de méchano-transducteur entre la membrane plasmique et le noyau (Cattaruzza *et al.*, 2004). Une fois dans le noyau, la zyxine interagit avec des facteurs de transcription tels que ZNF384 et ZHX1 et module ainsi la transcription de gènes cibles (Yamada *et al.*, 2003 ; Janssen et Marynen, 2006). LPP et TRIP-6 sont exprimées dans le muscle lisse où elles interagissent avec la supervillin dans la formation d'invadopodes (Takizawa *et al.*, 2006 ; Crowley *et al.*, 2009). La particularité qu'a *C. elegans* à présenter un unique membre de cette famille est donc d'un grand intérêt dans la compréhension du rôle de cette famille de protéines dans le muscle strié sain et pathologique. Nous avons étudié la fonction de ZYX-1 dans le muscle normal et dans le muscle dystrophique du modèle de dégénérescence musculaire dystrophine-dépendante (voir Chapitre 3^{ème} §V.III).

Nous avons précisément localisé la protéine ZYX-1 dans le muscle strié aux structures d'ancrage des filaments contractiles et dans le noyau par microscopies optique et électronique. Ces approches ont montré que ZYX-1 est située dans la région centrale du corps dense, chevauchant partiellement la région basale riche en DEB-1/vinculine et la région apicale, riche en ATN-1/alpha-actinine. La dynamique de la protéine ZYX-1 a été analysée par la méthode de FRAP. Cette approche a permis de mettre en évidence la mobilité de la protéine 1. parmi les structures d'ancrage des filaments contractiles et 2. entre le cytosol et le noyau. Ces résultats suggèrent un rôle de signalisation intra-cellulaire de la protéine. Nous avons aussi démontré l'importance de la présence de l'alpha-actinine pour assurer la localisation correcte de ZYX-1 au niveau du corps dense et la dynamique de la protéine.

Nous avons ensuite montré le rôle de ZYX-1 dans la dégénérescence musculaire dystrophine-dépendante. Nous avons observé que, paradoxalement, aussi bien l'absence que la surexpression de cette protéine conduit à une réduction du niveau de dégénérescence musculaire. L'analyse bio-informatique du gène *zyx-1* a mis en évidence la production d'au moins deux isoformes : ZYX-1a et ZYX-1b. Par l'utilisation d'ARNi et de transgènes spécifiques de chacune des isoformes, nous avons pu étudier leurs rôles respectifs dans le processus de dégénérescence. Nous avons ainsi démontré que ZYX-1b a un rôle bénéfique en stabilisant le muscle, à l'inverse, ZYX-1a promeut le phénotype dystrophique.

Ce travail suggère un rôle de détecteur de signal pour la protéine ZYX-1, comme cela est proposé pour les protéines de la famille zyxine des vertébrés. Nos résultats indiquent que chez *C. elegans*, la protéine ZYX-1 pourrait stabiliser le sarcomère et détecter une anomalie de l'organisation des structures d'ancrage du sarcomère à la suite de l'absence de la protéine DYS-1 et contribuerait ainsi à la dystrophie. Ce résultat constitue une nouvelle piste de recherche prometteuse de cibles thérapeutiques à confirmer dans les modèles DMD mammifères.

ZYX-1, the unique zyxin protein of *Caenorhabditis elegans*, is involved in dystrophin-dependent muscle degeneration

Claire Lecroisey^{a,b,*}, Nicolas Brouilly^{a,b,*}, Hiroshi Qadota^c, Marie-Christine Mariol^{a,b}, Nicolas C. Rochette^{a,d}, Edwige Martin^{a,b}, Guy M. Benian^c, Laurent Ségalat^{a,b}, Nicole Mounier^{a,b}, and Kathrin Gieseler^{a,b}

^aUniversité Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne, France; ^bCentre de Génétique et de Physiologie Moléculaires et Cellulaires, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5534, 69622 Villeurbanne, France; ^cDepartment of Pathology, Emory University, Atlanta, GA 30322; ^dLaboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5558, 69622 Villeurbanne, France

ABSTRACT In vertebrates, zyxin is a LIM-domain protein belonging to a family composed of seven members. We show that the nematode *Caenorhabditis elegans* has a unique zyxin-like protein, ZYX-1, which is the orthologue of the vertebrate zyxin subfamily composed of zyxin, migfilin, TRIP6, and LPP. The ZYX-1 protein is expressed in the striated body-wall muscles and localizes at dense bodies/Z-discs and M-lines, as well as in the nucleus. In yeast two-hybrid assays ZYX-1 interacts with several known dense body and M-line proteins, including DEB-1 (vinculin) and ATN-1 (α -actinin). ZYX-1 is mainly localized in the middle region of the dense body/Z-disk, overlapping the apical and basal regions containing, respectively, ATN-1 and DEB-1. The localization and dynamics of ZYX-1 at dense bodies depend on the presence of ATN-1. Fluorescence recovery after photobleaching experiments revealed a high mobility of the ZYX-1 protein within muscle cells, in particular at dense bodies and M-lines, indicating a peripheral and dynamic association of ZYX-1 at these muscle adhesion structures. A portion of the ZYX-1 protein shuttles from the cytoplasm into the nucleus, suggesting a role for ZYX-1 in signal transduction. We provide evidence that the *zyx-1* gene encodes two different isoforms, ZYX-1a and ZYX-1b, which exhibit different roles in dystrophin-dependent muscle degeneration occurring in a *C. elegans* model of Duchenne muscular dystrophy.

Monitoring Editor

Richard Fehon
University of Chicago

Received: Sep 20, 2012

Revised: Jan 7, 2013

Accepted: Feb 12, 2013

INTRODUCTION

Zyxin is a LIM domain-containing protein and belongs to the zyxin family, which in vertebrates is composed of seven members: ajuba, LIM domain-containing protein 1 (LIMD1), lipoma preferred partner

(LPP), migfilin, thyroid receptor-interacting protein 6 (TRIP 6), Wilms tumor interacting protein (WTIP), and zyxin (Renfranz *et al.*, 2003; Kadrmas and Beckerle, 2004; Zheng and Zhao, 2007). These proteins share the same overall protein organization, characterized by N-terminal proline-rich regions (PRRs), three C-terminal LIM domains (Sadler *et al.*, 1992), and a nuclear export signal (NES; Beckerle, 1997; Nix and Beckerle, 1997). LIM (Lin-11, Isl-1, and Mec-3) domains are cysteine- and histidine-rich motifs that form tandem zinc finger structures implicated in protein interaction. LIM domain-containing proteins are found in all eukaryotic organisms from yeast to human and are implicated in different biological processes (Kadrmas and Beckerle, 2004; Zheng and Zhao, 2007).

In mice, the genetic inactivation of zyxin has no obvious consequences for viability, embryonic development, fertility, morphology, or behavior. A functional redundancy between zyxin family proteins has been hypothesized, suggesting that their simultaneous inactivation might be necessary to produce a mutant phenotype (Hoffman *et al.*, 2003).

This article was published online ahead of print in MBoC in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E12-09-0679>) on February 20, 2013.

*These authors contributed equally.

Address correspondence to: Kathrin Gieseler (kathrin.gieseler@univ-lyon1.fr).

Abbreviations used: DMD, Duchenne muscular dystrophy; FRAP, fluorescence recovery after photobleaching; GFP, green fluorescent protein; HA, hemagglutinin; LIM, Lin-11, Isl-1, and Mec-3; LIMD1, LIM domain-containing protein 1; LPP, lipoma preferred partner; NES, nuclear export signal; NLS, nuclear localization signal; PRR, proline-rich region; RNAi, RNA interference; SEM, standard error of the mean; TRIP δ , thyroid receptor-interacting protein δ ; WTIP, Wilms tumor interacting protein.

© 2013 Lecroisey *et al.* This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>).

"ASCB®," "The American Society for Cell Biology®," and "Molecular Biology of the Cell®" are registered trademarks of The American Society of Cell Biology.

Many studies have been conducted in different vertebrate cell lines to decipher the function of the zyxin protein. Zyxin is a cytoskeletal protein shown to be associated with cell adhesion complexes and to shuttle between these sites and the nucleus (Nix and Beckerle, 1997; Nix et al., 2001; Wang and Gilmore, 2003; Hervy et al., 2006). Zyxin regulates actin assembly and remodeling, cell mobility, and cell adhesion, as well as gene expression (Yamada et al., 2003; Hoffman et al., 2006, 2012; Janssen and Marynen, 2006; Martynova et al., 2008; Fraley et al., 2012). Zyxin was further shown to promote apoptosis (Hervy et al., 2010; Crone et al., 2011) and to be implicated in mechanotransduction and stretch-induced gene expression (Cattaruzza et al., 2004; Wójtowicz et al., 2010). In humans, skeletal muscle expresses zyxin, which interacts with several sarcomeric proteins (Morgan et al., 1995; Linnemann et al., 2010; Sun et al., 2010). However, the physiological role of zyxin in skeletal muscle has not been reported.

The fruit fly *Drosophila melanogaster* has two zyxin-like proteins, ZYX102 and CG11063, containing the characteristic motifs of vertebrate zyxins. The *zyx102* gene is expressed during oogenesis and embryogenesis, which involve major cytoskeletal reorganizations (Renfranz et al., 2003). In follicular cells of egg chambers subjected to disruption of actin bundles by laser nanosurgery, the ZYX102 protein rapidly relocalizes at anchor points, suggesting a mechanosensitive role, as in vertebrates (Colombelli et al., 2009). Both *Drosophila* zyxin-like proteins seem to be required during development, as the knockdown of the corresponding genes results in lethality during the pharate adult stage (Das Thakur et al., 2010; Renfranz et al., 2010) and are also reported to be components of the Hippo signaling pathway implicated in growth control (Das Thakur et al., 2010; Rauskolb et al., 2011).

The nematode *Caenorhabditis elegans* has a homologue of the zyxin protein named ZYX-1. This protein was first identified in a yeast two-hybrid screen for proteins that bind to germline RNA helicase (GLH) proteins (Smith et al., 2002). A functional interaction between GLHs and ZYX-1 seems, however, unlikely, since the *zyx-1* gene is not expressed in the germline. We previously showed that ZYX-1 interacts with the DYC-1 protein known to be functionally related to DYS-1, the *C. elegans* orthologue of dystrophin (Bessou et al., 1998; Gieseler et al., 2000; Lecroisey et al., 2008). In humans, mutations of the dystrophin gene cause Duchenne muscular dystrophy (DMD), the major X-linked muscular disorder (Koenig et al., 1987; Ahn and Kunkel, 1993). In *C. elegans*, loss-of-function mutations of the *dys-1* gene do not lead to obvious muscle degeneration unless placed in the sensitized genetic background of a mild mutation affecting the *hlh-1* gene (Gieseler et al., 2000). HLH-1 is the homologue of MyoD, a muscle-specific transcription factor (Chen et al., 1994). The *dys-1(cx-18); hlh-1(cc561)* double mutant exhibits a time-dependent muscle degeneration phenotype and is a powerful *C. elegans* model for dystrophin-dependent muscle degeneration, mimicking DMD (Gieseler et al., 2000).

The overall sarcomeric composition and organization, as well as the function of the muscle cells, was well conserved between nematodes and vertebrates during evolution. The actin-containing thin filaments are anchored at Z-discs, myosin-containing thick filaments are anchored at M-lines, and both M-lines and Z-discs are connected to the extracellular matrix. In vertebrates, this connection is provided by costameres, which are muscle-specific integrin adhesion complexes (Ervasti, 2003; Samarel, 2005). In *C. elegans*, the Z-disc analogues, named dense bodies, and the M-lines are directly anchored into the sarcolemma via integrin-containing complexes (Moerman and Williams, 2006; Lecroisey et al., 2007). Genetic inactivation of *zyx-1* either by mutation or RNA interference (RNAi) is not

lethal and does not lead to any obvious phenotype except for a locomotion defect detected in a body-bending assay (Smith et al., 2002; Lecroisey et al., 2008; Nahabedian et al., 2012).

By sequence and phylogenetic analysis, we found that, in contrast to vertebrates and other animal species, ZYX-1 is the unique representative of zyxin protein family in *C. elegans* and appears to be the orthologue of the vertebrate zyxin subfamily composed of zyxin, migfilin, TRIP6, and LPP. This prompted us to decipher the function of this protein, and we investigated in detail the localization, dynamics, and protein interactions of ZYX-1 within the striated body-wall muscles of *C. elegans*. Using a genetic analysis, we established that ZYX-1 plays a role in dystrophin-dependent muscle degeneration.

RESULTS

The *C. elegans* ZYX-1 is a zyxin-like protein

The *zyx-1* gene (also known as F42G4.3) is located on chromosome II and is predicted to produce different transcripts encoding putative proteins of 200–647 amino acids (WormBase, www.wormbase.org). All predicted ZYX-1 isoforms contain three C-terminal LIM domains. The first isoform that was predicted on WormBase, F42G4.3a (ZYX-1a), is composed of 603 amino acids (Figure 1), and the LIM domains extend, respectively, over amino acids 411–463, 471–522, and 531–592 (Figure 2A). The shortest predicted isoform, F42G4.3b (ZYX-1b), composed of 200 amino acid residues, is almost identical to the C-terminus of the ZYX-1a isoform and contains the three LIM domains. The five most N-terminal amino acids are encoded by an alternative exon (Figure 1).

The LIM-domain consensus sequence is defined as CX₂CX_{16–23}HX₂CX₂CX₂CX_{16–21}CX₂(C/H/D), where X is any amino acid (reviewed in Kadmas and Beckerle, 2004). This consensus perfectly matches all three LIM domains of the *C. elegans* ZYX-1 proteins (Figure 2B). The high sequence conservation of these regions in ZYX-1 suggests that they form LIM domains, each consisting of two adjacent zinc (or other metal) fingers, a structure that mediates protein–protein interactions.

The ZYX-1a isoform contains two other characteristic motifs of zyxin-like proteins in its N-terminal region: a potential NES and three PRRs, which are putative sites for protein–protein interactions (reviewed in Kay et al., 2000).

The putative NES sequence extends from amino acid 69 to 81 and is in agreement with the generally accepted NES consensus sequence (Nix and Beckerle, 1997). In particular, the ZYX-1 NES sequence matches the class1 NES consensus sequence, for which nuclear export activity has been demonstrated (Kosugi et al., 2008; Figure 2B). No nuclear localization signal (NLS) has been reported in zyxins, and none was found in the ZYX-1 sequence.

The PRRs in ZYX-1a consist of two sequences of, respectively, nine and six contiguous proline residues, located at amino acids 3–11 and 283–288, and a third region expanding from amino acids 36–46 with the sequence PAPAPPKPSRP (Figure 2A). It is noteworthy that none of these three PRRs contains the consensus sequence F/LPPPP characterized as ActA repeats that were identified in vertebrate zyxins to link EVH1 domains of the Ena/VASP family (Renfranz and Beckerle, 2002).

ZYX-1 is the unique zyxin-like protein in *C. elegans*

To investigate whether other members of the zyxin-like protein family exist in *C. elegans*, we used the seven human members of the zyxin family to search for similarities in the nematode proteome (as available from WormBase) with PsiBLAST. The best hit was ZYX-1

for Cdc42 (Hikita *et al.*, 2005), and DYX-1, as previously described (Lecroisey *et al.*, 2008). Among the tested M-line components, ZYX-1 interacted with the LIM-domain proteins LIM-8 and LIM-9 (FHL; Qadota *et al.*, 2007) and the CTD-type protein phosphatase domain-containing SCPL-1 (SCP) protein (Qadota *et al.*, 2008).

ZYX-1 did not interact with the C-terminal domain of DYS-1 (dystrophin), a scaffold protein of the subsarcolemmal cytoskeleton (Bessou *et al.*, 1998; and our unpublished results); DIM-1 (disorganized muscle), necessary for proper myofilament anchoring (Rogalski *et al.*, 2003); TLN-1 (talin); and members of a four-protein complex associated with the cytoplasmic tail of integrin: UNC-97 (PINCH), PAT-4 (ILK), PAT-6 (actopaxin or parvin), and UNC-112 (kindlin; Moulder *et al.*, 1996; Rogalski *et al.*, 2003; Norman *et al.*, 2007; Qadota *et al.*, 2012). ZYX-1 also did not interact with the LIM-domain proteins PXL-1 (paxillin) and UNC-95, which are both present at the bases of dense bodies and M-lines (Broday *et al.*, 2004; reviewed in Qadota and Benian, 2010; Warner *et al.*, 2011), HUM-6 (myosin VIIa; Baker and Titus, 1997), KIN-32 (focal adhesion kinase; Cram *et al.*, 2008), MLP-1 (muscle LIM-domain protein), and F42H10.3 (LASP; Shaye and Greenwald, 2011).

We further observed that the ZYX-1a bait protein was able to interact with the ZYX-1a prey protein, indicating a possible homodimerization of ZYX-1 molecules. This interaction requires the LIM domains because a ZYX-1 prey protein deleted for the three LIM domains was no longer able to interact with the ZYX-1 bait protein. Accordingly, a prey protein composed of only the LIM domains interacted with the full-length ZYX-1a bait protein (Table 1).

Localization and dynamics of ZYX-1 at dense bodies is ATN-1 (α -actinin) dependent

To analyze the functional relevance of the protein interactions detected in yeast two-hybrid assays, we further asked whether the localization of ZYX-1 at dense bodies or M-lines depends on the presence of its two-hybrid partners and vice versa. For this purpose, using appropriate antibodies, we analyzed the localization of ATN-1, ALP-1, DEB-1, DYX-1, UIG-1, LIM-8, LIM-9, and SCPL-1 proteins in the body-wall muscles of *zyx-1(gk190)* mutants. The *zyx-1(gk190)* mutation deletes the coding sequences of the first two LIM domains (Figure 1), leading to a frameshift, followed by a premature stop codon, thus preventing the translation of all the three LIM domains (www.celeganskoconsortium.omrf.org). No significant modification of the localization of any of the analyzed proteins was detected in *zyx-1(gk190)* mutants compared with wild type (Figure 7 and Supplemental Figure S1). Thus it appears that ZYX-1 is not required for the proper assembly and morphology of muscle cell adhesion complexes.

Conversely, the ZYX-1 antibody was used to detect the protein in the muscle cells of *atn-1(ok84)*, *alp-1(tm1137)*, *dyc-1(cx32)*, *uig-1(ok884)*, *lim-8(ok941)*, *lim-9(gk106)*, and *scpl-1(gk283)* mutants. Because *deb-1* mutants are embryonic lethal, we were unable to establish whether ZYX-1 requires DEB-1 for its localization. The localization of the ZYX-1 protein was diffuse or even absent in the body-wall muscles of the *atn-1(ok84)* mutant (Figure 7, K and L) but remained unchanged in all the other tested mutants when compared with wild-type muscles (data not shown). These observations suggest that ALP-1, UIG-1, DYX-1, LIM-8, and LIM-9, and SCPL-1 are not essential for the localization of ZYX-1 at dense bodies or M-lines, whereas ATN-1 is required for proper ZYX-1 localization at dense bodies.

FRAP experiments performed on *atn-1(ok84)* mutants expressing ZYX-1–GFP further revealed a significant modification of the ZYX-1–GFP dynamic when compared with wild-type (Figure 7, M and N). We observed that after the bleaching of a sarcomeric zone,

ZYX-1–GFP fluorescence recovery had the same half-time of fluorescence recovery in wild-type and the *atn-1(ok84)* mutant; however, the mobile fraction of ZYX-1–GFP was significantly decreased in the *atn-1(ok84)* mutant compared with wild type. This indicates that the interaction of ZYX-1 with ATN-1 creates a mobile pool of ZYX-1 and thus that ATN-1 is required for the turnover of ZYX-1 at dense bodies. Moreover, we observed that in the absence of ATN-1, the DEB-1 and ZYX-1–GFP proteins were still present at dense bodies, but their localizations were enlarged compared with wild type (Supplemental Figure S2). A similar broadening of the localization of ALP-1 was reported in *atn-1(ok84)* mutants (Han and Beckerle, 2009). The broader localization of ZYX-1–GFP and DEB-1 is consistent with shorter and broader dense bodies observed by electron microscopy in *atn-1(ok84)* mutants (Moulder *et al.*, 2010).

ZYX-1 participates in dystrophin-dependent muscle degeneration

We previously showed that transgenic overexpression of the ZYX-1 binding partner DYX-1 in the dystrophic *dys-1(cx18)*; *hllh-1(cc561)* double mutant significantly reduced muscle degeneration compared with nontransgenic *dys-1(cx18)*; *hllh-1(cc561)* worms (Gieseler *et al.*, 2000). We thus investigated whether ZYX-1 plays a similar role in dystrophin-dependent muscle degeneration. To this end, we quantified abnormal body-wall muscle cells stained with phalloidin–rhodamine in different genetic contexts and normalized to 100% the muscle degeneration observed in the dystrophic *dys-1(cx18)*; *hllh-1(cc561)* mutant (Figure 8).

The pKG106 transgene (Figure 1) was introduced in the dystrophic *dys-1(cx18)*; *hllh-1(cc561)* mutant background in order to overexpress the ZYX-1 protein. These transgenic worms exhibited ~35% less muscle degeneration compared with nontransgenic dystrophic *dys-1(cx18)*; *hllh-1(cc561)* worms. This observation suggests that the overexpression of *zyx-1* is beneficial to dystrophin-dependent muscle degeneration. We then genetically introduced the *zyx-1(gk190)* loss-of-function allele into the *hllh-1(cc561)* and the *dys-1(cx18)* mutant background. The *zyx-1(gk190)* *hllh-1(cc561)* or the *zyx-1(gk190)*; *dys-1(cx18)* double mutant did not present obvious muscle degeneration (Figure 8A). However, the introduction of the *zyx-1(gk190)* allele in the *dys-1(cx18)*; *hllh-1(cc561)* double mutant background led to a strong reduction of muscle degeneration. The *dys-1(cx18)*; *hllh-1(cc561)* *zyx-1(gk190)* triple mutant exhibited ~60% fewer degenerated muscle cells compared with the *dys-1(cx18)*; *hllh-1(cc561)* double mutant (Figure 8A; representative pictures of phalloidin–rhodamine–stained muscles of the *dys-1(cx18)*; *hllh-1(cc561)* double mutant and the *dys-1(cx18)*; *hllh-1(cc561)* *zyx-1(gk190)* triple mutant are shown in Supplemental Figure S3). Thus the overexpression of *zyx-1* and the loss of *zyx-1* function are both beneficial to dystrophin-dependent muscle degeneration in the dystrophic *dys-1(cx18)*; *hllh-1(cc561)* genetic background; the beneficial effect, however, is more important when *zyx-1* function is lost (Figure 8A). We confirmed this result using systemic RNAi-mediated inactivation of the *zyx-1* gene by targeting the 3' sequence of the mRNA in the *dys-1(cx18)*; *hllh-1(cc561)* double mutant. The muscle degeneration was significantly reduced by ~45% compared with untreated *dys-1(cx18)*; *hllh-1(cc561)* control animals (Figure 8B), indicating that ZYX-1 actively contributes to muscle degeneration in dystrophic *dys-1(cx18)*; *hllh-1(cc561)* worms.

The role of ZYX-1 in muscle degeneration depends on its muscular localization

Because ZYX-1 is present in both muscle cells and motor neurons, we further asked whether the observed effect on muscle degeneration

<i>C. elegans</i> protein	Vertebrate orthologue or related family	Dense body			M-line	Interaction with ZYX-1
		Top	Mid	Base		
ATN-1	α -Actinin	X	X			Yes
ALP-1	ALP/ Enigma	X	X			Yes
DEB-1	Vinculin			X		Yes
DYC-1	CAPON			X		Yes
UIG-1	Cdc42 GEF			X		Yes
DYS-1	Dystrophin			X		No
DIM-1	Immunoglobulin-domain family			*		No
TLN-1	Talin			X	X	No
UNC-97	Pinch			X	X	No
PAT-4	ILK			X	X	No
PAT-6	Actopaxin			X	X	No
UNC-112	Kindilin			X	X	No
PXL-1	Paxilin			X	X	No
UNC-95	LIM-domain family			X	X	No
LIM-8	LIM-domain family				X	Yes
LIM-9	FHL				X	Yes
SCPL-1	SCP				X	Yes
HUM-6	MYO7A			Unknown		No
KIN-32	FAK			Unknown		No
MLP-1	MLP			Unknown		No
F42H10.3	LASP			Unknown		No
	ZYX-1					Yes
	ZYX-1 LIM domains					Yes
	ZYX-1 Δ LIM domains					No
	pGAD-C1 (empty vector)					No

All results obtained by yeast two-hybrid assays using the ZYX-1 bait protein (isoform ZYX-1a) against a prey protein collection of known dense body and M-line proteins. The first column gives the tested *C. elegans* proteins, and the second column their vertebrate orthologues or related families. The third and fourth columns summarize the localization of the concerned proteins at dense bodies and M-lines, respectively. For dense body localization three subcolumns indicate the position of the respective protein within the dense body along the basoapical axis. Last four lines: the ZYX-1a bait protein was also tested against itself (ZYX-1), ZYX-1 LIM domains, and ZYX-1 without LIM domains (ZYX-1 Δ LIM domains). The empty vector (pGAD-C1) was used as the negative control. The last column recapitulates the interactions: Yes, interaction; No, no interaction. *DIM-1 localizes near the muscle cell membrane around and between the dense bodies.

TABLE 1: Dense body and M-line proteins tested for interaction with ZYX-1.

transgenes (Figure 9A). In contrast, in transgenic worms carrying the pKG82 transgene the ZYX-1a–HA protein could be detected only in body-wall muscle cells with a localization that seemed restricted to dense bodies (Figure 9B). Thus the long and short isoforms exhibit different expression patterns. Both are coexpressed in body-wall muscle, where they colocalize at dense bodies. Accordingly, we observed that the specific RNAi-mediated down-regulation of the ZYX-1a isoform in transgenic worms expressing both isoforms (pKG106 transgene) did not abolish the muscular ZYX-1–GFP signal, suggesting that this remaining signal corresponds to the short ZYX-1b–GFP isoform (Figure 8D, c).

To investigate the role of the two ZYX-1 isoforms and their contribution to muscle degeneration, we introduced each transgene into the *dys-1(cx18); hlh-1(cc561) zyx-1(gk190)* triple mutant. As expected, the overexpression of the long isoform (pKG82) increased the muscle degeneration phenotype compared with the triple mutant, reaching 60% of muscle degeneration with respect to the dys-

trophic *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutant (Figure 9C). The overexpression of the short isoform (pKG83), in contrast, reduced muscle degeneration to 10% compared with the dystrophic mutant. In the genetic context of the *dys-1(cx18); hlh-1(cc561) zyx-1(gk190)* triple mutant, the overexpression of the long ZYX-1a isoform thus seemed to abolish the beneficial effect of the *zyx-1(gk190)* mutation on muscle degeneration, whereas the short isoform instead enhanced the beneficial effect.

DISCUSSION

Phylogeny of the *C. elegans* ZYX-1 protein

We demonstrated that ZYX-1 is the unique representative of the zyxin-like protein family in *C. elegans*. Our phylogenetic analysis indicated that zyxin family proteins are distributed into two distinct subfamilies: the *ajuba* and the *zyxin* subfamilies. Because these two subfamilies exist in both deuterostomes (amphioxus, zebrafish, and human) and protostomes (fruit fly, oyster, and the

degeneration. This reveals a dual and paradoxical function of ZYX-1 in the dystrophic *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* genetic context. Previous examples were reported in which the same *C. elegans* muscle phenotypes can be obtained by loss or gain of function: *unc-96* (Mercer et al., 2006; Qadota et al., 2007), *unc-45* (Barral et al., 1998; Landsverk et al., 2007), and *mel-26* and *mei-1* (Wilson et al., 2012).

The *zyx-1* gene produces at least two isoforms, a long, ZYX-1a, and a short, ZYX-1b, isoform, which are differently involved in dystrophin-dependent muscle degeneration. We propose that their functional domains dictate their different roles in muscle degeneration. LIM domains in vertebrate zyxins were shown to be essential for targeting the protein to focal adhesions and stress fibers. PRRs, α -actinin and Ena/Vasp-binding sites located in the N-terminal region, can independently direct the protein to the nucleus, whereas the NES is required to export zyxin from the nucleus; however, at steady state, no zyxin is detected in cell nuclei (Nix et al., 2001; Hoffman et al., 2012).

We hypothesized that in *C. elegans* muscle cells, the LIM domains would have a mechanical function to stabilize dense bodies and M-lines via interactions with several components of these structures. The N-terminal region, present only in the long, ZYX-1a isoform, would have a signaling function, sensing cytoplasmic stress such as disorganized sarcomeres, and, once within the nucleus, would activate transcription of genes involved in repair of the damage and if necessary, induce a death signal. This hypothesis would explain why loss and gain of function of the *zyx-1* gene in dystrophic worms are both beneficial for muscles.

In the case of *zyx-1* loss of function, the absence of the ZYX-1a isoform would prevent the induction of a death signal. Of interest, dystrophic *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutants overexpressing either the full-length ZYX-1a protein or the N-terminal domain of the ZYX-1a isoform lacking the LIM-domains are not viable (our unpublished results), arguing for the presence of a sequence in the N-terminal region able to induce a death response. The overexpression of the N-terminal region of vertebrate zyxin was also shown to be lethal in cultured cells (Nix et al., 2001). A death signal or survival function of zyxin was reported in cells subjected to various stresses (Cerisano et al., 2004; Kato et al., 2005; Hervy et al., 2010). Although there is no evidence for a direct binding of LIM proteins to DNA (Li et al., 2012), vertebrate zyxin has been shown to interact with transcription factors such as ZNF384 and ZHX1 (Yamada et al., 2003; Janssen and Marynen, 2006). In *C. elegans*, the ZYX-1a protein might modify gene expression through an interaction with transcription factors involved in the stress-induced gene expression.

In the case of the overexpression of both ZYX-1 isoforms in the muscle of dystrophic worms, the large amounts of LIM domains would stabilize dense bodies and M-lines, thereby reducing the ZYX-1a death signal. LIM domains were described to act as negative regulators of zyxin-VASP complexes by intramolecular interactions between head and tail of the protein, preventing subsequent binding to other partners (Moody et al., 2009). Thus LIM domains of the very abundant short, ZYX-1b isoform could also interact with those of the long isoform, forming a heterodimer, and could exhibit a dominant-negative effect by inhibiting the signaling function of the ZYX-1a isoform. Accordingly, a dominant-negative role of the LIM domains has been suggested for zyxin function in cell-cell adhesion (Hansen and Beckerle, 2006).

Zyxin, cell survival, and muscle pathologies

Members of the zyxin family were suggested to act as sensors at cell adhesion sites and to serve as putative transcriptional coregulators

in different cell survival-signaling processes. In humans, several mutations affecting genes encoding LIM proteins, most notably the FHL-1 and ALP-1 proteins, cause muscular dystrophies (Gueneau et al., 2009; Ohsawa et al., 2011; reviewed in Schessel et al., 2011). However, none of the members of the zyxin family has been associated with a human myopathy. In *C. elegans*, the genetic inactivation of the *zyx-1* gene does not cause any obvious structural muscle phenotype, but the loss of the ZYX-1 protein is beneficial to dystrophin-dependent muscle degeneration, thus suggesting for the first time that this protein actively contributes to the muscle degenerative process. With regard to our results, it would be of great interest to analyze the potential contribution of zyxin-family proteins to dystrophin-dependent muscle degeneration in mammalian models for DMD to establish whether targeting of zyxin proteins would be effective strategies for treatment of DMD.

MATERIALS AND METHODS

C. elegans strains

C. elegans strains were cultured as described (Brenner, 1974) and grown at 15°C on OP50 bacteria. The N2 Bristol strain was used as the wild-type control. The PD4613 *hlh-1(cc561ts)* strain (Harfe et al., 1998) was obtained from B. D. Harfe (University of Florida, Gainesville, FL) and A. Fire (Stanford University School of Medicine, Stanford, CA). The LS292 *dys-1(cx18)* strain was described in Bessou et al. (1998), the LS587 *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* and the LS396 *dyc-1(cx32)* strains were described in Gieseler et al. (2000), the VC299 *zyx-1(gk190)*, RB1812 *atn-1(ok84)*, RB978 *uig-1(ok884)*, VC654 *lim-8(ok941)*, VC209 *lim-9(gk106)*, and VC612 *scpl-1(gk283)* strains were obtained from the *Caenorhabditis* Genetic Center (University of Minnesota, St. Paul, MN), and the *alp-1(tm1137)* allele was obtained from the Mitani laboratory at the Tokyo Women's Medical University School of Medicine (Tokyo, Japan). Classic genetics methods were used to construct double and triple mutants: LS898 *hlh-1(cc561) zyx-1(gk190)*, LS901 *dys-1(cx18); hlh-1(cc561); atn-1(ok84)*, LS925 *dys-1(cx18); zyx-1(gk190)*, and LS936 *dys-1(cx18); hlh-1(cc561) zyx-1(gk190)*. The reference transgenic strains presented in this study are LS770 *pKG001(zyx-1::gfp); pRF4*, LS918 *pKG001(zyx-1::gfp); pRF4; atn-1(ok84)*, LS1028 *cxls19(pKG001 zyx-1::gfp; pKP13)*, LS1128 *pKG82(zyx-1a::HA)*, *pCFJ(Punc-122::gfp)*, LS1130 *pKG83(zyx-1b::ha)*, *pCFJ(Punc-122::gfp)*, LS1056 *cxls19(pKG001 zyx-1::gfp; pKP13); dys-1(cx18); hlh-1(cc561ts)*, LS1150 *pKG106 (zyx-1::ha::gfp)*, *pCFJ(Punc-122::gfp)*, LS1176 *pKG106(zyx-1::ha::gfp)*, *pCFJ(Punc-122::gfp); dys-1(cx18); hlh-1(cc561)*, KAG124 *pKG83(zyx-1b::ha)*, *pCFJ(Punc-122::gfp); dys-1(cx18); hlh-1(cc561) zyx-1(gk190)*, and KAG126 *pKG82(zyx-1a::ha)*, *pCFJ(Punc-122::gfp); dys-1(cx18); hlh-1(cc561) zyx-1(gk190)*.

Sequence comparison and phylogenetic analyses

Human zyxin-family member sequences were retrieved from UniProt (www.uniprot.org). They were aligned using MUSCLE, version 3.7 (Edgar, 2004), and used as seed for a PsiBLAST (Altschul et al., 1997) search against the WormBase *C. elegans* protein database (www.wormbase.org, version WB234). The five proteins with the highest scores were retained and used as seeds for BLASTp (Altschul et al., 1997) searches against RefSeq (www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/ [accessed November 2012]; Pruitt et al., 2009) *H. sapiens* proteins.

This procedure was repeated to find zyxin-family proteins in the proteomes of *D. rerio* (RefSeq), *B. floridae* (UniProt), *A. suum* (WormBase, version 233), *D. melanogaster* (RefSeq), and *C. gigas* (http://gigadb.org/pacific_oyster/). *A. suum* protein GS_14729 was discarded, as it is likely a pseudogene of GS 19714, as suggested by

its increased substitution rate and by the absence of hits when using tBLASTn in the National Center for Biotechnology Information Expressed Sequence Tag database.

The multiple alignment of all zyxin sequences was computed using MUSCLE and refined using BMGE (Crisuolo and Gribaldo, 2010). Maximum-likelihood tree estimation and parametric bootstrap were performed using RAXML, version 7.2 (Stamatakis, 2006), under model PROTCATLG, with 100 bootstrap replicates.

zyx-1 constructs and transgenesis

The different *zyx-1* constructs are presented in Figure 1. The plasmid pKG001 was described in Lecroisey *et al.* (2008). Briefly, this plasmid contains a 16,928–base pair *PstI*–*NcoI* fragment of cosmid F42G3 encompassing the genomic sequence of the *zyx-1* gene cloned into the *PstI*–*MscI* sites of pPD95.75 plasmid (kindly provided by A. Fire) in frame with the *gfp*-encoding sequence. This fragment starts 4171 base pairs upstream of the predicted initiation codon of the *zyx-1a* isoform—containing promoter sequences and ends at the *NcoI* site within exon 9, thus lacking the coding sequences of the 50 most C-terminal amino acids of the ZYX-1 protein (including the 39 C-terminal amino acids of the third LIM domain).

The pKG82 construct was obtained in different steps. 1) The pPD118.20 plasmid (kindly provided by A. Fire) was digested with *AgeI* and *EcoRI* to removed the GFP-coding sequence. The resulting plasmid was named pKG74. 2) The *zyx-1a* cDNA was amplified by PCR on the yk247e1 *zyx-1a* cDNA clone (kindly provided by Y. Kohara, National Institute of Genetics, Mishima, Japan), using forward primer tta agg tac cct tgg gtc gtc ctc gct cct tc, which contains a *KpnI* site, and reverse primer tta agg tac ctt aag cgt aat ctg gaa cat cgt atg ggt acg tgg agc tga cca cgc ggag, containing an HA-coding sequence followed by a stop codon and a *KpnI* site. This fragment was inserted into the *KpnI* site of pKG74, resulting in plasmid pKG79. 3) A 11,471–base pair *SgrAI*–*XhoI* fragment from cosmid F42G4 containing 7618 base pairs of upstream regulatory and promoter sequences and 3853 base pairs encompassing the genomic *zyx-1a* sequence from 1 to exon 5 was inserted into the *XmaI* and *XhoI* sites of pBluescript, resulting in plasmid pKG80. 4) A 1523–base pair *XhoI*–*Apal* fragment from plasmid pKG79 was inserted into the *XhoI* and *Apal* sites of pKG80, resulting in plasmid pKG82 (Figure 1).

The pKG83 plasmid was obtained in two steps: 1) a 12,182–base pair *NheI*–*FspI* genomic fragment from cosmid F42G4 starting in intron 4 and ending 1762 base pairs after the *zyx-1* stop codon was inserted into the *XbaI*–*EcoRV* sites of pBluescript, resulting in plasmid pKG81; 2) a 659–base pair *NcoI*–*Apal* *zyx-1* cDNA (fused to the HA tag–coding sequence) fragment from plasmid pKG79 was inserted into the *NcoI* and *Apal* sites of pKG80, resulting in plasmid pKG83 (Figure 1).

The pKG106 plasmid was constructed as follows. 1) A 1076–base pair PCR fragment was amplified on pKG83 using the forward primer ctc act gga gaa gtg tacc and the reverse primer tta agc tag cag cgt aat ctg gaa cat cgt atg ggta containing HA tag–encoding sequence and an *NheI* site. An *NcoI* and *NheI* fragment of this PCR product replaced the *NcoI*–*NheI* fragment of pKG83. The aim of this step was to suppress the stop codon present in pKG83 after the HA tag. The resulting plasmid was named pKG98. 2) A 869–base pair GFP-coding fragment was amplified on plasmid pPD118.20 using forward primer tta agc tag cat gag taa agg aga aga ac and reverse primer tta agc tag cgc cat gtc taa tcc cagc (both primers containing an *NheI* site) and inserted into the *NheI* site of pKG98, resulting in plasmid pKG103. 3) The *NruI*–*Apal* fragment of pKG82 was replaced by the *NruI*–*Apal* fragment from pKG103 (corre-

sponding to the 3' genomic sequence including introns 6–8, as well as exons 6–10 with the HA tag and GFP fused in frame at the end of exon 10. The resulting plasmid was named pKG106 (Figure 1).

The constructs of interest were injected into gonads of young adult wild-type or *zyx-1(gk190)* mutant animals using standard procedures (Mello and Fire, 1995) at a concentration of 10 ng/μl, along with the marker pCFJ68 (*Punc-122::gfp*) plasmid (Addgene, Cambridge, MA; expressed in coelomocytes) at a concentration of 25 ng/μl; pKG001 was coinjected with the marker pKP13 (100 ng/μl) or pRF4 (150 ng/μl; Ségalat *et al.*, 1995; Mello and Fire, 1995). At least three independent stable transgenic lines were generated for each transgene. The pKG001 transgene was integrated into the genome by ultraviolet irradiation of L4 larvae at 0015 J/cm². Fluorescent animals of the F1 and F2 generation were individually grown, and animals homozygous for the integrated transgene were selected in the F3 generation. Classic genetic procedures were used to introduce the pKG001 and pKG106 transgenes into the *dys-1(cx18)*; *h1h-1(cc561)* or *atn-1(ok84)* mutant background or the pKG82, pKG83 transgenes into the *dys-1(cx18)*; *h1h-1(cc561)* *zyx-1* mutant background.

Immunostaining and fluorescence microscopy

Worms were fixed by the constant-spring method unless stated otherwise (Benian *et al.*, 1996). Transgenic *zyx-1::gfp* worms were observed either directly after fixation on a fluorescence Zeiss LSM510 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) or stained with a GFP rabbit antibody (1/200; Invitrogen, Carlsbad, CA). Anti-rabbit Alexa 488 (Invitrogen) secondary antibody was used at 1/1000 dilution. Transgenic *zyx-1::ha* worms were stained with a HA primary mouse antibody (1/100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and then secondary anti-mouse Alexa 548 (1/1000; Invitrogen).

A ZYX-1 monoclonal antibody was produced by BIOTEM (Apprieu, France) against the peptide CALCSKPIVPODGEKESVRV of the first part of the third LIM domain (Figure 1), amino acids 531–550 in exon 9 of the ZYX-1-a isoform (F42G4.3a), or amino acids 127–146 in exon 4 of the ZYX-1-b isoform (F42G4.3b). This antibody was used on wild-type worms at a dilution of 1/50. Secondary anti-mouse antibody, conjugated to streptavidin (1/250), and tertiary fluorescein-conjugated biotin (1/400; Vector Laboratories, Burlingame, CA) were used to reveal the ZYX-1 antibody staining.

For costaining of ZYX-1–GFP and ATN-1 or DEB-1, a GFP rabbit antibody (1/200; Invitrogen) was used, along with an ATN-1 antibody (MH35 1/200; kindly provided by Pamela Hoppe, Western Michigan University, Kalamazoo, MI) and a DEB-1 antibody (MH24, 1/200; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA; Francis and Waterston, 1985). A secondary anti-rabbit Alexa 488 (Invitrogen) was used to reveal the GFP rabbit antibody (1/1000). Secondary anti-mouse Alexa 548 (Invitrogen) was used to reveal the MH35 or MH24 (1/1000) staining. Worms were mounted on a glass slide with a coverslip together with 40-μm microbeads (Thermo Scientific, Fremont, CA) and antifading Prolong mounting medium (Invitrogen).

Acquisition of images was done on a Zeiss LSM510 confocal microscope using a 63x oil immersion objective with the LSM software. Image postprocessing was performed in ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD), with the Grays LUT in Figure 5, A–C and E–G, and Fire LUT in Figure 5, D and H.

For immunolocalization of ZYX-1 interactors, wild-type and *zyx-1(gk190)* worms were fixed by the Nonet method (Nonet *et al.*, 1993), and antibodies to the following proteins were used: ATN-1 (MH35, 1/200 dilution), ALP-1 (B74 at 1/100; Han and Beckerle, 2009), DEB-1 (MH24, dilution 1/200), DYC-1 (dilution 1/20;

Lecroisey et al., 2008), UIG-1 (dilution 1/100; kindly provided by Kozo Kaibuchi, Nagoya University, Nagoya, Japan), LIM-8 (dilution 1/100; Qadota et al., 2007), LIM-9 (dilution 1/100; Qadota et al., 2007), and SCPL-1 antibodies (Benian-17 at 1/100 dilution; Qadota et al., 2008). As markers of M-lines and dense bodies, we used a UNC-95 antibody (Benian-13 at 1/100; Qadota et al., 2007). Wild-type, *zyx-1(gk190)*, *atn-1(ok84)*, *alp-1(tm1137)*, *dyc-1(cx32)*, *uig-1(ok884)*, *lim-8(ok941)*, *lim-9(gk106)*, and *scpl-1(ok1080)* worms were fixed by the constant-spring method (Benian et al., 1996) to determine the effect of these mutations on ZYX-1 localization, as detected by a ZYX-1 antibody (at 1/100; this study). Secondary antibodies, purchased from Invitrogen, were anti-rabbit Alexa 488, anti-mouse Alexa 594, and anti-rat Alexa 594, each used at 1/200 dilution. Stained samples were mounted on a glass slide with a coverslip containing mounting solution (20 mM Tris, pH 8.0), 0.2 M 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, and 90% glycerol). Images were captured at room temperature with a Zeiss confocal system (LSM510) equipped with an Axiovert 100M microscope and an Aplanachromat 63x/1.4 oil objective in 2.5x zoom mode. The color balances of the images were adjusted by using Photoshop (Adobe, San Jose, CA)

Electron microscopy

Electron microscopy analysis was performed on *zyx-1::gfp* worms containing the pKG001 transgene fixed by high-pressure freezing as previously described (Liegeois et al., 2007). The next steps were processed as previously described (Lecroisey et al., 2008).

Fluorescence recovery after photobleaching experiments

FRAP was performed on transgenic wild-type or *atn-1(ok84)* worms carrying the *zyx-1::gfp* (pKG001) transgene immobilized by capillarity between slice and large coverslip with 20 μ l of M9 buffer under a Leica spectral confocal microscope (TCS SP5 AOBSDM6000; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Five images were taken before bleaching, and then the region of interest was bleached with the 488-nm laser at full power; subsequent scans were taken at 5% of full laser power. Sarcomeric zones were bleached 20 times and nuclei 8 times to reduce significantly the amount of fluorescence. For each bleaching experiment, 20 frames were acquired every 0.5 s, followed by 30 frames acquired every 2 s. Ten bleaching experiments were performed on sarcomeric zones of *zyx-1::gfp*-expressing wild-type or *atn-1(ok84)* worms and four on muscle nuclei of wild-type *zyx-1::gfp*-expressing worms. One relevant experience performed on *zyx-1::gfp*-expressing wild-type worms was presented for sarcomeric zones and nucleus bleaching experiments in Figure 6. The five most representative data sets of sarcomeric zone bleaching experiments on *zyx-1::gfp*-expressing wild-type worms and *atn-1(ok84)* mutants are presented in Figure 7. Fluorescence intensity was measured using ImageJ software and analyzed using Igor (WaveMetrics, Portland, OR) software. Relative fluorescence intensity (RFI) was calculated as described in Ghosh and Hope (2010). On the y-axis, 1.0 represents the RFI of the bleached zone before bleaching steps. Time origin corresponds to the first acquisition after bleaching steps, and RFI was normalized to be zero at $t = 0$. Half-time recoveries and mobile fractions were calculated from the fitted curves as described (Ghosh and Hope, 2010). Statistical analyses were based on a Mann-Whitney test carried out using Excel Stat software (Microsoft, Redmond, WA). The p values for the tested data sets are presented below Figure 7N in brackets.

Yeast two-hybrid assay and screening

The yk247e1 *zyx-1a* cDNA was amplified using T3 and T7 primers, blunted by using the T4 DNA polymerase (New England Biolabs,

Ipswich, MA), digested by *SacI*, and cloned into the *SacI/SmaI* sites of pBluescript (SK+), resulting in the plasmid named pBSC-*zyx-1cDNA*. The ZYX-1a bait plasmid (encoding amino acids 68–603 of ZYX-1) was obtained by cloning an *AgeI-SalI* *zyx-1* cDNA fragment from pBSC-*zyx-1cDNA* into the *NcoI-SalI* sites of the pAS2-1 bait plasmid (Clontech, Palo Alto, CA), resulting in plasmid pAS2-1-*zyx-1*. The construction of prey plasmids encoding the C-terminal domain of DYS-1, the DYC-1 protein (pSEB), and ZYX-1a (pSNXX, amino acids 68–603) was described in Lecroisey et al. (2008). The ZYX-1a prey plasmid deleted for the three LIM domains (encoding amino acids 68–265 of ZYX-1a) was obtained by cloning an *NdeI-XhoI* *zyx-1* cDNA fragment from the pAS2-1-*zyx-1* plasmid into the *SmaI-XhoI* sites of the pACT2 prey plasmid (Clontech), resulting in plasmid pACT2-*zyx-1SNX*. The ZYX-1 prey plasmid encoding only the three LIM domains (amino acids 265–603 of ZYX-1a) was obtained by cloning an *XhoI-XhoI* *zyx-1* cDNA fragment from the pAS2-1-*zyx-1* plasmid into the *XhoI* site of the pAct2 prey plasmid (Clontech), resulting in plasmid pACT2-*zyx-1XX*. Transformations of yeasts were performed as described (Lecroisey et al., 2008). The collection of M-line and dense body prey proteins was described in Qadota et al. (2007, 2008) and Xiong et al. (2009). All two-hybrid assays were conducted using methods described in Mackinnon et al. (2002).

RNA interference

The pBSC-*zyx-1cDNA* plasmid was digested with *EcoRI*. The 5' cDNA *EcoRI* fragment containing 42 base pairs of the 5' UTR and ZYX-1a coding sequence (amino acids 1–303) and the 3' cDNA *EcoRI* fragment containing ZYX-1 coding sequences (amino acids 509–603 of ZYX-1a) and 257 base pairs of the 3' UTR were cloned into the *EcoRI* site of the RNAi feeding vector L4440. The 5' and 3' sequence-targeting constructs, named pKG116 and pKG117, respectively, were transformed into HT115 *Escherichia coli*. RNAi was performed by feeding wild-type worms or *dys-1(cx18)*; *h1h-1(cc561ts)* mutants with double-strand RNA-producing *E. coli* (Timmons et al., 2001). Negative and positive control experiments were performed, respectively, with the empty L4440 vector and a *pos-1* transcript-targeting RNAi clone (Ahringer library; Kamath et al., 2003).

Quantification of muscle degeneration

Animals were fixed and stained 3 d after they reached the L4 stage. Fixation and phalloidin-rhodamine staining (FluoProbes; Interchim, San Pedro, CA) were performed as described (Waterston et al., 1984). Stained body-wall muscles were observed using a Zeiss Axioskop microscope. Only the two most visible quadrants of body-wall muscles in each animal were quantified (47 or 48 cells per animal), and 20 animals were scored for each genotype. The *dys-1(cx18)*; *h1h-1(cc561ts)* dystrophic mutant present six to nine degenerated muscle cells, corresponding to 12–18% of total muscle cells (Gieseler et al., 2000). We normalized the number of degenerated muscle cells in this double mutant to 100% to compare to other genetic backgrounds. Statistical analyses were carried out between the strain of interest compared with the relative *dys-1*; *h1h-1* strain (unless stated otherwise using brackets) and based on a Mann-Whitney test carried out using Excel Stat software. Significant differences between tested strains are indicated by asterisks (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Reverse transcription-PCR and RT-qPCR analysis

Total RNA was extracted from worms fed with OP50 or HT115 *E. coli*. Four-day-old worms were harvested in M9 and washed twice in

M9 and once in RNase-free distilled water. Two volumes of TRIzol (Invitrogen) were added to one volume of pelleted worms and frozen at -80°C overnight. While unfreezing, samples were vortexed for 10 min, 0.2 volume of chloroform was added, and they were again vortexed for 1 min. After 3 min, samples were centrifuged. Total RNA was extracted with the RNeasy Mini Binding Kit (Qiagen, Valencia, CA). RNA from each extraction was DNase treated (Invitrogen) and reverse transcribed using iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) following provider's instructions. PCR were carried out on 1 μl of cDNA with the following primers: gta atc aga cag gtg ctc tgag and gta att tgc tgc cga cga gtcc for amplification of *zyx-1a* cDNA (Figure 8C); ctt ggg tgc tgc tgc ctc ctc and tct tac gca gac gtg ctgc for amplification of *zyx-1a* cDNA (Figure 8C); and aac tat ggc gga tca agaag and ttt gca gga gaa gca cac gaag for amplification of *zyx-1b* cDNA. PCR was stopped after 25 cycles (a 5- μl sample was removed and frozen) and run again up to 35 cycles. All 25th- and 35th-cycle PCR products were loaded on a 1.5% agarose gel. Acquisitions were processed with Image Lab Bio-Rad Software.

For RT-qPCRs total RNA from wild-type worms were extracted using the TRIzol/chloroform (Merck, Darmstadt, Germany) method. The RNeasy Mini Binding Kit was used to clean up the extracts, and 3 μg were treated with DNase (DNase I, Amp Grade; Invitrogen). A 10-ng amount of total RNA from three independent extractions was reverse transcribed using iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) and amplified in a CFX96 Realtime System C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) using the iQ SYBR Green SuperMix (Bio-Rad) and 1) the *zyx-1a*-specific forward primer act ccc atc cgg aga gat act and reverse primer cgt gct gta gtg ccg aag or 2) the *zyx-1b*-specific forward primer gag aga aac cac gcc ttc ta and reverse primer atc ttc ttg atc cgc cat agtt. The *act-1* gene was used as housekeeping gene, using forward primer cca gga att gct gat cgt atg cag aa and reverse primer tgg aga ggg aag cga gga taga.

Western blot analysis

To detect ZYX-1-GFP fusion proteins from transgenic worms, extracts were obtained from cultured worms harvested in M9, pelleted, frozen at -80°C , and boiled in Laemmli buffer. Electrophoresis migration was carried out in a Bio-Rad MiniProtean system using 4–10% gradient gels. After transferral of the proteins on a Protan 0.45- μm polyacrylamide membrane (Whatman, Piscataway, NJ) in an electrophoretic wet chamber (Bio-Rad Mini Trans-Blot), Ponceau's red staining (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was carried out, and the membrane was scanned. Then the membrane was treated as follows: TBS (Tris 20 mM, NaCl 0.14 mM, pH 7.6) with 5% fat reduced milk powder (Régilait, Saint Martin Belle Roche, France) for 1 h, three washes in TBS 1 \times and GFP mouse antibody (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1/1000 in TBS with 1% fat reduced milk powder, three washes in TBST 1 \times and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) diluted 1/2000 in TBS with 1% fat reduced milk powder, and one wash in TBST 1 \times . ECL Plus Kit (Pierce, Rockford, IL) was used to reveal the signal. Acquisitions were processed with Image Lab Bio-Rad Software under a Bio-Rad Chemidoc.

To detect endogenous ZYX-1 proteins, we prepared extracts (Hannak *et al.*, 2002) from wild-type and *zyx-1(gk190)* mutant worms. We loaded approximately equal amounts of protein extract, estimated by finding volumes of extracts that would give equal intensity of banding after Coomassie staining. After separation on a 10% SDS-PAGE and transfer to nitrocellulose, the blot was reacted with the monoclonal ZYX-1 antibody at 1/100 dilution and HRP-

conjugated anti-mouse antibody (GE Healthcare, Piscataway, NJ), and the signal was detected by ECL (Pierce).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Yuji Kohara for the gift of the *zyx-1* cDNA clone, B. D. Harfe and A. Fire for the *hlh-1(cc561ts)* strain, A. Fire for GFP-encoding plasmids, Pamela Hoppe for the gift of the MH35 antibody, Manolo Gouy for helpful discussions about phylogenetic analyses, and Samuel Leroy for help with FRAP data analysis. The MH24 antibody developed by R. H. Waterston was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development and maintained by the Department of Biological Sciences, University of Iowa, Iowa City, IA). Some nematode strains used in this work were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by the National Institutes of Health National Center for Research Resources. The *alp-1(tm1137)* mutant strain was provided by the Mitani laboratory at the Tokyo Women's Medical University School of Medicine (Tokyo, Japan). Electron microscopy was performed at the Centre d'Imagerie de the Institut Génétique Biologie Moléculaire Cellulaire (Illkirch, France) with the gracious help of Yannick Schwab. FRAP experiments were performed at the PLATIM IFR128 microscope platform at the Ecole Normale Supérieure Lyon (Lyon, France) with the gracious help of Christophe Chamot. Confocal microscopy was performed at the Center Technologique des Microstructures, Université Claude Bernard Lyon 1 (Villeurbanne, France).

This project was supported by Agence National de la Recherche Grant DUCHENNE ELEGANS 07 MRAR 005 01 and the European Muscle Development Network (MYORES). C.L. and N.B. were funded by Ph.D. fellowships from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and C.L. by the Fondation pour la Recherche Médicale en France. H.Q. and G.M.B. were supported at first by National Institutes of Health Grant R01AR052133 and later by American Heart Association Grant 11GRNT7820000.

REFERENCES

- Ahn AH, Kunkel LM (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* 3, 283–291.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389–3402.
- Baker JP, Titus MA (1997). A family of unconventional myosins from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 272, 523–535.
- Barral JM, Bauer CC, Ortiz I, Epstein HF (1998). Unc-45 mutations in *Caenorhabditis elegans* implicate a CRO1/She4p-like domain in myosin assembly. *J Cell Biol* 143, 1215.
- Barstead RJ, Waterston RH (1989). The basal component of the nematode dense-body is vinculin. *J Biol Chem* 264, 10177–10185.
- Barstead RJ, Waterston RH (1991). Vinculin is essential for muscle function in the nematode. *J Cell Biol* 114, 715.
- Beckerle MC (1997). Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion. *Bioessays* 19, 949–957.
- Benian GM, Tinley TL, Tang X, Borodovsky M (1996). The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-89*, required for muscle M-line assembly, encodes a giant modular protein composed of Ig and signal transduction domains. *J Cell Biol* 132, 835.
- Bessou C, Giuglia J-B, Franks CJ, Holden-Dye L, Ségalat L (1998). Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission. *Neurogenetics* 2, 61–72.
- Brenner S (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71.
- Brodav L, Kolotuev I, Didier C, Bhoumik A, Podbilewicz B, Ronai Z (2004). The LIM domain protein UNC-95 is required for the assembly of muscle

- attachment structures and is regulated by the RING finger protein RNF-5 in *C. elegans*. *J Cell Biol* 165, 857–867.
- Cattaruzza M, Latratch C, Hecker M (2004). Focal adhesion protein zyxin is a mechanosensitive modulator of gene expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 43, 726–730.
- Cerisano V et al. (2004). Molecular mechanisms of CD99-induced caspase-independent cell death and cell–cell adhesion in Ewing's sarcoma cells: actin and zyxin as key intracellular mediators. *Oncogene* 23, 5664–5674.
- Chen L, Krause M, Sepanski M, Fire A (1994). The *Caenorhabditis elegans* MYOD homologue HLH-1 is essential for proper muscle function and complete morphogenesis. *Development* 120, 1631–1641.
- Colombelli J, Besser A, Kress H, Reynaud EG, Girard P, Caussinus E, Haselmann U, Small JV, Schwarz US, Stelzer EHK (2009). Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *J Cell Sci* 122, 1665–1679.
- Conant GC, Wolfe KH (2008). Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nat Rev Genet* 9, 938–950.
- Cram EJ, Fontanez KM, Schwarzbauer JE (2008). Functional characterization of KIN-32, the *Caenorhabditis elegans* homolog of focal adhesion kinase. *Dev Dyn* 237, 837–846.
- Crawford AW, Beckerle MC (1991). Purification and characterization of zyxin, an 82,000-dalton component of adherens junctions. *J Biol Chem* 266, 5847–5853.
- Crisuolo A, Gribaldo S (2010). BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol Biol* 10, 210.
- Crone J, Glas C, Schultheiss K, Moehlenbrink J, Kriehoff-Henning E, Hofmann TG (2011). Zyxin is a critical regulator of the apoptotic HIPK2-p53 signaling axis. *Cancer Res* 71, 2350–2359.
- Das Thakur M, Feng Y, Jagannathan R, Seppa MJ, Skeath JB, Longmore GD (2010). Ajuba LIM proteins are negative regulators of the Hippo signaling pathway. *Curr Biol* 20, 657–662.
- Dehal P, Boore JL (2005). Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol* 3, e314.
- Edgar RC (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113.
- Ervasti JM (2003). Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J Biol Chem* 278, 13591–13594.
- Etheridge T, Oczypok EA, Lehmann S, Fields BD, Shephard F, Jacobson LA, Szewczyk NJ (2012). Calpains mediate integrin attachment complex maintenance of adult muscle in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 8, e1002471.
- Fraleley SI, Feng Y, Giri A, Longmore GD, Wirtz D (2012). Dimensional and temporal controls of three-dimensional cell migration by zyxin and binding partners. *Nat Commun* 3, 719.
- Francis GR, Waterston RH (1985). Muscle organization in *Caenorhabditis elegans*: localization of proteins implicated in thin filament attachment and I-band organization. *J Cell Biol* 101, 1532.
- Francis R, Waterston RH (1991). Muscle cell attachment in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 114, 465.
- Ghosh SR, Hope IA (2010). Determination of the mobility of novel and established *Caenorhabditis elegans* sarcomeric proteins in vivo. *Eur J Cell Biol* 89, 437–448.
- Gieseler K, Grisoni K, Ségalat L (2000). Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 10, 1092–1097.
- Gueneau L et al. (2009). Mutations of the FHL1 gene cause Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 85, 338–353.
- Han H-F, Beckerle MC (2009). The ALP-enigma protein ALP-1 functions in actin filament organization to promote muscle structural integrity in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 20, 2361–2370.
- Hannak E, Oegema K, Kirkham M, Gönczy P, Habermann B, Hyman AA (2002). The kinetically dominant assembly pathway for centrosomal asters in *Caenorhabditis elegans* is gamma-tubulin dependent. *J Cell Biol* 157, 591–602.
- Hansen MDH, Beckerle MC (2006). Opposing roles of zyxin/LPP ACTA repeats and the LIM domain region in cell–cell adhesion. *J Biol Chem* 281, 16178–16188.
- Harfe BD, Branda CS, Krause M, Stern MJ, Fire A (1998). MyoD and the specification of muscle and non-muscle fates during postembryonic development of the *C. elegans* mesoderm. *Development* 125, 2479–2488.
- Hervy M, Hoffman L, Beckerle MC (2006). From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins. *Curr Opin Cell Biol* 18, 524–532.
- Hervy M, Hoffman LM, Jensen CC, Smith M, Beckerle MC (2010). The LIM protein zyxin binds CARP-1 and promotes apoptosis. *Genes Cancer* 1, 506–515.
- Hikita T, Qadota H, Tsuboi D, Taya S, Moerman DG, Kaibuchi K (2005). Identification of a novel Cdc42 GEF that is localized to the PAT-3-mediated adhesive structure. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 139–145.
- Hirata H, Tatsumi H, Sokabe M (2008). Zyxin emerges as a key player in the mechanotransduction at cell adhesive structures. *Commun Integr Biol* 1, 192–195.
- Hoffman LM, Jensen CC, Chaturvedi A, Yoshigi M, Beckerle MC (2012). Stretch-induced actin remodeling requires targeting of zyxin to stress fibers and recruitment of actin regulators. *Mol Biol Cell* 23, 1846–1859.
- Hoffman LM, Jensen CC, Kloeker S, Wang A, Yoshigi M, Beckerle MC (2006). Genetic ablation of zyxin causes Mena/VASP mislocalization, increased motility, and deficits in actin remodeling. *J Cell Biol* 172, 771–782.
- Hoffman LM et al. (2003). Targeted disruption of the murine zyxin gene. *Mol Cell Biol* 23, 70–79.
- Janssen H, Marynen P (2006). Interaction partners for human ZNF384/CIZ/NMP4—zyxin as a mediator for p130CAS signaling. *Exp Cell Res* 312, 1194–1204.
- Kadmas JL, Beckerle MC (2004). The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 920–931.
- Kamath RS et al. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421, 231–237.
- Kassahn KS, Dang VT, Wilkins SJ, Perkins AC, Ragan MA (2009). Evolution of gene function and regulatory control after whole-genome duplication: comparative analyses in vertebrates. *Genome Res* 19, 1404–1418.
- Kato T, Muraski J, Chen Y, Tsujita Y, Wall J, Glembotski CC, Schaefer E, Beckerle M, Sussman MA (2005). Atrial natriuretic peptide promotes cardiomyocyte survival by cGMP-dependent nuclear accumulation of zyxin and Akt. *J Clin Invest* 115, 2716–2730.
- Kay BK, Williamson MP, Sudol M (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* 14, 231–241.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50, 509–517.
- Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H (2008). Nuclear export signal consensus sequences defined using a localization-based yeast selection system. *Traffic* 9, 2053–2062.
- Landsverk ML, Li S, Hutagalung AH, Najafov A, Hoppe T, Barral JM, Epstein HF (2007). The UNC-45 chaperone mediates sarcomere assembly through myosin degradation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 177, 205–210.
- Lecroisey C, Martin E, Mariol M-C, Granger L, Schwab Y, Labouesse M, Ségalat L, Gieseler K (2008). DYX-1, a protein functionally linked to dystrophin in *Caenorhabditis elegans* is associated with the dense body, where it interacts with the muscle LIM domain protein ZYX-1. *Mol Biol Cell* 19, 785–796.
- Lecroisey C, Ségalat L, Gieseler K (2007). The *C. elegans* dense body: anchoring and signaling structure of the muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 28, 79–87.
- Li A, Dos Ponten F, Remedios CG (2012). The interactome of LIM domain proteins: the contributions of LIM domain proteins to heart failure and heart development. *Proteomics* 12, 203–225.
- Liegeois S, Benedetto A, Michaux G, Belliard G, Labouesse M (2007). Genes required for osmoregulation and apical secretion in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 175, 709–724.
- Linnemann A, Van der Ven PFM, Vakeel P, Albinus B, Simonis D, Bendas G, Schenk JA, Micheel B, Kley RA, Fürst DO (2010). The sarcomeric Z-disc component myopodin is a multidapter protein that interacts with filamentin and α -actinin. *Eur J Cell Biol* 89, 681–692.
- Mackinnon AC, Qadota H, Norman KR, Moerman DG, Williams BD (2002). *C. elegans* PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr Biol* 12, 787–797.
- Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, Sugimoto A (2001). Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* 11, 171–176.
- Makino T, McLysaght A (2010). Ohnologs in the human genome are dosage balanced and frequently associated with disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 9270–9274.
- Martynova NY, Eroshkin FM, Ermolina LV, Ermakova GV, Korotaeva AL, Smurova KM, Gyoeva FK, Zaraisky AG (2008). The LIM-domain protein zyxin binds the homeodomain factor Xan1/Hesx1 and modulates its

- activity in the anterior neural plate of *Xenopus laevis* embryo. *Dev Dyn* 237, 736–749.
- McKeown CR, Han H-F, Beckerle MC (2006). Molecular characterization of the *Caenorhabditis elegans* ALP/Enigma gene *alp-1*. *Dev Dyn* 235, 530–538.
- Mello C, Fire A (1995). DNA transformation. *Methods Cell Biol* 48, 451–482.
- Mercer KB, Miller RK, Tinley TL, Sheth S, Qadota H, Benian GM (2006). *Caenorhabditis elegans* UNC-96 is a new component of M-lines that interacts with UNC-98 and paramyosin and is required in adult muscle for assembly and/or maintenance of thick filaments. *Mol Biol Cell* 17, 3832–3847.
- Moerman D, Williams BD (2006). Sarcomere assembly in *C. elegans* muscle. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*. Available at: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19751/.
- Moody JD, Grange J, Ascione MPA, Boothe D, Bushnell E, Hansen MDH (2009). A zyxin head–tail interaction regulates zyxin–VASP complex formation. *Biochem Biophys Res Commun* 378, 625–628.
- Morgan MJ, Madgwick AJ, Charleston B, Pell JM, Loughna PT (1995). The developmental regulation of a novel muscle Lim-protein. *Biochem Biophys Res Commun* 212, 840–846.
- Moulder GL, Cremona GH, Duerr J, Stirman JN, Fields SD, Martin W, Qadota H, Benian GM, Lu H, Barstead RJ (2010). α -Actinin is required for the proper assembly of Z-disk/focal-adhesion-like structures and for efficient locomotion in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 403, 516–528.
- Moulder GL, Huang MM, Waterston RH, Barstead RJ (1996). Talin requires beta-integrin, but not vinculin, for its assembly into focal adhesion-like structures in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 7, 1181.
- Nahabedian JF, Qadota H, Stirman JN, Lu H, Benian GM (2012). Bending amplitude—a new quantitative assay of *C. elegans* locomotion: Identification of phenotypes for mutants in genes encoding muscle focal adhesion components. *Methods* 56, 95–102.
- Nix DA, Beckerle MC (1997). Nuclear–cytoplasmic shuttling of the focal contact protein, zyxin: a potential mechanism for communication between sites of cell adhesion and the nucleus. *J Cell Biol* 138, 1139–1147.
- Nix DA, Fradelizi J, Bockholt S, Menichi B, Louvard D, Friederich E, Beckerle MC (2001). Targeting of zyxin to sites of actin membrane interaction and to the nucleus. *J Biol Chem* 276, 34759–34767.
- Nonet ML, Grundahl K, Meyer BJ, Rand JB (1993). Synaptic function is impaired but not eliminated in *C. elegans* mutants lacking synaptotagmin. *Cell* 73, 1291–1305.
- Norman KR, Cordes S, Qadota H, Rahmani P, Moerman DG (2007). UNC-97/PINCH is involved in the assembly of integrin cell adhesion complexes in *Caenorhabditis elegans* body wall muscle. *Dev Biol* 309, 45–55.
- Ohsawa N, Koebis M, Suo S, Nishino I, Ishiura S (2011). Alternative splicing of PDLIM3/ALP, for α -actinin-associated LIM protein 3, is aberrant in persons with myotonic dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 409, 64–69.
- Pruitt KD, Tatusova T, Klimke W, Maglott DR (2009). NCBI Reference Sequences: current status, policy and new initiatives. *Nucleic Acids Res* 37, D32–D36.
- Qadota H, Benian GM (2010). Molecular structure of sarcomere-to-membrane attachment at M-lines in *C. elegans* muscle. *J Biomed Biotechnol* 2010, 864749.
- Qadota H, McGaha LA, Mercer KB, Stark TJ, Ferrara TM, Benian GM (2008). A novel protein phosphatase is a binding partner for the protein kinase domains of UNC-89 (obscurin) in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 19, 2424–2432.
- Qadota H, Mercer KB, Miller RK, Kaibuchi K, Benian GM (2007). Two LIM domain proteins and UNC-96 link UNC-97/pinch to myosin thick filaments in *Caenorhabditis elegans* muscle. *Mol Biol Cell* 18, 4317–4326.
- Qadota H, Moerman DG, Benian GM (2012). A molecular mechanism for the requirement of PAT-4 (ILK) for the localization of UNC-112 (kindlin) to integrin adhesion sites. *J Biol Chem* 287, 28537–28551.
- Rauskolb C, Pan G, Reddy BVVG, Oh H, Irvine KD (2011). Zyxin links fat signaling to the hippo pathway. *PLoS Biol* 9, e1000624.
- Renfranz PJ, Beckerle MC (2002). Doing (F/L)pppps: EVH1 domains and their proline-rich partners in cell polarity and migration. *Curr Opin Cell Biol* 14, 88–103.
- Renfranz PJ, Blankman E, Beckerle MC (2010). The cytoskeletal regulator zyxin is required for viability in *Drosophila melanogaster*. *Anat Rec (Hoboken)* 293, 1455–1469.
- Renfranz PJ, Siegrist SE, Stronach BE, Macalma T, Beckerle MC (2003). Molecular and phylogenetic characterization of Zyx102, a *Drosophila* orthologue of the zyxin family that interacts with *Drosophila* Enabled. *Gene* 305, 13–26.
- Rogalski TM, Gilbert MM, Devenport D, Norman KR, Moerman DG (2003). DIM-1, a novel immunoglobulin superfamily protein in *Caenorhabditis elegans*, is necessary for maintaining bodywall muscle integrity. *Genetics* 163, 905–915.
- Sadler I, Crawford AW, Michelsen JW, Beckerle MC (1992). Zyxin and cCRP: two interactive LIM domain proteins associated with the cytoskeleton. *J Cell Biol* 119, 1573.
- Samarel AM (2005). Costameres, focal adhesions, cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H2291–H2301.
- Schessl J, Feldkirchner S, Kubny C, Schoser B (2011). Reducing body myopathy and other FHL1-related muscular disorders. *Semin Pediatr Neurol* 18, 257–263.
- Ségalat L, Elkes DA, Kaplan JM (1995). Modulation of serotonin-controlled behaviors by Go in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 267, 1648–1651.
- Shaye DD, Greenwald I (2011). OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS ONE* 6, e20085.
- Smith P, Leung-Chiu W-M, Montgomery R, Orsborn A, Kuznicki K, Gressman-Coberly E, Mutapic L, Bennett K (2002). The GLH proteins, *Caenorhabditis elegans* P granule components, associate with CSN-5 and KGB-1, proteins necessary for fertility, and with ZYX-1, a predicted cytoskeletal protein. *Dev Biol* 251, 333–347.
- Stamatakis A (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690.
- Sun N, Huiatt TW, Paulin D, Li Z, Robson RM (2010). Synemin interacts with the LIM domain protein zyxin and is essential for cell adhesion and migration. *Exp Cell Res* 316, 491–505.
- Timmons L, Court DL, Fire A (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263, 103–112.
- Wang Y, Gilmore TD (2003). Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear. *Biochim Biophys Acta* 1593, 115–120.
- Warner A, Qadota H, Benian GM, Vogl AW, Moerman DG (2011). The *Caenorhabditis elegans* paxillin orthologue, PXL-1, is required for pharyngeal muscle contraction and for viability. *Mol Biol Cell* 22, 2551–2563.
- Waterston RH, Hirsh D, Lane TR (1984). Dominant mutations affecting muscle structure in *Caenorhabditis elegans* that map near the actin gene cluster. *J Mol Biol* 180, 473–496.
- Welman A, Serrels A, Brunton VG, Ditzel M, Frame MC (2010). Two-color photoactivatable probe for selective tracking of proteins and cells. *J Biol Chem* 285, 11607–11616.
- Wilson KJ, Qadota H, Mains PE, Benian GM (2012). UNC-89 (obscurin) binds to MEL-26, a BTB-domain protein, and affects the function of MEL-1 (katanin) in striated muscle of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 23, 2623–2634.
- Wójtowicz A, Babu SS, Li L, Gretz N, Hecker M, Cattaruzza M (2010). Zyxin mediation of stretch-induced gene expression in human endothelial cells. *Circ Res* 107, 898–902.
- Wolfenson H, Bershadsky A, Henis YI, Geiger B (2011). Actomyosin-generated tension controls the molecular kinetics of focal adhesions. *J Cell Sci* 124, 1425–1432.
- Xiong G, Qadota H, Mercer KB, McGaha LA, Oberhauser AF, Benian GM (2009). A LIM-9 (FHL/SCPL-1 (SCP) complex interacts with the C-terminal protein kinase regions of UNC-89 (obscurin) in *Caenorhabditis elegans* muscle. *J Mol Biol* 386, 976–988.
- Yamada K, Kawata H, Shou Z, Hirano S, Mizutani T, Yazawa T, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Miyamoto K (2003). Analysis of zinc-fingers and homeoboxes (ZHX)-1-interacting proteins: molecular cloning and characterization of a member of the ZHX family, ZHX3. *Biochem J* 373, 167.
- Zheng Q, Zhao Y (2007). The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein–protein interaction. *Biol Cell* 99, 489–502.

Supplemental figure legends

Figure S1. Localization of ZYX-1 binding partners in the *zyx-1(gk190)* mutant

Antibodies directed against ALP-1, DEB-1, DYC-1, UIG-1, LIM-8, LIM-9 and SCPL-1 were used to stain the respective proteins in body wall muscles of N2 (wild-type) and *zyx-1(gk190)* worms. No significant modification of the localization of any of the analyzed proteins was detected in the *zyx-1(gk190)* mutant when compared to wild-type. Scale bar 10 μm for all images.

Figure S2. Localization in body wall muscle cells of ZYX-1-GFP and DEB-1 in wild-type and the *atn-1(ok84)* mutant and of DYS-1-GFP and DEB-1 in wild-type.

A-F: Localization of ZYX-1-GFP in body wall muscles of wild-type (A and green in C) and the *atn-1(ok84)* mutant (D and green in F). DEB-1 antibody was used as a positive control for dense bodies organization in wild-type (B and red in C) and *atn-1(ok84)* mutants, (E and red in F). The ZYX-1-GFP and DEB-1 staining partially overlap (merges in C and F). Note that in the *atn-1(ok84)* mutant the DEB-1 and ZYX-1-GFP proteins are still present at dense bodies but their localizations are enlarged compared to wild-type muscles.

G-I: Localization of DYS-1-GFP and DEB-1 in body wall muscles of wild-type worms. DYS-1-GFP in G, DEB-1 in H and the merged image in I shows DYS-1-GFP in green and DEB-1 in red. The DYS-1-GFP protein is abundantly expressed in striated body wall muscles where it localizes in broad bands overlapping actin containing thin filaments, *i.e.* overlapping the whole sarcomere except for the H-zone. The DYS-1-GFP staining seems to be less abundant at the basis of dense bodies and partially overlaps with the DEB-1 staining.

Scale bar 10 μm for all images.

Figure S3. Phalloidin-rhodamin staining of the *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutant and the *dys-1(cx18); hlh-1(cc561ts); zyx-1(gk190)* triple mutant

A-B: Body wall muscles cells analyzed after phalloidin-rhodamin staining of a *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutant (left) and a *dys-1(cx18); hlh-1(cc561ts); zyx-1(gk190)* triple mutant (right). Muscle cells of one quadrant were surrounded by dotted lines. Degenerated muscle cells are labeled in red. The triple mutant presents a diminution by 40% of muscle degeneration when compared to the double mutant (2 degenerated cells *versus* 5). Scale bar 100 μm for both images.

C-D: Enlargement of areas of interest indicated by the white rectangles in A and B. Red asterisks point missing muscle cells surrounded by cells in which actin filaments are visible.

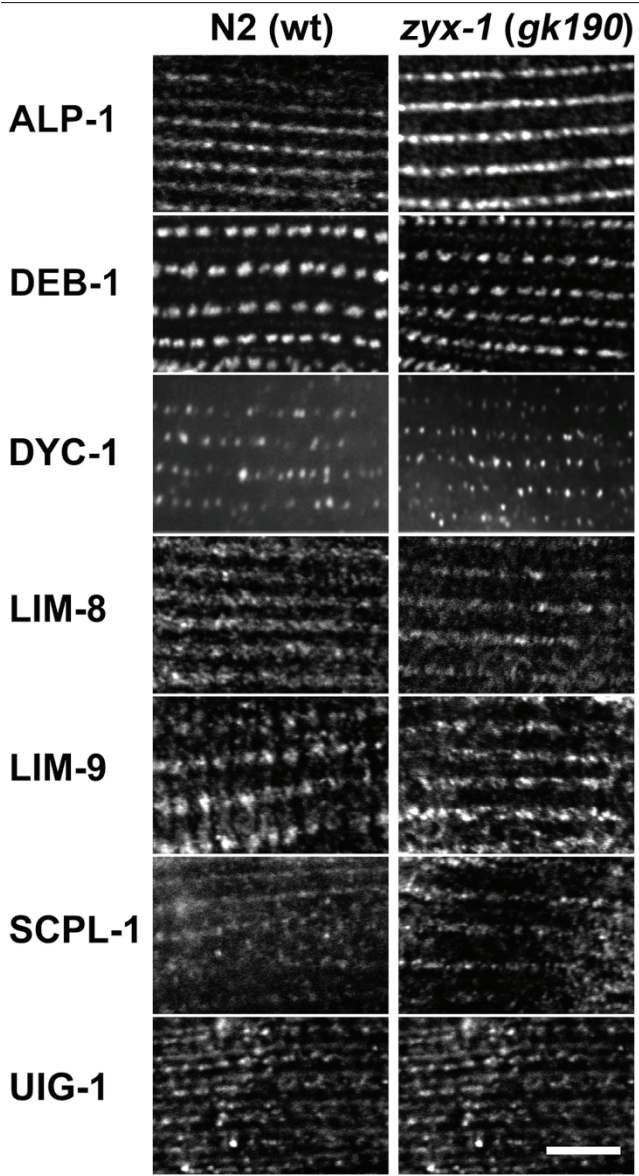
Figure S4. Western blots analysis of ZYX-1-GFP and ZYX-1 proteins

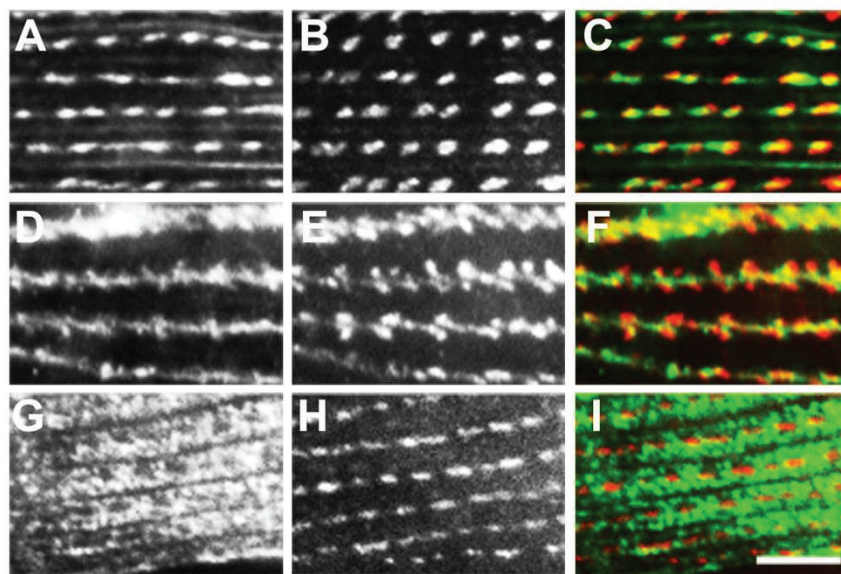
A: Proteins extracted from wild-type worms (lane 1), transgenic worms carrying the pKG001 (lane 2) and pKG106 (lane 3) plasmids were analyzed by Western blot using an antibody directed against GFP. No GFP signal was detected in wild-type worms (lane 1). The bands observed in lane 2 correspond to the predicted proteins encoded by the pKG001 transgene lacking the third LIM domain: 90 kDa for ZYX-1a-GFP (*) and 45 kDa for ZYX-1b-GFP (arrowhead), these proteins are both fused to the 29 kDa GFP protein. The bands observed in lane 3 correspond to the predicted proteins encoded by pKG106: 95 kDa for ZYX-1a-GFP (*) and 50 kDa for ZYX-1b-GFP (arrowhead). In both lanes 2 and 3, the signal of the long ZYX-1a isoform was estimated with Image Lab Biorad Software to correspond to 6% of the total detected ZYX-1-GFP proteins.

B: Western blot using the monoclonal antibody directed against ZYX-1 were performed on proteins extracted from wild-type and the *zyx-1(gk190)* mutant (lanes 4 and 5). A 23 kDa protein corresponding to the predicted small ZYX-1b isoform is detected in wild-type worms but not in the mutant, along with some weak and non specific bands. We were unable to detect the long ZYX-1a isoform with this antibody although the *zyx-1a* mRNA is present in wild-type (as shown in C). The numbers on the left correspond to the size in kDa of ladder proteins.

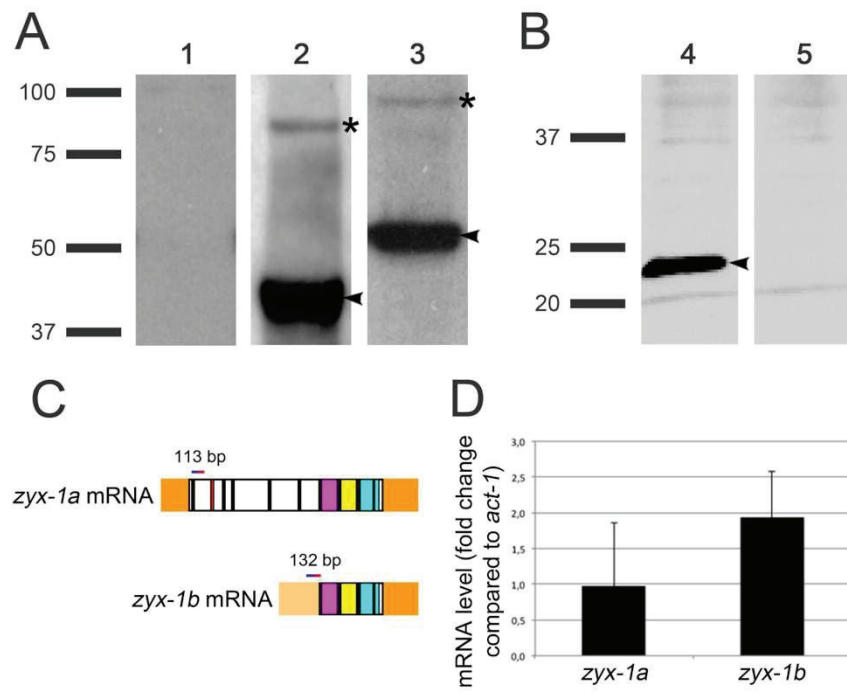
C: *zyx-1a* and *zyx-1b* mRNAs are schematically represented with the specific sequences amplified by RT-qPCR (113 and 132 bp respectively). Note that the forward primer for *zyx-1b* is located in the 5' untranslated region.

D: *zyx-1a* and *zyx-1b* mRNA levels quantified by RT-qPCR using *act-1* as housekeeping gene control. The *zyx-1b* mRNA is twice more abundant than *zyx-1a* mRNA. Bars correspond to standard deviations between three independent experiments.









II. Article N°2

Chemical genetics unveils a key role of mitochondrial dynamics, cytochrome c release and IP3R activity in muscular dystrophy

Jean Giacomotto, Nicolas Brouilly, Ludivine Walter, Marie-Christine Mariol, Joachim Berger, Laurent Ségalat, Thomas S. Becker, Peter D. Currie, and Kathrin Gieseler

Publié dans *Human Molecular Genetics*, 2013, Jul9 (Epub avant impression)

Les mitochondries sont des organelles aux fonctions multiples. Elles sont le lieu de la chaîne respiratoire permettant la production d'ATP, et sont impliquées dans la régulation des concentrations ioniques (dont Ca²⁺) dans le cytosol, dans le relargage de cytochrome c, signal intra cellulaire de la cascade apoptotique, la libération des ROS (pour « *Reactive Oxygen Species* »). Dans le tissu musculaire, la production d'ATP et la régulation de la concentration cytosolique du calcium sont fondamentales (voir Chapitre 1^{er}§III.2.).

Les mitochondries subissent des fusions et fissions régulant ainsi leur morphologie mais aussi leurs fonctions (Heath-Engel et Shore, 2006) et particulièrement dans le muscle squelettique (Chen *et al.*, 2010). L'altération de l'homéostasie calcique peut provoquer un dysfonctionnement des mitochondries et une perte de perméabilité par l'ouverture de pores dans les membranes mitochondriales (mPTP, pour « *mitochondrial Permeability Transition Pore* »). L'ouverture de ces pores provoque la perte du potentiel de membrane mitochondriale, le gonflement de la matrice mitochondriale et le relargage de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome c (Petronilli *et al.*, 2001). L'ouverture du mPTP est modulée par la cyclophiline D, protéine qui peut être inhibée par la Cyclosporine A (CsA) (Baines *et al.*, 2005).

De nombreux syndromes de dégénérescence musculaire ont été associés à des désordres primaires mitochondriaux. Les symptômes associés à ces myopathies, ainsi que les encéphalo-myopathies mitochondriales sont très variables. Dans des myopathies où le désordre primaire n'est pas d'origine mitochondriale, un dysfonctionnement des mitochondries est également fréquemment observé (Baghdiguian *et al.*, 1999 ; Irwin *et al.*, 2003 ; Angelin *et al.*, 2007; Mitsuhashi *et al.*, 2011 ; Bernardi et Bonaldo, 2013). Dans le muscle de la souris *mdx*, la localisation des mitochondries et leur production d'ATP sont perturbées (Braun *et al.*, 2001 ; Percival *et al.*, 2012). Cependant, il n'est pas établi à ce jour si ces perturbations jouent un rôle dans le processus de la dégénérescence du muscle.

Le bon état des mitochondries d'une cellule musculaire est donc primordial à son bon fonctionnement et à sa survie, et peut donc être considéré comme un marqueur dans l'analyse de muscle normal et pathologique.

Nous avons étudié dans cet article l'implication des mitochondries dans le processus dégénératif des cellules musculaires. L'objectif est de caractériser la dysfonction mitochondriale induite par l'absence de dystrophine chez *C. elegans* et d'estimer la pertinence de diverses voies impliquées dans cette dysfonction mitochondriale comme pistes thérapeutiques dans le traitement de la DMD.

Un crible chimique effectué dans notre laboratoire sur le modèle *C. elegans* de dégénérescence dystrophine-dépendante a montré que la Cyclosporine A est capable de réduire la dégénérescence musculaire. Ce résultat nous a conduit à étudier plus en détail la fonction de cette molécule qui en plus de son rôle immuno-suppresseur, régule l'ouverture du mPTP (« *mitochondrial Permeability Transition Pore* »). Chez les mammifères, l'ouverture du mPTP est activée par la cyclophiline D. La Cyclosporine A peut déplacer la cyclophiline D et ainsi inhiber l'ouverture du mPTP (Baines *et al.*, 2005). Nous montrons chez *C. elegans* que l'effet bénéfique de la Cyclosporine A sur la dégénérescence musculaire implique la protéine CYN-1, l'orthologue de la cyclophiline D mitochondriale. De plus, une réduction de la dégénérescence musculaire chez les vers dystrophiques est également observée lorsque la fonction du gène *cyn-1*, est altérée. Ces résultats confirment – comme cela a été suggéré chez les mammifères (Reutenauer *et al.*, 2008) – que l'inhibition de la cyclophiline D et du mPTP permet de réduire la dégénérescence musculaire. De plus, nos observations suggèrent pour la première fois l'existence d'un mPTP, chez le nématode.

Par ailleurs, nous avons observé dans le modèle *C. elegans* de la DMD, que les mitochondries présentent une organisation perturbée dans les cellules musculaires par rapport à la souche sauvage, et nous avons pu établir que la fragmentation du réseau mitochondrial est un événement précoce dans le processus de la dégénérescence. Cette altération du réseau mitochondrial que nous avons également pu confirmer dans un modèle de la DMD chez le poisson zèbre semble être due à une augmentation de la fission des mitochondries. En effet, nous montrons chez le modèle *C. elegans* de la DMD que l'inactivation du gène *drp-1* qui est requis pour la fission mitochondriale, réduit significativement la fragmentation du réseau mitochondrial et la dégénérescence musculaire.

Nous avons aussi montré que le cytochrome c (CYC-2.1) relargué par les mitochondries à la suite de la modification de la perméabilité mitochondriale est impliqué dans la mort de la cellule musculaire en dégénérescence. Ceci est un résultat original, car il n'avait pas encore été décrit chez *C. elegans* de lien entre le CYC-2.1 et la mort cellulaire. Chez les vertébrés, la présence d'un domaine WD40 dans la structure d'APAF-1 (pour « *Apoptotic*

Protease Activating Factor 1 ») est nécessaire à son interaction avec le cytochrome c. Or CED-9, l'orthologue d'APAF-1 chez *C. elegans* ne possède pas ce domaine. La compréhension du mode d'action de CYC-2.1 dans la mort cellulaire est donc d'un intérêt particulier (Abdelwahid *et al.*, 2011).

Pour préciser son mode d'action, nos expériences de double hybride en levure indiquent que CYC-2.1 se lie à ITR-1, l'orthologue du récepteur Inositol tri Phosphate (IP3R), qui est un canal calcique du réticulum sarcoplasmique relargant le Ca²⁺ dans le cytosol. L'inhibition par RNAi des gènes *itr-1* ou *cyc-2.1* réduit la dégénérescence musculaire. Enfin, la surexpression du domaine C-terminal d'ITR-1 interagissant avec CYC-2.1 diminue également la dégénérescence musculaire. Ces résultats suggèrent que le cytochrome c, une fois relargué par la mitochondrie dans le cytosol se lie à ITR-1, augmentant ainsi la concentration calcique dans le cytosol, et conduisant à la mort de la cellule par un mécanisme qui reste à être élucidé.

Ensemble, ces résultats démontrent l'importance de la dysfonction mitochondriale dans le processus de dégénérescence dystrophine-dépendante chez *C. elegans* et en font une cible de choix pour le développement de stratégies thérapeutiques pour le traitement de la DMD.

Chemical genetics unveils a key role of mitochondrial dynamics, cytochrome *c* release and IP3R activity in muscular dystrophy

Jean Giacomotto^{1,2,3,*}, Nicolas Brouilly^{2,3}, Ludivine Walter^{2,3}, Marie-Christine Mariol^{2,3}, Joachim Berger⁴, Laurent Ségalat^{2,3}, Thomas S. Becker¹, Peter D. Currie⁴ and Kathrin Gieseler^{2,3,*}

¹Brain and Mind Research Institute, Sydney Medical School, University of Sydney, NSW 2050, Australia, ²Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaires et Cellulaires, CNRS UMR 5534, Campus de la Doua, 16 rue Dubois, 69622 Villeurbanne, France, ³Université Claude Bernard Lyon 1, 43 boulevard du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France and ⁴Australian Regenerative Medicine Institute, Monash University, Clayton, VIC, Australia

Received May 1, 2013; Revised and Accepted June 21, 2013

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a neuromuscular disease caused by mutations in the dystrophin gene. The subcellular mechanisms of DMD remain poorly understood and there is currently no curative treatment available. Using a *Caenorhabditis elegans* model for DMD as a pharmacologic and genetic tool, we found that cyclosporine A (CsA) reduces muscle degeneration at low dose and acts, at least in part, through a mitochondrial cyclophilin D, CYN-1. We thus hypothesized that CsA acts on mitochondrial permeability modulation through cyclophilin D inhibition. Mitochondrial patterns and dynamics were analyzed, which revealed dramatic mitochondrial fragmentation not only in dystrophic nematodes, but also in a zebrafish model for DMD. This abnormal mitochondrial fragmentation occurs before any obvious sign of degeneration can be detected. Moreover, we demonstrate that blocking/delaying mitochondrial fragmentation by knocking down the fission-promoting gene *drp-1* reduces muscle degeneration and improves locomotion abilities of dystrophic nematodes. Further experiments revealed that cytochrome *c* is involved in muscle degeneration in *C. elegans* and seems to act, at least in part, through an interaction with the inositol trisphosphate receptor calcium channel, ITR-1. Altogether, our findings reveal that mitochondria play a key role in the early process of muscle degeneration and may be a target of choice for the design of novel therapeutics for DMD. In addition, our results provide the first indication in the nematode that (i) mitochondrial permeability transition can occur and (ii) cytochrome *c* can act in cell death.

INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD, OMIM 310200) is the most prevalent X-linked recessive neuromuscular disorder, affecting striated and cardiac muscles with an incidence of 1 out of 3000 male births. It is caused by mutations in the dystrophin gene (1). Dystrophin is a large cytoskeletal protein that links the cytoskeleton to the extracellular matrix (2).

Current treatments for DMD consist of long-term medication with the steroid prednisone, physiotherapy and specific bracing, but these interventions only slightly prolong ambulation in patients (3). Moreover, since severe side effects often

accompany prednisone treatment, it is debatable whether its benefits outweigh its adverse effects. Therefore, the search for efficient palliative treatments is of great value. In addition, identifying the mechanism of action of beneficial drugs may help to understand better the physiopathology of this genetic disease.

The nematode *Caenorhabditis elegans* exhibits 95 striated body-wall muscle cells that are distributed in four longitudinal bands, named quadrants (Supplementary Material, Fig. S1). These muscle cells do not fuse, are not able to regenerate and, to our knowledge, do not undergo inflammatory processes after damage. We previously developed a *C. elegans* model for

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +61 291144208, Fax: +61 293510599; Email: jean.giacomotto@sydney.edu.au, giacomottojean@gmail.com (J.G.); Tel: +33 472432951; Fax: +33 472432951; Email: kathrin.gieseler@univ-lyon1.fr (K.G.)

DMD (4). In this model, a mutation in the dystrophin gene, *dys-1*, is coupled with a hypomorphic mutation in the *C. elegans* MyoD gene, *hlh-1* (Supplementary Material, Table S1). Single *dys-1(cx18)* mutants present only weak muscle degeneration. In adult worms, up to two muscle cells are occasionally absent. However, combined with the hypomorphic *hlh-1(cc561)* allele, the *dys-1(cx18)* allele leads to progressive paralysis due to extensive muscle degeneration, which is time- and activity-dependent (Supplementary Material, Video S1) (4). The degenerative phenotype is generally observed after actin filament staining with phalloidin–rhodamine and can be quantified by scoring muscle cells with disrupted or absent actin filaments (Supplementary Material, Fig. S1). The use of this nematode model as a tool for chemical screens provides an alternative to traditional screening systems and fills the gap in seeking drugs against DMD (5,6). Indeed, this approach led to the identification of drugs that have been further validated in the *mdx* mouse model for DMD (7,8).

In mammals, the subcellular mechanisms that lead to muscle degeneration are poorly understood. It is, however, commonly accepted that loss of dystrophin function induces intracellular Ca^{2+} overload. In *C. elegans*, Ca^{2+} transients have also been found to play a critical role in the degenerative process. Reducing the activity of the L-type voltage-gated EGL-19 or the Ryanodine Receptor UNC-68 calcium channels in the nematode DMD model diminishes muscle degeneration (9,10).

Mitochondria are dynamic organelles whose morphology and function are controlled by a balance between fission and fusion events (11). Under normal physiologic conditions, fusion predominates and the mitochondrial network presents mostly tubular morphology (12). However, under particular conditions such as high intracellular Ca^{2+} concentration, oxidative stress, aging or activation of apoptotic and necrotic signals, the dynamic balance is shifted to fission, leading to mitochondrial network fragmentation (13). In such conditions, mitochondrial permeability transition (mPT) of mitochondrial membranes and the opening of large pores called mitochondrial permeability transition pores (mPTP) can occur and cause the cytosolic release of apoptotic factors (14). One of the released factors is cytochrome *c*, which is known in mammals to trigger apoptosis through its interaction with APAF-1 (15). When mPT is not reversed in a timely manner, cytosolic accumulation of these factors can lead to cell death. Several studies have shown that a mitochondrial matrix prolyl *cis*–*trans* isomerase, cyclophilin D, controls Ca^{2+} and reactive oxygen species-dependent mPT (16). Targeting cyclophilin D with chemicals, such as the specific cyclophilin inhibitor Debio025, can reduce apoptotic signals release and cell death (17).

Cyclosporine A (CsA) is well known as an immunosuppressive drug, which is generally used after organ transplantation to prevent rejection. This compound has the ability to bind cytosolic cyclophilin A to form a complex that inhibits calcineurin, thus leading to lower T cell activity and immune response (18). CsA was suspected to be beneficial for DMD patients, as they present chronic muscle inflammation potentially due to calcium-dependent activation of calcineurin (19). In addition, CsA also exerts a calcineurin-independent effect on mPTP opening through cyclophilin D inhibition (20).

Using the *C. elegans* DMD model as a chemical screening tool, we found that CsA reduces dystrophin-dependent muscle

degeneration at low dose but loses its positive effect at high dose. Our data further indicate that its beneficial effect involves a *C. elegans* mitochondrial cyclophilin D homolog, CYN-1, suggesting an implication of mPT in muscle degeneration in *C. elegans*. This finding also provides the first indication that mPT can occur in *C. elegans* (reviewed in 21). Furthermore, we show that mitochondrial dynamics is dramatically affected at the early stages of muscle degeneration not only in dystrophic nematodes but also in a zebrafish model for DMD. Moreover, we demonstrate that knockdown of the fission-promoting gene *drp-1* reduces both mitochondrial fragmentation and muscle degeneration in dystrophic nematodes. This observation suggests (i) that mitochondrial fragmentation observed in dystrophic muscles is due to increased mitochondrial fission, and (ii) that mitochondrial fission plays a key role in the early process of muscle degeneration. We further demonstrate a role for cytochrome *c* and the inositol trisphosphate receptor (IP3R) calcium channel, ITR-1, in both mitochondrial fission and muscle degeneration. Thus, our study also unveils for the first time, to our knowledge, that in *C. elegans* cytochrome *c* is involved in muscle cell death by acting, at least partially, through an interaction with IP3R/ITR-1.

RESULTS

CsA reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient nematodes

Using the *C. elegans dys-1; hlh-1* model for DMD to search for potential bioactive drugs against muscle degeneration, we found that worms grown on agar medium supplemented with 100 nM CsA moved better than control animals treated with the solvent DMSO. Examination of body-wall muscle cells after phalloidin–rhodamine staining revealed a reduction of muscle degeneration by >50% (Fig. 1A and 2D; Supplementary Material, Fig. S1). Dose–response experiments showed an optimal effect of CsA against muscle degeneration at concentrations between 10 and 100 nM (Fig. 1A). This beneficial effect gradually decreased with lower doses, and was no longer significant at 0.1 nM and below. The beneficial effect of CsA on muscle degeneration of *dys-1; hlh-1* double mutants was lost at high dose. Above 10 μM , CsA exhibited no significant effects on muscle degeneration (Fig. 1A). At 100 μM , it induced moderate growth retardation, and at a concentration of $\geq 500 \mu\text{M}$ it induced lethality (Fig. 1A).

Muscle degeneration in the worm model for DMD is caused by the synergistic effect of the *dys-1* and *hlh-1* mutations, as the mild *hlh-1(cc561)* mutation serves as an amplifier of the *dys-1(cx18)* phenotype. To confirm a specific effect on the *dys-1*-dependent phenotype, CsA was also tested at a concentration of 100 nM on *dys-1* single mutants and we found that it led to a significant decrease of muscle degeneration compared with control worms (Supplementary Material, Fig. S2A).

Muscle degeneration in the nematode is both activity- and time-dependent. Consequently, chemicals that have a sedative effect or that slow down development can reduce muscle degeneration. To exclude the possibility that CsA acted through these indirect effects, we analyzed its impact on mobility and growth rate. At a concentration of 100 nM in the medium, CsA had no significant impact on the growth rate of *dys-1; hlh-1* double

suggesting that the observed toxicity was not related to CYN-1 inhibition. In contrast, RNAi constructs targeting *cyn-2* to *-16* failed to modify the CsA dose–response curve on muscle degeneration (data not shown). In order to verify the specificity of *cyn-1* RNAi on the effect of CsA, we performed the same dose–response experiments by knocking down the *cah-4* gene (*cah-4*, carbonic anhydrase 4). *cah-4* encodes one of the six putative carbonic anhydrases of the worm, and has previously been found to reduce muscle degeneration in *C. elegans* when knocked down by RNAi (8). The RNAi-mediated knockdown of *cah-4* failed to modify the profile of the CsA dose–response curve (Fig. 1E). Altogether, these results indicate that CsA and *cyn-1* knockdown act through common mechanisms to reduce muscle degeneration.

The close homology of the *C. elegans* CYN-1 protein with mouse cyclophilin D along with its putative mitochondrial localization and its effect on the dose–response curve of CsA suggests that mPT occurs in *C. elegans*, and that the genetic or pharmacologic inhibition of CYN-1 protects from muscle degeneration by blocking or delaying mPTP opening.

Dystrophin-deficient nematodes present abnormal mitochondrial network morphology

Considering that mPT may be involved in the process of muscle degeneration, mitochondrial morphology and dynamics were analyzed. For this purpose, we took advantage of the *ccIs4251* transgene, which drives the expression of the green fluorescent protein (GFP) in body-wall muscle cells where GFP localizes to nuclei and mitochondria (23). This transgene was genetically introduced into dystrophin-deficient *dys-1(cx18)* and *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* as well as into *hlh-1(cc561)* mutants (Supplementary Material, Video S1, Table S1). The morphology of the mitochondrial network reflected by the GFP signal observed by confocal microscopy unveiled dramatic mitochondrial fragmentation in all analyzed strains compared with control worms (PD4251 strain) (Fig. 2A–C; Supplementary Material, Fig. S4). Eight-day-old adult control worms presented $81 \pm 2.4\%$ of muscle cells with tubular mitochondria. In *hlh-1* or *dys-1* single mutants, this proportion was reduced to 66 ± 3.5 and $56 \pm 4.4\%$, respectively, whereas *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutants exhibited only $32 \pm 2.9\%$ of cells with tubular-shaped mitochondria (Fig. 2B). Interestingly, *dys-1; hlh-1* double mutants presented $16 \pm 2.1\%$ of degenerating muscle cells, and *dys-1* and *hlh-1* single mutants 2 ± 0.7 and $2 \pm 0.8\%$, respectively. Thus, it appears that the severity of the changes in mitochondrial network morphology was correlated with the muscle degeneration phenotype. Importantly, mitochondrial network modifications precede sarcomeric defects as observed by disrupted actin filaments stained with phalloidin–rhodamine (Supplementary Material, Fig. S5). Altogether, our data suggest that morphologic defects of mitochondria may be an early process in dystrophin-dependent muscle degeneration.

Mitochondrial fragmentation further increased with age, regardless of the considered strains (Fig. 2C). This pattern is in accordance with previous studies, which link mitochondrial fragmentation to the aging process of muscle cells (24). However, fragmentation progression of the mitochondrial network in muscles of *dys-1; hlh-1* double mutants is dramatically increased over time, as after 9 days of culture at 15°C only

$13 \pm 2.9\%$ of muscle cells still presented tubular mitochondria compared with $74 \pm 5.5\%$ in the PD4251 control strain (Fig. 2C).

Reducing mitochondrial fission reduces muscle degeneration

Mitochondrial phenotypes observed in the *dys-1; hlh-1* double mutant suggest that mitochondrial defects are involved in the muscle degenerative process. RNAi-mediated knockdown of the fission-promoting dynamin-related *drp-1* gene was carried out to establish whether the loss of the tubular mitochondrial shape detected in muscle cells of dystrophic worms was due to increased mitochondrial fission. Knockdown of *drp-1* by RNAi in *dys-1; hlh-1* double mutants reduced muscle degeneration by almost 40% compared with control worms (Fig. 2D). Growth rate remained unchanged in wild-type control worms as well as in *dys-1(cx18)* single and *dys-1; hlh-1* double mutants (Supplementary Material, Fig. S2B). Locomotion was not modified in *dys-1* single mutants or wild-type worms, whereas *drp-1* knockdown significantly improved locomotion abilities of *dys-1; hlh-1* double mutants (Supplementary Material, Fig. S2C). Moreover, LS761 *dys-1(cx18) ccls4251; hlh-1(cc561)* mutants subjected to *drp-1* RNAi presented fewer muscle cells with fragmented mitochondria compared with control worms (Fig. 3). These data confirm that mitochondrial fission is likely to contribute to muscle degeneration in dystrophic nematodes and that reducing fission delays muscle degeneration progression.

Mitochondrial network abnormality is also an early event of muscle degeneration in a zebrafish DMD model

Mitochondria pattern and distribution were analyzed in a zebrafish DMD model, named *dmd^{pc2}* (25). Homozygous *dmd^{pc2+/+}* embryos and larvae present many hallmarks of human DMD patients, including muscle degeneration, fibrosis and inflammatory response. The first obvious sign of muscle degeneration in *dmd^{pc2+/+}* embryos is the detachment of some muscle fibers from their myotendinous junction starting at 3 days post-fertilization (d.p.f.). To visualize the mitochondrial network and dynamics in muscle fibers of homozygous *dmd^{pc2+/+}* animals, a plasmid that drives the expression of mitochondria-targeted GFP in striated muscle was injected into one-cell-stage embryos obtained from heterozygous *dmd^{pc2+/-}* incrosses. Similar to dystrophic *C. elegans* muscles, myofibers of dystrophin-deficient *dmd^{pc2+/+}* zebrafish embryos and larvae exhibited fragmented mitochondria (Fig. 4; Supplementary Material, Fig. S6 and S7). All dystrophic muscle fibers that have detached from the myotendinous junction, and appeared retracted, presented a mitochondrial network with a pronounced fragmented pattern, similar to the pattern observed in chemical-induced muscle cell death (26) (Supplementary Material, Fig. S6). At 3 d.p.f., GFP-positive muscle fibers that did not present any signs of degeneration, as indicated by tears or detachment from the myotendinous junction, already exhibited a fragmented mitochondrial network compared with tubular mitochondria observed in the control sibling embryos (Fig. 4).

These results suggest that ITR-1 and CYC-2.1 and their interaction contribute to both altered mitochondrial dynamics and muscle degeneration observed in dystrophic nematodes.

DISCUSSION

Here, we demonstrate that CsA is beneficial toward dystrophin-dependent muscle degeneration in the nematode *C. elegans*. Efficient doses of CsA upon muscle degeneration range from 1 nM to 1 μM in the culture medium, thus revealing a high efficiency and bioavailability of the drug into the nematode. Indeed, most of the drugs identified as being beneficial toward muscle degeneration in the nematode DMD model presented an optimal effect in a dose range from 100 μM to 2 nM in the medium [(8), L.S., unpublished results]. Similar results have been reported within the *mdx* mouse model. Administration of 10 mg/kg/day of CsA by feeding led to improvement of outcomes in *mdx* mice and suggested that this compound may be of interest for humans (19). However, a recent clinical trial showed that this drug, when delivered at relative high dose (4 mg/kg/day), did not significantly improve muscle functions of DMD patients (36). Our results show that, in the *C. elegans* DMD model, CsA treatment loses its beneficial effect against muscle degeneration when used at doses >10 μM in the medium. Accordingly, high-dose treatment of *mdx* mice (30 mg/kg/day intraperitoneally) did not lead to any benefit, and was rather deleterious for muscles in the dystrophic context (37). Considering body surface area normalization method, administration to a child of 4 mg/kg/day of a drug corresponds to ~33 mg/kg/day in adult mice (38). This dose might thus be too high to induce any beneficial effect in humans. It is noteworthy that no deleterious effect of the drug was reported in the human trial. The deleterious effect in mice was attributed to an interference with muscle regeneration due to calcineurin inhibition. Besides lethal toxicity at the highest dose tested, no deleterious muscular effect was observed in *C. elegans*, which is potentially due to the lack of muscle regenerative processes in the nematode. It is also well established that mice possess a more effective regenerative capacity than humans, which may also explain that no deleterious effect on muscles was reported in the human trial. So far, results obtained with *C. elegans* and mice suggest that the optimal dose of CsA that could lead to potential beneficial effects may have been missed in humans.

CsA was initially suspected to be beneficial against the inflammatory processes that take place in the muscles of DMD patients and *mdx* mice (19,36). However, since *C. elegans* lacks an inflammatory system, at least in muscles, finding CsA to be beneficial toward dystrophin-dependent muscle degeneration supports the hypothesis that the effect of this compound on muscle degeneration involves mechanisms other than immunosuppression. Our study shows that, in the nematode, low doses of CsA act, at least in part, through cyclophilin D to reduce muscle degeneration. Interestingly, the CsA analog Debio025 was also found to improve the outcomes in *mdx* mice (39). Since Debio025 lacks immunosuppressive activity, it has been suggested that this drug reduces muscle degeneration through the regulation of mPTP opening. This hypothesis was further supported by the observation that genetic inhibition of cyclophilin D improves *mdx* mouse phenotypes, reinforcing the relevance

of this protein as a potential therapeutic target against DMD (40). In addition, cyclophilin D was further linked to muscle cell death in collagen VI myopathic mice, thus suggesting that cyclophilin D inhibition may be relevant as a treatment for myopathies in general (41).

The relevance of cyclophilin D as a therapeutic target is also confirmed by our observation of a key role for mitochondrial dynamics in the early process of muscle degeneration in *C. elegans* and most likely in zebrafish. Cyclophilin D directly regulates calcium-dependent mPTP and cellular necrosis. Mice lacking cyclophilin D present protection against necrotic cell death after ischemic injury, and mitochondria isolated from these mice are resistant to calcium-induced swelling (16). Cytosolic calcium overload has been observed in *mdx* mouse muscle fibers as well as in humans, and we previously showed that Ca²⁺ transients play a critical role in the DMD nematode model (9). This excess of calcium may be up-taken by mitochondria, and thus lead to mPTP, increased mitochondrial fission, as well as cytochrome *c* release, and all these phenomena may promote muscle cell degeneration. This hypothesis is further supported by our observations showing that inhibiting mPTP opening with CsA treatment and/or *cyn-1* knockdown, reducing mitochondrial fission with *drp-1* knockdown as well as inhibiting cytochrome *c* via *cyc-2.1* knockdown, all improve the dystrophic muscle phenotype in the *C. elegans* DMD model (Fig. 9).

The beneficial effect of cytochrome *c* knockdown toward dystrophic muscle tends to confirm that mitochondria play a significant role in dystrophin-dependent muscle degeneration. However, cytochrome *c* may not promote directly apoptosome formation in the nematode, as the *C. elegans* APAF-1 heterologous CED-4 lacks the cytochrome *c*-binding domain (29). Thus, in *C. elegans*, cytochrome *c* may promote muscle degeneration by contributing to the increase of Ca²⁺ intake and accumulation in mitochondria through its interaction with the calcium channel IP3R, thereby amplifying subsequent events involved in cell death. Rizzuto *et al.* (42) demonstrated that IP3R is directly juxtaposed to mitochondria, and mediates Ca²⁺ transient between these organelles. It has been further determined that cytochrome *c* interaction with the C-terminus of the IP3R is critical for Ca²⁺ signaling in cell death, resulting in Ca²⁺ poisoning of the mitochondria (31). The mitochondrial Ca²⁺ overload induced by IP3R activity has been described to occur prior to apoptosome formation, and seems to be a crucial step for global caspases activation, which can in turn lead to IP3R cleavage and dysregulation (43). Additionally, under high Ca²⁺ concentration conditions, calpains are also involved in the N-terminal degradation of the IP3R, leading to constitutive activation and further Ca²⁺ depletion of the ER (44) (Fig. 9). The degradation of the IP3R N-terminal region (which carries the IP3-binding site) would explain why in our study the knockdown of PLC-encoding genes or the chemical inhibition of PLC did not lead to a significant beneficial effect upon muscle degeneration. Indeed, PLC is required to generate IP3. Thus, if, in dystrophic muscles, the Ca²⁺ transient through IP3R were no longer regulated by IP3 release, PLC inactivation would have no effect. However, we cannot rule out the possibility that other PLC homologs, than the six described so far in *C. elegans* (35,45), exist and interact with ITR-1 in the muscle degenerative process. After all, it remains unclear whether cytochrome *c* plays a direct role in apoptosome formation in *C. elegans*.

were grown at 15°C, which is the permissive temperature for the thermo-sensitive mutation *hlh-1(cc561)* (4). The N2, PD4613 and PD4251 strains were obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center.

Preparation of chemical compounds and drug-containing plates

All pharmacologic compounds were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Methazolamide (Meth) was used as a positive control to reduce muscle degeneration (8). Concentrated solutions (10×) of each drug were prepared in DMSO. *C. elegans* tolerates DMSO up to a final concentration of 2% vol/vol. Compounds were added to liquid NGM agar that had been autoclaved and cooled to 55°C, and the media was immediately mixed and dispensed into Petri dishes. Depending on the experiment, a drop of *E. coli* OP50 bacteria, empty plasmid L4440 containing HT115 bacteria or HT115 bacteria expressing dsRNA were added on top of the medium. *C. elegans* is permeable to aqueous and organic molecules, and it is admitted that drugs penetrate the worms both by diffusion through the cuticle and ingestion (8). Drugs used in this study were CsA, Meth, 2-APB, U-73122 hydrate.

Preparation of RNAi plates and generation of dsRNA-expressing bacteria

RNAi experiments were performed on NGM plates supplemented with 100 µg/ml ampicillin, 12.5 µg/ml tetracycline and 2 mM IPTG (NGM-ATI). For each bacteria clone carrying an RNAi plasmid, one colony was cultured overnight at 37°C in 2 ml of LB medium supplemented with 100 µg/ml ampicillin and 12.5 µg/ml tetracycline (LBAT). The day after, 0.01 volume of this preculture was added in 1 volume of LBAT and incubated at 37°C. When the culture had reached 0.45–0.5 DO, 2 mM IPTG was added. At 0.7 DO, 100 to 200 µl of the bacteria culture was seeded on NGM-ATI plates. Plates were allowed to dry at room temperature for at least 3 days before experiments. HT115 bacteria strains producing dsRNA for *cyn-2*, *cyn-3*, *cyn-4*, *cyn-6*, *cyn-8*, *cyn-9*, *cyn-11*, *cyn-12*, *itr-1*, *plc-1*, *plc-2*, *plc-3*, *plc-4*, *p11-1*, *egl-8*, *cyc-1*, *cyc-2.1*, *cyc-2.2*, *drp-1*, *cah-4* and *pos-1* were obtained from the *C. elegans* RNAi library (48). Clones for *cyn-1*, *cyn-5*, *cyn-7*, *cyn-10*, *cyn-13*, *cyn-14*, *cyn-15* and *cyn-16* were constructed for the study. Constructs were obtained by amplification of ~400–600 pb of genomic DNA of either gene and cloned into the RNAi feeding vector L4440 (for primers, see Supplementary Material, Fig. S9). Note that *pos-1* knockdown is used as an RNAi efficiency control in every experiments, which resulted in nearly 100% embryonic lethality.

Drug and/or RNAi assays

Three gravid adults of the N2, PD4251, LS292, LS541 or LS762 strains and five gravid adults of the LS587 or LS761 strains were put on plates for one night and removed, so as progeny was exposed to drug and/or dsRNA from hatching to fixation. All worms were fixed and observed at day 8 of culture, unless stated otherwise. Before collecting each population, the plates were observed to ensure that the bacteria layer has not been

depleted before the end of the assay. As RNAi efficiency control, *pos-1* RNAi knockdown performed in parallel resulted in nearly 100% embryonic lethality. As RNAi-negative control, plates seeded with empty plasmid L4440 containing bacteria were used. All experiments were performed in duplicate and were repeated at least three times.

Scoring of muscle degeneration

The 95 body-wall muscles of *C. elegans* are organized into four quadrants (ventral right and left, dorsal right and left) each of which consists of 23 or 24 diamond-shaped muscle cells, arranged in two staggered rows (Supplementary Material, Fig. S1). Unless stated otherwise, muscle observation was performed on worms after 8 days of culture at 15°C. All worms were collected and fixed for 1 h in 1 ml of PBS supplemented with 30 µl of 37% formaldehyde. Each sample was stained by rhodamine-coupled phalloidin, a marker of filamentous actin. Staining was performed according to Waterston *et al.* (49). Slides were observed on a Zeiss Axioplan microscope. A body-wall muscle cell is considered degenerating when its actin fibers are fragmented or destroyed (Supplementary Material, Fig. S1B) (4). Only the two most visible muscle quadrants of each animal were scored. A minimum of 20 worms per conditions were examined per experiments. Experiments were repeated three to five times. Numbers were compared by a Student's *t*-test.

Locomotion and growth rate

To estimate the locomotion rate of nematodes, worms cultured for 8 days at 15°C were scored for the number of body bends generated during an interval of 1 min on NGM plates without bacteria. A body bend was defined as one complete sinusoidal movement from maximum to minimum amplitude and back again. The growth rate refers to the time from F0 eggs to the first F1 eggs (generation time). A minimum of 20 worms were examined. Numbers were compared by a Student's *t*-test.

cyc-2.1::GFP construct and localization

Approximately 1 kb upstream of the ATG start codon of *cyc-2.1* was amplified by PCR (forward primer: AATTGTCGACC-CACTTCGCCTAAGTTGCGG; reverse primer: AAT-TACCGGTGTTGAACCCCTAAAATACAG). This fragment containing the putative endogenous promoter of the *cyc-2.1* gene was cloned upstream of the GFP-encoding sequence in pPD95.75 (kindly provided by A. Fire, Stanford University School of Medicine), resulting in plasmid pJG03. Wild-type N2 hermaphrodite young adults were injected with 25 ng/µl pCFJ68 (*Punc-122::GFP*) as selection marker (Addgene), and 10 ng/µl *Pcyc-2.1::GFP* containing plasmid. Plasmid micro-injection was performed as described (50). Individual F1 worms expressing GFP in coelomocytes (due to the expression of the *Punc-122::GFP* transgene) were isolated. Four independent stable transgenic lines were isolated, as defined by F1 giving transgenic progeny. Transgenic worms (50, all stages) were observed using a fluorescence microscopy on a Zeiss LSM 510 Meta fluorescence confocal microscope so as to detect the expression pattern of the *Pcyc-2.1::GFP* transgene.

Confocal imaging and image treatment

All *C. elegans* images presented in this manuscript were recorded using a Zeiss LSM 510 Meta fluorescence confocal microscope at room temperature, and the files were processed and converted under ImageJ environment.

Mitochondrial morphology analysis

For mitochondrial analysis, *C. elegans* strains were grown at 15°C for 6, 7, 8 and 9 days in the presence or absence of drugs and/or specific dsRNA-expressing bacteria. Worms were collected with PBS and fixed with formaldehyde (0.37% final), 15 min at room temperature under agitation. Samples were then washed three times with PBS to remove formaldehyde, mounted on slides with DAKO mounting medium and observed under a Zeiss LSM 510 Meta fluorescence confocal microscope the same day.

To score mitochondria morphology, approximately 16 body-wall muscle cells per animal were observed. These 16 body-wall muscle cells belonged to 1 quadrant (Supplementary Material, Fig. S1), excluding the first 4 anterior cells in the head and the last 4 posterior cells in the tail. These cells were excluded, as they are less subject to degeneration and difficult to analyze due to their small size and their heterogeneous mitochondrial pattern. Individual muscle cell mitochondrial pattern was categorized as (i) tubular, (ii) fragmented, (iii) intermediate or (iiii) absent. Interconnected mitochondria profile, as described by Tan *et al.* (12), was also observed in some muscle cells of the LS762 strain. However, these cells were classified as tubular. The mitochondrial pattern of a given muscle cell was stated as 'tubular' if almost all mitochondria had a length/width ratio of >2, 'fragmented' if most of the mitochondria had a spherical pattern (length/width ratio of ~1), 'intermediate' if one can clearly observe a mix of tubular and fragmented pattern. All experiments were performed in duplicate and were repeated at least three times.

IP3R sequence comparison

IP3R sequences were obtained from the NCBI website. *Homo sapiens* type 1 isoform 1, NP_001093422.2; *Mus musculus* type 1, NP_034715.3; *Rattus norvegicus* type 1, NP_001007236.1; *Danio rerio* type 1, XP_696007.5; *Drosophila melanogaster* isoform B, AAN13240.1 and *C. elegans*, NP_001023173.1. Cytochrome *c*-binding domain was identified in the different sequences by alignment studies using the amino acids 2621–2636 of the type I IP3R rat sequence published by Boehning *et al.* (31). Alignments were performed with MUSCLE, Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation. Alignment presented in Figure 6 was designed manually under Photoshop environment based on MUSCLE alignment.

Cytochrome *c* sponge generation and expression in *C. elegans*

To amplify the cytochrome *c* binding sequence encoded by the *itr-1* gene, a PCR fragment encompassing the full *itr-1* C-terminal sequence (starting from the end of the last transmembrane domain) was amplified using *C. elegans* cDNA material

(primers available in Supplementary Material, Fig. S9) (this fragment encodes ITR-1 amino acids sequence 2703–2846 and is named Sp-cyc). An HA-tag sequence was introduced in the 3' primer for the construct Sp-cyc-HA to allow *in situ* validation of the peptide expression in the nematode. In addition, forward and reverse primers contained an *Xba*I and *Nco*I site, respectively. PCR products were introduced in the *Xba*I/*Nco*I sites of the pKG123 plasmid, downstream of a muscle-specific promoter (*Pmyo-3*) and upstream of the *unc-54* 3'UTR. Resulting plasmids were named pKG160 and pKG159, respectively. Young adult hermaphrodites of the N2 strain were injected with 25 ng/μl pKG160 (*Pmyo-3::Sp-cyc::HA-tag::unc-54* 3'UTR) or pKG159 (*Pmyo-3::Sp-cyc::unc-54* 3'UTR) and with (i) 2.5 ng/μl pCFJ90 (*Pmyo-2::mCherry*) as selection marker (Addgene) for the construct with HA tag, or (ii) with 2.5 ng/μl pCFJ90 (*Pmyo-2::mCherry*) and 5 ng/μl pCFJ104 (*Pmyo-3::mCherry*) (Addgene) as selection markers for the construct without an HA tag. Plasmid microinjection was performed as described (50). Individual wild-type F1 expressing mCherry in pharyngeal muscles were isolated and two different lines retained for each construct that were positive for the injection marker in the F2 generation. Transgenics lines were then crossed with the LS761 line to test the effect of tagged or not tagged sponges against muscle degeneration. Expression of the Sp-cyc-HA construct was assessed in N2, checking the presence of a mosaic HA signal in the muscle tissue. Worms were analyzed by immuno-chemistry on whole-mount preparations as described by Benian *et al.* (51). Secondary Alexa 555 goat anti-mouse antibody (Invitrogen) was used to reveal the primary mouse anti-HA antibody (Santa Cruz). Imaging was carried out as stated above.

Yeast two-hybrid experiments

To carry out this yeast two-hybrid assays, bait and prey vectors from Clontech (Palo Alto, CA, USA) were used. The pAS2-1 bait plasmid contains the Gal4 DNA binding domain (Gal4-BD) upstream of a polylinker. The pACT-2 prey plasmid contains the Gal4 activation domain (Gal4-AD) upstream of a polylinker.

The coding sequences of CYC-2.1 (amino acids 1–111) and ITR-1 C-ter (amino acids 2703–2846, named Sp-cyc) were amplified by PCR using *C. elegans* cDNA with the use of appropriate primers integrating *Nco*I and *Xma*I restriction sites, respectively, at 5' and 3' ends of each PCR product (Supplementary Material, Fig. S9). For the Sp-cyc-HA construct, the same ITR-1 C-ter (amino acids 2703–2846) coding sequence as for SP-cyc was amplified by PCR; the HA coding sequence was integrated to the PCR product through the 3' primer (Supplementary Material, Fig. S9). All PCR products were digested by *Nco*I/*Xma*I and cloned into the *Nco*I/*Xma*I sites of the pACT2 as well as the pAS2-1 plasmids. The resulting bait plasmids were named pKG162 (Sp-cyc sequence in pAS2-1), pKG164 (Sp-cyc-HA in pAS2-1), pKG166 (*cyc-2.1* in pAS2-1); the resulting prey plasmids were named pKG161 (Sp-cyc sequence in pACT2), pKG163 (Sp-cyc-HA in pACT2), pKG165 (*cyc-2.1* in pACT2). Bait plasmids were transformed into the yeast strain CG1945 and prey plasmids into the yeast strain Y187 using the LiAc transformation procedure (Clontech, Yeast protocols Handbook, PT 3024-1). Interactions

between Sp-cyc, Sp-cyc::HA and CYC-2.1 were assayed as described (52) after mating of transformed CG1945 yeast cells with the transformed Y187 yeast cells. Ten microliters of mating cultures were deposited on minimal medium lacking Leu and Trp (growth control) or minimal medium lacking leucine (Leu), tryptophan (Trp) and histidine (His) on which yeast can only grow if the prey and bait proteins interact, and incubated for 3 days at 30°C. The 3-AT competitive inhibitor (3-amino-1,2,4-triazol) was added at a final concentration of 30 mM, when the Sp-cyc::HA construct was used as bait.

Phylogenetic analyses

A Blastp search was performed on *C. elegans* genome (taxid: 6239) with six *M. musculus* cyclophilin sequences obtained from the NCBI website as query sequence: cyclophilin A (NP_032933.1), cyclophilin C (AAA37511.1), cyclophilin D (AAH19778.1), cyclophilin E (AAH45154.1), cyclophilin F (AAH04041.1), cyclophilin G (AAI50695.1). The *C. elegans* sequences selected are CYN-1 (CAB07303.1), CYN-2 (NP_499828.1), CYN-3 (CAA21762.1), CYN-4 (CAA85417.1), CYN-5 (CAB07192.1), CYN-6 (CCD61884.1), CYN-7 (CAA21760.1), CYN-8 (CCD64413.1), CYN-9 (CAA88291.1), CYN-10 (CCD61542.1), CYN-11 (CAA91297.1), CYN-12 (CCD66606.1), CYN-13 (CBK19486.1), CYN-14 (CAB03088.2), CYN-15 (CAB60429.1), CYN-16 (CAA19454.2). A maximum likelihood tree was constructed using SEAVIEW version 4.0, based on MUSCLE alignment (MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation). The *C. elegans* carbonic anhydrase 4 (CAH-4) sequence (CAA92190.2) was used as an out-group. The bootstrap was performed with 500 replicates.

Zebrafish strains, injection, sorting and imaging

The *dmd*^{pc2+/-} zebrafish line was described in Berger *et al.* (25). Zebrafish were bred and maintained by standard protocols approved by MAS/2009/05. All experiments were approved also by the University of Sydney Animal Ethics Committee. In aiming to express GFP in zebrafish muscle mitochondria, pSCAC-69 plasmid (courtesy of Dr Seok-Yong Choi), which carries GFP sequence with a mitochondrial targeting signal, was digested by *XhoI/HindIII* to remove the pEF1A promoter. Polymerase I large Klenow fragment was then used to generate blunt end. Muscle-specific alpha-actin promoter was cut from P5EA-acta1 plasmid (courtesy of Thomas Hall) using *AvaI/EcoRI*, made blunt and cloned upstream of the GFP sequence, final plasmid was named JG013. Thirty picograms of JG013 plasmid were injected into one-cell-stage embryos obtained by incrossing PC2^{+/-} animals. GFP-positive embryos were sorted using a fluorescent stereo-microscope at 1 d.p.f. Homozygous DMD *dmd*^{pc2+/+} larvae start to die from 9 d.p.f. and can usually not survive more than 30 d.p.f. Homozygous *dmd*^{pc2+/+} embryos and larvae can, therefore, only be obtained by crossing heterozygous *dmd*^{pc2+/-} adults. Homozygous *dmd*^{pc2+/+} embryos were detected, at 3 d.p.f., by birefringence using polarized light and two circular polarized filters. *dmd*^{pc2-/-} and *dmd*^{pc2+/-} control siblings and *dmd*^{pc2+/+} embryos and larvae were mounted in 1% low-melting agarose supplemented with 0.02% tricaine and scanned using an LSM710 confocal microscope.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

J.G. designed research; J.G. and N.B. performed research; M.-C.M. and L.S. generated LS587, LS541, LS762 and LS761 *C. elegans* strains; J.B. and P.D.C. generated *dmd*^{pc2} zebrafish line; L.W. and T.S.B. were involved in the review process; J.G. analyzed data and J.G. and K.G. wrote the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) for providing nematode strains, Caroline Borrel for the management of the Geneservice RNAi Library, Adam Svahn for helpful comments on this manuscript and Stefan Jünemann for sharing unpublished results on ITR-1. We thank Dr Andrew Fire for the gift of the pPD95.75 plasmid, Dr Thomas Hall for the p5EA-acta1 plasmid and Dr Seok-Yong Choi for the pSCAC-69 plasmid.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM, contract AFM_tireur, hors AO-2006) and by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR, Projet DUCHENNE_ELEGANS—ANR-07-MRAR-005). J.G. was also supported by the National Health and Medical Research Council of Australia (grant number APP1024863). P.D.C. and J.B. were supported by the National Health and Medical Research Council of Australia (grant number 1024482) and the Muscular Dystrophy Association USA (grant number 201098).

REFERENCES

1. Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C. and Kunkel, L.M. (1987) Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, **50**, 509–517.
2. Rando, T.A. (2001) The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve*, **24**, 1575–1594.
3. Manzur, A.Y., Kuntzer, T., Pike, M. and Swan, A. (2008) Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD003725.
4. Gieseler, K., Grisoni, K. and Segalat, L. (2000) Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.*, **10**, 1092–1097.
5. Giacomotto, J. and Segalat, L. (2010) High-throughput screening and small animal models, where are we? *Br. J. Pharmacol.*, **160**, 204–216.
6. Giacomotto, J., Segalat, L., Carre-Pierrat, M. and Gieseler, K. (2011) *Caenorhabditis elegans* as a chemical screening tool for the study of neuromuscular disorders. Manual and semi-automated methods. *Methods*, **56**, 103–113.
7. Carre-Pierrat, M., Lafoux, A., Tanniu, G., Chambonnier, L., Divet, A., Fougereousse, F., Huchet-Cadiou, C. and Segalat, L. (2011) Pre-clinical study of 21 approved drugs in the mdx mouse. *Neuromuscul. Disord.*, **21**, 313–327.
8. Giacomotto, J., Pertl, C., Borrel, C., Walter, M.C., Bulst, S., Johnsen, B., Baillie, D.L., Lochmuller, H., Thirion, C. and Segalat, L. (2009) Evaluation

- of the therapeutic potential of carbonic anhydrase inhibitors in two animal models of dystrophin deficient muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 4089–4101.
9. Mariol, M.C. and Segalat, L. (2001) Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. *Curr. Biol.*, **11**, 1691–1694.
 10. Mariol, M.C., Martin, E., Chambonnier, L. and Segalat, L. (2007) Dystrophin-dependent muscle degeneration requires a fully functional contractile machinery to occur in *C. elegans*. *Neuromuscul. Disord.*, **17**, 56–60.
 11. Chan, D.C. (2012) Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu. Rev. Genet.*, **46**, 265–287.
 12. Tan, F.J., Husain, M., Manlandro, C.M., Koppenol, M., Fire, A.Z. and Hill, R.B. (2008) CED-9 and mitochondrial homeostasis in *C. elegans* muscle. *J. Cell Sci.*, **121**, 3373–3382.
 13. Detmer, S.A. and Chan, D.C. (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 870–879.
 14. Green, D.R. and Kroemer, G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, **305**, 626–629.
 15. Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, **15**, 2922–2933.
 16. Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W. et al. (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, **434**, 658–662.
 17. Tiepolo, T., Angelin, A., Palma, E., Sabatelli, P., Merlini, L., Nicolosi, L., Finetti, F., Braghetta, P., Vuagniaux, G., Dumont, J.M. et al. (2009) The cyclophilin inhibitor Debio 025 normalizes mitochondrial function, muscle apoptosis and ultrastructural defects in Col6a1^{-/-} myopathic mice. *Br. J. Pharmacol.*, **157**, 1045–1052.
 18. Matsuda, S. and Koyasu, S. (2000) Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*, **47**, 119–125.
 19. De Luca, A., Nico, B., Liantonio, A., Didonna, M.P., Fraysse, B., Pierno, S., Burdi, R., Mangieri, D., Rolland, J.F., Camerino, C. et al. (2005) A multidisciplinary evaluation of the effectiveness of cyclosporine a in dystrophic mdx mice. *Am. J. Pathol.*, **166**, 477–489.
 20. Broekemeier, K.M., Dempsey, M.E. and Pfeiffer, D.R. (1989) Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **264**, 7826–7830.
 21. Azzolin, L., von Stockum, S., Basso, E., Petronilli, V., Forte, M.A. and Bernardi, P. (2010) The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett.*, **584**, 2504–2509.
 22. Claros, M.G. and Vincens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.*, **241**, 779–786.
 23. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806–811.
 24. Kamp, F., Exner, N., Lutz, A.K., Wender, N., Hegemann, J., Brunner, B., Nuscher, B., Bartels, T., Giese, A., Beyer, K. et al. (2010) Inhibition of mitochondrial fusion by alpha-synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *EMBO J.*, **29**, 3571–3589.
 25. Berger, J., Berger, S., Jacoby, A.S., Wilton, S.D. and Currie, P.D. (2011) Evaluation of exon-skipping strategies for Duchenne muscular dystrophy utilizing dystrophin-deficient zebrafish. *J. Cell. Mol. Med.*, **15**, 2643–2651.
 26. Kim, M.J., Kang, K.H., Kim, C.H. and Choi, S.Y. (2008) Real-time imaging of mitochondria in transgenic zebrafish expressing mitochondrially targeted GFP. *Biotechniques*, **45**, 331–334.
 27. Zamzami, N. and Kroemer, G. (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 67–71.
 28. Vincelli, A.J., Pottinger, D.S., Zhong, F., Hanske, J., Rolland, S.G., Conradt, B. and Pletneva, E.V. (2013) Recombinant expression, biophysical characterization, and cardiolipin-induced changes of two *Caenorhabditis elegans* cytochrome *c* proteins. *Biochemistry*, **52**, 653–666.
 29. Abdelwahid, E., Rolland, S., Teng, X., Conradt, B., Hardwick, J.M. and White, K. (2011) Mitochondrial involvement in cell death of non-mammalian eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**, 597–607.
 30. 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.
 31. Boehning, D., van Rossum, D.B., Patterson, R.L. and Snyder, S.H. (2005) A peptide inhibitor of cytochrome *c*/inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding blocks intrinsic and extrinsic cell death pathways. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 1466–1471.
 32. Galvan, D.L. and Mignery, G.A. (2002) Carboxyl-terminal sequences critical for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subunit assembly. *J. Biol. Chem.*, **277**, 48248–48260.
 33. Walker, D.S., Gower, N.J., Ly, S., Bradley, G.L. and Baylis, H.A. (2002) Regulated disruption of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in *Caenorhabditis elegans* reveals new functions in feeding and embryogenesis. *Mol. Biol. Cell.*, **13**, 1329–1337.
 34. Yin, X., Gower, N.J., Baylis, H.A. and Strange, K. (2004) Inositol 1,4,5-trisphosphate signaling regulates rhythmic contractile activity of myoepithelial sheath cells in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell.*, **15**, 3938–3949.
 35. Gower, N.J., Walker, D.S. and Baylis, H.A. (2005) Inositol 1,4,5-trisphosphate signaling regulates mating behavior in *Caenorhabditis elegans* males. *Mol. Biol. Cell.*, **16**, 3978–3986.
 36. Kirschner, J., Schessl, J., Schara, U., Reitter, B., Stettner, G.M., Hobbiebrunken, E., Wilichowski, E., Bernert, G., Weiss, S., Stehling, F. et al. (2010) Treatment of Duchenne muscular dystrophy with cyclosporin A: a randomised, double-blind, placebo-controlled multicentre trial. *Lancet Neurol.*, **9**, 1053–1059.
 37. Stupka, N., Gregorevic, P., Plant, D.R. and Lynch, G.S. (2004) The calcineurin signal transduction pathway is essential for successful muscle regeneration in mdx dystrophic mice. *Acta Neuropathol.*, **107**, 299–310.
 38. Reagan-Shaw, S., Nihal, M. and Ahmad, N. (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.*, **22**, 659–661.
 39. Reutenauer, J., Dorchies, O.M., Patthey-Vuadens, O., Vuagniaux, G. and Ruegg, U.T. (2008) Investigation of Debio 025, a cyclophilin inhibitor, in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *Br. J. Pharmacol.*, **155**, 574–584.
 40. Millay, D.P., Sargent, M.A., Osinska, H., Baines, C.P., Barton, E.R., Vuagniaux, G., Sweeney, H.L., Robbins, J. and Molkentin, J.D. (2008) Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat. Med.*, **14**, 442–447.
 41. Palma, E., Tiepolo, T., Angelin, A., Sabatelli, P., Maraldi, N.M., Basso, E., Forte, M.A., Bernardi, P. and Bonaldo, P. (2009) Genetic ablation of cyclophilin D rescues mitochondrial defects and prevents muscle apoptosis in collagen VI myopathic mice. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 2024–2031.
 42. Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M. and Pozzan, T. (1993) Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*, **262**, 744–747.
 43. Patterson, R.L., Boehning, D. and Snyder, S.H. (2004) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 437–465.
 44. Wojcikiewicz, R.J. and Oberdorf, J.A. (1996) Degradation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors during cell stimulation is a specific process mediated by cysteine protease activity. *J. Biol. Chem.*, **271**, 16652–16655.
 45. Vazquez-Manrique, R.P., Nagy, A.I., Legg, J.C., Bales, O.A., Ly, S. and Baylis, H.A. (2008) Phospholipase C-epsilon regulates epidermal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.*, **4**, e1000043.
 46. Vafai, S.B. and Mootha, V.K. (2012) Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature*, **491**, 374–383.
 47. Percival, J.M., Siegel, M.P., Knowels, G. and Marcinek, D.J. (2013) Defects in mitochondrial localization and ATP synthesis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy are not alleviated by PDE5 inhibition. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 153–167.
 48. Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M. et al. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, **421**, 231–237.
 49. Waterston, R.H., Hirsh, D. and Lane, T.R. (1984) Dominant mutations affecting muscle structure in *Caenorhabditis elegans* that map near the actin gene cluster. *J. Mol. Biol.*, **180**, 473–496.
 50. Mello, C. and Fire, A. (1995) DNA transformation. *Methods Cell Biol.*, **48**, 451–482.
 51. Benian, G.M., Tinley, T.L., Tang, X. and Borodovsky, M. (1996) The *Caenorhabditis elegans* gene unc-89, required for muscle M-line assembly, encodes a giant modular protein composed of Ig and signal transduction domains. *J. Cell Biol.*, **132**, 835–848.
 52. Grisoni, K., Gieseler, K., Mariol, M.C., Martin, E., Carre-Pierrat, M., Moulder, G., Barstead, R. and Segalat, L. (2003) The stn-1 syntrophin gene of *C. elegans* is functionally related to dystrophin and dystrobrevin. *J. Mol. Biol.*, **332**, 1037–1046.

SUPPORTING INFORMATION

Strain name	Genotype
N2	wild type (wt)
LS292	dys-1(cx18) I
PD4613	hlh-1(cc561) II
LS587	dys-1(cx18) I; hlh-1(cc561) II
PD4251	ccIs4251 I; dpy-20(e1282) IV
LS541	dys-1(cx18) ccIs4251 I
LS762	ccIs4251 I; hlh-1(cc561) II
LS761	dys-1(cx18) ccIs4251 I; hlh-1(cc561) II; dpy-20(e1282) IV

Table S1 : Names and genotypes of the various *C. elegans* strain used in this study.

PLC	Mus musculus homolog	sequence name	Primers used to generate dsRNA		RNAi (cDNA targetted/cDNA length)
<i>plc-1</i>	phospholipase C epsilon	F31B12.1	CGAAAAATGATCTTCGCCAT	GCCGACTGATTGTTGGTTTT	77-803/5697
<i>plc-2</i>	phospholipase C beta	Y75B12B.6	AAACGAGGCTAATTTAGATTCC	CACAACCTCCATTTCTCTCAAAC	817-1924/2691
<i>plc-3</i>	phospholipase C gamma	T01E8.3	GCGGGTACCTACTGAAACCA	TTTTGGATTTGGAGGAATGC	3248-4053/4053
<i>plc-4</i>	phospholipase C delta	R05G6.8	CTTCCTCCATTGCAATTCGT	TGCGTTTGAAACATCACCAT	1188-2246/2256
<i>egl-8</i>	phospholipase C beta	B0348.4	GCAGATCCGGACAGAAAGAG	CAAGTTGGTGACGTTTCGATG	771-1507/4296
<i>pll-1</i>	Inactive PLC isozyme	K10F12.3	TAGCGTGACCGATAATCC	TACGAAGTGTCCEAAGGACC	1733-2564/3228

CYC	<i>mus musculus</i> cytochrome c (CAA25899.1) homology	sequence name	Primers used to generate dsRNA		RNAi (cDNA targetted/cDNA length)
<i>cyc-1</i>	22,86%	C54G4.8	TTTCTGCGACTTCGTGAATG	CGACGTGGTACGTAATGCAG	1-810/858
<i>cyc-2.1</i>	58,65%	E04A4.7	GGAAAAGGAAAACGAATTTAGGA	AITTTAAGGGCAAACCTTTTCAG	1-336/336
<i>cyc-2.2</i>	58,65%	ZC116.2	ACAGATGTTTCCAACTCCAGA	TTACTCGTAATCCACGTTTCGTT	1-372/372

Table S2 : *C. elegans* *plc* and *cyc* genes

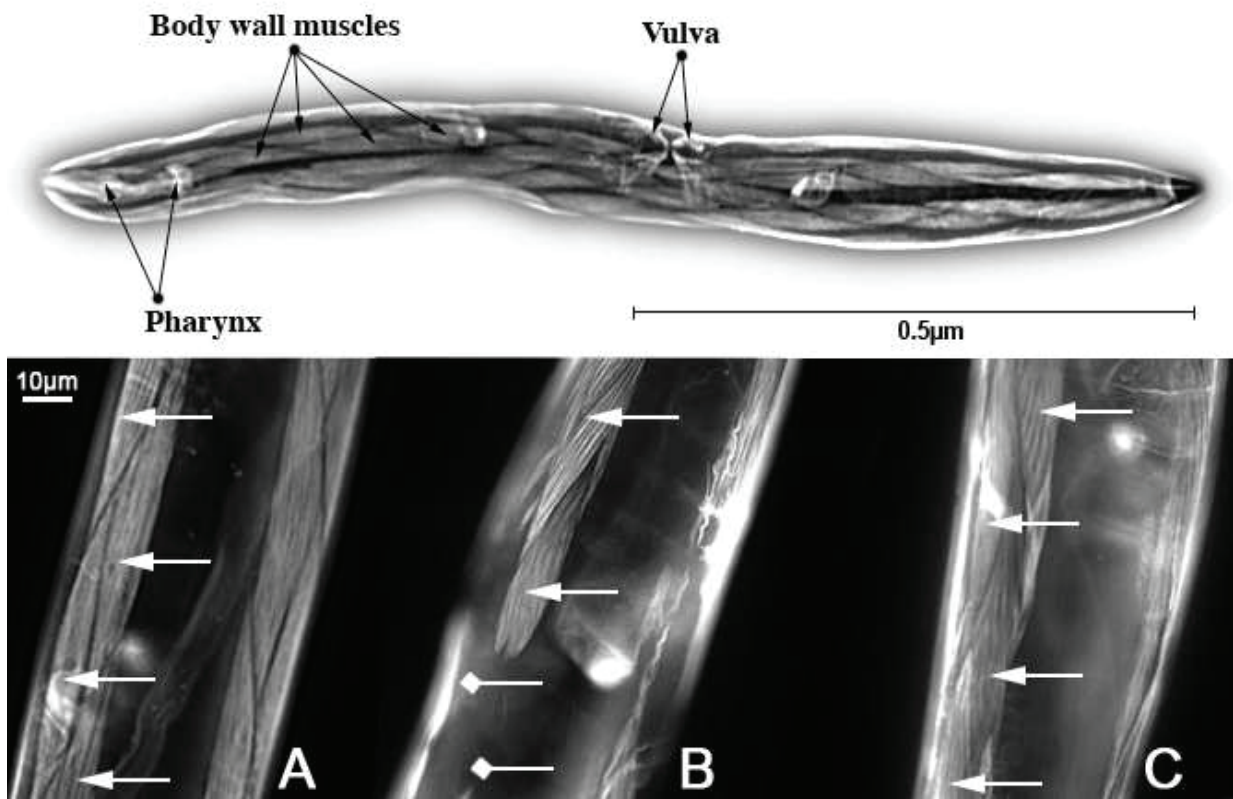


Figure S1: Phalloidin-rhodamine staining of actin filaments in striated muscles of *C. elegans*.

The top panel shows an entire wild-type nematode stained for actin with phalloidin-rhodamine. Vulval, pharyngeal and some of the 95 diamond shaped striated body wall muscles are pointed with arrows. The lower panel shows striated body-wall muscles cells (arrow) of a wild-type animal (**A**), of a dystrophic LS587 *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutant worm (**B**), and of a dystrophic LS587 *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutant treated with cyclosporine A (100nM) (**C**). Dystrophic *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutants show a high number of degenerating muscles cells (diamond arrows in B) rarely seen in cyclosporine A treated animals (panel C). All animals were grown 7 days at 15°C, and were observed after phalloidin-rhodamine staining.

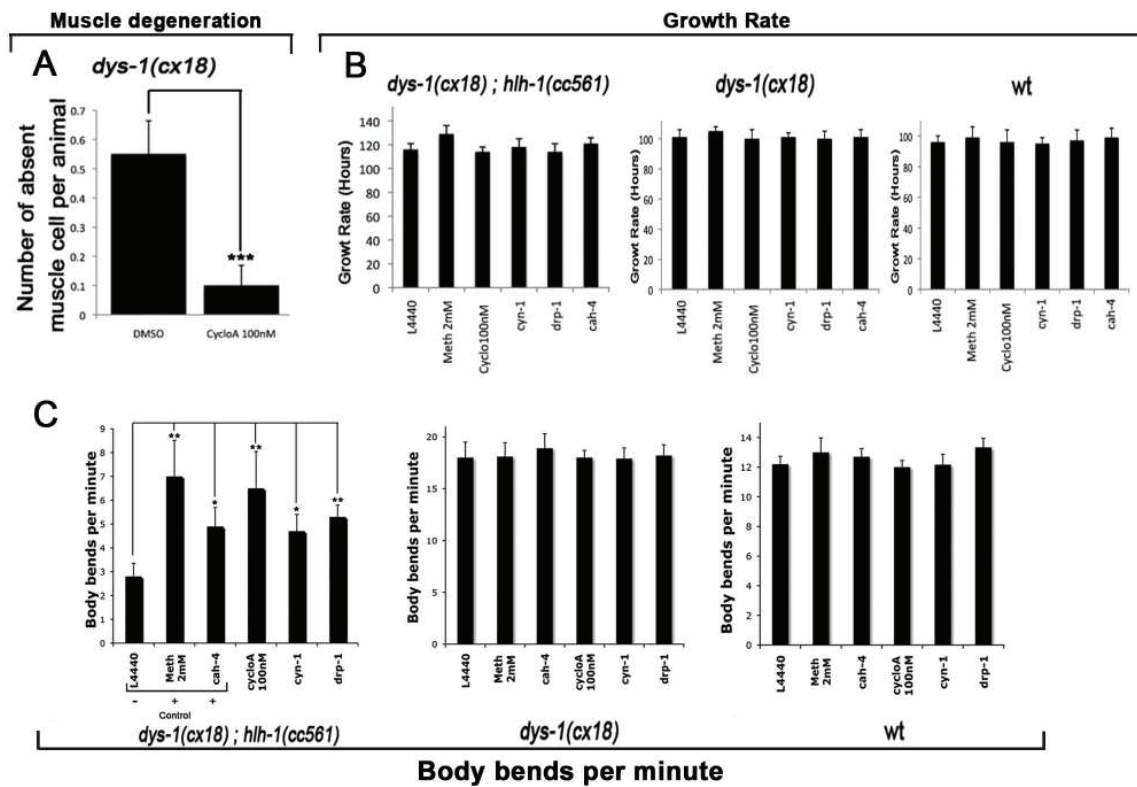


Figure S2: Effects of drug and RNAi treatments upon muscle degeneration and growth rate.

A, Effect of cyclosporine A treatment on muscle degeneration of single *dys-1(cx18)* mutants.

B, Effect of dsRNA exposure and chemical treatment on growth rate of *dys-1(cx18); hih-1(cc561)* double mutants, *dys-1(cx18)* single mutants, and wild-type (wt) worms. Growth rate correspond to the time (in hours) from eggs to reproductive adult worms. **C**, Effect of chemical treatments and knockdown experiments on locomotion rate of *dys-1(cx18); hih-1(cc561)*, *dys-1(cx18)* and wild-type (wt) animals. L4440, bacteria carrying an empty vector (negative control). *cah-4*, Carbonic Anhydrase 4 (positive control). Meth, methazolamide (Carbonic Anhydrase inhibitor, positive control). CycloA, cyclosporine A. Animals were grown 8 days at 15°C unless stated otherwise. Mean of 20 nematodes \pm Standard Error of the Mean (SEM). Different from control at *P < 0.05, **P < 0.02, ***P < 0.01.

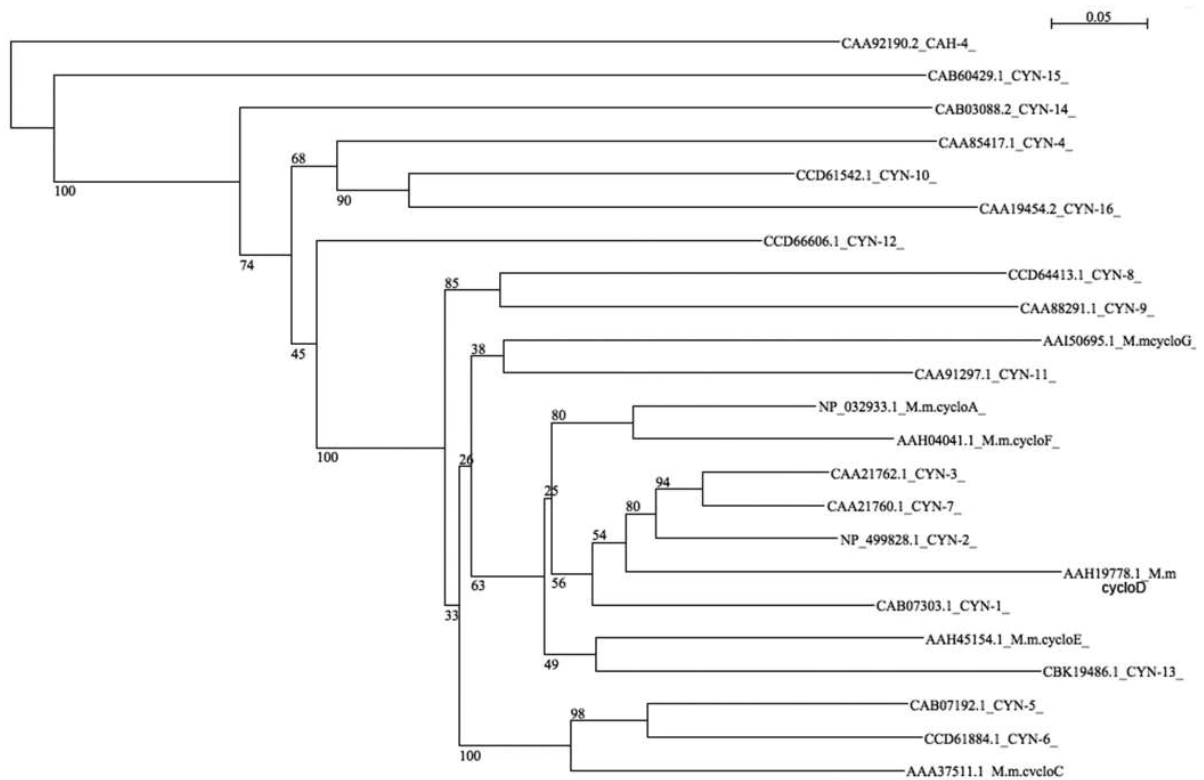


Figure S3: Phylogenetic relationship of *Mus musculus* (M.m) and putative *C. elegans* cyclophilins (CYN-1 to -16).

The tree was constructed by the maximum likelihood method. The number at each node represents bootstrap values from 500 replicates. The *C. elegans* Carbonic Anhydrase 4 (CAH-4) was used as outgroup. The bar indicates the number of substitutions per site.

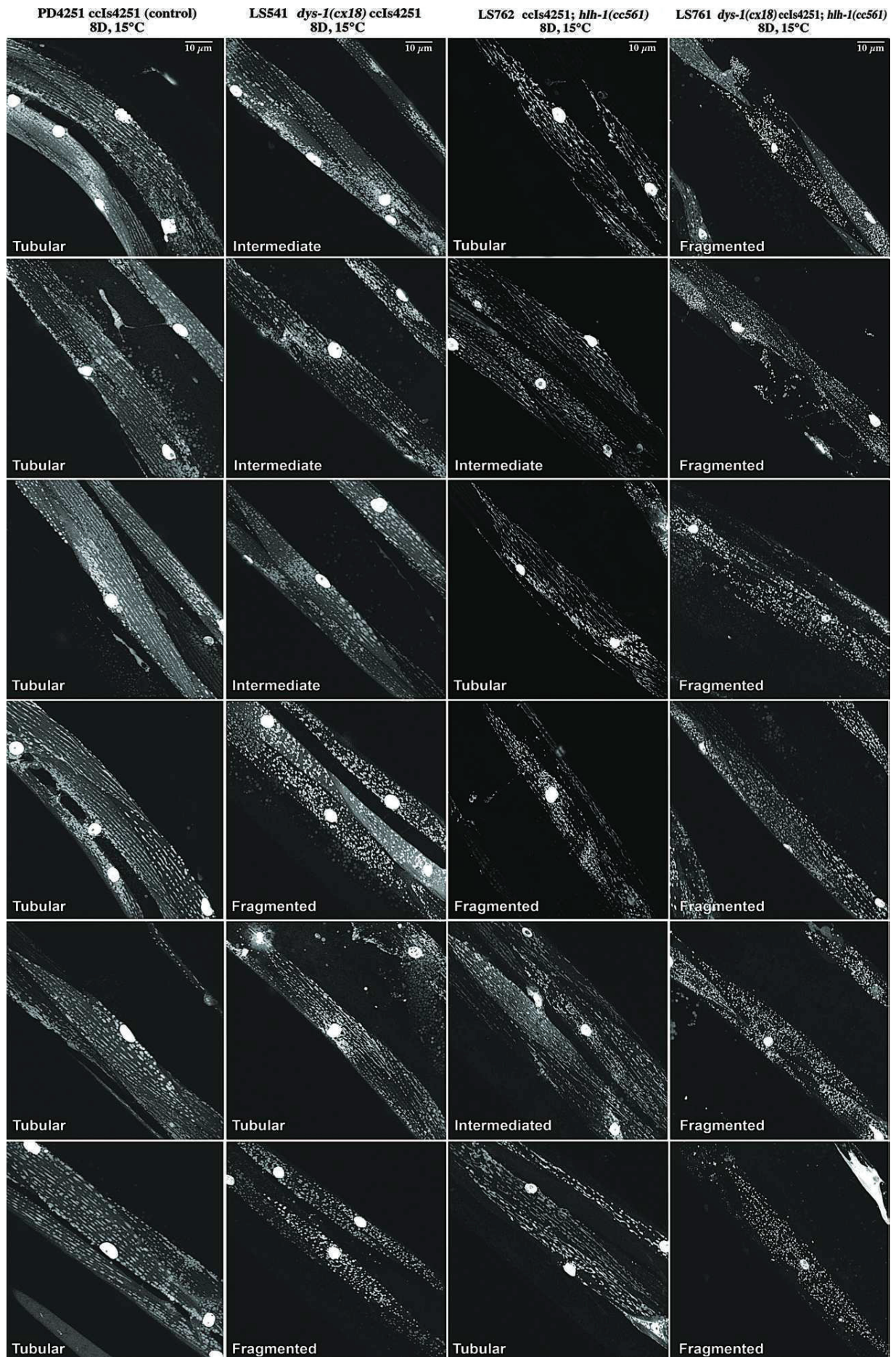


Figure S4: Confocal microscopy images of mitochondrial morphology in different *C. elegans* strains.

LS541 *dys-1(cx18) ccl/s4251*, LS762 *hlh-1(cc561) ccl/s4251* and LS761 *dys-1(cx18) ccl/s4251; hlh-1(cc561)* mutant animals present muscle cells exhibiting abnormal mitochondrial fragmentation when compared to control animals (PD4251 *ccl/s4251* strain). Animals were grown 8 days at 15°C.

24 *Human Molecular Genetics*, 2013

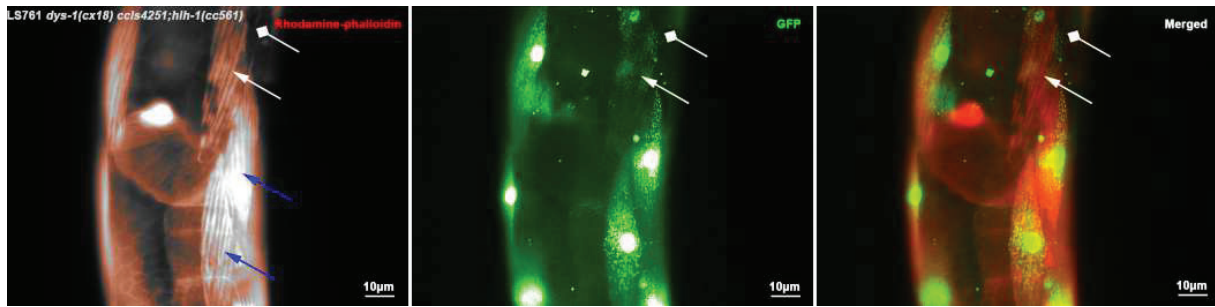


Figure S5: Mitochondrial fragmentation pattern appears before actin filament abnormalities in muscle cells of dystrophin-deficient nematodes.

Mitochondria (GFP, green) of LS761 *dys-1(cx18) ccls4251; hhh-1(cc561)* mutants exhibit a fragmented pattern before disruption of actin filaments stained with phalloidin-rhodamine (red) can be detected (muscle cell indicated by blue arrows). The mitochondrial GFP signal starts to disappear in cells that present first signs of actin filament disruption (white arrow). The mitochondrial GFP signal is no longer visible after muscle cell degeneration/death (diamond arrow). Animals were grown 8 days at 15°C.

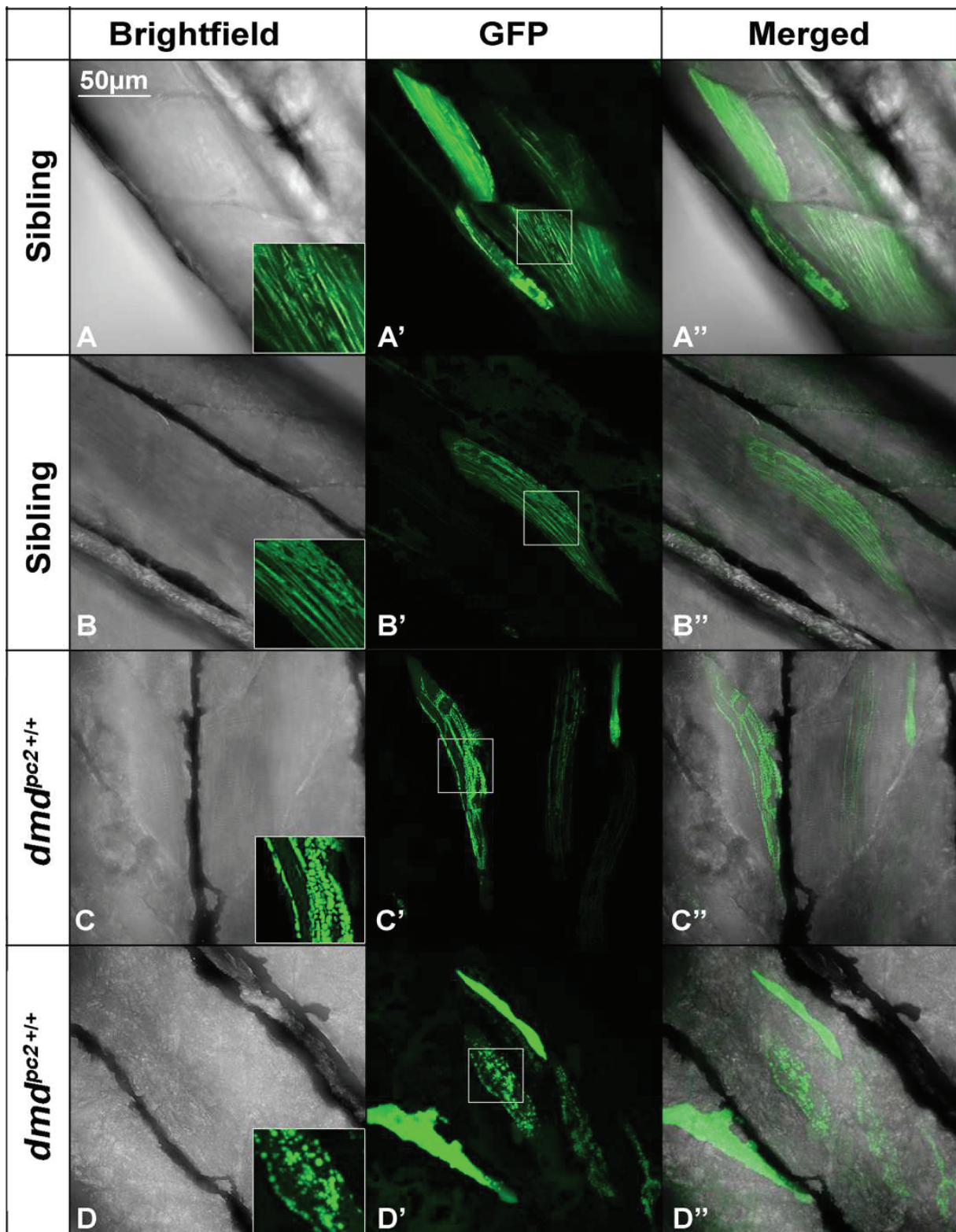


Figure S6: Representative images of the mitochondrial network in muscle fibers of 6 dpf wild type and *dmd^{pc2+/+}* zebrafish larvae.

26 *Human Molecular Genetics, 2013*

A, B, Control siblings still present a mitochondrial network with a tubular pattern. **C, D**, Muscle fibers of *dmd*^{pc2+/+} zebrafish larvae present a highly fragmented mitochondrial network.

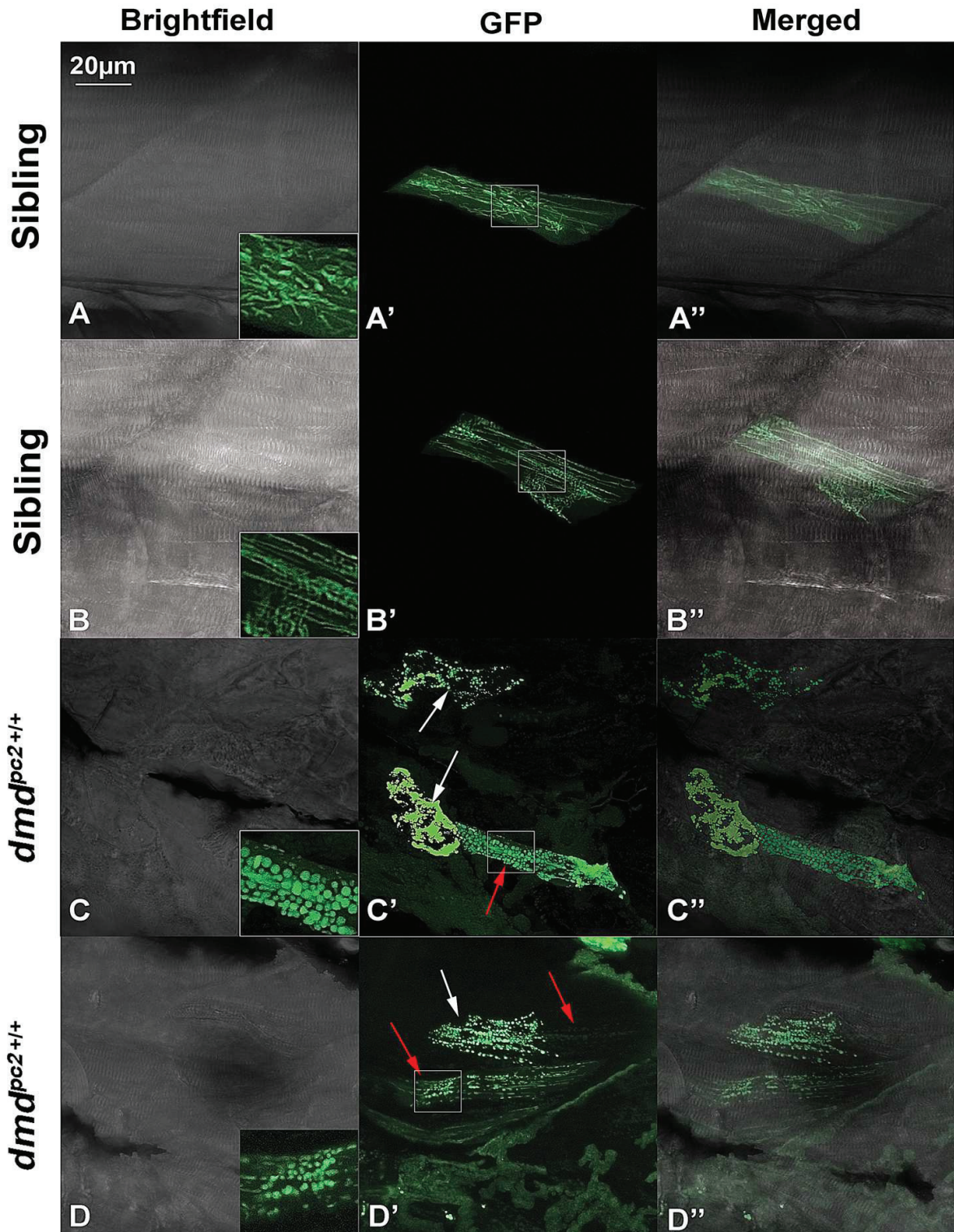


Figure S7: Representative images of mitochondrial network observed in muscle fibers of 4dpf wild type and *dmd^{pc2+/+}* zebrafish larvae.

At 4dpf, wild-type zebrafish larvae (A, B) exhibit muscle fibers with tubular mitochondria whereas *dmd^{pc2+/+}* homozygote zebrafish embryos (C, D) present mostly muscle fibers with

28 *Human Molecular Genetics, 2013*

fragmented mitochondria. At this stage, in *dmd^{pc2+/+}* larvae some muscle fibers lost the myotendinous junctions and appear retracted (white arrows), these fibers always exhibit a strongly fragmented mitochondrial network. Mitochondria in fibers that are still attached to the myoseptum (red arrows) present a milder fragmented phenotype, but are also strongly fragmented compared to control siblings. Note in C', a non-detached muscle fiber (red arrow), which presents sign of tearing at the right portion of the fiber.

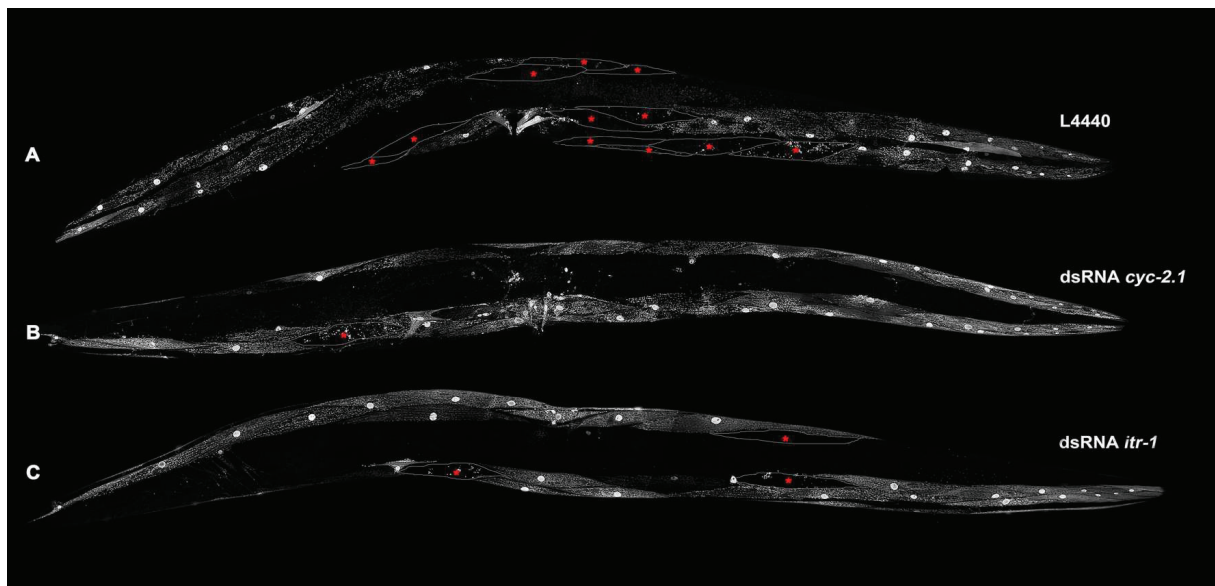


Figure S8: Confocal microscopy images of mitochondrial GFP of the DMD worm model LS761 *dys-1(cx18) ccls4251; hlh-1(cc561)* subjected or not to RNAi.

Confocal microscopy images of mitochondrial GFP pattern observed in LS761 *dys-1(cx18) ccls4251; hlh-1(cc561)* animals subjected to control (A), *cyc-2.1* (B) or *itr-1* (C) RNAi.

Absent muscle cells are underlined and marked by a red *. Animals were grown 8 days at 15°C.

30 *Human Molecular Genetics, 2013*

	Forward Primer	Reverse primer
cyclophilin		
cyn-1	AATTGAGCTCAATTTCTACTCCGTGCCTCC	AATTCTCGAGTCTTCAACTCTCCGCAATCG
cyn-5	AATTGAGCTCGAAGTCGCTTCTTGTGTGG	AATTCTCGAGTCGCGTTCAACAGAGAATGG
cyn-7	AATTGAGCTCGAAAACCAACCGGACGTATC	AATTCTCGAGTTGCTGACGATGTCCAATCC
cyn-10	AATTGAGCTCTAGTCACACTTCACACCACTTCC	AATTCTCGAGTTTGCTGAACGAGAGGTCTG
cyn-13	AATTGAGCTCTTGCACCGAGAAAACCGATTGG	AATTCTCGAGCCTTCTGGGCAATTTTTC
cyn-14	AATTGAGCTCGAAGACGAGGGAAAACTGC	AATTCTCGAGTACCTTCTACGTCTTGCTGG
cyn-15	AATTGAGCTCGGAATGATCGAATGCTGGAACG	AATTCTCGAGAATTGGTGTCCGGTAGAGAAGG
cyn-16	AATTGAGCTCGTTGGAATGGCAAATGCTGG	AATTCTCGAGCCAATTCTTGCTCATCCTC
cytosome c sponge Y2H		
without HA-tag	AATTTCTAGAAATGGATTTGAGAGCCGAGAAAAACGAG	AATTCCATGGCTAACGAGGCTGAAATTGTTCC
with HA-tag	AATTTCTAGAAATGGATTTGAGAGCCGAGAAAAACGAG	AATTCCATGGCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG GGTAACGAGGCTGAAATTGTTCC
cyc-2.1	AATCCATGGTGTCCGATATCCAGCTGG	AATCCCGGGTTAGAGGGACTTGGCGGATTCAACC
cytochrome c sponge Injection		
without HA-tag	AATTTCTAGAAATGGATTTGAGAGCCGAGAAAAACGAG	AATTCCATGGCTAACGAGGCTGAAATTGTTCC
with HA-tag	AATTTCTAGAAATGGATTTGAGAGCCGAGAAAAACGAG	AATTCCATGGCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG GGTAACGAGGCTGAAATTGTTCC

Figure S9: Primers used to generate constructs encoding the SP-cyc and SP-cyc-HA sponges and cyclophilin PCR fragment inserted into the RNAi L4440 plasmid.

Video S1: Behavioral and fluorescent pattern of PD4251 *cc/s4251* (A), LS541 *dys-1(cx18) cc/s4251* (B), LS762 *cc/s4251; hlh-1(cc561)* (C) and LS761 *dys-1(cx18) cc/s4251; hlh-1(cc561)* nematodes (D).

The *cc/s4251* transgene leads to GFP localization in muscle nuclei (green dots) and mitochondria in all strains. Double mutant LS761 animals present a strong paralysis due to muscle degeneration and muscle cell loss. Absent muscle cells in the double mutant LS761 can be detected *in vivo* by the loss of the nuclear GFP-signal. Animals cultured 7 days at 15°C.

III. Article n°3 (en préparation)

The ultrastructural and chronological study of muscle degeneration and its recovery highlights a crucial role for exercise and plasma membrane repair

Nicolas Brouilly, Claire Lecroisey, Edwige Martin, Hiroshi Qadota, Michel Labouesse, Nicole Mounier and Kathrin Gieseler

L'observation de l'ultrastructure de muscles dystrophine-déficients a été menée dans divers organismes modèles vertébrés de la DMD et l'analyse de biopsies de patients par microscopie électronique à transmission est une expérience fréquente dans le diagnostic de la maladie. Ces approches ont démontré différentes altérations de la morphologie des cellules (structures d'ancrage altérées, trous dans le sarcolemme, accumulation de lipofuscine et de vésicules). En revanche, ces approches ne permettent pas d'apprécier la chronologie du processus de dégénérescence sur plusieurs points dans le temps. En effet, en raison du phénomène de régénérescence des cellules musculaires, le niveau de dégénérescence est hétérogène d'une fibre à l'autre. De plus, il est impossible de savoir si la région de fibre observée présente des caractéristiques morphologiques reflétant sa dégénérescence ou au contraire sa régénérescence.

L'absence de régénérescence musculaire chez *C. elegans*, le fait que ses cellules soient individuellement identifiables et sa petite taille en font un organisme modèle de choix pour décrire morphologiquement la chronologie du processus de dégénérescence par microscopie électronique. Nous avons entrepris la caractérisation de tout le processus de dégénérescence en observant les vers du stade suivant l'éclosion au stade adulte où les cellules ont souvent atteint le stade le plus tardif du processus qui est défini par leur disparition.

Dans un premier temps, nous avons analysé la « cartographie » de la dégénérescence en identifiant la probabilité de dégénérescence pour chacun des 95 « *body wall muscle* » par microscopie optique. Par cette approche, nous avons montré que 1. le phénomène de dégénérescence est « *cell autonomous* » et 2. les cellules se trouvant au centre du ver – selon l'axe antéro-postérieur – présentaient une probabilité de dégénérescence plus élevée. Nous avons entrepris l'observation des vers par microscopie électronique dans cette région afin de normaliser l'expérimentation et d'augmenter la fréquence d'observation de cellules en dégénérescence.

L'observation par microscopie électronique des cellules de vers *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* du stade L1 à adulte, nous a permis d'identifier différents défauts morphologiques

potentiellement impliqués dans les phénotypes décelés par microscopie optique (réseau d'actine sarcomérique, Gieseler *et al.*, 2000 ; réseau mitochondrial, Giacomotto *et al.*, 2013). Nous avons également observé l'activation de mécanismes cellulaires et proposé de nouvelles hypothèses quand à la physiopathologie de la dégénérescence musculaire dystrophine-dépendante et au type de mort cellulaire impliqué.

Comme chez les patients et les modèles animaux vertébrés de la DMD, nous avons observé l'apparition de trous dans le sarcolemme, ainsi que l'accumulation de vésicules et l'altération des structures d'ancrage des filaments contractiles. De plus, l'altération du réseau mitochondrial a été confirmée par reconstruction 3D d'une portion de cellule en dégénérescence à partir de coupes sériées.

Enfin, nous avons évalué l'implication de l'exercice dans le processus de dégénérescence musculaire. Lorsque les vers sont placés dans des conditions assimilables à un exercice de force, leur dégénérescence musculaire augmente. Au contraire, sous des conditions assimilables à un exercice d'endurance, la dégénérescence musculaire diminue.

The ultrastructural and chronological study of muscle degeneration and its recovery in *C. elegans* highlights a crucial role for exercise

Nicolas Brouilly^{1,2}, Claire Lecroisey^{1,2}, Edwige Martin^{1,2}, Hiroshi Qadota³ Michel Labouesse⁴, Nicole Mounier^{1,2}, Kathrin Gieseler^{1,2}

¹Université Claude Bernard Lyon 1, 43 boulevard du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France

²Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaires et Cellulaires, CNRS UMR 5534, 16 rue Dubois, 69622 Villeurbanne, France

³Emory University, Atlanta GA, Department of Pathology, 615 Michael St, Whitehead 165, Atlanta, GA 30322 USA

⁴Intitut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 7104 - Inserm U 964,
1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch CEDEX

Keywords (à mettre à jour après titre définitif) : *Caenorhabditis elegans*, muscle degeneration, dystrophin, Duchenne Muscular Dystrophy, DAPC, DGC, transmission electron microscopy, TEM, plasma membrane repair, prednisone, zyxin, exercise, Lifeact

INTRODUCTION

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is an X-linked inherited disease affecting one male birth out of 3300 (ref Emery). It is characterized by a progressive muscle loss and caused by mutations in the dystrophin gene. Dystrophin is a large cytosquelettal protein localized under the sarcolemmal membrane of muscle fibers. Without functional dystrophin, muscle fibers lose their sarcolemmal integrity and degenerate through necrosis that triggers a worsening immune response (ref). Despite great recent advances in the design of curative treatments, most patients currently receive a palliative treatment based on steroid molecules such as prednisone or deflazacort that are thought to act through their immunosuppressive properties (ref). These molecules only slightly slow down the progression of the disease and lead to severe side effects (ref). The physiopathology of the disease has been studied for more

than 25 years but fundamental research is still needed to reveal mechanisms involved in the disease that could be exploited as therapeutic targets.

Both vertebrates and invertebrates animal models of DMD strongly participated in the understanding of dystrophin function, in the depicting of the physiopathology and in the design and validation of therapeutic approaches.

The most prominent invertebrate model for the study of DMD is the nematode *Caenorhabditis elegans*. In *C. elegans*, the dystrophin orthologous protein is coded by the *dys-1* gene (Bessou et al., 1998). Mutations in the *dys-1* gene cause only weak muscle degeneration suggesting that the muscles of *C. elegans* are more resistant to dystrophin-dependent muscle degeneration than vertebrate muscles (Bessou et al., 1998, Gieseler et al., 2000). We have previously shown that the combination of the *dys-1(cx18)* allele with the *hllh-1(cc561)* thermo-sensitive allele in worms grown at permissive temperature is sufficient to increase the level of muscle degeneration by about 20 fold compared to *dys-1(cx18)* single mutants (Gieseler et al., 2000). This *dys-1(cx18); hllh-1(cc561)* mutant was extensively used by us and others to analyze the muscle degenerative process and to identify genetic suppressors of dystrophin-dependent muscle degeneration (Gieseler et al., 2000; Carre-Pierrat et al., 2006b; Nyamsuren et al., 2007; Lecroisey et al., 2013; Giacomotto et al., 2013). The use of this model also enabled the identification of pharmacologic molecules that inhibit the process of muscle degeneration, and some of them were validated in the murine model of DMD (Carre-Pierrat et al., 2011).

The ultrastructural observation of dystrophin-deficient muscles in animal models of DMD or from patients biopsies enabled the identification of characteristic features of degenerating muscle such as sarcolemma loss of integrity, accumulation of lipofuscin and vesicles, alteration of the structural components of the muscle (reviewed in Cullen and Watkins, 1993; Nakae et al., 2004). However, because of the heterogeneity in the level of muscle degeneration between different fibers and the muscle regeneration occurring in these organisms, it is difficult to draw the chronology of these events, to identify their interactions and to understand the physiopathology of the process. The absence of muscle regeneration in *C. elegans*, the fact that its cells are individually discernable and its small size make it an invaluable model organism for the morphological description of the chronological process of muscle degeneration by transmission electron microscopy. Here, we undertook the characterization of the entire process of muscle degeneration observing *dys-1(cx18); hllh-1(cc561)* worms during development, from hatching to adulthood where the cells often reached the later stage of the process which is defined by their total loss.

In a first step, we used optical microscopy to map the muscle degenerating cells from the 95 body wall muscle cells of *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms. We showed that the muscle degeneration process is cell autonomous and that cells in the mid-body are more likely to degenerate. We used this peculiar compartment to normalize our experiments cutting and observing muscle cells from this region by electron microscopy.

Electron microscopy highlighted a loss of sarcolemma integrity during the very first steps of the degenerating process in accordance with observations from patient biopsies and animal models. Furthermore, we observed an accumulation of subsarcolemmal vesicles reminiscent of a plasma membrane repair process. Several other morphological alterations that we observed are potentially implicated in the phenotypes previously observed by optical microscopy (sarcomeric and mitochondrial networks disruption).

In addition, we characterize for the first time the sub-cellular localization of DYS-1/dystrophine in *C. elegans*. Our results demonstrate that, similarly to vertebrates, DYS-1 exhibits a subsarcolemmal localization and co-localizes with dense bodies. Using yeast two-hybrid assays, we further showed that DYS-1 interacts with proteins that are required for the development and the maintenance of the dense bodies. Dense bodies are the functional equivalents of both Z-discs and costameres and are required for the anchoring of sarcomeres to the sarcolemma. Interestingly, in vertebrates, dystrophin co-localizes with costameres and is thought to provide a mechanical link between the sarcomere and the extra-cellular matrix.

Given our observations arguing for a mechanical hypothesis in the pathogenesis of DMD, we evaluated the implication of exercise in the muscle degeneration process. When worms are placed in conditions comparable to force exercise, their muscle degeneration increases whereas it decreases when worms are placed in conditions comparable to rest or endurance exercise. These observations could help to clarify the controverted implication of exercise in DMD patients.

Finally, our group previously showed that prednisone – the widely prescribed drug to DMD patients – reduces muscle degeneration in *C. elegans* (Gaud et al., 2004). Prednisone is thought to act against inflammatory processes that take place in the muscles of DMD patients. However, *C. elegans* does not induce an inflammation response in degenerating muscles suggesting that prednisone may act through mechanisms others than anti-inflammation. To investigate this hypothesis we observed prednisone-treated animals by electron microscopy and found that the sarcolemma loss of integrity was greatly reduced suggesting a role of the molecule in plasma membrane stabilization.

RESULTS

The DYS-1 protein exhibits a sub-sarcolemmal localization in *C. elegans* body wall muscles

The expression of the *dys-1* gene was previously reported in pharyngeal, vulval and striated body wall muscles of *C. elegans* (Bessou et al., 1998). In order to establish the subcellular localization of the DYS-1 protein in body wall muscles of adult wild-type worms we used a monoclonal antibody directed against a C-terminal region (Figure 1A-D), as well as the *dys-1::gfp* transgene (Figure 1 E-I, Bessou et al., 1998). Dense bodies and M-lines were identified using antibodies directed against UNC-95, a protein located at the basis of these two sarcomere-anchoring structures (Figure 1B and F, Broday et al., 2004). Using confocal microscopy, the DYS-1 protein was detected at I bands in the same z plan as UNC-95 (Figure 1A-C). A vertical line-plot of the DYS-1 signal showed that the fluorescence was slightly less intense at the basis of dense bodies/Z disks as indicated by double peaks within the I-band (Figure 1D) and rather excluded from the M-line. These localization patterns were confirmed using the *dys-1::gfp* transgene (Figure 1 E-H) although the DYS-1-GFP localization at I bands appears wider. In addition, the DYS-1-GFP protein localized at muscle-muscle cell junctions as well as on the apical side of the muscle cell (Figure 1H). Finally, DYS-1-GFP was observed in muscle arms, which are cellular extensions toward motoneurons to form neuromuscular junctions (Figure 1H). Using the DYS-1 monoclonal antibody no signal was detected on the apical side nor in muscle arms, probably because of the lower amounts of the endogenous protein compared to overexpressed transgenes.

We then defined more precisely the localization of the DYS-1-GFP protein in body-wall muscles by immuno-electron microscopy using the GFP monoclonal antibody on the same transgenic line as in Figure 1E-H. On transverse sections, gold beads revealed the localization of DYS-1-GFP in contact with, or close to the inner layer of the plasma membrane all around the muscle cell (Figure 1I). Most gold beads localized close to the edges of dense bodies but were rather excluded from the M line and H zone area (Figure 1I). Few gold beads were found in the central cell region of the muscle cell, which may correspond to background signal. The same immuno-gold experiments performed with the DYS-1 monoclonal antibody did not allow for the detection of a specific signal (data not shown).

Electron and confocal microscopy experiments were therefore complementary to respectively determine the apico-basal and lateral localization of the DYS-1 protein at the

plasma membrane, at muscle-muscle cell junction, I-bands and with a lower amount in the center of dense bodies bases.

DYS-1 binding partners by yeast-two hybrid

The localization of DYS-1 at dense body basis prompted us to investigate its binding partners using the yeast two-hybrid system (Figure 2). To do so, we used a construct coding the DYS-1 C-terminal (amino acid 2857 to 3674) as bait. This region is known to bind a variety of dystrophin partners in vertebrate muscle (Blake et al., 2002). Prey plasmids encode known *C. elegans* muscle proteins (Qadota et al., 2007, 2008; Xiong et al., 2009).

Among the tested proteins, DYS-1₍₂₈₅₇₋₃₆₇₄₎ binds DYB-1/dystrobrevin (Grisoni et al., 2002, Genes), UNC-15/paramyosin (Hoppe et Waterson, 2000, Genetics) and DEB-1/vinculin (Barstead et Waterston, 1989, J. Biol. Chem). The proteins that did not interact with DYS-1-Cter are ATN-1/alpha-actinin, PXL-1/paxillin, TLN-1/talin, DIM-1/Disorganized-muscle, PAT-3/beta-integrin, PAT-4/ILK, PAT-6/actopaxin, UNC-112/kindlin (Moulder et al., 1996), UNC-97/PINCH, UNC-98 and ZYX-1 (Lecroisey et al., 2013, Mol. Biol. Cell). In addition, DYS-1(2857-3674) interacts with the central rod domain of DYS-1₍₂₅₀₀₋₂₈₈₀₎ suggesting a possible homo-dimerization of the protein as observed for the vertebrate protein (Le Rumeur et al., 2012).

The four positive interactions were confirmed using two other constructs to refine the site of interaction on DYS-1: DYS-1₍₂₈₅₇₋₃₅₄₀₎ (from the central rod domain to the WW domain) and DYS-1₍₃₄₀₀₋₃₆₇₄₎ (C-terminal domain only). While DYB-1/dystrobrevin, UNC-15/paramyosin and DEB-1/vinculin interacted with the DYS-1₍₃₄₀₀₋₃₆₇₄₎ C-ter domain, the homo-dimerization of the protein would be mediated by the region between amino acids 2857 and 2880.

dys-1 mutants show weak and progressive muscle degeneration

Previous studies reported that *dys-1(cx18)* single mutants did not exhibit apparent muscle disorganization when observed by polarized light microscopy (Bessou et al., 1998). Using rhodamine-phalloidin staining of actin filaments, one degenerated muscle cell was rarely observed in adult *dys-1(cx18)* mutants at three days post-L4 stage (Mariol and Ségalat, 2001; Lecroisey et al., 2013). This muscle degenerative phenotype increases dramatically when the *dys-1(cx18)* mutation is placed in a sensitized *hll-1(cc561)* genetic background (Gieseler et al., 2000). In *dys-1(cx18); hll-1(cc561)* mutants muscle degeneration progressively increased from L4 until three days post-L4 and then reached a plateau.

To assess the evolution of muscle degeneration in *dys-1(cx18)* single mutants at the whole organism scale, worms were analyzed after rhodamine-phalloidin staining from L4 larval stage to ten days post-L4 stage (Figure 3 A-B). The number of degenerating cells constantly increased up to 1.6 degenerating cells per adult worm until six days post-L4 and then reached a plateau (Figure 1C). This observation indicates that *dys-1(cx18)* single mutants exhibit a progressive muscle degeneration phenotype, which is however weaker and slower compared to the *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutant.

Muscle degeneration predominantly occurs in the mid body

The distribution and frequency of muscle degeneration was assessed by individually mapping the degenerating cells along the four muscle quadrants in *dys-1(cx18)* single mutants and *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double-mutants. Degenerating muscle cells were observed after rhodamin-phalloidine staining of actin filaments and Hedgecock et al. (1987) indexation of *C. elegans* body-wall muscle cells was used to plot the degenerating cells along the antero-posterior axis of the worm.

No muscle degeneration was observed in wild-type worms. In *dys-1(cx18)* three days post-L4 worms, muscle cells in the mid body region of the worm showed the highest probability to degenerate (cells 13 to 18 between positions A/P = 0.405 and A/P = 0.64). In addition, cell 10 (A/P = 0.27) and cell 21 (A/P = 0,78) (Figure 4A) occasionally degenerate.

We then analyzed the evolution of the distribution and probability of muscle cell degeneration in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutants (Figure 4B). Degenerating cells were mapped in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms from the L4 larval stage (day 0) to four days post-L4 adults (day 4). The curves were progressively higher from the L4 larval stage (blue curve) to two days post-L4 (green curve) and then stagnated from two days post-L4 to four days post-L4 (red curve). This result is in accordance with the link between muscle degeneration and the progressive uncoordinated phenotype previously reported (Gieseler et al., 2000). At the L4 stage (blue curve), the first degenerative events only occurred between the positions 0.2 and 0.75 (corresponding to cells number 9 to 20). During adulthood, the occurrence of muscle degeneration roughly follows a bell-shaped curve extending from positions 0.15 to 0.90 (cells 7 to 24) and centered at the vulva region (A/P = 0.55). Between 30 to 50% of the cells of the mid body region (cells 11 to 20) were degenerating at three and four days post-L4 (orange and red curves).

This approach indicates that muscle degeneration does not occur evenly along the anteroposterior axis of the worm and that the mid-body of the worm is the region where muscle degeneration is the most likely to occur.

Muscle degeneration is a cell-autonomous phenomenon

In order to analyze whether a degenerating cell influences the probability of its neighboring cells to degenerate, adult *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms were analyzed at four days post-L4 when they exhibit the highest muscle degeneration rate of all tested conditions. The probability to degenerate for each individual muscle cell was plotted on the Hedgecock indexation schematic (Figure 4C). In accordance to the results presented above in Figure 4B, muscle degeneration never occurred in the most anterior part of the worm (cells 1 to 7 of each quadrant), but occurred frequently in the cells located in the middle region of the worm and rarely in the posterior region. Interestingly, neither the cell lineage origin of all individual 95 muscle cells (Sulston et al., 1983) nor the nature of the innervating motoneurons (Haspel and O'Donovan, 2011) seemed to be linked to the individual probability of the cells to degenerate.

Muscle degeneration frequency follows a bell-shaped curve along the antero-posterior axis (Figure 4B). Cell16 located in the mid-body of the worm exhibits a high probability to degenerate. A Chi^2 -test was used to analyze the probabilities of degeneration of the neighboring cells of cell 16 depending on its state: degenerating or healthy (Figure 4D). The Chi^2 -based approach showed that a degenerating cell 16 did not influence the probability of degeneration of its four neighboring cells. This observation indicates that muscle degeneration is a cell autonomous phenomenon.

Actin filament degradation is a progressive process that lasts about 20 hours

To further characterize the progression of actin filament degradation occurring during muscle degeneration and to estimate the timing of this process, the actin network organization was followed in alive wild-type worms and in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutants. For this purpose a LifeAct-mCherry transgene was expressed in the muscles of these worms. LifeAct constructs have already been used in several species (Riedl et al., 2008; Berepiki et al., 2010; Huang et al., 2012; Jang et al., 2012), but, to our knowledge, this is the first study using a LifeAct construct in living muscle. First, the influence of the transgene on the level of muscle degeneration was analyzed in three days post-L4 *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms. Worms carrying the LifeAct transgene did not show significantly different levels of muscle degeneration when compared to their non-transgenic siblings (Figure 5A).

Second, to assess the evolution of the morphology of actin filaments in degenerating muscle cells, *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutants carrying the LifeAct were observed every four hours during twenty hours starting from the L4 larvae stage. This approach emphasized the progressive actin network disruption that can be subdivided in 4 steps. First, the actin network appeared undulating; second, actin accumulated at the tips of the cell; third, actin formed coils; fourth actin coils progressively disappeared (Figure 5B-E, Video S1). Thus, degradation of actin filaments as observed by phalloidin-rhodamin staining or Life-Act-mCherry is one of the hallmarks of muscle degeneration in *C. elegans*, which lasts about 20 hours.

Electron micrographs on adult dystrophic worms highlight severe phenotypes

To observe the sub-cellular defects in degenerating muscle cells at higher resolution, adult *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms were analyzed at three days post-L4, using transmission electron microscopy.

Because muscle degeneration is a mosaic event and most frequently occurs in the mid-body region (Figure 6D), transverse sections were performed in the vulva region. As in *C. elegans* muscle cell do not regenerate and we showed that muscle degeneration is a cell-autonomous mechanism (Figure 6B), the observation of several cell sections allowed for the observation of the average subcellular muscle phenotype.

In wild-type adults transverse section of body wall muscle cells allowed for the observation of the myofilament lattice composed of adjacent sarcomeric bundles, which localizes near the plasma membrane facing the hypodermis. The layer of the contractile apparatus, is approximately 1,5 μm thick. Dense bodies and M-lines, which respectively link thin and thick filaments, anchor the sarcomeres to sarcolemma. Dense bodies appear as electron dense structures whereas M-line are often undistinguishable. Flattened sarcoplasmic reticulum surrounds each dense body and can also be observed adjacent to the plasma membrane underneath the lattice. The muscle belly contains the nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum and ribosomes (Figure 6A). The nucleus is seen only in few cell sections as its diameter is 5-10 μm in a cell that is about 100 μm along the antero-posterior axis.

The muscles of *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutants displayed wide and miscellaneous cellular defects (Figure 6B-F). Cell fraying or even cell fragmentation was suggested by the observation of more than 3 cell sections per quadrant (Figure 6B). In addition cell-cell adhesion issues (Figure 6E) and wide plasma membrane disruption were observed (Figure

6B). Ribosomes were seen within the actomyosin bundles of degenerating cells whereas this observation was rarely made in wild-type adult muscle (Figure 6C, D and F). The actomyosin bundles were often miss-shaped and miss-oriented (Figure 6D). Directly linked to this latter observation, dense bodies were disrupted into several pieces or totally detached from the sarcolemma (Figure 6D and Video S2). Accordingly, reminiscent dense material of disrupted dense bodies was often observed on the inner side of the sarcolemma. At a whole-cell scale these defects in actin filaments anchoring structures could explain the actin network phenotype observed by rhodamine-phalloidin and LifeAct. M-lines are not easily distinguishable by TEM in *C. elegans*. Thus, to assess their morphology, immunofluorescence experiments were carried out and stained worms were observed by optical microscopy. Similar defects such as those seen by rhodamine-phalloidin for the actin network were observed for the myosin network (Figure S1 [work in progress]). We can thus speculate that similar defects to the ones observed for dense bodies could happen to M-lines at the ultra-structural scale. A wide variety of vesicles was found in the apical part of degenerating muscle cells. Single and multi-membrane vesicles that were only rarely seen in wild-type cells were often observed in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* cells (Figure 6D and E). Finally, morphological defects in mitochondrial electron density were observed. Mitochondria were darker compared to wild-type, presented white crystals and were swollen (6C, E and F). In addition swollen endoplasmic reticulum was frequently observed in degenerating cells (Figure 6F).

As a conclusion, *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* muscle cells display severe defects in sarcomeric structures (dense bodies, M-lines, actomyosin bundles) but also alterations in non-muscle specific structures and organelles (plasma membrane, mitochondria, endoplasmic reticulum). Similar observations were made on DMD patients biopsies where the loss of plasma membrane integrity is evident as well as the accumulation of subsarcolemma vesicles, disruption of Z-disks, and swelling of endoplasmic reticulum. Moreover, mitochondria with abnormal morphology were seen in degenerating fibers (Figure S2).

Chronological analysis of the ultra-structure of the muscle degeneration phenomenon reveals miscellaneous morphological defects

To study the primary subcellular events and the morphological evolution leading to the strong sub-cellular phenotype observed in the muscles of *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutants at three day post-L4, the ultrastructure of muscle cells was observed during development. *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms and the three control strains (*dys-1(cx18)* and *hlh-1(cc561)*)

single mutants and wild-type worms) were analyzed at all stages from L1 larvae to one day-post L4, using transmission electron microscopy (Figure 7).

Because muscle degeneration is a mosaic event and most frequently occurs in the mid-body region (Figure 6), transverse sections were performed in the vulva region. As in *C. elegans* muscle cell do not regenerate and we showed that muscle degeneration is a cell-autonomous mechanism (Figure 6B), the observation of several cell sections allowed for the observation of the average subcellular muscle phenotype at a given stage. For each muscle cell section, several morphological parameters were measured (cell area and circularity; sarcomeric bundles area and circularity; mitochondria number and area; vesicles number and area; see the single mutants measures and non-significant measures in Figure S3 [work in progress]).

Using phalloidin-rhodamin staining of actin filaments, the first significant signs of muscle degeneration are classically observed at the L4 larval stage. Interestingly, observations of muscle cells by transmission electron microscopy revealed the occurrence of first significant morphological defects in muscles *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms already at the L1 stage (Figure 7A and D). At this stage, sarcomeric bundles appeared less compact and showed significantly lower circularity compared to wild-type (Figure 8A-D, $cN2=0.687\pm 0.030$ vs. $cDMD=0.571\pm 0.033$). This measure highlights a compartmentalization issue translated by abnormal localization of the sarcomeric bundles that can reach the apical cell membrane, and atypical presence of ribosomes on the basal side of the cell.

At the L2 stage, additional defects were observed in muscles of in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutants. Dense bodies were of smaller size than in wild-type. The muscle cells of *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutants sometimes had small holes in their plasma membrane. Whereas wild-type cells showed only few vesicles at this stage, *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* muscle cells often had single membrane vesicles (sv in Figure 7E).

At the L3 stage, wild-type muscle cells had well-organized sarcomeric bundles and mitochondria (Figure 7C). On the contrary, in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms, the muscle cells showed dramatic disorganization of the sarcomeric bundles and disrupted dense bodies. In addition, mitochondria appeared dispersed and the number of holes in the plasma membrane increased (Figure 7F).

At the L4 stage, wild-type muscles and their sarcomeric bundles increased in size compared to the L3 stage (Figure 7G). The muscle cells of *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms however exhibited an increase of the previously observed sarcomeric defects. In addition, mitochondria presented morphological defects as they appeared darker and they showed white

crystals. In addition, important swelling of the endoplasmic reticulum was observed (Figure 7H).

In addition, during the progression of muscle degeneration, an accumulation of vesicles was observed in the muscles of *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutants (Figure 7). To reflect their different nature, these vesicles were classified into three groups; i. single membrane vesicles, ii. multi-membrane vesicles and iii. lipid droplets accordingly to the morphological classification presented in Figure S4. The measures of the vesicular area per cell section particularly emphasized the faster increase of the overall vesicular area per cell in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms from L1 to one day post-L4 when compared to wild-type worms (Figure 8E). Paradoxically, the lipid droplet area per cell is lower in muscle cells of *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* at all stages and significantly in L4 ($a_{N_2}=0.055\pm 0.027$ vs. $a_{DMD}=0.014\pm 0.007$) and one day post-L4 worms muscle cells ($a_{N_2}=0.060\pm 0.026$ vs. $a_{DMD}=0.012\pm 0.010$). Both single-membrane and multi-membrane vesicular areas significantly increased with age. The increase of single-membrane vesicular area was significant at the L3 larval stage ($a_{N_2}=0.003\pm 0.002$ vs. $a_{DMD}=0.023\pm 0.008$) and the increase of multi-membrane vesicular area became significant at the L4 larval stage ($a_{N_2}=0.000\pm 0.000$ vs. $a_{DMD}=0.034\pm 0.011$).

Multi-membrane vesicles may correspond to autophagosomes or late lysosomes. Along with the autophagic process, the single membrane vesicles could be reminiscent of lysosomes that are also involved in the mechanisms of proteins and organelles degradation and recycling (Borsos et al., 2011, Autophagy). However, these vesicles could also be reminiscent of an increase in the exo-endocytosis flux (Figure 7H). Finally, these vesicles could also correspond to sarcoplasmic reticulum surrounding the dense bodies that was released after the disruption of these anchoring structures (Figure 7H).

Altogether, the ultrastructural analysis of *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutants during development revealed the chronology of sub-cellular events occurring during the degenerative process of the muscle cells. Issues in sarcomere organization and sarcolemma integrity occur early during larval development, and are followed by the disruption of sarcomeric anchoring structures (*i.e.* dense bodies). It is likely, that these primary defects then trigger the appearance of single and multi-membrane vesicles, the disorganization of the mitochondrial network and the swelling of the endoplasmic reticulum. The primary defects such as the compartmentalization issue, the loss of sarcolemmal integrity and the disruption of dense bodies in is agreement with the localization of the DYS-1 protein at the sarcolemma and

dense bodies. In vertebrates, dystrophin interacts with microtubules (Pins et al., 2009, J. Cell Biol.) and thus could participate in the organization of the cytoskeleton and help in stabilizing the polarity of the cell. In *C. elegans* muscle, such interaction remains elusive but particular localization of the microtubules at the vicinity of the sarcolemma in the region where the muscle belly and the sarcomeric bundles separates argue for a compartmentalization function of the protein.

Muscle degeneration is bending forces dependent

The distribution of bending forces along the antero-posterior axis, during forward movement, was recently defined (Shen et al., 2012). The highest values of bending forces were located in the mid-body region of the worm. Since muscle degeneration occurs more frequently in this same region, we tested whether the intensity of bending forces was directly involved in this process.

Agar concentration of culture media was shown to modify the mobility behavior of the worms and higher agar concentration makes it harder for worms to move forward (Karbowski et al., 2006; Figure S5D and E). The drag forces against worm movement depend on the width of the liquid layer on the top of the plate on which worms move. The width of the liquid layer is correlated with the size of the liquid meniscus forming around the worms (Sauvage et al., 2000; Shen et al., 2012).

In order to establish the impact of different drag forces on muscle degeneration *dys-1(cx18)*, *hlh-1(cc561)* single mutants, *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutants and wild-type worms were grown on NGM (Normal Growth Medium) plates containing 0.8%, 2% or 5% of agar, and the degeneration of body-wall muscle cells was quantified after rhodamin-phalloidin staining at three days post-L4 (Figure 9A). In our culture conditions, the liquid layer as indicated by the width of the meniscus forming around the worm decreased with increasing agar concentrations (Figure S5A-C). According to previous studies (Karbowski et al., 2006; Shen et al., 2012), this observation suggests that with increasing agar concentrations, the drag forces against the worm movement increased and worms need to produce higher bending forces to move.

In *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutants, the muscle degeneration significantly increased with the firmness of the media. Four, six and eight cells were degenerating in average per pair of quadrants in 3-days post-L4 worms grown on 0.8%, 2% and 5% agar NGM plates, respectively (Figure 9A).

To compare muscle degeneration in worms grown on NGM plates containing 0.8% and 5% to standard culture conditions (2% of agar), the level of muscle degeneration on 2% agar NGM plates was set at 100% for each strain (Figure 9B). No difference was observed for the *hlh-1(cc561)* single mutant. Conversely, for both the *dys-1(cx18)* single mutant and the *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutant, the level of muscle degeneration decreased on plates containing 0.8% of agar, and increased on plates containing 5% of agar (Figure 9B). To further confirm that increased firmness of the culture plates led to increased muscle degeneration, *dys-1(cx18)* mutants were cultured on plates with agar concentrations ranging from 2 to 14% (Figure 9C). When grown on plates containing 5%, 8%, 11% and 14% of agar, adult *dys-1(cx18)* worms at three days post-L4 exhibited significantly increased levels of muscle degeneration compared to standard culture plates (2% of agar). On 14% agar containing plates about 1 degenerating muscle cells per worm was observed compared to 0.1 cells on standard NGM 2% of agar containing plates.

These results demonstrated the impact of plate firmness on muscle degeneration. In agreement with this observation, when grown in liquid culture – where bending forces are low (Shen et al., 2012) – *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutants showed only rarely degenerating muscle cells (our unpublished results). Altogether, these results confirm the hypothesis that bending forces intensity influences dystrophin-dependent muscle degeneration.

We then investigated whether a forced immobilization of the worms could reduce muscle degeneration (Figure 9D). To this end, *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutants were cultured on standard NGM plates and transferred at the L4 larvae stage on plates containing 10 mM muscimol for 24 hours and then transferred back to standard NGM plates. Muscimol is an anesthetic used to paralyze *C. elegans* (Davis et al., 2010). All muscimol-treated worms were paralyzed after 24 hours and recovered their mobility in less than two hours after being transferred back to standard plates. Muscle degeneration was quantified using rhodamin-phalloidin staining directly after the 24 hours muscimol treatment (at one day post-L4) and 24h after the worms were transferred back on standard NGM plates (at two days post-L4). At one day post-L4 the number of degenerating muscle cells was reduced to two cells per pair of quadrants in muscimol treated worms compared to five degenerating cells per pair of quadrants in control worms; at two days post-L4 muscimol treated worms exhibited 3 degenerating muscle cells per pair of quadrants compared to 6.5 degenerating cells per pair of quadrants in control worms. This result shows that muscimol treatment significantly reduces muscle degeneration and indicates that movement is detrimental to dystrophic muscle.

Immobilization-mediated reduction of muscle degeneration and prednisone treatment ameliorate plasma membrane condition

To assess the mode of action of muscimol-mediated immobilization on the reduction of muscle degeneration, *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutants were treated with muscimol as described above and observed by electron microscopy 2 hours after the end of the treatment (Figure 10A).

Cells from control worms (*dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutants not treated with muscimol) showed similar morphological defects to that observed in Figure 7H with plasma membrane holes, altered dense bodies, denser and swollen mitochondria and swollen endoplasmic reticulum (data not shown). In contrast, muscle cells of muscimol-treated *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutants exhibited fewer holes in their plasma membrane and milder morphological defects in mitochondria and endoplasmic reticulum. Occasionally, external budding of cytoplasmic content was observed in these cells suggesting a plasma membrane repair mechanism dependent on budding of altered regions of the plasma membrane (Figure 10A).

Our group previously showed that prednisone, the current molecule prescribed to most DMD patients, also reduces muscle degeneration in *C. elegans*. Whereas the molecule is thought to work through its immunosuppressive properties, the fact that there is no inflammatory-mediated amplification of the degenerative process suggests that the molecule could also have a muscle specific path of action. To investigate this possibility, we observed prednisone-treated worms by electron microscopy at the young adult stage (Figure 10B-F).

This approach showed that all typical observations of the degeneration process previously shown could be observed in treated animals albeit in a lesser extent. Particularly, infrequent alteration of the plasma membrane testified for an amelioration of sarcolemmal integrity (Figure 10B-C). However, in some cells at later stages of muscle degeneration autophagic reminiscent vesicles, altered mitochondria and swollen endoplasmic reticulum were observed (Figure 10D-F). The rareness of single membrane vesicles also argue for a higher stability of the sarcolemma. Prednisone could thus delay the muscle degeneration process stabilizing the plasma membrane.

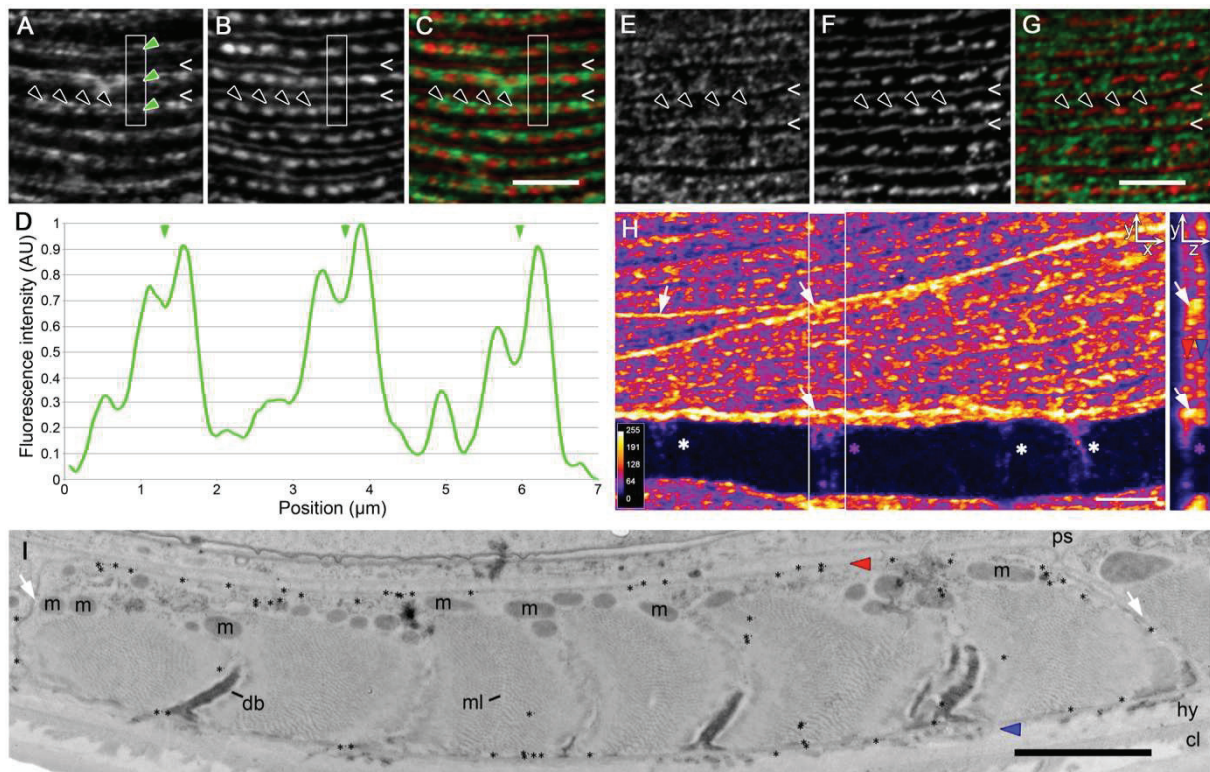


Figure 1: DYS-1 and DYS-1-GFP proteins exhibit subsarcolemmal localization and overlap I bands in adult body-wall muscles

A-I: Confocal analysis of DYS-1 (A-D) and DYS-1-GFP (E-I) localization in wild-type and *dys-1::gfp* transgene-carrying adult worms respectively. DYS-1 (A, green in C) and DYS-1-GFP (E, green in G) localization was assessed using DYS-1 and GFP monoclonal antibody respectively. UNC-95 polyclonal antibody (B and F, red in C and G) was used as positive control for dense bodies (black arrowheads) and M-lines (chevrons) organization (red).

C and G: Merge of the A, B and E, F images respectively showing a localization of DYS-1 and DYS-1-GFP proteins along I bands.

D: Line plot of the DYS-1 fluorescence along the 7µm-length vertical area indicated in A-C. The three double peaks revealed a peculiar pattern of localization of DYS-1 at I bands with a slightly weaker signal at the basis of dense bodies (green arrowheads in A and D).

H: Maximum projection of the DYS-1-GFP signal in wild-type muscle along the y-axis. The use of the Fire look-up table enables the observation of a faint DYS-1-GFP signal in muscle arms (asterisks in H). The right panel corresponds to a maximum projection of the rectangular area along the x-axis suggesting that DYS-1-GFP localizes close to the plasma membrane on both apical and basal sides of the cell (red and blue arrowheads respectively) as well as on the cell edges (white arrows). It also allows a lateral visualization of a muscle arm (purple asterisk)

Scale bars 5 µm.

J: Electron microscopy analysis of DYS-1-GFP localization on transversal section of a body-wall muscle cell with the GFP antibody. Gold-beads were observed in contact or close to the plasma membrane all around the cell (asterisks in J). Red and blue arrowheads point to apical membrane and sarcolemma respectively. White arrows point to cell-cell junctions plasma membranem: mitochondria, db: dense body, ml: M-line, ps: pseudocoelom, hy: hypodermis, cl: cuticle. Scale bar 2 µm.

Bait	Domains	Prey protéins														
		pACT-2	DYS-1	DYB-1	UNC-15	DEB-1	ATN-1	PXL-1	TLN-1	PAT-3	PAT-4	PAT-6	UNC-112	UNC-97	UNC-98	ZYX-1
DYS-1(2857-3674)	End of central domain, WW, Cystein-rich, Coil-coil	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
DYS-1(2857-3540)	End of central domain, WW, Cystein-rich	Red	Green	Red	Red	Red	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
DYS-1(3400-3674)	Coil-coil	Red	Red	Green	Green	Green	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Figure 2: *C. elegans* muscle proteins tested for interaction with DYS-1 by the yeast two-hybrid system.

All results obtained by yeast two-hybrid assays using DYS-1 bait constructs against a prey *C. elegans* muscle protein collection. Green: interaction; Red: no interaction, NT: not tested.

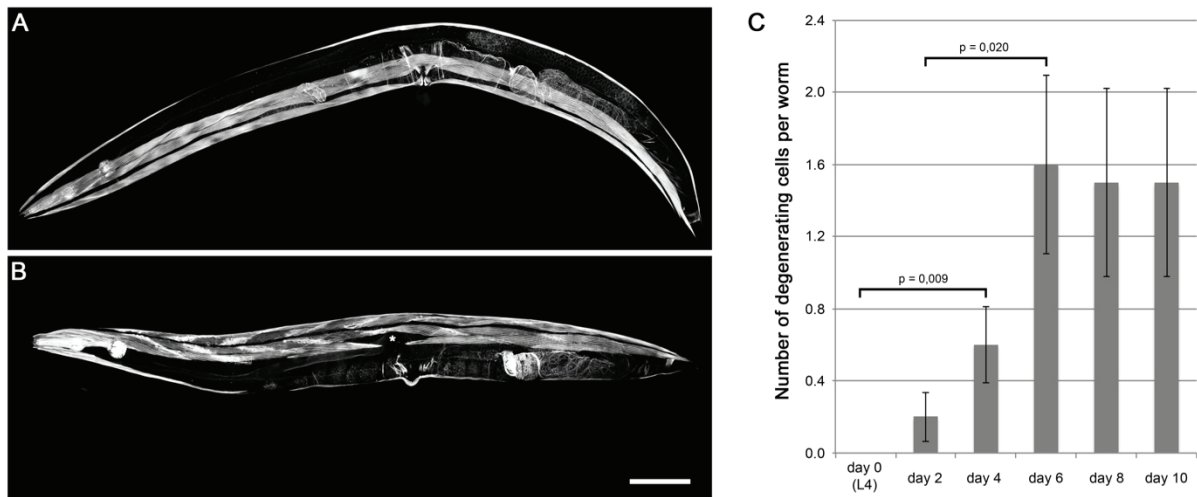


Figure 3: Muscle degeneration in *dys-1* mutants is unfrequent but significant and progressive

A-B: Rhodamin-phalloidin staining of wild-type worm (A; ventral quadrant) and a *dys-1(cx18)* (B; dorsal quadrant) worm showing a degenerating cell (asterisk in B). Scale bar: 100 μ m.

C: Quantification of the number of degenerating cells in *dys-1(cx18)* worms from L4 (day 0) to 10-days post-L4 showing the progression of the phenotype in this context (n=20). A plateau is reached in 6-days post-L4 worms in which a mean of 1.6 degenerating cell per worm is observed (0.8 cell per pair of quadrants). Error bars: SEM (Standard Error to the Mean). The statistical analysis was carried out using Mann-Whitney test.

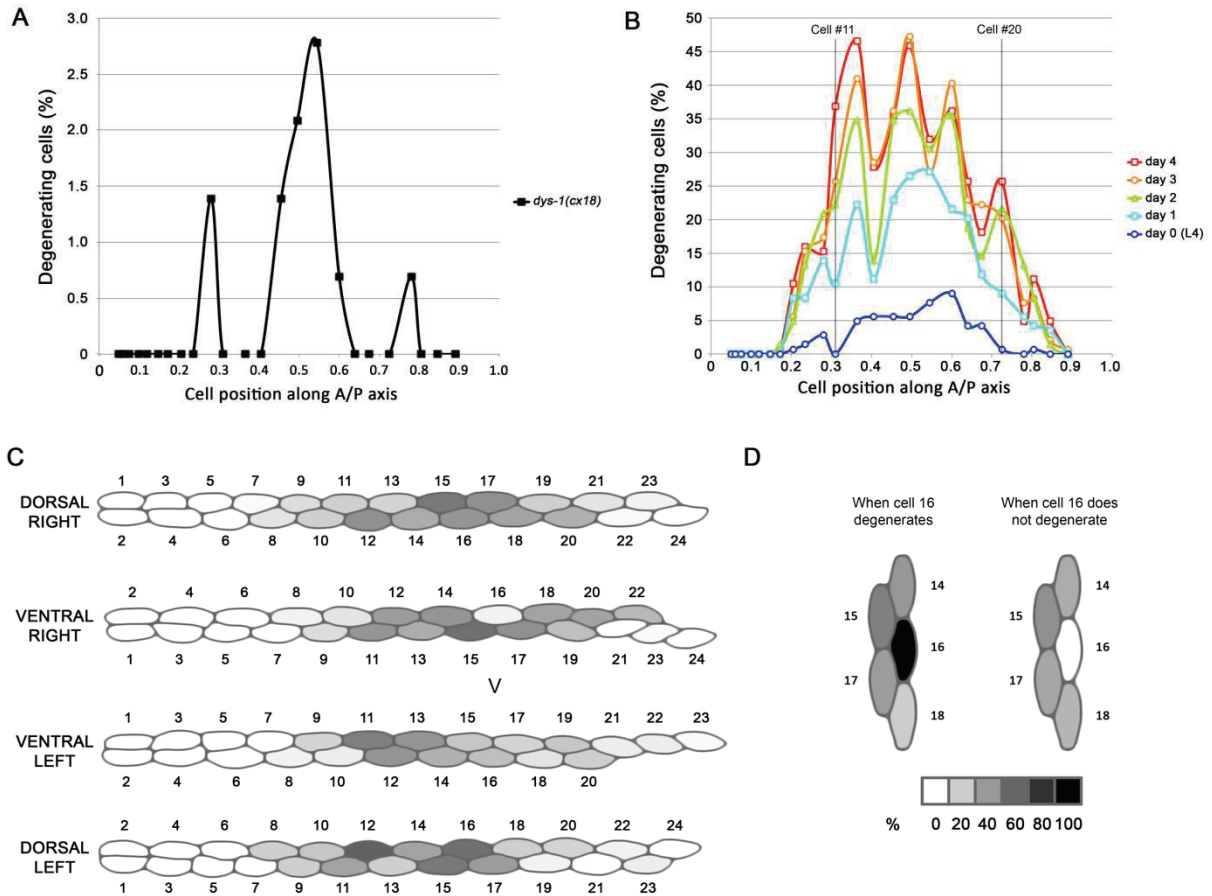


Figure 4: Muscle degeneration is more likely to occur in the mid body of the worm.

A. Distribution of degenerating cells in 4-days post L4 *dys-1(cx18)* single mutants (n=144 quadrants). Note the difference of the y-axis scale between B and C. No degenerating were observed in wild-type worms (n=144 quadrants).

B: Evolution of the distribution of degenerating cells in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms at L4. The number of degenerating cells is plotted along the antero-posterior axis of the worm (0=head; 1=tail, vulva=0.55 ; n=144 quadrants). The position of cells 11 and 20 are noted for landmarks.

C. Distribution of degenerating cells and their probability to degenerate. Individual degenerating cells were mapped in 4-days post-L4 *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms. The muscle degeneration was measured and mapped per quadrants (n=144). The schematic indexation of the 95 body-wall muscle cells is adapted from Hedgecock *et al.* (1987). Note that the relative size of muscle cells is not respected (V: vulva). The scale below the panel D indicates the assigned color of 6 typical degeneration probabilities. The results in C correspond to the results plotting the red curve for 4-days post-L4 presented in B.

D. Distribution of the degeneration probabilities in the neighbouring cells of the cell 16 in 4-days post-L4 *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutants (same data set as in B). The left and right panels respectively represents the probabilities to degenerates for cells 14, 15, 17 and 18 when the cell 16 degenerates (n=46 quadrants) or not (n=98 quadrants). The scale below indicates the assigned color of typical degeneration probability. Statistical analyses were carried out using the Chi²-test (alpha=0.05; dof=3; theoretical Chi²=7.815; observed Chi²=6.553).

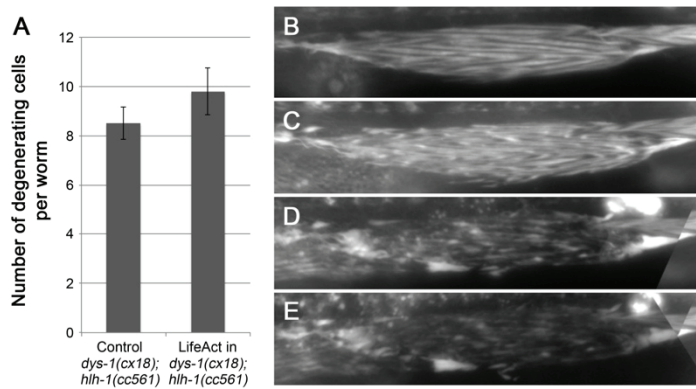


Figure 5: Muscle degeneration is a 20 hours lasting phenomenon

A: Effect of the LifeAct transgene on the muscle degeneration level in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mutants. Muscle degeneration was quantified after rhodamin-phalloidin staining of 3 days post-L4 worms carrying or not the LifeAct transgene. Degenerating cells were quantified per pair of quadrants (n=20). Error bars: SEM (Standard Error to the Mean). Statistical analyses were carried out using the Mann-Whitney test.

B-E: Actin network observation during muscle degeneration in LifeAct *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms using the LifeAct Daily Imaging procedure (see Material and Methods). Worms were observed every 4 hours till disappearance of the signal.

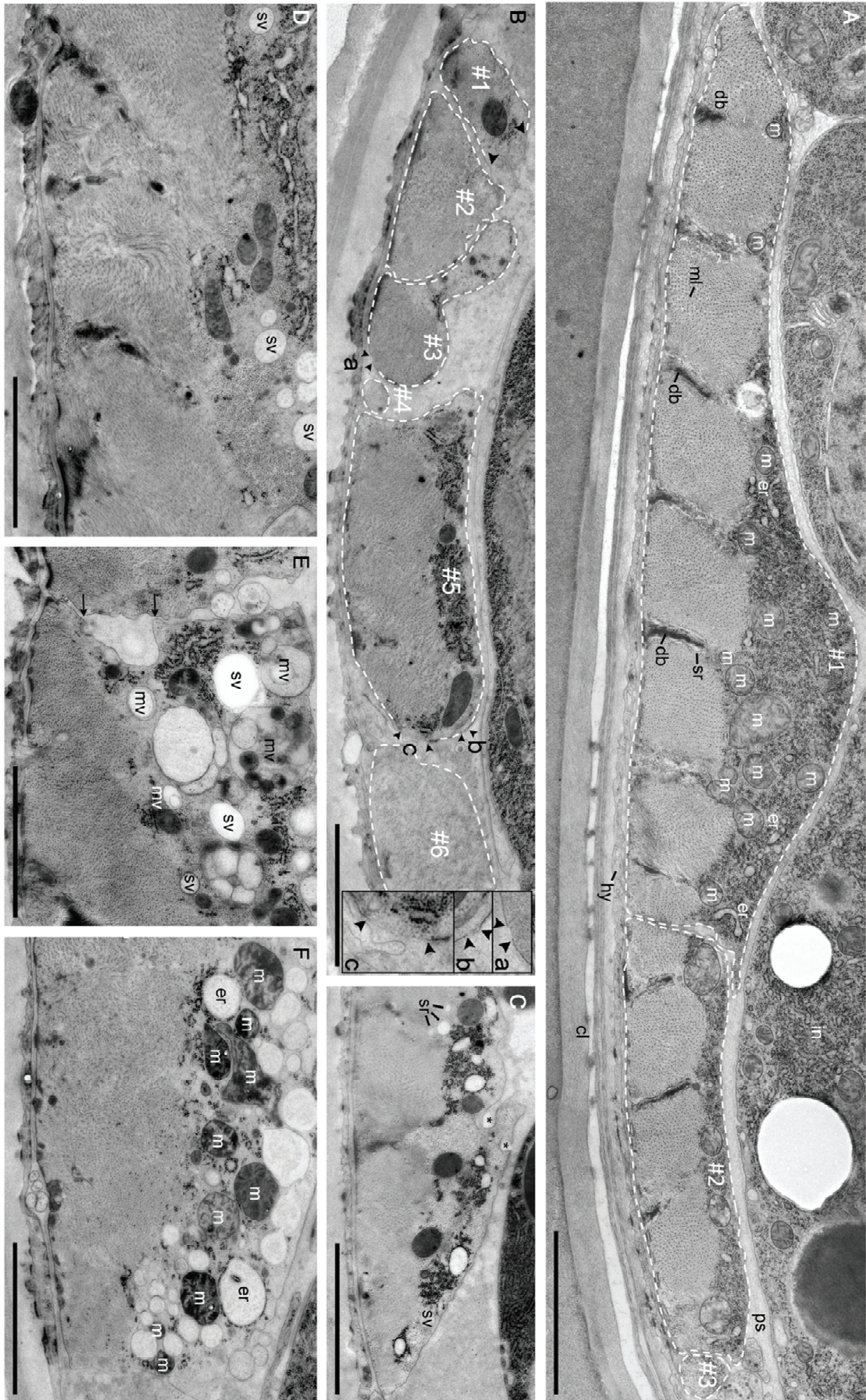


Figure 6: The ultrastructural analysis of muscle degeneration emphasizes several morphological defects

Transversal sections were performed in the mid body region of 3-days post-L4 wild type and *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutants worms.

A: Transversal section of a muscle quadrant in a wild type worm. The dotted lines surround 3 muscle cells (#1, #2 and #3). The basal part of the cells contains dense bodies (db), sarcomeric bundles (sb), sarcoplasmic reticulum (sr), and the apical region contains mitochondria (m), endoplasmic reticulum (er). Neither the nucleus nor M-lines can be observed in this section. Outside the muscle cells, on the basal side, one can observe the hypodermis (hy) and the cuticle (cl). On the apical side, the internal region of the worm, the pseudocoelom (ps) and an intestine cell (int).

B-F: Morphological defects of a degenerating muscle cells in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutants.

B: 6 muscle cells sections are observed in this quadrant (#1 to #6). Note that only reminiscent material is observed for cell #6.

C-D: Plasma membrane disruption is observed between arrowheads in C. Insets in C correspond to magnified areas a, b and c to allow an easier observation of the holes in the plasma membrane. Muscle cells in C and D show alteration of their sarcomeric bundles and disruption of their dense bodies (particularly in D).

E: Cell-cell adhesion defect is indicated by two arrows.

Mislocalisation of ribosomes at the basal side of the cell and the accumulation of numerous single-membrane (sv) and multi-membrane-vesicles (mv) are observed in C, D, E and F.

Scale bar 2 μ m for all images.

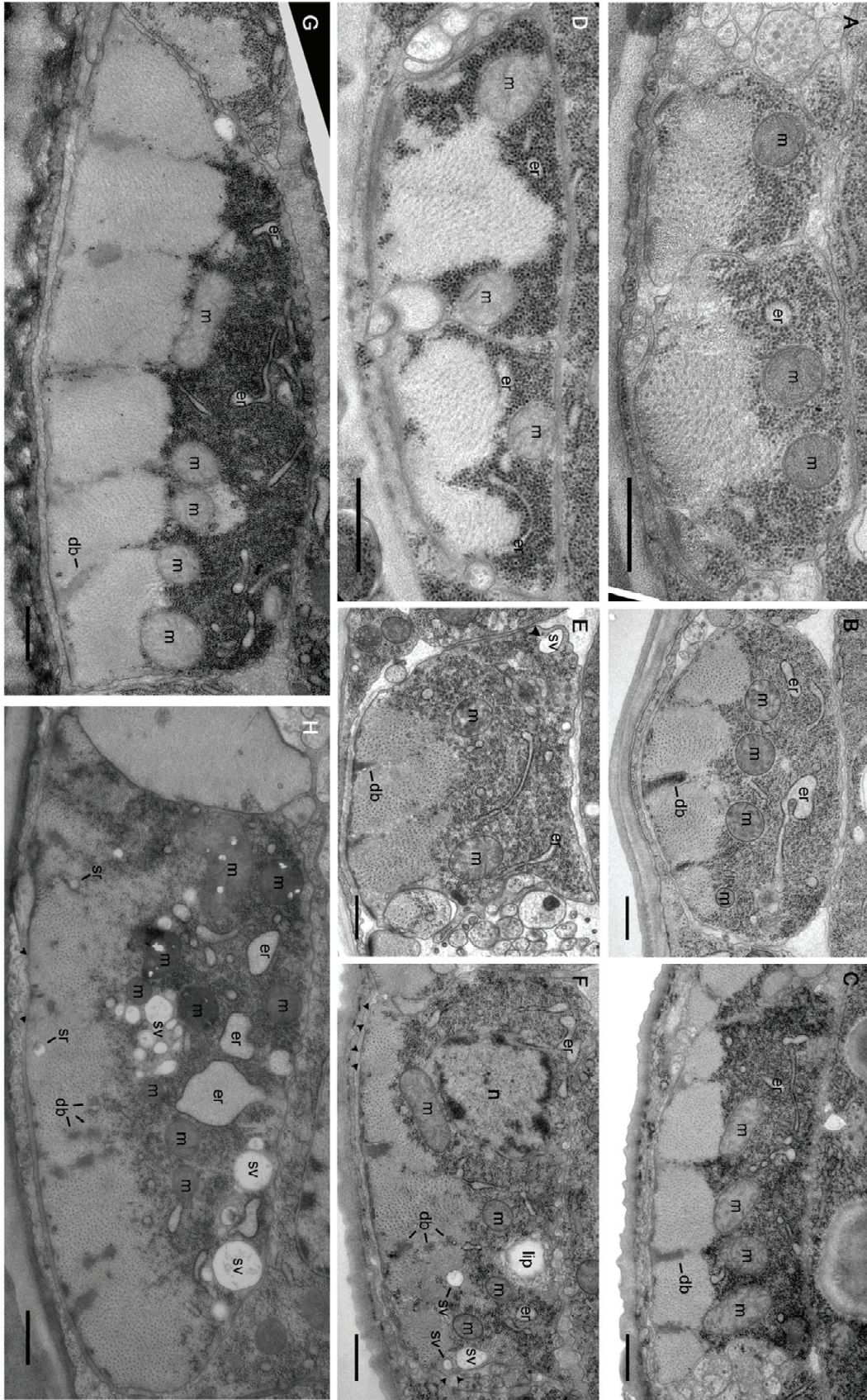


Figure 7: Chronological analysis of the muscle degeneration process from L1 to L4 (ou young adults à voir)

A-C and G: Electron-micrographs of representative muscle cells of wild-type worms at L1 (A), L2 (B), L3 (C) and L4 (G)

D-F and H: Electron-micrographs of representative muscle cells of *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worm at L1 (D), L2 (E), L3 (F) and L4 (H)

m: mitochondria, er: endoplasmic reticulum, sr: sarcoplasmic reticulum n: nucleus, sv: single-membrane vesicle, db: dense body, lip: lipid droplet

D: At L1 stage, the sarcomeric bundles appear less compact and ordered in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms.

E: At L2 stage, holes in the plasma membrane might appear as suggested by the presence of a hole (arrowhead) in a vesicle membrane (sv) which content has the same electron density as the pseudocoelom.

F: At L3 stage, several single-membrane vesicles are found in the cytoplasm (sv), several holes in the plasma membranes are observed (arrowheads pairs) and dense bodies seem to be disrupted into pieces (db).

H: At L4 stage, in addition to the observations made in F, mitochondria appear denser to electrons than in wild-type and present white crystals (m), the endoplasmic reticulum is swollen (er) and sarcoplasmic reticulum can be found detached from any dense body or the plasma membrane (sr).

Scale bars: 0.5µm

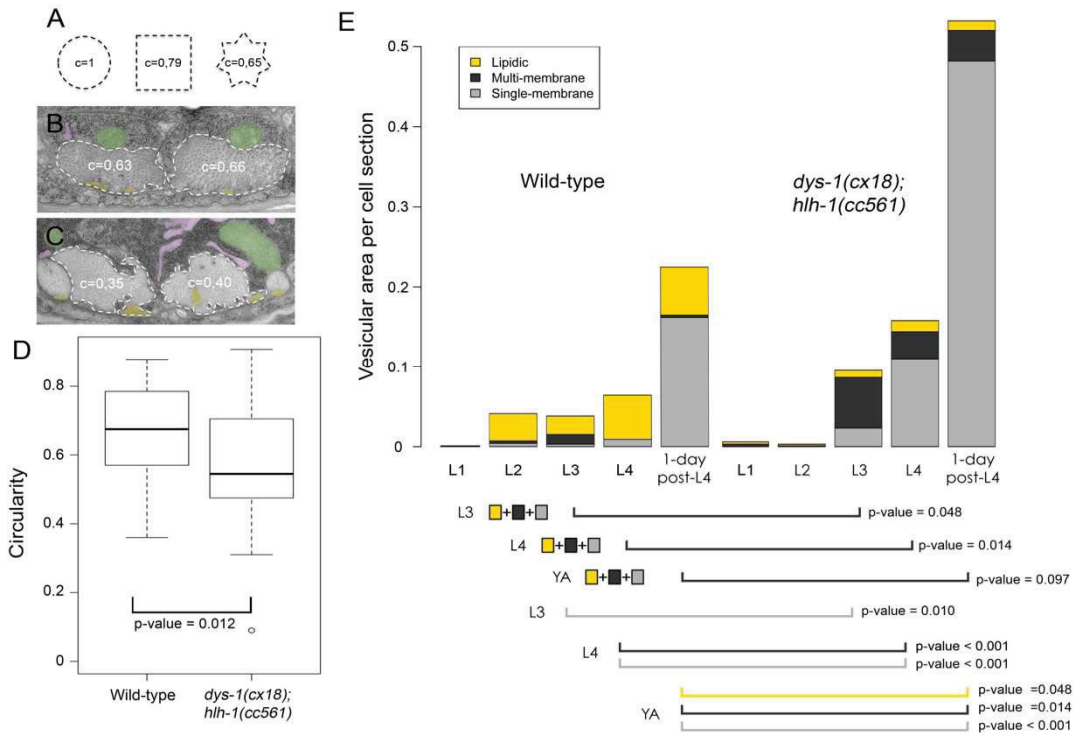


Figure 8: Statistical analysis of the morphological alterations observed in muscle degeneration

A-D: Analysis of the circularity of sarcomeric bundles in L1 worms.

A: Examples of geometrical shapes and their corresponding circularity as measured in ImageJ.

B and C: Measures of circularity on two muscle cell sections from wild-type (B) and *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* (C) worms cells respectively.

D: Box-plot showing the lower circularity of sarcomeric bundles from *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms cells when compared to cells from wild-type worms ($n > 20$). Statistical analyses were carried out using the Student T-test.

E: Analysis of the vesicular area per cell section in wild-type and *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms cells from L1 to young adults worms ($n > 20$). The single-, multi-membrane and lipidic vesicular areas per cell section are respectively shown in light gray, dark gray and yellow. Statistical analyses were carried out using the Mann-Whitney test.

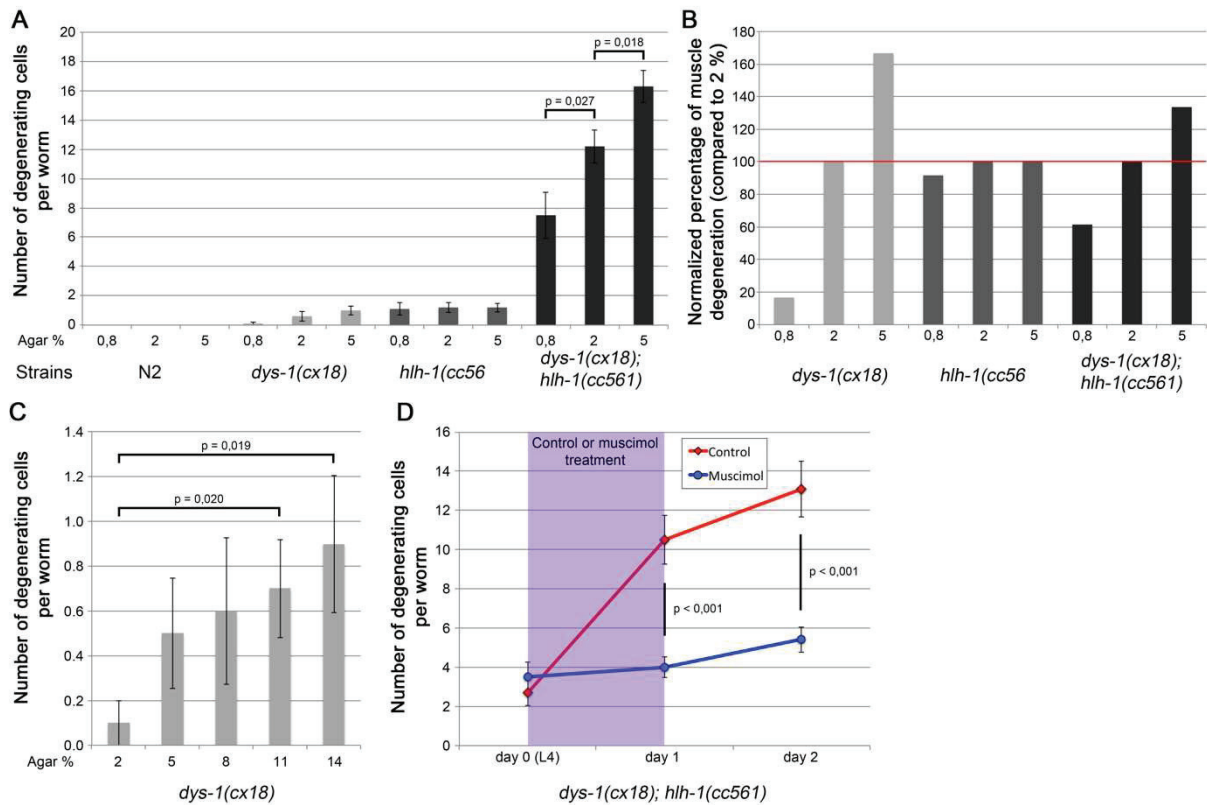


Figure 9: DYS-1-dependent muscle degeneration varies with bending forces intensity and is a cell-autonomous phenomenon

A: Effect of culture media firmness on muscle degeneration. Wild-type (N2), *dys-1(cx18)* and *hlh-1(cc561)* single mutants and *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutants were grown on 0.8%, 2% and 5% agar NGM plates till 3-days post-L4. After rhodamin-phalloidin staining, the degenerating cells were quantified per pair of quadrants (n=20).

B: Normalization of the data in A to the routine culture conditions (2% agar NGM plates condition is set at 100%, red line) for each genotype and culture condition.

C: Effect of culture media firmness on muscle degeneration in *dys-1(cx18)* worms. Worms were grown on 0.8%, 2%, 5%, 8%, 11% and 14% agar NGM plates till 3-days post-L4. After rhodamin-phalloidin staining, the degenerating cells were quantified per pair of quadrants (n=20).

D: Effect of the anesthetic muscimol on muscle degeneration. *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutants were grown on classical NGM plates and L4 worms were then transferred for 24 hours on plates containing 10 mM muscimol, and finally transferred back on classical NGM plates without muscimol. The violet area corresponds to the treatment period (water control or muscimol). Muscle degeneration was quantified by rhodamin phalloidin staining at day 0 (L4), day 1 and 2 on treated and untreated worms (n=20).

Error bars: SEM (Standard Error to the Mean). Statistical analyses were carried out using the Mann-Whitney test.

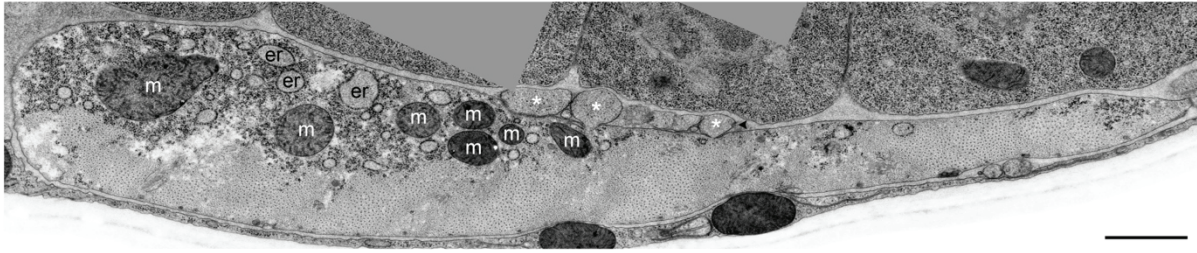


Figure 10: Effects of the muscimol treatment on the ultrastructural morphology of *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms.

Representative electron micrograph of a muscle cell section of a *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worm immobilized for 24 hours with muscimol and fixed two hours after the end of the treatment. The plasma membrane shows no holes but rather external budding of cytoplasmic content (asterisks). On these buds presents a hole in its lipidic membrane (arrowhead).
 m: mitochondria, er: endoplasmic reticulum, db: dense body. Scale bars: 1 μ m

Figure S1: Myosin network phenotype in DMD worms

Figure S2: Biopsies

Figure S3: Single mutants and non-significative measures

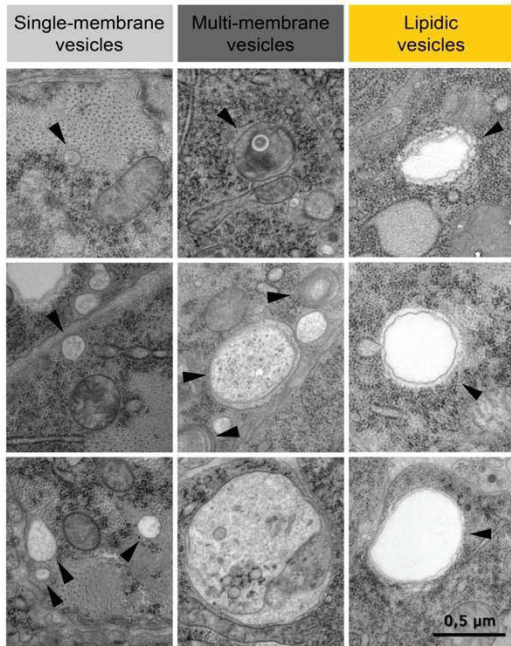


Figure S4: Classification chart of observed vesicles

First column: single-membrane vesicles can be of several origins (endosomes, exosomes, lysosomes, sarcoplasmic reticulum).

Second column: multi-membrane vesicles are reminiscent of the autophagic process.

Third column: lipid droplets are easily distinguishable on their low density to electrons and their peculiar lipidic monolayer.

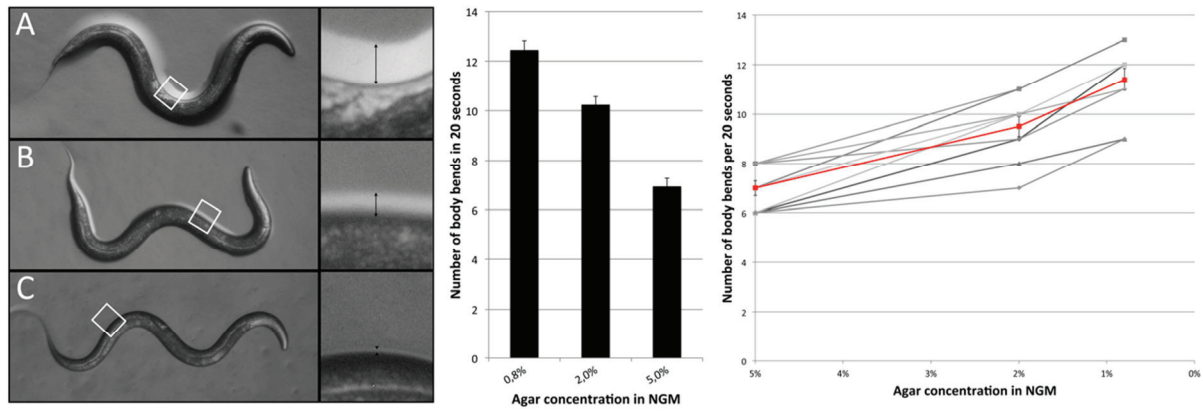


Figure S5: Media firmness, meniscus and *Caenorhabditis elegans* locomotion

A-C: The size of the meniscus forming at the edges of the worm get bigger when the firmness of the culture media decrease meaning that the liquid layer width increases. The area of the image in the white rectangle is magnified on the respective left panels. The double arrow or the arrowheads indicate the edges of the meniscus. An L4 stage wild-type worm grown on a classical plate has been transferred to a 0.8% agar NGM plate (A), a 2% agar NGM plate (B) and then a 5% agar NGM plate (C).

D-E: Locomotion analysis has been carried out counting the number of body bends of wild-type L4 worms in 20 seconds periods in 90 (D) and 10 (E) worms respectively.

D: Worms grown on media of different firmness show differences in frequency of body bends (n=30).

E: Worms transferred from one media to an other (0.8%, 2% and then 5%) show similar variation in frequency of body bends indicating that firmer is the media, harder it is for the worm to move (n=10). The red curve corresponds to the calculated mean for each media type.

Error bars: SEM (Standard Error to the Mean).

DISCUSSION

DYS-1 localization

In vertebrates, dystrophin localization has been established beneath the entire sarcomere (Blake et al., 2002, *Physiol. Rev.*). Our results show that DYS-1 presents the same pattern of localization except that it is absent from the sarcolemma near the M-lines. Because DEB-1 is enriched at the dense body, the interaction between DYS-1 and DEB-1 could slightly drive the localization to this structure. A particularity of *C. elegans* sarcomere anchoring could also explain this difference. Indeed, in *C. elegans* both M-lines and Z-disks homologs are anchored to the plasma membrane and the extra-cellular matrix, whereas in vertebrate skeletal muscle, only Z-disks are anchored through costameres (Moerman and Williams, 2006; refs vertebrates). Hypothetically, DYS-1 could be excluded from this precise site to ensure a proper anchorage of this structure. Thus in both *C. elegans* and vertebrate muscle, dystrophin is indirectly implicated in Z-disk but not in M-line anchorage. The structural difference mentioned above could explain why DYS-1 is localized throughout the plasma membrane with the exception of the M-line basis.

Our results also show that DYS-1 is localized in higher proportion at the cell edges. Dystrophin is thought to bind to microtubules (Prins et al., 2009), which in *C. elegans* larval and adult muscle run along the edges of the cell and seem to participate in the compartmentalization of the cell splitting the muscle belly and the sarcomeric spindle. Because the mitochondrial network is linked to microtubules, the effect of the absence of dystrophin on the microtubular network could further affect the mitochondrial network. In a previous study, we presented mitochondrial network perturbations in the *dys-1(cx18)* single mutants, in the *dys-1(cx18); hlh-1(cx18)* worms and the role of this perturbation in the muscle degenerative process (Giacomotto et al., 2013, *Hum. Mol. Genet.*).

Muscle degeneration dynamics

When assessing the level of muscle degeneration in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutants, we observed that it reached a plateau in 2-days old adults (Figure 2D; Gieseler et al., 2000). At this age, the locomotion of the worm is altered by the loss of 28 cells per worm on average and only 18% of the observed *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms are still able to move (Gieseler et al., 2000). This observation suggests that the muscle degeneration process would require the worm to move to affect additional cells suggesting a role for movement. Interestingly, in *dys-1(cx18)* the plateau is lower and reached later (reached in 6-days old

adults with a value of 1,6 degenerating cells per worm). This finding indicates that the locomotion of *dys-1(cx18)* at this age was sufficiently slowed down to avoid the degeneration of additional muscle cells. However, these worms still show an higher locomotion than *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms and thus should continue to increase the amounts of degenerated muscle cells. An explanation could be the role of the *hlh-1(cc561)* mutation in sensitizing the muscle to movement. Although the *dys-1(cx18)* still move better than *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms, their body wall muscle cells may better resist to this mild exercise whereas even low locomotion of *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* continues to increase muscle degeneration until the worm cannot move at all. In other words, *dys-1(cx18)* and *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms would show two different levels of resistance to movement and would degenerate as long as their movement will slow down to this threshold. Along with this idea, the immobilization of *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* for the 24 hours following the L4 stage avoids the increase of muscle degeneration. Furthermore, after this period, the worm reached adulthood where it moves less and the level of muscle degeneration stayed low and showed only a slight increase.

Bending forces and mechanical stress in *C. elegans* muscle degeneration

Given this hypothetical role of movement, we then varied the bending forces generated by the worm to move in order to investigate the eventual implication of exercise in muscle degeneration. The accepted model of *C. elegans* locomotion defines the dragging forces against the worm movement depending on the width of the thin liquid layer on the top of the culture medium (Sauvage et al., 2011; Shen et al., 2012). This liquid layer provokes capillarity forces on the worm through a meniscus formed all around the animal. The thinner is the liquid layer, the smaller is the meniscus, the higher are the capillarity forces and the higher have to be the bending forces of the worm to produce movement. To vary bending forces in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms, we varied the density of the culture media. Increasing the agar concentration in NGM makes the media firmer and decreases the width of the liquid layer, reducing the size of the meniscus and increases these capillarity forces and dragging forces against worm movement.

In both *DYS-1*-dependant muscle degeneration conditions – *dys-1(cx18)* single mutants and *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* double mutants – the level of muscle degeneration varied along with agar concentration in the media. Interestingly, the level of muscle degeneration in single *hlh-1(cc561)* mutants did not vary with the increase of exercise suggesting that there is an *hlh-1(cc561)*-dependent muscle degeneration that does not rely on mechanical stress. Our

results demonstrate that dystrophin-dependent muscle degeneration is directly correlated to the agar concentration in the media and thus to the intensity of bending forces.

Along with this idea, the use of the pRF4 (*rol-6(su1006)*) co-injection marker led to lower or even absent muscle degeneration (unpublished results). Indeed, the *rol-6(su1006)* mutants were shown to present altered cuticle with altered alae and annulae (Cox et al., 1980) that could decrease dragging forces against movement. Moreover, roller worms often exhibit a peculiar movement in which part of their cuticle does not adjoin to the media. As a conclusion, bending forces and mechanical stress may be implicated or even required for muscle degeneration to occur. This new understanding of the muscle degeneration mechanism may help us in deciphering the mode of action of several suppressors.

Moreover, these experiments allowed us to increase muscle degeneration in *dys-1(cx18)* single mutants by a 10 fold. The consequent level of muscle degeneration is therefore more pertinent and suitable to carry out comparative studies of suppressors by photonic microscopy on *dys-1* single mutants. Finally, it would be of great interest to check whether other single mutants - usually studied in the sensitized *hlh-1* background - act the same way in these culture conditions to induce muscle degeneration.

Ultrastructural morphology of dystrophin-dependant muscle degeneration in *C. elegans*

Our chronological approach to observe the ultrastructure of the degenerating cells from L1 to 3-days old adults emphasized miscellaneous morphological defects in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)*.

From L1, we observed defects in the organization of the sarcomeric bundles with the observation of irregular height of the sarcomeric bundle within the same cell section. This phenotype could be explained by heterogeneous growth of the anchoring structures (dense bodies or M-lines) during post-embryonic development of the muscle. Indeed, for a given sarcomere, if the anchoring structures exhibit a heterogeneous size, the sarcomeric bundle will be pulled down by the smallest ones. At the cell scale, if these structures have heterogeneous size, the transversal section should show sarcomeric bundle of heterogeneous height.

We then observed the appearance of holes (from 50 to 200 μm in length on the section) from the L2 stage. These holes were observed all around the cell plasma membrane. This observation is reminiscent of the localization of the DYS-1 protein that we described in Figure 7. Interestingly, starting from the L3 stage, we observed the accumulation of single membrane vesicles. These vesicles were often found at a sub-sarcolemmal position suggesting a possible relation with a plasma membrane repair mechanism. Indeed, plasma membrane

mechanisms often involve the endo/exocytosis flux in the plasma membrane healing or budding. Accordingly, we observed intracellular vesicles with interruption of their membrane suggesting a role for endocytosis in the repair of the damaged area of the plasma membrane.

Single sections electron micrograph as well as serial sectioning revealed a disruption/detachment from the plasma membrane of dense bodies during muscle degeneration. However, the actin thin filaments were not altered *per se*, thus, one could suggest that actin filaments would stay attached to their neighboring dense body. Therefore, the accumulation of actin in coils or at the tips of the cells as seen by rhodamin-phalloidin staining could be explained by the detachment/disruption of dense bodies. Such scenario also strongly implies the tension exerted by the excitation/relaxation cycles in the observed phenotype.

Given that the dense bodies are often disrupted during muscle degeneration we wondered if the DGC was also altered. Our results show that the DYB-1-GFP protein no longer localizes to remaining dense bodies in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms. Moreover, we show that this delocalization is an early step in the process of muscle degeneration as it occurs even in cells that show only mild defects in myosin filaments anchoring. Data from vertebrates indicate that the DGC could form aggregates during muscle degeneration. Although we didn't see patches of GFP signal that could support this idea in *C. elegans*, it is possible that these aggregates lie under the size of detection by confocal microscopy.

The accumulation of double-membrane vesicles is reminiscent with an activation of autophagy that could help in the degradation of such aggregates. This mechanism could also be implicated in the degradation of disrupted dense bodies. We also often observed the presence of ribosomes and endoplasmic reticulum within autophagosomes.

Our morphological observation also suggest that metabolism is altered in degenerating cells. One class of vesicles that we observed corresponds to lipid vesicles. Quantification of the three classes of vesicles showed a faster increase of overall vesicular area per cell section in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* when compared to wild-type. However, when quantified alone, the lipid vesicles showed a lower vesicular area per cell section in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms at all stages.

We first observed a developmental phenotype at L1 stage where the height of the sarcomeric bundles was heterogeneous within the same cell. This phenotype was then even more severe in L2 and recovered in L3 where the first ultra-structural defects of the sarcomere anchoring structures were observed. These observations show that the muscle may not be as efficient in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* than in wild-type. The lipid droplets are considered as

fat, membrane and energy storage (Mak et al., 2012, J. Lipid. Res.). It is possible that the *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms had to draw on its lipid droplets to produce more energy to achieve locomotion. One can also imagine that the cell could make use of its lipid droplets to form lipids bilayer to strengthen its plasma membrane.

Finally, we occasionally cut the muscle cells through their nuclei but did not observe any particular morphological defects. A previous study addressed the morphology of nuclei and nucleolus by confocal microscopy in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms expressing GFP in body-wall muscle nuclei and mitochondria (Nyamsuren et al., 2004). This directed approach revealed changes in nucleus shape and increased nucleolus size suggesting an increase in ribosomal biogenesis.

Regarding translation mechanisms, the *C. elegans* muscle tissue has the particularity of having regions of the cell that are distant of more than 2 μm from rough endoplasmic reticulum. Our results showed that in wild-type growing muscle - in L1 and L2 larvae - some ribosomes are localized at the basal plasma membrane. This atypical localization is reminiscent of an *in situ* translation of sarcomere-specific proteins. Interestingly, ribosomes of degenerating cells in *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms also show this peculiar localization suggesting a reactive mechanism for protein production.

All in all, this study contributed to deciphering numerous alterations occurring in degenerating cells that could lead to a less efficient muscle cell (sarcomeric and/or cell homeostasis defects). Frequent muscle degeneration can then lead to reduced movement without necessarily imply wide actin network disorganisation or even cell death. Therefore, markers of muscle degeneration in *C. elegans* other than the traditionally used rhodamine-phalloidin staining would be useful in the quantification of muscle degeneration and particularly in the study of the primary steps of the process.

New hints for the understanding of dystrophin-dependant muscle degeneration in *C. elegans*

Altogether, our results indicate a major role for bending forces and mechanical stress in the process of muscle degeneration. Our morphological study highlighted two major defects that can be related to bending forces and mechanical stress: disruption of sarcolemma and disruption of anchoring structures of contractile filaments. These two defects might be at the origin of the muscle degeneration process triggering the accumulation of single and multi-membrane vesicles, respectively. Sarcolemma disruption might also trigger perturbation of cell homeostasis such as cytosolic calcium concentration regulation leading to a calcium

overload in the cell and to mitochondrial dysfunction as recently indicated (Giacomotto et al., 2013). Dense bodies and M-line disruption might be the cause of the locomotion defects observed in the *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* worms.

Exercise and muscle degeneration: “Heal the worm...”

To our knowledge, there is no clear-cut argument to state about the impact of exercise on muscular dystrophies symptoms (Gianola et al. 2012, Jansen et al. 2010). In this situation, it is difficult to advice patients with respect of the effects of their physical activity. Here, we used the *C. elegans* model of Duchenne Muscular Dystrophy to play our part in the clarification of this issue.

First, our findings show that the intensity of the bending forces that worms develop is implicated in the muscle degeneration process. When compared to classical culture conditions, increasing the media firmness makes the worm move less, increases its bending forces and can then be considered as force exercise. On the contrary, when we reduced the media firmness, the worm moved with a higher frequency of bending, develops lower bending forces what could be considered as endurance exercise.

Secondly, in *C. elegans*, the first condition increases muscle degeneration whereas the second decreases it. These findings suggest that force exercise is detrimental to dystrophin-deficient muscle in *C. elegans*, whereas endurance exercise would be beneficial compared to the classical culture conditions.

Further experiments on vertebrate models of DMD should be oriented toward this issue to see in which extent our findings can be extrapolated to the impact of force and endurance exercise in DMD patients.

MATERIALS AND METHODS

C. elegans strains and culture conditions

C. elegans strains were cultured as previously described (Brenner, 1974). N2 Bristol strain was used as wild-type control. The PD4613 *hlh-1(cc561ts)* strain (Harfe *et al.*, 1998) was obtained from B.D. Harfe (University of Florida) and A. Fire (Stanford University School of Medicine). The LS292 *dys-1(cx18)* strain, LS587 *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* strain, and LS936 *dys-1(cx18); hlh-1(cc561) zyx-1(gk190)* were respectively described in Bessou *et al.*, 1998, Gieseler *et al.*, 2000, and Lecroisey *et al.*, 2013. The LS643 strain contains the *dys-1::gfpX* integrated transgene described in Bessou *et al.*, 1998. The LS632 strain contains the *dyb-*

1::gfpIII transgene described in Gieseler et al., 2001 along with the pKP13 co-injection marker (Ségalat et al., 1995). This strain was used to cross this transgene in wild-type, LS292 and PD4613 worms.

Unless stated otherwise, strains were grown at 15°C on 2% agar NGM plates and fed with OP50 bacteria.

To study the effect of firmness media on muscle activity and degeneration, different concentrations of agar were tested. 0.8%, 2%, 5%, 8%, 11% and 14% agar NGM plates were prepared and poured as usual. To ensure the minimal effect from the growth of the bacteria on the different plates, OP50 was harvested from 2% plates and sprayed on the test plates.

Yeast Two-Hybrid Screening

The pAS2.1-DYS-1₍₂₈₅₇₋₃₆₇₄₎bait plasmid was described in Grisoni et al., 2002. A yeast two-hybrid screening was performed as previously described (Lecroisey et al., 2008) by mating CG1945 yeasts carrying the pAS2.1-DYS-1₍₂₈₅₇₋₃₆₇₄₎bait plasmid with Y187 yeasts transformed with a random primed *C. elegans* cDNA activation domain library (RB2) subcloned into the pACT vector (R. Barstead, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City). 1.1×10^7 diploid clones were analyzed for their ability to grow on minimal medium lacking Leu, Trp, and His, after 3-d incubation at 30°C. Growth can occur only if the bait and the prey proteins interact and the HIS3 reporter gene is transactivated. 48 positive clones were obtained and prey cDNAs were sequenced. Sequence analysis was performed using BLASTn searches. Three of the positive clones corresponded to the cDNA of UNC-15 (amino acids 490-620), one clone to the cDNA of DEB-1 (amino acids 1-798), ten clones to the cDNA of DYS-1 (amino acids 2500-2880) and 34 clones to the cDNA of SEC-8.

To recover prey plasmids, plasmid extractions from diploid yeast clones were performed as described in Fromont-Racine et al., 1997 and the obtained DNA transformed by electroporation into *Escherichia coli* DH5alpha (Invitrogen, Carlsbad, CA). Prey plasmid containing bacteria were screened by PCR and the prey plasmids were purified using (miniprep kit) and transformed into the yeast strain Y187 following standard procedures (Clontech Palo Alto, CA, Yeast Protocols Handbook, PT 3024-1).

Interactions of DYS-1₍₂₈₅₇₋₃₆₇₄₎ with UNC-15 (amino acids 490-620), DEB-1 (amino acids 1-798) and DYS-1 (amino acids 2500-2880) prey proteins with the DYS-1₍₂₈₅₇₋₃₆₇₄₎ were confirmed by mating prey plasmid carrying Y187 yeasts with CG1945 yeasts carrying the pAS2.1-DYS-1₍₂₈₅₇₋₃₆₇₄₎bait plasmid or the empty pAS2.1 plasmid (Clontech Palo Alto, CA), used as a negative control. SEC-8 was considered as a false positive as diploid cells

carrying the empty pAS2-1 plasmid along with the SEC-8 encoding prey plasmids were able to grow on minimal medium lacking Leu, Trp, and His. The same technique was used to test interaction between

UNC-15 (amino acids 490-620), DEB-1 (amino acids 1-798) and DYS-1 (amino acids 2500-2880) DYS-1₍₂₈₅₇₋₃₆₇₄₎DYB-1₍₅₋₅₉₀₎ prey proteins with DYS-1₍₃₄₀₀₋₃₆₇₄₎ and DYS-1₍₂₈₅₇₋₃₅₄₀₎bait proteins.

pAS2.1-DYS-1₍₃₄₀₀₋₃₆₇₄₎ and pAS2.1-DYS-1₍₂₈₅₇₋₃₅₄₀₎were derived from pAS2.1-DYS-1₍₂₈₅₇₋₃₆₇₄₎bait plasmid. The pACT2-DYS-1₍₂₈₅₇₋₃₆₇₄₎prey plasmid was described in(Lecroisey et al., 2008) and pACT2-DYB-1₍₅₋₅₉₀₎ prey plasmids was described in Grisoni et al., 2003

Pharmacological compounds

All pharmacological compounds were added as previously described (Giacomotto, 2009). Muscimol (diluted in water) and prednisone (diluted in B-cyclodextrin) were used at final concentration of 10 mM and 1 mg/ml respectively.

For muscimol treatment, *dys-1(cx18)*; *hlh-1(cc561)* worms were grown on classical NGM plates and L4 were then transferred for 24 hours on muscimol-containing or control NGM plates. Finally, worms were transferred back on classical NGM plates. At each step, a portion of both populations (treated and control) was fixed. The six samples were then processed for rhodamine-phalloidin staining.

Immunostaining and fluorescence microscopy

Worms were prepared by Constant Spring method (Benian *et al.*, 1996). Wild-type and LS643 (*dys-1::gfpX*) worms were respectively stained with a DYS-1 (1/200) and GFP (1/200 Invitrogen) mouse monoclonal antibodies as well as an UNC-95 polyclonal rabbit antibody (Qadota *et al.*, 2007) used as a marker for M-lines and dense bodies. Secondary antibodies, purchased from Invitrogen, were anti-mouse Alexa 488 and anti-rabbit Alexa 555, each used at 1/200 dilution. Stained samples were mounted on a glass slide with DAKO (Invitrogen) as mounting solution (1/2 in washing solution).

Acquisition of images was done on a Zeiss LSM510 confocal microscope using 63X oil immersion objective with the LSM software (Zeiss). Image post-processing was performed in ImageJ, with the “Grays” LUT in Figure 1 A-C, E-G images and “Fire” LUT in Figure 3H.

Quantification and mapping of muscle degeneration

Animals were cultured, harvested, fixed and stained with phalloidin-rhodamin as previously described (Lecroisey et al., 2013). Mapping of the degenerated cells was carried out following Hedgecock et al. (1987) numeration. The cells of the two most visible quadrants were scored for 24 worms per condition. Three independent experiments were gathered to obtain the results presented in Figure 3A-C.

Statistical analyses were carried out with ExcelStat Software using the Mann-Whitney test.

For the cell-autonomous approach, 144 quadrants were counted. In 46 of them the cell 16 was degenerating, in 98 of them the cell 16 was healthy. The state (degenerating or not) of the neighbouring cells was assessed in these two populations of quadrants. The probability of degeneration for each of the neighbouring cell was then calculated in the two populations. We used a Chi-2 test to check that the probabilities were not significantly different between the two populations (dof = 3 as there was 4 compared probabilities between the two populations).

LifeAct Daily Imaging

Worms carrying the LifeAct transgene were individually taken from the plate using a micropipette and M9 to avoid any damage. They were then dropped off on a slide with a 0,5% agar pad, 10 µl of M9 and about fifty 40 µm microbeads (Themofisher, Vermont, C). A coverslip with a 0,5% agar pad was gently put over the worm and the montage was immediately observed under a Zeiss Axioscop microscope using a 40X air objective and images were acquired with Metaview software. Cell of interest was sought gently rotating the worm using the beads and mapped using Hedgecock et al. (1987) numeration. Worms were then released from the montage and put back on their individual plate using a micropipette and the resting M9 till the next acquisition.

Worms were processed as described above at L4 (*dys-1(cx18); hlh-1(cc561)*) or 3-days post-L4 (*dys-1(cx18)*) and the same mapped cell of interest was imaged every 4 h for an overall experimental time of 20 h. Series of 5 images of each cell were then processed in JavaMorph to obtain a morphing of the cell for 20 h.

Quantification of movement

Wild-type worms were grown on 0.8%, 2% and 5% agar NGM plates. The number of body bends of 30 worms was assessed during 20 seconds periods for each condition. The movement of 10 worms grown on 2% agar NGM was also individually assessed after transfer

to 0.8%, 2% and 5% agar NGM. A body bend is defined as a period of one sinusoidal movement.

Electron microscopy

For immunolabelling, LS643 (*dys-1::gfpX*) adult worms were picked and processed as previously described (Lecroisey et al., 2008).

For morphological analysis, N2, LS292 *dys-1 (cx18)*, PD4613 *hlh-1 (cc561)* and LS587 *dys-1 (cx18) ; hlh-1 (cc561)* worms were picked up from staged plates after egg-lay preparation. High-pressure freezing, freeze-substitution and flat embedding were performed as previously described (Kolotuev et al., 2010). Ultramicrotomy was carried out so as to image the mid-body area around the vulva.

Measurements on electron-micrographs

Cells and organelles size and shape were measured from electron-micrographs in ImageJ. Results were then exported to R where appropriate statistical analysis was carried out.

Statistical analysis

For the measurements on electron micrographs, variance equality between the tested population and wild-type condition was first addressed by the Fisher-Snedecor test. Then, normality of the data was addressed by the Shapiro-Wilk test. When both tests showed variance equality and normality of the data, the Student t-test was used to address the mean difference between the two populations. Otherwise, the non-parametric Wilcoxon test was used.

Chapitre 6^{ème} :

Discussion Générale et Perspectives

I. Physiopathologie chez le modèle DMD

I.1. Les défauts précoces en absence de DYS-1

Chez le ver sauvage, DYS-1 est localisée au sarcolemme tout autour de la cellule avec une localisation légèrement plus importante autour des bases des corps denses (Article n°3). Cette localisation concorde avec la localisation de DYB-1 et de SGCA-1 indiquant la localisation du DGC à la base de cette structure. L'absence de dystrophine perturbe le développement du fuseau sarcomérique chez les doubles mutants *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)*. Nos observations de la morphologie ultra-structurale des vers du stade L1 au jeune adulte ont permis d'identifier et d'établir l'évolution de deux altérations précoces.

Premièrement, la croissance des corps denses semble être ralentie et hétérogène aux stades L1 et L2 avant d'atteindre, au stade L3, une taille identique au contrôle (Article n°3). Il est donc possible que, en dépit de leur apparence normale (taille, densité aux électrons), les corps denses des vers *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* au stade L3 aient des défauts d'organisation et de ce fait pourraient être moins résistants. Des résultats antérieurs dans l'équipe ainsi que des résultats présentés dans l'article n°1 montrent que la surexpression de protéines du corps dense réduit la dégénérescence (Gieseler *et al.*, 2000 ; Gieseler *et al.*, 2002 ; Article n°1). Ces résultats sont à la base de notre proposition selon laquelle un renforcement mécanique du corps dense permettrait la réduction de la dégénérescence musculaire.

Deuxièmement, en absence de dystrophine, le sarcolemme présente des trous dès le stade L2, et les cellules montrent une accumulation de vésicules sub-sarcolemmales dès le stade L3 (Article n°3). Ces observations nous ont mené à l'hypothèse selon laquelle, les cellules, pour maintenir leur intégrité réparent la membrane par endocytose de la région altérée. Les hypothèses concernant le mécanisme sous-jacent à cette réparation sont développées dans le paragraphe I.3..

Chez les vertébrés, l'absence de dystrophine provoque la disparition du DGC au sarcolemme, voire son agrégation dans les cellules (voir Chapitre 2^{ème}, §III.3.). Les résultats de thèse d'April Reedy indiquent qu'un phénomène équivalent pourrait se produire dans la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*. La fonction du DGC serait donc perturbée à la suite de son absence d'ancrage par la dystrophine fragilisant ainsi 1. le sarcolemme où il est localisé et 2. les corps denses qu'il ancre à la membrane. A forces de répétition du cycle

contraction/relâchement, le sarcolemme pourrait se déliter et entraîner le décrochement et/ou la désagrégation des corps denses.

I.2 Les conséquences de ces défauts précoces

La désagrégation des corps denses est probablement à l'origine des défauts de locomotion observés chez les vers avant même l'observation en microscopie optique par rhodamine-phalloïdine de la première cellule dégénérée (Article n°3). Nous avons observé, dès le stade L3, l'accumulation de vésicules multi-membranées ce qui indique l'activation du processus autophagique dans ces cellules. Ce mécanisme de dégradation des protéines et des organites endommagés pourrait être impliqué dans l'élimination de ces débris de corps denses.

Les trous provoqués dans la membrane perturberaient l'homéostasie calcique de la cellule et pourraient être à l'origine des défauts morphologiques observés pour les mitochondries à partir du stade L4 (Article n°3) et de leur dysfonction (Article n°2). De plus, nos résultats indiquent que la perte d'intégrité du sarcolemme est probablement responsable de l'accumulation de vésicules mono-membranées, traces d'un mécanisme de réparation du sarcolemme (Article n°3 et voir Chapitre 6^{ème} §II.2.).

I.3. Le type de mort cellulaire

L'analyse morphologique du stade tardif du processus de dégénérescence présentée dans l'Article n°3 suggère une mort par nécrose. Les altérations importantes de la membrane plasmique, le gonflement des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique sont autant de signes attestant d'une mort de type nécrotique. De plus, les noyaux que nous avons pu observé au cours du processus de dégénérescence ne présentaient pas les caractéristiques du noyau apoptotique telles que sa fragmentation et/ou la margination de la chromatine.

Le modèle présenté dans l'Article n°2 suggère un rôle majeur au cytochrome c dans la mort de la cellule en dégénérescence. Chez les mammifères le cytochrome c est un signal intracellulaire décrit pour être impliqué dans le déclenchement de l'apoptose (Boehning *et al.*, 2003). Chez *C. elegans*, CYC-2.1/cytochrome c n'est pas impliqué dans la formation de l'apoptosome. Il est donc possible que le rôle de CYC-2.1 soit indépendant du type de la mort apoptotique classiquement décrite. Dans cet article, nous proposons un rôle pour l'interaction entre CYC-2.1 et ITR-1/IP3R dans l'amplification de la surcharge calcique des mitochondries, l'altération de leur morphologie et la mort des cellules. Chez *C. elegans* la surcharge calcique est impliquée dans l'initiation de la nécrose neuronale (Driscoll et Chalfie,

1991 ; Xu *et al.*, 2001 ; Bianchi *et al.*, 2004). L'augmentation de la concentration en calcium active les calpaïnes (protéases calcium-dépendantes), qui peuvent détériorer la cellule. Le clivage d'ITR-1 par ces protéases pourrait amplifier le relargage de calcium dans le cytoplasme et les mitochondries et ainsi accélérer la dégradation de la cellule.

Les données morphologiques de l'Article n°3 orientent donc plutôt le type de mort de la cellule musculaire en dégénérescence vers la nécrose. Les données génétiques de l'Article n°2 indiquent une mort cytochrome c-dépendante. Des études supplémentaires seront nécessaires pour identifier clairement le rôle du cytochrome c dans la mort des cellules musculaires et pour déterminer si la nécrose est le seul processus de mort impliqué dans la dégénérescence musculaire.

II. Exercice et réparation membranaire dans la physiopathologie

Les deux phénotypes primaires observés au sarcolemme et au corps dense sont en lien étroit avec une fonction « mécanique » de la dystrophine. Nous avons, par la suite, souhaité étudier l'implication de l'exercice dans le mécanisme de dégénérescence musculaire chez *C. elegans*.

II.1. Exercice dans la physiopathologie

Pour étudier le rôle de l'exercice dans la dégénérescence musculaire, nous avons cultivé les vers modèles de la DMD sur des milieux de concentration en agar différente (Article n°3). Nous avons d'abord démontré que plus la concentration en agar dans le milieu est élevée plus le ver a du mal à se déplacer. Puis nous avons montré que l'exercice provoqué par ces conditions particulières de culture augmente la dégénérescence musculaire. Enfin, nous avons montré que l'immobilisation au muscimol des vers pendant 24h permettait de ralentir l'évolution du phénomène et que ce ralentissement reposait sur un meilleur état des membranes plasmiques et des corps denses. Ces résultats suggèrent que la période d'immobilisation serait bénéfique à une réparation des membranes plasmiques et des structures d'ancrage des filaments fins. Ces résultats sont particulièrement intéressants si on les extrapole à la maladie humaine. Evidemment, le message n'est pas d'empêcher toute activité sportive aux jeunes garçons atteints de DMD, d'autant plus que la question de l'effet de l'exercice chez les patients DMD est toujours débattue (Jansen *et al.*, 2010 ; Gianola *et al.*, 2013). Par contre, ces résultats démontrent l'intérêt particulier à porter à l'exercice des muscles diaphragmatiques et cardiaques qui sont les seuls à ne jamais connaître de temps de repos.

Le fait de mettre les vers en culture sur un milieu de concentration en agar plus faible, à l'inverse, a eu pour effet de diminuer le niveau de dégénérescence. En effet, des résultats de l'équipe montrent qu'en culture liquide, les vers *dys-1(cx18)* ; *hlh-1(cc561)* ont un niveau de dégénérescence quasi nul (résultats non publiés). Pourtant, dans ce type de milieu (liquide ou solide à faible concentration en agar), le ver produit plus de mouvements mais s'oppose à moins de force de frottement et produit donc moins de force à chaque cycle de contraction/relâchement (Article n°3 ; Shen *et al.*, 2011). D'ailleurs, le groupe de Monica Driscoll observe que l'exercice de nage améliore les performances physiques des vers sauvages (Mary Ann Royal, communication personnelle, voir Chapitre 6^{ème} §IV.). Pour les vers *dys-1(cx18)*; *hlh-1(cc561)*, ces conditions de culture pourraient être assimilées à un exercice d'endurance alors que les conditions présentées précédemment seraient assimilées à un exercice de force. Ainsi, ces deux types d'exercice auraient des effets contraires sur le niveau de dégénérescence. Ces résultats apportent un élément de réponse à la question controversée de l'effet de l'exercice sur la dégénérescence musculaire. Bien que ces résultats requièrent confirmation chez des modèles vertébrés, ils indiquent que l'exercice d'endurance serait bénéfique pour les patients, alors que l'exercice de force serait à proscrire.

II.2. Protection et réparation membranaire dans la physiopathologie

Les cavéoles sont des invaginations membranaires à la surface des cellules dont la structure dépend des protéines de la famille des cavéolines. Dans le muscle vertébré, les cavéoles ont un rôle de prévention dans la perte d'intégrité du sarcolemme (Parton et Simmons, 2007). En augmentant la superficie membranaire du muscle, elles permettent à la cellule de se protéger contre le stress mécanique dû aux cycles de contraction/relaxation répétés (Sinha *et al.*, 2011). Chez *C. elegans*, les cavéolines se localisent au niveau des boutons synaptiques et ne semblent pas impliquées dans un mécanisme de protection de la membrane (Parker *et al.*, 2007). J'ai pu observer, par microscopie électronique, des cellules musculaires en état de contraction et de relaxation chez les vers sauvages coupés selon l'axe sagittal. Je n'ai pas observé de structures semblables aux cavéoles, en revanche, j'ai pu observer des plis au niveau de la membrane plasmique sur la face interne de la cellule en contraction (résultats non-publiés). L'ensemble de ces résultats indique que la superficie membranaire des cellules musculaires pendant les cycles de contraction chez *C. elegans* est régulée de façon passive et qu'il n'y a pas de structures similaires aux cavéoles.

Chez les vertébrés, le rôle de la dysferline dans la réparation membranaire est largement documenté (voir pour revue Han et Campbell, 2007 ; Han, 2011). En revanche, chez *C. elegans*, l'expression du gène *fer-1/dysferlin* dans le muscle est débattue. Il est exprimé dans des cellules musculaires de *C. elegans* mises en culture (Krajacic *et al.*, 2009),

et dans la gonade mâle où son expression est nécessaire à la fusion de vésicules dans les spermatozoïdes (Achanzar et Ward, 1997). Il n'est pas exprimé dans le muscle en développement chez l'embryon (Fox *et al.*, 2007) ni dans le muscle adulte. De plus, il n'existe pas d'orthologue de MG53 – principal partenaire de la dysferline – chez *C. elegans*. L'implication d'une réparation membranaire *fer-1*-dépendante dans le muscle est donc peu probable.

Les sphingomyélinases acides sont des enzymes capables de modifier la nature des lipides de la face externe de la membrane plasmique afin de provoquer son invagination et la formation d'endosomes (Tam *et al.*, 2010). L'exocytose de cette enzyme dans le milieu extracellulaire peut être dirigée par l'entrée de calcium au niveau d'un trou dans la membrane et participer à sa « cicatrisation » par endocytose de la région environnante au trou. Nos observations par microscopie électronique présentées dans l'Article n°3 montrent la présence de vésicules sous-membranaires trouées suggérant l'implication de ce mécanisme dans la réparation membranaire du muscle de *C. elegans*. Il existe trois gènes codant des ASM (pour « *Acid SphingoMyelinase* ») chez *C. elegans*. De plus, la recherche bio-informatique de protéines présentant les domaines « saposin B-type » et/ou « C2 » reconnus pour être impliqués dans la réparation membranaire a permis de dresser la liste d'une quinzaine de protéines de *C. elegans* potentiellement impliquées dans ce processus. Il serait intéressant de tester l'expression musculaire de ces gènes et de déterminer si ces protéines sont impliquées dans la réparation du sarcolemme chez *C. elegans*.

Nos observations ont également montré la formation de bourgeonnements à la membrane plasmique après immobilisation des vers par traitement transitoire au muscimol. Ces bourgeonnements sont vraisemblablement le signe d'un autre mécanisme de réparation membranaire où la région altérée serait éliminée à l'extérieur de la cellule (dans le pseudocoelome) plutôt que par endocytose. A notre connaissance, les mécanismes moléculaires à l'origine d'un tel processus sont inconnus à l'heure actuelle, mais leurs effets bénéfiques sur le niveau de dégénérescence chez le ver en font des pistes particulièrement intéressantes.

II.3. Phases de léthargie chez *C. elegans*

Avant d'atteindre le stade adulte, *C. elegans* passe par 4 stades larvaires entre lesquels il mue. Avant chacune de ces mues, il subit une phase de léthargie où il s'immobilise pendant deux heures (Cassada et Russell, 1975 ; Singh et Sulston, 1978 ; Raizen *et al.*, 2008). Cette période de léthargie à chaque mue pourrait fonctionner comme le muscimol retardant ainsi le début du processus de dégénérescence musculaire. Chez l'adulte, le ver ne montre plus d'aussi longues périodes d'arrêt et le sarcolemme de ses cellules n'aurait plus

la possibilité de « cicatriser » suggérant ainsi un rôle majeur pour les périodes de léthargie aux stades larvaires.

Nous pourrions utiliser les deux mutants gain et perte de fonction du gène *egl-4* (*ad450* et *n479* respectivement) régulant le temps de léthargie avant les mues afin de valider l'importance de ces phases d'immobilisation développementales dans la réparation musculaire. L'allèle *ad450* provoque un raccourcissement du temps de léthargie avant chaque mue, alors que l'allèle *n479* induit des phases de léthargies ectopiques à l'âge adulte (Raizen *et al.*, 2008). Chez le mutant *egl-4(n479)*, ces temps d'immobilisation chez l'adulte pourraient être favorables à la réparation musculaire et ainsi réduire la dégénérescence chez les *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)*. De plus, pour identifier le mécanisme responsable de la réparation membranaire chez *C. elegans*, nous pourrions observer spécifiquement les larves *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* pendant leurs périodes de léthargie. Cette approche morphologique pourrait être couplée à une approche par génétique classique à l'aide de RNAi dirigés contre les différents ARNm des protéines cibles citées ci-dessus (FER-1, ASM-1, ASM-2, ASM-3 et les autres protéines contenant un domaine « saponin B-type » et/ou « C2 »).

Il a été démontré que pendant cette phase de léthargie, le niveau d'expression des protéines du corps dense diminue et que la protéine UNC-95 est ubiquitinyllé par RNF-5 dont le niveau d'expression augmente à chaque mue (Zaidel-Bar *et al.*, 2010). Ce résultat indique qu'après chaque mue, un renouvellement en profondeur des protéines du corps dense serait mis en place. Cette hypothèse pourrait expliquer que la dégénérescence musculaire des vers *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* mesurée par marquage des filaments d'actine augmente fortement à partir du stade L4+1 où le ver ne connaît plus de phase de léthargie en tant que telle (Gieseler *et al.*, 2000).

En conclusion, nos résultats ouvrent deux nouvelles pistes d'investigation dans l'étude de la dégénérescence musculaire chez *C. elegans* :

- les effets opposés des exercices de force et d'endurance et l'effet bénéfique du repos ;
- la réparation membranaire pour le maintien de l'intégrité de la cellule musculaire.

L'étude expérimentale de ces pistes permettrait de mieux appréhender la physiopathologie de la DMD et de les évaluer en tant que voies thérapeutiques pour le traitement de la maladie.

III. Analyse systémique de la dégénérescence musculaire chez *C. elegans*

La mesure de la dégénérescence dans notre modèle et la méthodologie associée sont des points clés dans notre étude qu'il est nécessaire de bien éclaircir.

Le nématode *C. elegans* possède exactement 95 cellules musculaires striées appelées « *body wall muscles* ». Lorsque nous parlons du niveau de dégénérescence musculaire chez *C. elegans*, nous faisons référence au nombre de cellules musculaires ayant une perturbation du réseau de filaments d'actine visualisé par coloration à la phalloïdine-rhodamine en microscopie optique. Etant donné qu'il n'y a pas de régénérescence musculaire chez *C. elegans*, cette valeur indique le nombre de cellules atteintes et permet ainsi de mesurer le taux de dégénérescence musculaire à un moment donné. Ce phénotype est corrélé au phénotype de perte de la mobilité qui permet l'évaluation de la fonction musculaire (Gieseler *et al.*, 2000). D'ailleurs, il est important de préciser qu'il n'existe pas nécessairement une corrélation entre perturbation du réseau de filaments d'actine et mobilité. En effet, un ver peut présenter un réseau de filaments d'actine « sauvage » sans pour autant être capable de se déplacer. Ceci est notamment le cas pour des mutants présentant un défaut de la transmission neuro-musculaire. De plus, chez des mutants présentant un phénotype de dégénérescence musculaire, il est probable que le nombre de cellules dégénérées comptées sous-estime le nombre réel de cellules en cours de dégénérescence lorsque l'état du réseau de filaments d'actine est visualisé par marquage à la phalloïdine-rhodamine. En effet, mes observations par microscopie électronique ont montré des défauts d'organisation des fuseaux sarcomériques dès le stade L1, alors que l'observation par microscopie optique de vers après marquage à la phalloïdine-rhodamine ne révèle de défauts qu'à partir des stades L3/L4.

Les mesures du niveau de dégénérescence sont généralement réalisées au stade L4+3 à 15°C où le double mutant *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* atteint son niveau de dégénérescence maximum avant d'aboutir à un plateau. Il est parfois nécessaire de réaliser ces mesures sur plusieurs points afin de dresser un profil dynamique de l'évolution de la dégénérescence musculaire. Afin de pouvoir évaluer plus précisément, l'effet de suppresseurs pharmacologiques ou génétiques sur l'évolution de la dégénérescence musculaire, il serait très intéressant de réaliser des mesures dynamiques par rapport au modèle DMD. En effet, trois cinétiques peuvent être modélisées dans le cas d'une réduction de 50% de la dégénérescence observée à L4+3. Cette réduction pourrait résulter :

- d'un ralentissement dans l'augmentation du nombre de cellules musculaires dégénérées (cas 1 sur la Figure 26);
- d'un déclenchement plus tardif du processus de dégénérescence (cas 2) ;
- d'une diminution du niveau du plateau (cas 3).

La réduction observée pourrait également reposer sur une combinaison de ces trois possibilités.

Dans le cas 1, nous pourrions imaginer que le temps moyen de dégénérescence par cellule serait allongé. Cette notion a été abordée dans l'article n°3 par la mesure du temps de dégénérescence à l'aide du transgène LifeAct. En lien avec nos résultats de l'article n°2, un candidat pour cette cinétique de suppression pourrait être une molécule ralentissant la fuite de calcium du réticulum par exemple. La dégradation progressive des protéines, des structures (dont les corps denses) et des organites serait alors ralentie.

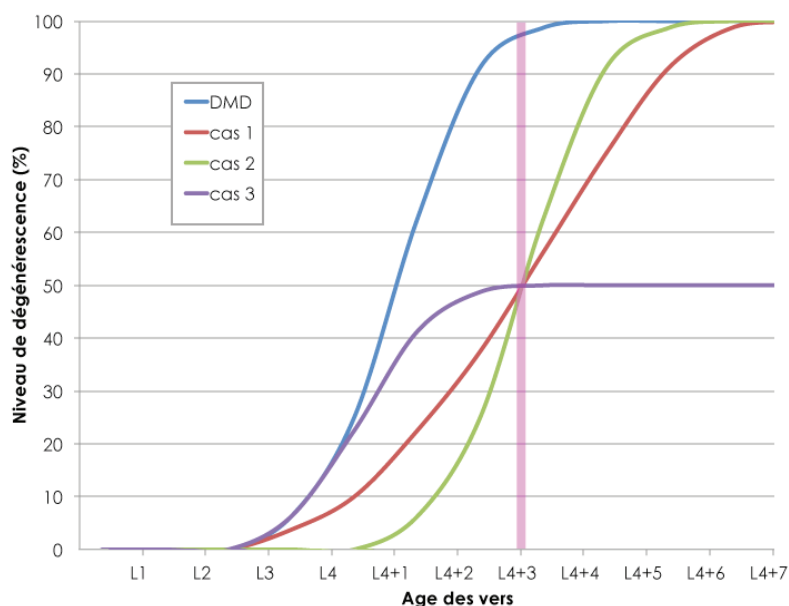


Figure 26 : Représentation graphique de l'évolution du niveau de dégénérescence musculaire du modèle DMD et de trois cinétiques de suppression d'environ 50% à L4+3 jours. Le trait rose matérialise le point « L4+3 jours » où le niveau de dégénérescence est classiquement mesuré.

Le cas 2 ferait intervenir une notion de seuil à atteindre sur l'« échelle » du stress mécanique avant que la dégénérescence ne commence. Ce seuil serait ici plus élevé et le début de la dégénérescence serait par conséquent retardé (ici L4+1). Un candidat pour ce mode de suppression pourrait d'abord rendre les corps denses plus solides sans pouvoir continuer à les renforcer avec le temps. Ainsi les corps denses pourraient tenir plus longtemps mais finir par céder.

Le cas 3 ferait intervenir un mécanisme de ralentissement capable de diminuer le niveau du plateau de la dégénérescence. Comme nous l'expliquons dans l'Article n°3, le plateau de dégénérescence atteint chez les *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)* à L4+3 jours serait expliqué par une baisse de la locomotion des vers due à la perte d'un trop grand nombre de cellules. Ce suppresseur diminuerait la locomotion du ver à partir du stade L4+2. Par exemple,

le transfert de vers au stade L4+2 sur des boîtes à concentration faible de muscimol devraient provoquer un ralentissement de la locomotion des vers et montrer une cinétique de dégénérescence de ce type.

La logique de chacune de ces cinétiques proposée pour un suppresseur peut aussi s'appliquer à un « élévateur » de la dégénérescence musculaire. Dans le cas 1, l'élévateur accélérerait l'augmentation du nombre de cellule dégénérées. Dans le cas 2, il provoquerait un déclenchement plus précoce du processus. Dans le cas 3, il hausserait le niveau du plateau atteint.

La classification de différents suppresseurs génétiques ou pharmacologiques selon leur cinétique pourrait nous aider à mieux comprendre leur mode d'action. *In fine*, cela pourrait nous aider à identifier les suppresseurs que nous pourrions combiner afin de réduire le niveau de dégénérescence de façon plus importante.

IV. Le mutant *dys-1(cx18)* et implication de la mutation *hlh-1(cc561)*

L'absence de dystrophine chez *C. elegans* provoque un niveau de dégénérescence de 0,1 à 0,2% (ce qui correspond à 2-4 cellules dégénérant parmi les 95 cellules de « *Body wall muscles* » d'un échantillon de 20 vers *dys-1(cx18)* à L4+3 jours). Il est difficile de comparer ces observations avec celles faites sur les autres modèles animaux de la DMD en raison des différences entre les approches de mesure de la dégénérescence. Cependant, nos résultats permettent de proposer plusieurs hypothèses pour expliquer ce « faible » niveau de dégénérescence et des pistes de compréhension du rôle de la mutation thermosensible d'*hlh-1* dans l'augmentation de la fréquence du phénomène chez les vers *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)*.

« Il n'y a pas d'inflammation chez le ver »: le rôle de l'inflammation dans l'aggravation du phénotype dystrophique chez les vertébrés a été démontré (voir Chapitre 2^{ème} §IV.3.). Chez *C. elegans* de tels mécanismes ne semblent pas exister ce qui pourrait expliquer qu'il n'y ait pas d'amplification du processus et que finalement le taux de dégénérescence soit plus faible. De plus, nous avons montré dans l'Article n°3 que le phénomène de dégénérescence était autonome à l'échelle cellulaire indiquant qu'il n'y a pas non plus de propagation à la cellule voisine.

« Le ver ne vit pas assez longtemps »: les mécanismes impliqués dans le processus de dégénérescence, comme la réparation membranaire, l'autophagie, la dynamique mitochondriale, sont des mécanismes biologiques suivant une dynamique dont la grandeur de temps est peut-être incompatible avec la courte durée de vie du ver. Bien que la dégénérescence chez les simples mutants *dys-1(cx18)* n'atteigne jamais celle des doubles mutants *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)*, il est intéressant de noter qu'elle atteint son plateau plus tardivement (L4+6 jours, Article n°3, Figure 3). Si l'on suit cette hypothèse, l'utilisation du double mutant permettrait soit 1. d'accélérer ces différents mécanismes biologiques ou 2. de les déclencher plus précocement. La première hypothèse suggère que la mutation d'*hlh-1(cc561)* provoquerait la production de catalyseurs (chimiques ou enzymatiques) permettant d'accélérer ces réactions. La seconde hypothèse suggère que la mutation d'*hlh-1(cc561)* abaisse le seuil à partir duquel tel ou tel processus est enclenché et accélérant ainsi l'apparition de la dégénérescence.

De façon intéressante, le travail d'une doctorante de l'équipe sur l'homéostasie protéique suggérerait également une notion de « seuil » à atteindre pour déclencher la dégénérescence. Plus précisément, le phénomène de dégénérescence était déclenché beaucoup plus fréquemment en provoquant l'accumulation artificielle d'agrégats protéiques dans les cellules (thèse d'April Reedy, Université Claude Bernard Lyon1, 2012).

En lien avec cette notion de « seuil », nos études suggèrent un rôle de la protéine ZYX-1a dans le déclenchement du processus de dégénérescence à partir d'un certain seuil d'altération des structures sarcomériques (Article n°1). Il est possible que dans le simple mutant *dys-1(cx18)*, jusqu'au stade de L4+3 jours, ces altérations ne soient pas suffisantes pour que ZYX-1a soit localisé au noyau pour provoquer le signal de mort cellulaire. Dans cette hypothèse, la fonction de la mutation thermosensible d'*hlh-1* serait de fragiliser le muscle pour que les altérations des fuseaux sarcomériques soient suffisantes pour déclencher une réponse au stress comme le déplacement de la protéines ZYX-1a du corps dense au noyau chez les vers *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)*.

« Les muscles du ver sont plus résistants »: chez les vertébrés, le sarcomère ne semble relié à la matrice extracellulaire que par le couple [disque Z+costamères]. En effet, l'ancrage des lignes M à la membrane et au niveau de la matrice extracellulaire (MEC) est débattu. En revanche, chez *C. elegans*, les corps denses et les lignes M sont clairement ancrés au niveau du sarcolemme et de la MEC (voir Chapitre 4^{ème} §III.4.2.). De plus, par l'absence de costamères en tant que tels, l'ancrage des corps denses – qui sont des équivalents fonctionnelles à la fois des disques Z et des costamères– est plus direct et peut-être plus résistant.

Les muscles vertébrés sont organisés en myofibrilles et par conséquent, les sarcomères centraux sont éloignées de l'ancrage dans la membrane et dans la MEC. De façon intéressante, la sévérité de la maladie chez les différents organismes modèles semble corrélée avec le diamètre moyen des fibres musculaires. Chez *C. elegans*, l'organisation des structures équivalentes aux myofibrilles est différente dans le sens où, analogiquement, chaque myofibrille serait directement ancrée dans le sarcolemme et la MEC.

Enfin, nos résultats et d'autres ont montré que la dynamique des protéines musculaires des structures d'ancrage serait beaucoup plus rapide que chez les vertébrés (Article n°1 ; Ghosh et Hope, 2010). Ainsi le remplacement rapide des protéines sarcomériques permettrait le renouvellement des protéines endommagées et permettrait aux structures musculaires de mieux résister à l'absence de dystrophine.

Dans cette hypothèse, la mutation thermosensible d'*hlh-1* chez le modèle DMD fragiliserait le muscle adulte. Du fait de son rôle de facteur de transcription myogénique, HLH-1 est impliqué dans le développement du muscle et pourrait l'être dans le renouvellement des protéines du sarcomère. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions mesurer le niveau d'expression de différentes protéines sarcomériques chez les simples mutants *hlh-1(cc561)* et chez les vers sauvages. La liste des gènes cibles d'HLH-1 a été publiée (Lei et al., 2010). Plus indirectement, si l'on suit cette hypothèse de « fragilisation » du muscle, la mutation d'*hlh-1* pourrait être à l'origine de perturbations du renouvellement par dégradation des protéines du sarcomère. En effet, la dégradation contrôlée de certaines protéines musculaires médiée par les calpaïnes est nécessaire au maintien de l'état du muscle chez *C. elegans* (Etheridge et al., 2012). Pour vérifier cette hypothèse, il serait particulièrement intéressant de tester l'implication des calpaïnes dans le processus de dégénérescence et de mesurer la dynamique des protéines sarcomériques par FRAP dans le contexte *hlh-1(cc561)*.

Ces différentes hypothèses co-existent et jouent probablement de façon conjointe dans la résistance du muscle de *C. elegans*. Il serait intéressant de comprendre précisément la « résistance » à l'absence de dystrophine chez *C. elegans* pour l'envisager comme piste thérapeutique dans le traitement de la DMD.

VI. La dégénérescence dystrophine-dépendante : un vieillissement du muscle accéléré ?

La sarcopénie est définie par la baisse de la masse, de la force et de la fonction musculaire avec l'âge (voir Chapitre 1^{er} §IV.2.). La dégénérescence musculaire et la sarcopénie sont deux phénomènes présentant des similarités évidentes chez les vertébrés.

Dans les deux cas, le muscle développe moins de force, il perd ses capacités régénératives, il présente une inflammation chronique aggravant son état et présente une accumulation de tissus conjonctif et adipeux (Kent-Braun *et al.*, 2000). De plus, la diminution spécifique du diamètre des fibres II dans la sarcopénie rappelle l'atteinte précoce de ce type de fibres dans le mécanisme de dégénérescence. Enfin, les altérations métaboliques et mitochondriales seraient partagées par les deux phénomènes et seraient à l'origine d'une augmentation de la production de ROS (pour « *Reactive Oxygen Species* »). Par exemple, l'accumulation de mutations dans l'ADN mitochondrial serait à l'origine de nombreux dysfonctionnements dans la mitochondrie du muscle vieillissant (voir pour revue Peterson *et al.*, 2012). Dans la dégénérescence musculaire dystrophine-dépendante, l'augmentation cytosolique de calcium mène à l'adaptation des mitochondries à ce changement et provoque l'augmentation de la production de ROS (Brookes *et al.*, 2004). Enfin, il semblerait que l'autophagie soit altérée dans ces deux phénomènes (De Palma *et al.*, 2012 ; O'Leary *et al.*, 2013).

En revanche, la sarcopénie et la dégénérescence diffèrent au regard des défauts sub-cellulaires observés. En effet, la perturbation du sarcolemme et des structures sarcomériques caractéristique des fibres en dégénérescence n'est pas observée dans le processus de sarcopénie. Ces observations coïncident avec les activations des cascades de morts cellulaires supposées dans chacun des deux phénomènes. Alors que la nécrose semble être le type de mort à l'origine de la perte des fibres musculaires dans la DMD, la sarcopénie présente une activation de la voie apoptotique (voir pour revue Dirks-Naylor et Lennon-Edwards, 2011). Enfin, l'exercice a été démontré bénéfique pour lutter contre la sarcopénie (voir pour revue Butler-Browne et Bigard, 2006) alors que son effet est toujours débattu en ce qui concerne les dystrophies musculaires et la DMD en particulier (Jansen *et al.*, 2010 ; Gianola *et al.*, 2013).

Chez *C. elegans*, une telle comparaison morphologique peut être dressée à la lumière de nos résultats sur la dégénérescence musculaire chez le modèle de la DMD, et de ceux du groupe de Monica Driscoll sur le vieillissement du nématode et de son tissu musculaire en particulier (Herndon *et al.*, 2002).

Premièrement, dans les deux cas, la locomotion du ver est altérée (Gieseler *et al.*, 2000, ; Herndon *et al.*, 2002) et cette perte de locomotion serait due à une altération musculaire plutôt que neuronale. Au niveau cellulaire, Herndon *et al.* observent une diminution de la taille des fuseaux sarcomériques lors de la sarcopénie, alors que leur taille ne semble pas être altérée pendant la dégénérescence musculaire. Lors du vieillissement du muscle, les corps denses semblent bien conservés contrairement à nos résultats qui montrent un « éclatement » ou un détachement de ces structures du sarcolemme (Article n°3).

Herndon *et al.* observent également une rupture individuelle de filaments de myosine alors que nos résultats montrent une bonne conservation des filaments épais en tant que tels mais plutôt une altération de leur structure d'ancrage – la ligne M – menant à une désorganisation du réseau entier. Alors qu'au stade le plus avancé du vieillissement du muscle, la protéine MYO-3 ::GFP ne révèle qu'une légère perturbation des filaments épais (parallélisme altéré, présence de chevrons ; Herndon *et al.*, 2002, Nature), nos résultats montrent la désorganisation et la perte totale de ces structures au stade le plus tardif. Par rapport au phénotype de désorganisation des filaments d'actine observé chez les *dys-1(cx18); hlh-1(cc561)*, et dont la dynamique est décrite dans l'article n°3, un marquage de cellules musculaires vieillissantes à la phalloïdine-rhodamine ne montre une disparition du signal que dans de très rares cellules (0,05-0,15% des cellules, 9 jours après le stade L4 à 20°C) et sans présenter les différentes étapes morphologiques décrites dans la dégénérescence musculaire (Adeline Mergoud-dit-Lamarche, communication personnelle).

Deuxièmement, par l'utilisation d'un transgène marquant les noyaux et les mitochondries, la perte de marquage nucléaire a été observée dans les deux cas (Giacomotto *et al.*, 2012 ; Adeline Mergoud-dit-Lamarche, communication personnelle). Cependant, l'utilisation de ce transgène est débattue : ce transgène réduit la dégénérescence musculaire et la durée de vie. De plus, l'augmentation de la taille du nucléole du noyau des cellules musculaires a été observée dans les deux cas (Nyamsuren *et al.*, 2007, ; Herndon *et al.*, 2002). Cette observation suggérerait une modification de la biogénèse ribosomiale mais la morphologie générale des noyaux est si altérée que l'on peut douter d'une explication fonctionnelle de ce phénotype nucléolaire.

Troisièmement, des travaux réalisés dans l'équipe indiquent que l'UPR (pour « *Unfolded Protein Response* ») joue un rôle dans le mécanisme de dégénérescence musculaire. En effet des mutations dans les gènes *atf-6* (codant un facteur de transcription cAMP-dépendant orthologue de ATF6alpha des mammifères) et *ire-1* (codant une serine-threonine kinase, orthologue de l'inositol-requiring 1 protein kinase (Ire1) de *Saccharomyces cerevisiae* et de la protéine humaine pour endoplasmic reticulum-to-nucleus signaling 1, ERN-1) – requis pour l'UPR – favorisent la dégénérescence musculaire dans le contexte génétique *hlh-1(cc561)*. Ces résultats suggèrent une fonction de l'UPR dans le maintien de l'état du muscle en cas de stress dégénératif (résultats non-publiés). En revanche, aucun résultat concernant le rôle de l'UPR dans la sarcopénie chez *C. elegans* n'a été rapporté à ce jour.

Ensuite, nous avons montré dans l'Article n°2 que la morphologie et la fonction mitochondriales étaient altérées et impliquées dans le processus de dégénérescence. Nous avons également montré que le réseau mitochondrial s'orientait vers une morphologie similaire avec l'âge (Article n°2, Figure 2). Parallèlement, l'accumulation de ROS dans le muscle vieillissant chez *C. elegans* a été récemment observée, suggérant une dysfonction

mitochondriale (Yang *et al.*, 2013). Cependant, les auteurs n'ont pas vérifié que les mitochondries étaient à l'origine de ces ROS.

Enfin, dans l'Article n°3, nous avons montré l'effet bénéfique de la diminution de la fermeté du milieu sur lequel évolue le vers sur le niveau de dégénérescence. Ces conditions de culture pourraient être considérées comme des conditions d'exercice d'endurance. Le groupe de Monica Driscoll s'intéresse également à l'effet de l'exercice sur la sarcopénie. Leurs résultats indiquent qu'un exercice de nage – qui peut aussi être considéré comme un exercice d'endurance du fait des faibles contraintes mécaniques qu'il impose – améliore l'activité physique et allonge la durée de vie. De plus, ils observent que des mutants pour la régulation positive de la densité mitochondriale en réponse à l'exercice ne montrent plus les phénotypes associés à l'exercice précédemment cités (Mary Ann Royal, communication personnelle).

Il semblerait donc qu'à l'image des vertébrés, il y ait chez *C. elegans* de nombreuses similarités entre le processus dégénératif et la sarcopénie tout en conservant certaines spécificités. Ces deux processus semblent liés, et l'intérêt de les comparer est de pouvoir identifier leurs singularités afin d'orienter les recherches soit 1. vers leurs points communs pour d'éventuelles pistes thérapeutiques communes ou au contraire 2. vers leur spécificités pour approfondir nos connaissances fondamentales à leur sujet.

Ainsi il serait d'intérêt de tester des molécules à effet bénéfique sur la dégénérescence musculaire et la sarcopénie. Notre groupe a démontré l'effet bénéfique d'un traitement à la sérotonine sur la dégénérescence musculaire (Carre-Pierrat *et al.*, 2006). Ce neurotransmetteur supprime également quelques phénotypes liés au vieillissement chez *C. elegans* (Murakami *et al.*, 2008). Il serait donc particulièrement intéressant de tester si cette molécule diminue également les observations liées à la sarcopénie chez *C. elegans* tissant ainsi un autre lien entre sarcopénie et dégénérescence musculaire.

Références bibliographiques

- Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J.C.T., Fokkema, I.F., Van Ommen, G.-J.B., and Den Dunnen, J.T. (2006). Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 34, 135–144.
- Abraham, L.S., Oh, H.J., Sancar, F., Richmond, J.E., and Kim, H. (2010). An alpha-catulin homologue controls neuromuscular function through localization of the dystrophin complex and BK channels in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 6,.
- Adams, J.C., and Watt, F.M. (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117, 1183–1198.
- Agarkova, I., Ehler, E., Lange, S., Schoenauer, R., and Perriard, J.-C. (2003). M-band: a safeguard for sarcomere stability? *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 24, 191–203.
- Alexander, M., Chan, K.K.M., Byrne, A.B., Selman, G., Lee, T., Ono, J., Wong, E., Puckrin, R., Dixon, S.J., and Roy, P.J. (2009). An UNC-40 pathway directs postsynaptic membrane extension in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 136, 911–922.
- Alexander, M., Selman, G., Seetharaman, A., Chan, K.K.M., D'Souza, S.A., Byrne, A.B., and Roy, P.J. (2010). MADD-2, a homolog of the Opitz syndrome protein MID1, regulates guidance to the midline through UNC-40 in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Cell* 18, 961–972.
- Allard, B. (2006). Sarcolemmal ion channels in dystrophin-deficient skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 27, 367–373.
- Allen, D.G., Lamb, G.D., and Westerblad, H. (2008). Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol. Rev.* 88, 287–332.
- Allen, D.G., and Whitehead, N.P. (2011). Duchenne muscular dystrophy—what causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 290–294.
- Ambros, V. (2000). Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 428–433.
- Ambrose, H.J., Blake, D.J., Nawrotzki, R.A., and Davies, K.E. (1997). Genomic organization of the mouse dystrobrevin gene: comparative analysis with the dystrophin gene. *Genomics* 39, 359–369.
- Ambrósio, C.E., Valadares, M.C., Zucconi, E., Cabral, R., Pearson, P.L., Gaiad, T.P., Canovas, M., Vainzof, M., Miglino, M.A., and Zatz, M. (2008). Ringo, a Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog with absent dystrophin but normal strength. *Neuromuscul. Disord.* 18, 892–893.
- Amenta, A.R., Yilmaz, A., Bogdanovich, S., McKechnie, B.A., Abedi, M., Khurana, T.S., and Fallon, J.R. (2011). Biglycan recruits utrophin to the sarcolemma and counters dystrophic pathology in mdx mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 762–767.
- Amin, N.M., Hu, K., Pruyne, D., Terzic, D., Bretscher, A., and Liu, J. (2007). A Zn-finger/FH2-domain containing protein, FOZ1-1, acts redundantly with CeMyoD to specify striated body wall muscle fates in the *Caenorhabditis elegans* postembryonic mesoderm. *Development* 134, 19–29.
- Amin, N.M., Lim, S.-E., Shi, H., Chan, T.L., and Liu, J. (2009). A conserved Six-Eya cassette acts downstream of Wnt signaling to direct non-myogenic versus myogenic fates in the *C. elegans* postembryonic mesoderm. *Dev. Biol.* 331, 350–360.
- Anderson, J.E., Weber, M., and Vargas, C. (2000). Deflazacort increases laminin expression and myogenic repair, and induces early persistent functional gain in mdx mouse muscular dystrophy. *Cell Transplant* 9, 551–564.
- Andersson, D.C., Meli, A.C., Reiken, S., Betzenhauser, M.J., Umanskaya, A., Shiomi, T., D'Armiento, J., and Marks, A.R. (2012). Leaky ryanodine receptors in β -sarcoglycan deficient mice: a potential common defect in muscular dystrophy. *Skeletal Muscle* 2, 9.
- Angelini, C., Pegoraro, E., Turella, E., Intino, M.T., Pini, A., and Costa, C. (1994). Deflazacort in Duchenne dystrophy: study of long-term effect. *Muscle Nerve* 17, 386–391.
- Aoki, Y., Yokota, T., Nagata, T., Nakamura, A., Tanihata, J., Saito, T., Duguez, S.M.R., Nagaraju, K., Hoffman, E.P., Partridge, T., et al. (2012). Bodywide skipping of exons 45-55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 13763–13768.

- Arahata, K., Ishiura, S., Ishiguro, T., Tsukahara, T., Suhara, Y., Eguchi, C., Ishihara, T., Nonaka, I., Ozawa, E., and Sugita, H. (1988). Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature* 333, 861–863.
- Arikawa-Hirasawa, E., Le, A.H., Nishino, I., Nonaka, I., Ho, N.C., Francomano, C.A., Govindraj, P., Hassell, J.R., Devaney, J.M., Spranger, J., et al. (2002). Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1368–1375.
- Asai, A., Sahani, N., Kaneki, M., Ouchi, Y., Martyn, J.A.J., and Yasuhara, S.E. (2007). Primary role of functional ischemia, quantitative evidence for the two-hit mechanism, and phosphodiesterase-5 inhibitor therapy in mouse muscular dystrophy. *PLoS ONE* 2, e806.
- Asakura, A., Komaki, M., and Rudnicki, M. (2001). Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 68, 245–253.
- Atkinson, R.A., Joseph, C., Kelly, G., Muskett, F.W., Frenkiel, T.A., Nietlispach, D., and Pastore, A. (2001). Ca²⁺-independent binding of an EF-hand domain to a novel motif in the alpha-actinin-titin complex. *Nat. Struct. Biol.* 8, 853–857.
- Augier, N., Leger, J., Robert, A., Pons, F., Leger, J.J., and Mornet, D. (1992). Proteolytic susceptibility of the central domain in chicken gizzard and skeletal muscle dystrophins. *Biochim. Biophys. Acta* 1138, 297–304.
- Avner, P., and Heard, E. (2001). X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat. Rev. Genet.* 2, 59–67.
- Bagnato, P., Barone, V., Giacomello, E., Rossi, D., and Sorrentino, V. (2003). Binding of an ankyrin-1 isoform to obscurin suggests a molecular link between the sarcoplasmic reticulum and myofibrils in striated muscles. *J. Cell Biol.* 160, 245–253.
- Balghi, H., Sebillé, S., Mondin, L., Cantereau, A., Constantin, B., Raymond, G., and Cognard, C. (2006). Mini-dystrophin expression down-regulates IP3-mediated calcium release events in resting dystrophin-deficient muscle cells. *J. Gen. Physiol.* 128, 219–230.
- Baltgalvis, K.A., Call, J.A., Nikas, J.B., and Lowe, D.A. (2009). Effects of prednisolone on skeletal muscle contractility in mdx mice. *Muscle Nerve* 40, 443–454.
- Bamber, B.A., Beg, A.A., Twyman, R.E., and Jorgensen, E.M. (1999). The *Caenorhabditis elegans* unc-49 locus encodes multiple subunits of a heteromultimeric GABA receptor. *J. Neurosci.* 19, 5348–5359.
- Bandman, E., and Strohmman, R.C. (1982). Increased K⁺ inhibits spontaneous contractions reduces myosin accumulation in cultured chick myotubes. *J. Cell Biol.* 93, 698–704.
- Barstead, R.J., Kleiman, L., and Waterston, R.H. (1991). Cloning, sequencing, and mapping of an alpha-actinin gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 20, 69–78.
- Bassett, D.I., Bryson-Richardson, R.J., Daggett, D.F., Gautier, P., Keenan, D.G., and Currie, P.D. (2003). Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development* 130, 5851–5860.
- Beck, K.A., and Nelson, W.J. (1996). The spectrin-based membrane skeleton as a membrane protein-sorting machine. *Am. J. Physiol.* 270, C1263–1270.
- Benian, G.M., Tinley, T.L., Tang, X., and Borodovsky, M. (1996). The *Caenorhabditis elegans* gene unc-89, required for muscle M-line assembly, encodes a giant modular protein composed of Ig and signal transduction domains. *The Journal of Cell Biology* 132, 835.
- Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2012). Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4,.
- Berger, J., Berger, S., Hall, T.E., Lieschke, G.J., and Currie, P.D. (2010). Dystrophin-deficient zebrafish feature aspects of the Duchenne muscular dystrophy pathology. *Neuromuscul. Disord.* 20, 826–832.
- Berger, J., Berger, S., Jacoby, A.S., Wilton, S.D., and Currie, P.D. (2011). Evaluation of exon-skipping strategies for Duchenne muscular dystrophy utilizing dystrophin-deficient zebrafish. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 2643–2651.
- Berger, J., Sztal, T., and Currie, P.D. (2012). Quantification of birefringence readily measures the level of muscle damage in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423, 785–788.
- Bershadsky, A.D., Balaban, N.Q., and Geiger, B. (2003). Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 677–695.
- Bertz, M., Wilmanns, M., and Rief, M. (2009). The titin-telethonin complex is a directed, superstable molecular bond in the muscle Z-disk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13307–13310.

- Bessou, C., Giuglia, J.-B., Franks, C.J., Holden-Dye, L., and Ségalat, L. (1998). Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission. *Neurogenetics* 2, 61–72.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L.L., Simonetti, R.G., and Gluud, C. (2012). Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst Rev* 3, CD007176.
- Blaauw, B., Del Piccolo, P., Rodriguez, L., Hernandez Gonzalez, V.-H., Agatea, L., Solagna, F., Mammano, F., Pozzan, T., and Schiaffino, S. (2012). No evidence for inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca²⁺ release in isolated fibers of adult mouse skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 140, 235–241.
- Blake, D.J., Nawrotzki, R., Loh, N.Y., Górecki, D.C., and Davies, K.E. (1998). beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 241–246.
- Blake, D.J., Nawrotzki, R., Peters, M.F., Froehner, S.C., and Davies, K.E. (1996). Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87-kDa postsynaptic protein. *J. Biol. Chem.* 271, 7802–7810.
- Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E., and Davies, K.E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.* 82, 291–329.
- Bodensteiner, J.B., and Engel, A.G. (1978). Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology* 28, 439–446.
- Boffoli, D., Scacco, S.C., Vergari, R., Solarino, G., Santacroce, G., and Papa, S. (1994). Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1226, 73–82.
- Boittin, F.X., Coussin, F., Morel, J.L., Halet, G., Macrez, N., and Mironneau, J. (2000). Ca²⁺ signals mediated by Ins(1,4,5)P₃-gated channels in rat ureteric myocytes. *Biochem. J.* 349, 323–332.
- Bolliger, M.F., Zurlinden, A., Lüscher, D., Bütikofer, L., Shakhova, O., Francolini, M., Kozlov, S.V., Cinelli, P., Stephan, A., Kistler, A.D., et al. (2010). Specific proteolytic cleavage of agrin regulates maturation of the neuromuscular junction. *J. Cell. Sci.* 123, 3944–3955.
- Bonet-Kerrache, A., Fabbrizio, E., and Momet, D. (1994). N-terminal domain of dystrophin. *FEBS Lett.* 355, 49–53.
- Borodinsky, L.N., and Spitzer, N.C. (2007). Activity-dependent neurotransmitter-receptor matching at the neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 335–340.
- Bradley, W.G., and Fulthorpe, J.J. (1978). Studies of sarcolemmal integrity in myopathic muscle. *Neurology* 28, 670–677.
- Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., et al. (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84, 757–767.
- Brenman, J.E., Chao, D.S., Xia, H., Aldape, K., and Bretl, D.S. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82, 743–752.
- Brenner, S. (1973). The genetics of behaviour. *Br. Med. Bull.* 29, 269–271.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.
- Briese, M., Esmacilli, B., Fraboulet, S., Burt, E.C., Christodoulou, S., Towers, P.R., Davies, K.E., and Sattelle, D.B. (2009). Deletion of *smn-1*, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the spinal muscular atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan. *Hum. Mol. Genet.* 18, 97–104.
- Brodal, P., Ingjer, F., and Hermansen, L. (1977). Capillary supply of skeletal muscle fibers in untrained and endurance-trained men. *Am. J. Physiol.* 232, H705–712.
- Brodoy, L., Kolotuev, I., Didier, C., Bhoumik, A., Podbilewicz, B., and Ronai, Z. (2004). The LIM domain protein UNC-95 is required for the assembly of muscle attachment structures and is regulated by the RING finger protein RNF-5 in *C. elegans*. *J. Cell Biol.* 165, 857–867.
- Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., and Sheu, S.-S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 287, C817–833.
- Brown, G.C., and Borutaite, V. (2007). Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc. Res.* 75, 283–290.
- Brunelli, S., Sciorati, C., D'Antona, G., Innocenzi, A., Covarello, D., Galvez, B.G., Perrotta, C., Monopoli, A., Sanvito, F., Bottinelli, R., et al. (2007). Nitric oxide release combined with nonsteroidal antiinflammatory activity prevents muscular dystrophy pathology and enhances stem cell therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 264–269.

- Buetler, T.M., Renard, M., Offord, E.A., Schneider, H., and Ruegg, U.T. (2002). Green tea extract decreases muscle necrosis in mdx mice and protects against reactive oxygen species. *Am. J. Clin. Nutr.* 75, 749–753.
- Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A., and Moore, K.J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 1189–1192.
- Burke, R.E., Levine, D.N., Tsairis, P., and Zajac, F.E., 3rd (1973). Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J. Physiol. (Lond.)* 234, 723–748.
- Buscaino, A., Lejeune, E., Audergon, P., Hamilton, G., Pidoux, A., and Allshire, R.C. (2013). Distinct roles for Sir2 and RNAi in centromeric heterochromatin nucleation, spreading and maintenance. *EMBO J.* 32, 1250–1264.
- Bushby, K., Finkel, R., Bimkrant, D.J., Case, L.E., Clemens, P.R., Cripe, L., Kaul, A., Kinnett, K., McDonald, C., Pandya, S., et al. (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol* 9, 77–93.
- Butler-Browne, G. and Bigard, A.X. (2006). Caractéristiques du vieillissement musculaire et effets préventifs de l'exercice régulier. *Sci Sports* 21:184–93.
- Buyandelger, B., Ng, K.-E., Miocic, S., Piotrowska, I., Gunkel, S., Ku, C.-H., and Knöll, R. (2011). MLP (muscle LIM protein) as a stress sensor in the heart. *Pflugers Arch.* 462, 135–142.
- Byerly, L., Cassada, R.C., and Russell, R.L. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev. Biol.* 51, 23–33.
- C. elegans Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012–2018.
- Cairns, D.M., Sato, M.E., Lee, P.G., Lassar, A.B., and Zeng, L. (2008). A gradient of Shh establishes mutually repressing somitic cell fates induced by Nkx3.2 and Pax3. *Dev. Biol.* 323, 152–165.
- Caldwell, J.E., Heiss, S.G., Mermall, V., and Cooper, J.A. (1989). Effects of CapZ, an actin capping protein of muscle, on the polymerization of actin. *Biochemistry* 28, 8506–8514.
- Campbell N.A., and Reece, J.B. (2007). *Biologie*. (Pearson Education),.
- Carpenter, J.L., Hoffman, E.P., Romanul, F.C., Kunkel, L.M., Rosales, R.K., Ma, N.S., Dasbach, J.J., Rae, J.F., Moore, F.M., and McAfee, M.B. (1989). Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am. J. Pathol.* 135, 909–919.
- Carpenter, S., Karpati, G., Zubrzycka-Gaarn, E., Bulman, D.E., Ray, P.N., and Worton, R.G. (1990). Dystrophin is localized to the plasma membrane of human skeletal muscle fibers by electron-microscopic cytochemical study. *Muscle Nerve* 13, 376–380.
- Ceccarini, M., Grasso, M., Veroni, C., Gambarà, G., Artegiani, B., Macchia, G., Ramoni, C., Torreri, P., Mallozzi, C., Petrucci, T.C., et al. (2007). Association of dystrobrevin and regulatory subunit of protein kinase A: a new role for dystrobrevin as a scaffold for signaling proteins. *J. Mol. Biol.* 371, 1174–1187.
- Cesari, M., Kritchevsky, S.B., Baumgartner, R.N., Atkinson, H.H., Penninx, B.W.H.J., Lenchik, L., Palla, S.L., Ambrosius, W.T., Tracy, R.P., and Pahor, M. (2005). Sarcopenia, obesity, and inflammation—results from the Trial of Angiotensin Converting Enzyme Inhibition and Novel Cardiovascular Risk Factors study. *Am. J. Clin. Nutr.* 82, 428–434.
- Chandra, M., Mamidi, R., Ford, S., Hidalgo, C., Witt, C., Ottenheijm, C., Labeit, S., and Granzier, H. (2009). Nebulin alters cross-bridge cycling kinetics and increases thin filament activation: a novel mechanism for increasing tension and reducing tension cost. *J. Biol. Chem.* 284, 30889–30896.
- Charette, S.L., McEvoy, L., Pyka, G., Snow-Harter, C., Guido, D., Wiswell, R.A., and Marcus, R. (1991). Muscle hypertrophy response to resistance training in older women. *J. Appl. Physiol.* 70, 1912–1916.
- Chelly, J., Marlhens, F., Dutrillaux, B., Van Ommen, G.J., Lambert, M., Haioun, B., Boissinot, G., Fardeau, M., and Kaplan, J.C. (1988). Deletion proximal to DXS68 locus (L1 probe site) in a boy with Duchenne muscular dystrophy, glycerol kinase deficiency, and adrenal hypoplasia. *Hum. Genet.* 78, 222–227.
- Chelly, J., Marlhens, F., Le Marec, B., Jeanpierre, M., Lambert, M., Hamard, G., Dutrillaux, B., and Kaplan, J.C. (1986). De novo DNA microdeletion in a girl with Turner syndrome and Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Genet.* 74, 193–196.
- Chen, B.L., Hall, D.H., and Chklovskii, D.B. (2006). Wiring optimization can relate neuronal structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 4723–4728.
- Chetboul, V., Blot, S., Sampedrano, C.C., Thibaud, J.-L., Granger, N., Tissier, R., Bruneval, P., Gaschen, F., Gouni, V., Nicolle, A.P., et al. (2006). Tissue Doppler imaging for detection of radial and longitudinal myocardial dysfunction in a family of cats affected by dystrophin-deficient hypertrophic muscular dystrophy. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 640–647.

- Childers, M.K., Bogan, J.R., Bogan, D.J., Greiner, H., Holder, M., Grange, R.W., and Kornegay, J.N. (2011). Chronic administration of a leupeptin-derived calpain inhibitor fails to ameliorate severe muscle pathology in a canine model of duchenne muscular dystrophy. *Front Pharmacol* 2, 89.
- Collet, C., Allard, B., Tourneur, Y., and Jacquemond, V. (1999). Intracellular calcium signals measured with indo-1 in isolated skeletal muscle fibres from control and mdx mice. *J. Physiol. (Lond.)* 520 Pt 2, 417–429.
- Cooper, B.J., Winand, N.J., Stedman, H., Valentine, B.A., Hoffman, E.P., Kunkel, L.M., Scott, M.O., Fischbeck, K.H., Kornegay, J.N., and Avery, R.J. (1988). The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 334, 154–156.
- Cotton, S., Voudouris, N.J., and Greenwood, K.M. (2001). Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: full-scale, verbal, and performance intelligence quotients. *Dev Med Child Neurol* 43, 497–501.
- Cox, G.N., Kusch, M., and Edgar, R.S. (1981). Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterization. *J. Cell Biol.* 90, 7–17.
- Cozzi, F., Cerletti, M., Luvoni, G.C., Lombardo, R., Brambilla, P.G., Faverzani, S., Blasevich, F., Cornelio, F., Pozza, O., and Mora, M. (2001). Development of muscle pathology in canine X-linked muscular dystrophy. II. Quantitative characterization of histopathological progression during postnatal skeletal muscle development. *Acta Neuropathol.* 101, 469–478.
- Crosbie, R.H., Lebakken, C.S., Holt, K.H., Venzke, D.P., Straub, V., Lee, J.C., Grady, R.M., Chamberlain, J.S., Sanes, J.R., and Campbell, K.P. (1999). Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *J. Cell Biol.* 145, 153–165.
- Crum-Cianflone, N.F. (2008). Bacterial, fungal, parasitic, and viral myositis. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 473–494.
- Danowski, B.A., Imanaka-Yoshida, K., Sanger, J.M., and Sanger, J.W. (1992). Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J. Cell Biol.* 118, 1411–1420.
- Davis, K.M., Sturt, B.L., Friedmann, A.J., Richmond, J.E., Bessereau, J.-L., Grant, B.D., and Bamber, B.A. (2010). Regulated lysosomal trafficking as a mechanism for regulating GABAA receptor abundance at synapses in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Neurosci.* 44, 307–317.
- Deconinck, N., and Dan, B. (2007). Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr. Neurol.* 36, 1–7.
- Deconinck, N., Ragot, T., Maréchal, G., Perricaudet, M., and Gillis, J.M. (1996). Functional protection of dystrophic mouse (mdx) muscles after adenovirus-mediated transfer of a dystrophin minigene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 3570–3574.
- Desguerre, I., Christov, C., Mayer, M., Zeller, R., Becane, H.-M., Bastuji-Garin, S., Leturcq, F., Chiron, C., Chelly, J., and Gherardi, R.K. (2009). Clinical heterogeneity of duchenne muscular dystrophy (DMD): definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. *PLoS ONE* 4, e4347.
- Van Deutekom, J.C., Janson, A.A., Ginjaar, I.B., Frankhuizen, W.S., Aartsma-Rus, A., Bremmer-Bout, M., den Dunnen, J.T., Koop, K., van der Kooij, A.J., Goemans, N.M., et al. (2007). Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N. Engl. J. Med.* 357, 2677–2686.
- De Deyne, P.G. (2000). Formation of sarcomeres in developing myotubes: role of mechanical stretch and contractile activation. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 279, C1801–1811.
- Dezawa, M., Ishikawa, H., Itokazu, Y., Yoshihara, T., Hoshino, M., Takeda, S., Ide, C., and Nabeshima, Y. (2005). Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* 309, 314–317.
- Dietrich, S., Abou-Rebyeh, F., Brohmann, H., Bladt, F., Sonnenberg-Riethmacher, E., Yamaai, T., Lumsden, A., Brand-Saberi, B., and Birchmeier, C. (1999). The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development* 126, 1621–1629.
- Dinçer, P., Balci, B., Yuva, Y., Talim, B., Brockington, M., Dinçel, D., Torelli, S., Brown, S., Kale, G., Haliloglu, G., et al. (2003). A novel form of recessive limb girdle muscular dystrophy with mental retardation and abnormal expression of alpha-dystroglycan. *Neuromuscul. Disord.* 13, 771–778.
- Dixon, A.K., Tait, T.M., Campbell, E.A., Bobrow, M., Roberts, R.G., and Freeman, T.C. (1997). Expression of the dystrophin-related protein 2 (Drp2) transcript in the mouse. *J. Mol. Biol.* 270, 551–558.
- Dixon, S.J., Alexander, M., Chan, K.K.M., and Roy, P.J. (2008). Insulin-like signaling negatively regulates muscle arm extension through DAF-12 in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 318, 153–161.

- Dixon, S.J., Alexander, M., Fernandes, R., Ricker, N., and Roy, P.J. (2006). FGF negatively regulates muscle membrane extension in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 133, 1263–1275.
- Dixon, S.J., and Roy, P.J. (2005). Muscle arm development in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 132, 3079–3092.
- DOUGHERTY, E.C. (1955). The genera and species of the subfamily Rhabditinae Micoletzky, 1922 (Nematoda): a nomenclatorial analysis, including an addendum on the composition of the family Rhabditidae Orley, 1880. *J. Helminthol.* 29, 105–152.
- DOUGHERTY, E.C., and CALHOUN, H.G. (1948). Possible significance of free-living nematodes in genetic research. *Nature* 161, 29.
- Drachman, D.B., Toyka, K.V., and Myer, E. (1974). Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 2, 1409–1412.
- Eagle, M., Baudouin, S.V., Chandler, C., Giddings, D.R., Bullock, R., and Bushby, K. (2002). Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscul. Disord.* 12, 926–929.
- Ehmsen, J., Poon, E., and Davies, K. (2002). The dystrophin-associated protein complex. *J. Cell. Sci.* 115, 2801–2803.
- Engel, A, and Banker, B. Q. (1986). *Myology: Basic and Clinical.* (McGraw-Hill Education),.
- Ervasti, J.M. (2003). Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J. Biol. Chem.* 278, 13591–13594.
- Falls, D.L., Rosen, K.M., Corfas, G., Lane, W.S., and Fischbach, G.D. (1993). ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* 72, 801–815.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Flanigan, K.M., Campbell, K., Viollet, L., Wang, W., Gomez, A.M., Walker, C.M., and Mendell, J.R. (2013). Anti-Dystrophin T Cell Responses in Duchenne Muscular Dystrophy: Prevalence and a Glucocorticoid Treatment Effect. *Hum Gene Ther Methods.*
- Francis, G.R., and Waterston, R.H. (1985). Muscle organization in *Caenorhabditis elegans*: localization of proteins implicated in thin filament attachment and I-band organization. *J. Cell Biol.* 101, 1532–1549.
- Francis, R., and Waterston, R.H. (1991). Muscle cell attachment in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 114, 465–479.
- Frøkjær-Jensen, C., Davis, M.W., Hopkins, C.E., Newman, B.J., Thummel, J.M., Olesen, S.-P., Grunnet, M., and Jørgensen, E.M. (2008). Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* 40, 1375–1383.
- Fukushige, T., Brodigan, T.M., Schriefer, L.A., Waterston, R.H., and Krause, M. (2006). Defining the transcriptional redundancy of early bodywall muscle development in *C. elegans*: evidence for a unified theory of animal muscle development. *Genes Dev.* 20, 3395–3406.
- Fukuzawa, A., Lange, S., Holt, M., Vihola, A., Carmignac, V., Ferreira, A., Udd, B., and Gautel, M. (2008). Interactions with titin and myomesin target obscurin and obscurin-like 1 to the M-band: implications for hereditary myopathies. *J. Cell. Sci.* 121, 1841–1851.
- Gailly, P. (2002). New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* 1600, 38–44.
- Garry, D.J., Meeson, A., Elterman, J., Zhao, Y., Yang, P., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (2000). Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5416–5421.
- Gaschen, F., and Burgunder, J.M. (2001). Changes of skeletal muscle in young dystrophin-deficient cats: a morphological and morphometric study. *Acta Neuropathol.* 101, 591–600.
- Gaschen, F.P., Hoffman, E.P., Gorospe, J.R., Uhl, E.W., Senior, D.F., Cardinet, G.H., 3rd, and Pearce, L.K. (1992a). Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J. Neurol. Sci.* 110, 149–159.
- Gaschen, F.P., Hoffman, E.P., Gorospe, J.R., Uhl, E.W., Senior, D.F., Cardinet, G.H., 3rd, and Pearce, L.K. (1992b). Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J. Neurol. Sci.* 110, 149–159.
- Gazda, L., Pokrzywa, W., Hellerschmied, D., Löwe, T., Forné, I., Mueller-Planitz, F., Hoppe, T., and Clausen, T. (2013). The myosin chaperone UNC-45 is organized in tandem modules to support myofilament formation in *C. elegans*. *Cell* 152, 183–195.

- Gazzerro, E., Assereto, S., Bonetto, A., Sotgia, F., Scarfi, S., Pistorio, A., Bonuccelli, G., Cilli, M., Bruno, C., Zara, F., et al. (2010). Therapeutic potential of proteasome inhibition in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Am. J. Pathol.* 176, 1863–1877.
- Gehlert, S., Weber, S., Weidmann, B., Gutsche, K., Platen, P., Graf, C., Kappes-Horn, K., and Bloch, W. (2012). Cycling exercise-induced myofiber transitions in skeletal muscle depend on basal fiber type distribution. *Eur. J. Appl. Physiol.* 112, 2393–2402.
- Giacomotto, J., Ségalat, L., Carre-Pierrat, M., and Gieseler, K. (2012). *Caenorhabditis elegans* as a chemical screening tool for the study of neuromuscular disorders. Manual and semi-automated methods. *Methods* 56, 103–113.
- Gieseler, K., Abdel-Dayem, M., and Ségalat, L. (1999). In vitro interactions of *Caenorhabditis elegans* dystrophin with dystrobrevin and syntrophin. *FEBS Letters* 461, 59–62.
- Gieseler, K., Grisoni, K., and Ségalat, L. (2000). Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 10, 1092–1097.
- Goemans, N.M., Tulinius, M., van den Akker, J.T., Burm, B.E., Ekhardt, P.F., Heuvelmans, N., Holling, T., Janson, A.A., Platenburg, G.J., Sipkens, J.A., et al. (2011). Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 364, 1513–1522.
- Goldspink, G. (1999). Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J. Anat.* 194 (Pt 3), 323–334.
- Gonyea, W.J. (1980). Role of exercise in inducing increases in skeletal muscle fiber number. *J Appl Physiol* 48, 421–426.
- Gordon, B.S., Delgado Díaz, D.C., and Kostek, M.C. (2013). Resveratrol decreases inflammation and increases utrophin gene expression in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Clin Nutr* 32, 104–111.
- Górecki, D.C., Monaco, A.P., Derry, J.M., Walker, A.P., Barnard, E.A., and Barnard, P.J. (1992). Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum. Mol. Genet.* 1, 505–510.
- Grady, R.M., Grange, R.W., Lau, K.S., Maimone, M.M., Nichol, M.C., Stull, J.T., and Sanes, J.R. (1999). Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nat. Cell Biol.* 1, 215–220.
- Grady, R.M., Zhou, H., Cunningham, J.M., Henry, M.D., Campbell, K.P., and Sanes, J.R. (2000). Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin–glycoprotein complex. *Neuron* 25, 279–293.
- Granato, M., van Eeden, F.J., Schach, U., Trowe, T., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., et al. (1996). Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. *Development* 123, 399–413.
- Granzier, H.L., and Labeit, S. (2004). The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ. Res.* 94, 284–295.
- Green, H., Goreham, C., Ouyang, J., Ball-Burnett, M., and Ranney, D. (1999). Regulation of fiber size, oxidative potential, and capillarization in human muscle by resistance exercise. *Am. J. Physiol.* 276, R591–596.
- Green, H.J., Thomson, J.A., Daub, W.D., Houston, M.E., and Ranney, D.A. (1979). Fiber composition, fiber size and enzyme activities in vastus lateralis of elite athletes involved in high intensity exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 41, 109–117.
- Griggs, R.C., Moxley, R.T., 3rd, Mendell, J.R., Fenichel, G.M., Brooke, M.H., Pestronk, A., Miller, J.P., Cwik, V.A., Pandya, S., and Robison, J. (1993). Duchenne dystrophy: randomized, controlled trial of prednisone (18 months) and azathioprine (12 months). *Neurology* 43, 520–527.
- Grishok, A. (2005). RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* 579, 5932–5939.
- Grisoni, K., Gieseler, K., Mariol, M.-C., Martin, E., Carre-Pierrat, M., Moulder, G., Barstead, R., and Ségalat, L. (2003). The *stn-1* Syntrophin Gene of *C. elegans* is Functionally Related to Dystrophin and Dystrobrevin. *Journal of Molecular Biology* 332, 1037–1046.
- Grisoni, K., Martin, E., Gieseler, K., Mariol, M.-C., and Ségalat, L. (2002). Genetic evidence for a dystrophin-glycoprotein complex (DGC) in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 294, 77–86.
- Grissom, F.E., and Kahn, J.S. (1975). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Euglena gracilis*. Purification and physical and chemical characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 171, 444–458.
- Grounds, M.D., and McGeachie, J.K. (1992). Skeletal muscle regeneration after crush injury in dystrophic mdx mice: an autoradiographic study. *Muscle Nerve* 15, 580–586.

- Guillet, C., and Boirie, Y. (2005). Insulin resistance: a contributing factor to age-related muscle mass loss? *Diabetes Metab.* 31 Spec No 2, 5S20–25S26.
- Guo, S., and Kempthorn, K.J. (1995). *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611–620.
- Guyon, J.R., Goswami, J., Jun, S.J., Thorne, M., Howell, M., Pusack, T., Kawahara, G., Steffen, L.S., Galdzicki, M., and Kunkel, L.M. (2009). Genetic isolation and characterization of a splicing mutant of zebrafish dystrophin. *Hum. Mol. Genet.* 18, 202–211.
- Hack, A.A., Groh, M.E., and McNally, E.M. (2000). Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microsc. Res. Tech.* 48, 167–180.
- Hahn, B.S., and Labouesse, M. (2001). Tissue integrity: hemidesmosomes and resistance to stress. *Curr. Biol.* 11, R858–861.
- Hall, D.H., and Russell, R.L. (1991). The posterior nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*: serial reconstruction of identified neurons and complete pattern of synaptic interactions. *J. Neurosci.* 11, 1–22.
- Hammonds, R.G., Jr (1987). Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of alpha-actinin. *Cell* 51, 1.
- Han, R. (2011). Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy. *Skelet Muscle* 1, 10.
- Harrington, A.J., Knight, A.L., Caldwell, G.A., and Caldwell, K.A. (2011). *Caenorhabditis elegans* as a model system for identifying effectors of α -synuclein misfolding and dopaminergic cell death associated with Parkinson's disease. *Methods* 53, 220–225.
- Harris, H.E., Tso, M.Y., and Epstein, H.F. (1977). Actin and myosin-linked calcium regulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Biochemical and structural properties of native filaments and purified proteins. *Biochemistry* 16, 859–865.
- Hartigan-O'Connor, D., Kirk, C.J., Crawford, R., Mulé, J.J., and Chamberlain, J.S. (2001). Immune evasion by muscle-specific gene expression in dystrophic muscle. *Mol. Ther.* 4, 525–533.
- Haslett, J.N., Sanoudou, D., Kho, A.T., Bennett, R.R., Greenberg, S.A., Kohane, I.S., Beggs, A.H., and Kunkel, L.M. (2002). Gene expression comparison of biopsies from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and normal skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 15000–15005.
- Heemskerk, H.A., de Winter, C.L., de Kimpe, S.J., van Kuik-Romeijn, P., Heuvelmans, N., Platenburg, G.J., van Ommen, G.-J.B., van Deutekom, J.C.T., and Aartsma-Rus, A. (2009). In vivo comparison of 2'-O-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy exon skipping. *J Gene Med* 11, 257–266.
- Helman, L.J., and Meltzer, P. (2003). Mechanisms of sarcoma development. *Nat. Rev. Cancer* 3, 685–694.
- Hibbs, J.B., Jr, Taintor, R.R., Vavrin, Z., and Rachlin, E.M. (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 87–94.
- Hikita, T., Qadota, H., Tsuboi, D., Taya, S., Moerman, D.G., and Kaibuchi, K. (2005). Identification of a novel Cdc42 GEF that is localized to the PAT-3-mediated adhesive structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335, 139–145.
- Hinchee-Rodriguez, K., Garg, N., Venkatakrisnan, P., Roman, M.G., Adamo, M.L., Masters, B.S., and Roman, L.J. (2013). Neuronal nitric oxide synthase is phosphorylated in response to insulin stimulation in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435, 501–505.
- Hirai, H., Verma, M., Watanabe, S., Tastad, C., Asakura, Y., and Asakura, A. (2010). MyoD regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of Pax3. *J. Cell Biol.* 191, 347–365.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr, and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–928.
- Holloszy, J.O. (1967). Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 242, 2278–2282.
- Holt, K.H., and Campbell, K.P. (1998). Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.* 273, 34667–34670.
- Hoogerwaard, E.M., Bakker, E., Ippel, P.F., Oosterwijk, J.C., Majoor-Krakauer, D.F., Leschot, N.J., Van Essen, A.J., Brunner, H.G., van der Wouw, P.A., Wilde, A.A., et al. (1999). Signs and symptoms of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy among carriers in The Netherlands: a cohort study. *Lancet* 353, 2116–2119.

- Hoppe, P.E., Chau, J., Flanagan, K.A., Reedy, A.R., and Schriefer, L.A. (2010). *Caenorhabditis elegans* unc-82 encodes a serine/threonine kinase important for myosin filament organization in muscle during growth. *Genetics* 184, 79–90.
- Hori, Y.S., Kuno, A., Hosoda, R., Tanno, M., Miura, T., Shimamoto, K., and Horio, Y. (2011). Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338, 784–794.
- Houde, S., Filiatrault, M., Fournier, A., Dubé, J., D'Arcy, S., Bérubé, D., Brousseau, Y., Lapierre, G., and Vanasse, M. (2008). Deflazacort use in Duchenne muscular dystrophy: an 8-year follow-up. *Pediatr. Neurol.* 38, 200–206.
- Howard, P.L., Dally, G.Y., Ditta, S.D., Austin, R.C., Worton, R.G., Klamut, H.J., and Ray, P.N. (1999). Dystrophin isoforms DP71 and DP427 have distinct roles in myogenic cells. *Muscle Nerve* 22, 16–27.
- Hresko, M.C., Williams, B.D., and Waterston, R.H. (1994). Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 124, 491–506.
- Hsu, J.D., and Quinlivan, R. (2013). Scoliosis in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Neuromuscul. Disord.*
- Ibraghimov-Beskrovnya, O., Ervasti, J.M., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S.W., and Campbell, K.P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355, 696–702.
- Ibrahim, M., Siedlecka, U., Buyandelger, B., Harada, M., Rao, C., Moshkov, A., Bhargava, A., Schneider, M., Yacoub, M.H., Gorelik, J., et al. (2013). A critical role for Telethonin in regulating t-tubule structure and function in the mammalian heart. *Hum. Mol. Genet.* 22, 372–383.
- Ichida, F., Tsubata, S., Bowles, K.R., Haneda, N., Uese, K., Miyawaki, T., Dreyer, W.J., Messina, J., Li, H., Bowles, N.E., et al. (2001). Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome. *Circulation* 103, 1256–1263.
- Imbert, N., Vandebrouck, C., Constantin, B., Duport, G., Guillou, C., Cognard, C., and Raymond, G. (1996). Hypoosmotic shocks induce elevation of resting calcium level in Duchenne muscular dystrophy myotubes contracting in vitro. *Neuromuscul. Disord.* 6, 351–360.
- Isaac, C., Wright, A., Usas, A., Li, H., Tang, Y., Mu, X., Greco, N., Dong, Q., Vo, N., Kang, J., et al. (2013). Dystrophin and utrophin "double knockout" dystrophic mice exhibit a spectrum of degenerative musculoskeletal abnormalities. *J. Orthop. Res.* 31, 343–349.
- Jacobs, P.A., Hunt, P.A., Mayer, M., and Bart, R.D. (1981). Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosomal translocation: further evidence that the DMD locus is at Xp21. *Am. J. Hum. Genet.* 33, 513–518.
- James, J., Kinnett, K., Wang, Y., Ittenbach, R.F., Benson, D.W., and Cripe, L. (2011). Electrocardiographic abnormalities in very young Duchenne muscular dystrophy patients precede the onset of cardiac dysfunction. *Neuromuscul. Disord.* 21, 462–467.
- Jang, Y.C., and Van Remmen, H. (2011). Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Exp. Gerontol.* 46, 193–198.
- Jennings, C.G., Dyer, S.M., and Burden, S.J. (1993). Muscle-specific trk-related receptor with a kringle domain defines a distinct class of receptor tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 2895–2899.
- Jospin, M., Jacquemond, V., Mariol, M.-C., Ségalat, L., and Allard, B. (2002). The L-type voltage-dependent Ca²⁺ channel EGL-19 controls body wall muscle function in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 159, 337–348.
- Jourdan, M., Cynober, L., Moinard, C., Blanc, M.C., Neveux, N., De Bandt, J.P., and Aussel, C. (2008). Splanchnic sequestration of amino acids in aged rats: in vivo and ex vivo experiments using a model of isolated perfused liver. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R748–755.
- Kadi, F., Charifi, N., Denis, C., and Lexell, J. (2004). Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle Nerve* 29, 120–127.
- Kahane, N., Cinnamon, Y., and Kalcheim, C. (2002). The roles of cell migration and myofiber intercalation in patterning formation of the postmitotic myotome. *Development* 129, 2675–2687.
- Karp G (2010). *Biologie Cellulaire et Moléculaire*. (De Boeck),.
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomès, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V., and Tajbakhsh, S. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* 431, 466–471.

- Katzemich, A., Kreisköther, N., Alexandrovich, A., Elliott, C., Schöck, F., Leonard, K., Sparrow, J., and Bullard, B. (2012). The function of the M-line protein obscurin in controlling the symmetry of the sarcomere in the flight muscle of *Drosophila*. *J. Cell. Sci.* 125, 3367–3379.
- Kawahara, G., Karpf, J.A., Myers, J.A., Alexander, M.S., Guyon, J.R., and Kunkel, L.M. (2011). Drug screening in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 5331–5336.
- Kent-Braun, J.A., Ng, A.V., and Young, K. (2000). Skeletal muscle contractile and noncontractile components in young and older women and men. *J. Appl. Physiol.* 88, 662–668.
- Kim, H., Pierce-Shimomura, J.T., Oh, H.J., Johnson, B.E., Goodman, M.B., and McIntire, S.L. (2009). The dystrophin complex controls bk channel localization and muscle activity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 5, e1000780.
- Kirschner, J., Schessl, J., Schara, U., Reitter, B., Stettner, G.M., Hobbiebrunken, E., Wilichowski, E., Bernert, G., Weiss, S., Stehling, F., et al. (2010). Treatment of Duchenne muscular dystrophy with ciclosporin A: a randomised, double-blind, placebo-controlled multicentre trial. *Lancet Neurol* 9, 1053–1059.
- Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M., et al. (2013). Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum. Mol. Genet.*
- Knöll, R., Kostin, S., Klede, S., Savvatis, K., Klinge, L., Stehle, I., Gunkel, S., Kötter, S., Babicz, K., Sohns, M., et al. (2010). A common MLP (muscle LIM protein) variant is associated with cardiomyopathy. *Circ. Res.* 106, 695–704.
- Kobayashi, Y.M., Rader, E.P., Crawford, R.W., and Campbell, K.P. (2012). Endpoint measures in the mdx mouse relevant for muscular dystrophy pre-clinical studies. *Neuromuscul. Disord.* 22, 34–42.
- Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50, 509–517.
- Koenig, M., and Kunkel, L.M. (1990). Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J. Biol. Chem.* 265, 4560–4566.
- Kong, Y., Flick, M.J., Kudla, A.J., and Konieczny, S.F. (1997). Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4750–4760.
- Koves, T.R., Noland, R.C., Bates, A.L., Henes, S.T., Muoio, D.M., and Cortright, R.N. (2005). Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria play distinct roles in regulating skeletal muscle fatty acid metabolism. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 288, C1074–1082.
- Krause, M., Fire, A., Harrison, S.W., Priess, J., and Weintraub, H. (1990). CeMyoD accumulation defines the body wall muscle cell fate during *C. elegans* embryogenesis. *Cell* 63, 907–919.
- Kunkel, L.M., and Hoffman, E.P. (1989). Duchenne/Becker muscular dystrophy: a short overview of the gene, the protein, and current diagnostics. *Br. Med. Bull.* 45, 630–643.
- LAGUENS, R. (1963). SATELLITE CELLS OF SKELETAL MUSCLE FIBERS IN HUMAN PROGRESSIVE MUSCULAR DYSTROPHY. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 336, 564–569.
- Lampe, A.K., and Bushby, K.M.D. (2005). Collagen VI related muscle disorders. *J. Med. Genet.* 42, 673–685.
- Larsson, L., Edström, L., Lindegren, B., Gorza, L., and Schiaffino, S. (1991). MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. *Am. J. Physiol.* 261, C93–101.
- Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., Price, S.R., Mitch, W.E., and Goldberg, A.L. (2004). Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 18, 39–51.
- Lecroisey, C., Martin, E., Mariol, M.-C., Granger, L., Schwab, Y., Labouesse, M., Ségalat, L., and Gieseler, K. (2008). DYX-1, a protein functionally linked to dystrophin in *Caenorhabditis elegans* is associated with the dense body, where it interacts with the muscle LIM domain protein ZYX-1. *Mol. Biol. Cell* 19, 785–796.
- Lecroisey, C., Ségalat, L., and Gieseler, K. (2007). The *C. elegans* dense body: anchoring and signaling structure of the muscle. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 28, 79–87.
- Li, P., Collins, K.M., Koelle, M.R., and Shen, K. (2013). LIN-12/Notch signaling instructs postsynaptic muscle arm development by regulating UNC-40/DCC and MADD-2 in *Caenorhabditis elegans*. *Elife* 2, e00378.
- Libíková, H., Pogády, J., Wiedermann, V., and Breier, S. (1975). Search for herpetic antibodies in the cerebrospinal fluid in senile dementia and mental retardation. *Acta Virol.* 19, 493–495.

- Lin, W., Burgess, R.W., Dominguez, B., Pfaff, S.L., Sanes, J.R., and Lee, K.F. (2001). Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* 410, 1057–1064.
- Littlefield, R., Almenar-Queralt, A., and Fowler, V.M. (2001). Actin dynamics at pointed ends regulates thin filament length in striated muscle. *Nat. Cell Biol.* 3, 544–551.
- Liu, Q., Jones, T.I., Tang, V.W., Briehner, W.M., and Jones, P.L. (2010). Facioscapulohumeral muscular dystrophy region gene-1 (FRG-1) is an actin-bundling protein associated with muscle-attachment sites. *J. Cell. Sci.* 123, 1116–1123.
- Louis, H.A., Pino, J.D., Schmeichel, K.L., Pomiès, P., and Beckerle, M.C. (1997). Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. *J. Biol. Chem.* 272, 27484–27491.
- Love, D.R., Byth, B.C., Tinsley, J.M., Blake, D.J., and Davies, K.E. (1993). Dystrophin and dystrophin-related proteins: a review of protein and RNA studies. *Neuromuscul. Disord.* 3, 5–21.
- De Luca, A., Pierno, S., Liantonio, A., Cetrone, M., Camerino, C., Frayssé, B., Mirabella, M., Servidei, S., Rüegg, U.T., and Conte Camerino, D. (2003). Enhanced dystrophic progression in mdx mice by exercise and beneficial effects of taurine and insulin-like growth factor-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 453–463.
- Mackinnon, A.C., Qadota, H., Norman, K.R., Moerman, D.G., and Williams, B.D. (2002). *C. elegans* PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr. Biol.* 12, 787–797.
- Madhavan, R., Gong, Z.L., Ma, J.J., Chan, A.W.S., and Peng, H.B. (2009). The function of cortactin in the clustering of acetylcholine receptors at the vertebrate neuromuscular junction. *PLoS ONE* 4, e8478.
- Malik, V., Rodino-Klapac, L.R., Viollet, L., Wall, C., King, W., Al-Dahhak, R., Lewis, S., Shilling, C.J., Kota, J., Serrano-Munuera, C., et al. (2010). Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 67, 771–780.
- Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., et al. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* 6, 458–471.
- Mandel, J.L. (1989). Dystrophin. The gene and its product. *Nature* 339, 584–586.
- Marchand, E., Constantin, B., Balghi, H., Claudepierre, M.-C., Cantereau, A., Magaud, C., Mouzou, A., Raymond, G., Braun, S., and Cognard, C. (2004). Improvement of calcium handling and changes in calcium-release properties after mini- or full-length dystrophin forced expression in cultured skeletal myotubes. *Exp. Cell Res.* 297, 363–379.
- Marshall, J.L., and Crosbie-Watson, R.H. (2013). Sarcospan: a small protein with large potential for Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle* 3, 1.
- Martins, P.C.M., Ayub-Guerrieri, D., Martins-Bach, A.B., Onofre-Oliveira, P., Malheiros, J.M., Tannus, A., de Sousa, P.L., Cartier, P.G., and Vainzof, M. (2013). Dmdmdx/Largemyd: a new mouse model of neuromuscular diseases useful for studying physiopathological mechanisms and testing therapies. *Dis Model Mech.*
- Marzetti, E., Calvani, R., Cesari, M., Buford, T.W., Lorenzi, M., Behnke, B.J., and Leeuwenburgh, C. (2013). Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: From signaling pathways to clinical trials. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*
- Matsumura, K., Yamada, H., Shimizu, T., and Campbell, K.P. (1993). Differential expression of dystrophin, utrophin and dystrophin-associated proteins in peripheral nerve. *FEBS Lett.* 334, 281–285.
- Mattout, A., Pike, B.L., Towbin, B.D., Bank, E.M., Gonzalez-Sandoval, A., Stadler, M.B., Meister, P., Gruenbaum, Y., and Gasser, S.M. (2011). An EDMD mutation in *C. elegans* lamin blocks muscle-specific gene relocation and compromises muscle integrity. *Curr. Biol.* 21, 1603–1614.
- Matzke, M.A., and Birchler, J.A. (2005). RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* 6, 24–35.
- Maupas, E (1900). Modes et formes de reproduction des nematodes. *Archives de Zoologie Experimentale et Generale.*
- McCull, G., Roberts, B.R., Pukala, T.L., Kenche, V.B., Roberts, C.M., Link, C.D., Ryan, T.M., Masters, C.L., Barnham, K.J., Bush, A.I., et al. (2012). Utility of an improved model of amyloid-beta ($A\beta_{1-42}$) toxicity in *Caenorhabditis elegans* for drug screening for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 7, 57.
- McKeown, C.R., Han, H.-F., and Beckerle, M.C. (2006). Molecular characterization of the *Caenorhabditis elegans* ALP/Enigma gene alp-1. *Developmental Dynamics* 235, 530–538.
- Megeney, L.A., Kablar, B., Perry, R.L., Ying, C., May, L., and Rudnicki, M.A. (1999). Severe cardiomyopathy in mice lacking dystrophin and MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 220–225.

- Mendell, J.R., Campbell, K., Rodino-Klapac, L., Sahenk, Z., Shilling, C., Lewis, S., Bowles, D., Gray, S., Li, C., Galloway, G., et al. (2010). Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 363, 1429–1437.
- Mendell, J.R., Kissel, J.T., Amato, A.A., King, W., Signore, L., Prior, T.W., Sahenk, Z., Benson, S., McAndrew, P.E., and Rice, R. (1995). Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 333, 832–838.
- Mercer, K.B., Benian, G.M., and Qadota, H. (2003). *Caenorhabditis elegans* UNC-98, a C2H2 Zn Finger Protein, Is a Novel Partner of UNC-97/PINCH in Muscle Adhesion Complexes. *Molecular Biology of the Cell* 14, 2492–2507.
- Mercer, K.B., Miller, R.K., Tinley, T.L., Sheth, S., Qadota, H., and Benian, G.M. (2006). *Caenorhabditis elegans* UNC-96 is a new component of M-lines that interacts with UNC-98 and paramyosin and is required in adult muscle for assembly and/or maintenance of thick filaments. *Molecular Biology of the Cell* 17, 3832–3847.
- Merlini, L., Cicognani, A., Malaspina, E., Gennari, M., Gnudi, S., Talim, B., and Franzoni, E. (2003a). Early prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 27, 222–227.
- Merlini, L., Solari, A., Vita, G., Bertini, E., Minetti, C., Mongini, T., Mazzoni, E., Angelini, C., and Morandi, L. (2003b). Role of gabapentin in spinal muscular atrophy: results of a multicenter, randomized Italian study. *J. Child Neurol.* 18, 537–541.
- Messonnier, L., Freund, H., Féasson, L., Prieur, F., Castells, J., Denis, C., Linossier, M.T., Geysant, A., and Lacour, J.R. (2001). Blood lactate exchange and removal abilities after relative high-intensity exercise: effects of training in normoxia and hypoxia. *Eur. J. Appl. Physiol.* 84, 403–412.
- Mi-Mi, L., Votra, S., Kemphues, K., Bretscher, A., and Pruyne, D. (2012). Z-line formins promote contractile lattice growth and maintenance in striated muscles of *C. elegans*. *J. Cell Biol.* 198, 87–102.
- Michele, D.E., and Campbell, K.P. (2003). Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J. Biol. Chem.* 278, 15457–15460.
- Miller, R.G., Sharma, K.R., Pavlath, G.K., Gussoni, E., Mynhier, M., Lanctot, A.M., Greco, C.M., Steinman, L., and Blau, H.M. (1997). Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study. *Muscle Nerve* 20, 469–478.
- Miller, R.K., Qadota, H., Landsverk, M.L., Mercer, K.B., Epstein, H.F., and Benian, G.M. (2006). UNC-98 links an integrin-associated complex to thick filaments in *Caenorhabditis elegans* muscle. *J. Cell Biol.* 175, 853–859.
- Miller, R.K., Qadota, H., Mercer, K.B., Gernert, K.M., and Benian, G.M. (2008). UNC-98 and UNC-96 interact with paramyosin to promote its incorporation into thick filaments of *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* 19, 1529–1539.
- Miller, R.K., Qadota, H., Stark, T.J., Mercer, K.B., Wortham, T.S., Anyanful, A., and Benian, G.M. (2009). CSN-5, a component of the COP9 signalosome complex, regulates the levels of UNC-96 and UNC-98, two components of M-lines in *Caenorhabditis elegans* muscle. *Mol. Biol. Cell* 20, 3608–3616.
- Millevoi, S., Trombitas, K., Kolmerer, B., Kostin, S., Schaper, J., Pelin, K., Granzier, H., and Labeit, S. (1998). Characterization of nebulin and nebulette and emerging concepts of their roles for vertebrate Z-discs. *J. Mol. Biol.* 282, 111–123.
- Miyagoe-Suzuki, Y., Nakagawa, M., and Takeda, S. (2000). Merosin and congenital muscular dystrophy. *Microsc. Res. Tech.* 48, 181–191.
- Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S.I. (2001). Association of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) with alpha1-syntrophin at the sarcolemma. *Microsc. Res. Tech.* 55, 164–170.
- Mizuno, Y. (1992). Prevention of myonecrosis in mdx mice: effect of immobilization by the local tetanus method. *Brain Dev.* 14, 319–322.
- Mizuno, Y., Thompson, T.G., Guyon, J.R., Lidov, H.G., Brosius, M., Imamura, M., Ozawa, E., Watkins, S.C., and Kunkel, L.M. (2001). Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha-dystrobrevin and desmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6156–6161.
- Moerman, D.G., and Fire, A. (1997). Muscle: Structure, Function, and Development. In C. *Elegans* II, D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer, and J.R. Priess, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press),.
- Moerman, D.G., and Williams, B.D. (2006). Sarcomere assembly in *C. elegans* muscle. *WormBook* 1–16.
- Mohri, K., Ono, K., Yu, R., Yamashiro, S., and Ono, S. (2006). Enhancement of actin-depolymerizing factor/cofilin-dependent actin disassembly by actin-interacting protein 1 is required for organized actin filament assembly in the *Caenorhabditis elegans* body wall muscle. *Mol. Biol. Cell* 17, 2190–2199.
- Mokhtarian, A., Lefaucheur, J.P., Even, P.C., and Sebille, A. (1999). Hindlimb immobilization applied to 21-day-old mdx mice prevents the occurrence of muscle degeneration. *J. Appl. Physiol.* 86, 924–931.

- Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., and Kunkel, L.M. (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2, 90–95.
- Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Middlesworth, W., Colletti, C.A., Aldridge, J., Fischbeck, K.H., Bartlett, R., Pericak-Vance, M.A., Roses, A.D., and Kunkel, L.M. (1985). Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature* 316, 842–845.
- Moore, C.J., and Winder, S.J. (2012). The inside and out of dystroglycan post-translational modification. *Neuromuscul. Disord.* 22, 959–965.
- Moorwood, C., Lozynska, O., Suri, N., Napper, A.D., Diamond, S.L., and Khurana, T.S. (2011). Drug discovery for Duchenne muscular dystrophy via utrophin promoter activation screening. *PLoS ONE* 6, e26169.
- Morrison, J., Lu, Q.L., Pastoret, C., Partridge, T., and Bou-Gharios, G. (2000). T-cell-dependent fibrosis in the mdx dystrophic mouse. *Lab. Invest.* 80, 881–891.
- MORTON, N.E., and CHUNG, C.S. (1959). Formal genetics of muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 11, 360–379.
- Moxley, R.T., 3rd, Pandya, S., Ciafaloni, E., Fox, D.J., and Campbell, K. (2010). Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. *J. Child Neurol.* 25, 1116–1129.
- Mulle, C., Benoit, P., Pinset, C., Roa, M., and Changeux, J.P. (1988). Calcitonin gene-related peptide enhances the rate of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor in cultured mouse muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5728–5732.
- Mullen, G.P., Rogalski, T.M., Bush, J.A., Gorji, P.R., and Moerman, D.G. (1999). Complex patterns of alternative splicing mediate the spatial and temporal distribution of perlecan/UNC-52 in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* 10, 3205–3221.
- Muntoni, F., Torelli, S., and Ferlini, A. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2, 731–740.
- Nakamura, A., Harrod, G.V., and Davies, K.E. (2001). Activation of calcineurin and stress activated protein kinase/p38-mitogen activated protein kinase in hearts of utrophin-dystrophin knockout mice. *Neuromuscul. Disord.* 11, 251–259.
- Nakamura, H., Kimura, E., Mori-Yoshimura, M., Komaki, H., Matsuda, Y., Goto, K., Hayashi, Y.K., Nishino, I., Takeda, S.J., and Kawai, M. (2013). Characteristics of Japanese Duchenne and Becker muscular dystrophy patients in a novel Japanese national registry of muscular dystrophy (Remudy). *Orphanet J Rare Dis* 8, 60.
- Nakano, N., Hori, H., Abe, M., Shibata, H., Arimura, T., Sasaoka, T., Sawabe, M., Chida, K., Arai, T., Nakahara, K., et al. (2007). Interaction of BMP10 with Tcap may modulate the course of hypertensive cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H3396–3403.
- Narayanan, D., Adebisi, A., and Jaggar, J.H. (2012). Inositol trisphosphate receptors in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, H2190–2210.
- Nevin, N.C., Hughes, A.E., Calwell, M., and Lim, J.H. (1986). Duchenne muscular dystrophy in a female with a translocation involving Xp21. *J. Med. Genet.* 23, 171–173.
- Newey, S.E., Benson, M.A., Ponting, C.P., Davies, K.E., and Blake, D.J. (2000). Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr. Biol.* 10, 1295–1298.
- Nguyen, F., Cherel, Y., Guigand, L., Goubault-Leroux, I., and Wyers, M. (2002). Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. *J. Comp. Pathol.* 126, 100–108.
- Nguyen, T.M., Ellis, J.M., Love, D.R., Davies, K.E., Gatter, K.C., Dickson, G., and Morris, G.E. (1991). Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines. *J. Cell Biol.* 115, 1695–1700.
- Nicholas, G., Thomas, M., Langley, B., Somers, W., Patel, K., Kemp, C.F., Sharma, M., and Kambadur, R. (2002). Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin. *J. Cell. Physiol.* 193, 120–131.
- Nicholas, W.L., Dougherty, E.C., and Hansen, E.L. (1959). Axenic cultivation of *C. briggsae* (Nematoda: Rhabditidae) with chemically undefined supplements; comparative studies with related nematodes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*
- Nicholson, P., Yepiskoposyan, H., Metzke, S., Zamudio Orozco, R., Kleinschmidt, N., and Mühlemann, O. (2010). Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 677–700.

- Nicole, S., Davoine, C.S., Topaloglu, H., Cattolico, L., Barral, D., Beighton, P., Hamida, C.B., Hammouda, H., Cruaud, C., White, P.S., et al. (2000). Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). *Nat. Genet.* 26, 480–483.
- Nigon, V. (1949). Les modalités de la reproduction et le déterminisme du sexe chez quelques nematodes libres. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.*
- Nilwik, R., Snijders, T., Leenders, M., Groen, B.B.L., van Kranenburg, J., Verdijk, L.B., and van Loon, L.J.C. (2013). The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. *Exp. Gerontol.* 48, 492–498.
- Nishio, H., Takeshima, Y., Narita, N., Yanagawa, H., Suzuki, Y., Ishikawa, Y., Ishikawa, Y., Minami, R., Nakamura, H., and Matsuo, M. (1994). Identification of a novel first exon in the human dystrophin gene and of a new promoter located more than 500 kb upstream of the nearest known promoter. *J. Clin. Invest.* 94, 1037–1042.
- Noakes, P.G., Phillips, W.D., Hanley, T.A., Sanes, J.R., and Merlie, J.P. (1993). 43K protein and acetylcholine receptors colocalize during the initial stages of neuromuscular synapse formation in vivo. *Dev. Biol.* 155, 275–280.
- Nomura, K., Ono, K., and Ono, S. (2012). CAS-1, a *C. elegans* cyclase-associated protein, is required for sarcomeric actin assembly in striated muscle. *J. Cell. Sci.* 125, 4077–4089.
- Norman, K.R., Cordes, S., Qadota, H., Rahmani, P., and Moerman, D.G. (2007). UNC-97/PINCH is involved in the assembly of integrin cell adhesion complexes in *Caenorhabditis elegans* body wall muscle. *Dev. Biol.* 309, 45–55.
- Odom, G.L., Gregorevic, P., Allen, J.M., Finn, E., and Chamberlain, J.S. (2008). Microtrophin delivery through rAAV6 increases lifespan and improves muscle function in dystrophic dystrophin/utrophin-deficient mice. *Mol. Ther.* 16, 1539–1545.
- Ohlendieck, K., and Campbell, K.P. (1991). Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. *J. Cell Biol.* 115, 1685–1694.
- Ono, K., Yu, R., Mohri, K., and Ono, S. (2006). *Caenorhabditis elegans* kettin, a large immunoglobulin-like repeat protein, binds to filamentous actin and provides mechanical stability to the contractile apparatuses in body wall muscle. *Mol. Biol. Cell* 17, 2722–2734.
- Ono, S., and Ono, K. (2002). Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics. *J. Cell Biol.* 156, 1065–1076.
- Osche, G. Systematik und phylogenie der gattung Rhabditis (Nematoda). *Zoologische Jahrbucher - Abt. Zool. Phys. Der Tiere.*
- Otey, C.A., and Carpen, O. (2004). Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil. Cytoskeleton* 58, 104–111.
- Ozawa, E. (2010). Our trails and trials in the subsarcolemmal cytoskeleton network and muscular dystrophy researches in the dystrophin era. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* 86, 798–821.
- Pappas, C.T., Bhattacharya, N., Cooper, J.A., and Gregorio, C.C. (2008). Nebulin interacts with CapZ and regulates thin filament architecture within the Z-disc. *Mol. Biol. Cell* 19, 1837–1847.
- Pardo, J.V., Siliciano, J.D., and Craig, S.W. (1983). A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 1008–1012.
- Parker, M.H., Seale, P., and Rudnicki, M.A. (2003). Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 4, 497–507.
- Parker, S., Peterkin, H.S., and Baylis, H.A. (2007). Muscular dystrophy associated mutations in caveolin-1 induce neurotransmission and locomotion defects in *Caenorhabditis elegans*. *Invert. Neurosci.* 7, 157–164.
- Parton, R.G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 185–194.
- Périé, S., Trollet, C., Mouly, V., Vanneaux, V., Mamchaoui, K., Bouazza, B., Pierre Marolleau, J., Laforêt, P., Chapon, F., Eymard, B., et al. (2013). Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a Phase I/IIa clinical study. *Mol. Ther.*
- Perrini, S., Laviola, L., Carreira, M.C., Cignarelli, A., Natalicchio, A., and Giorgino, F. (2010). The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J. Endocrinol.* 205, 201–210.

- Pescatori, M., Broccolini, A., Minetti, C., Bertini, E., Bruno, C., D'Amico, A., Bernardini, C., Mirabella, M., Silvestri, G., Giglio, V., et al. (2007). Gene expression profiling in the early phases of DMD: a constant molecular signature characterizes DMD muscle from early postnatal life throughout disease progression. *FASEB J.* 21, 1210–1226.
- Peters, M.F., Adams, M.E., and Froehner, S.C. (1997a). Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J. Cell Biol.* 138, 81–93.
- Peters, M.F., O'Brien, K.F., Sadoulet-Puccio, H.M., Kunkel, L.M., Adams, M.E., and Froehner, S.C. (1997b). beta-dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning, and protein associations. *J. Biol. Chem.* 272, 31561–31569.
- Pinotsis, N., Chatziefthimiou, S.D., Berkemeier, F., Beuron, F., Mavridis, I.M., Konarev, P.V., Svergun, D.I., Morris, E., Rief, M., and Wilmanns, M. (2012). Superhelical architecture of the myosin filament-linking protein myomesin with unusual elastic properties. *PLoS Biol.* 10, e1001261.
- Van der Plas, M.C., Pilgram, G.S.K., de Jong, A.W.M., Bansraj, M.R.K.S., Fradkin, L.G., and Noordermeer, J.N. (2007). *Drosophila* Dystrophin is required for integrity of the musculature. *Mech. Dev.* 124, 617–630.
- Van der Plas, M.C., Pilgram, G.S.K., Plomp, J.J., de Jong, A., Fradkin, L.G., and Noordermeer, J.N. (2006). Dystrophin is required for appropriate retrograde control of neurotransmitter release at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 26, 333–344.
- Politano, L., Nigro, V., Nigro, G., Petretta, V.R., Passamano, L., Papparella, S., Di Somma, S., and Comi, L.I. (1996). Development of cardiomyopathy in female carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *JAMA* 275, 1335–1338.
- Porter, G.A., Dmytrenko, G.M., Winkelmann, J.C., and Bloch, R.J. (1992). Dystrophin colocalizes with beta-spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 117, 997–1005.
- Proctor, D.N., Sinning, W.E., Walro, J.M., Sieck, G.C., and Lemon, P.W. (1995). Oxidative capacity of human muscle fiber types: effects of age and training status. *J. Appl. Physiol.* 78, 2033–2038.
- Pyle, W.G., and Solaro, R.J. (2004). At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ. Res.* 94, 296–305.
- Qadota, H., and Benian, G.M. (2010). Molecular Structure of Sarcomere-to-Membrane Attachment at M-Lines in *C. elegans* Muscle. *J Biomed Biotechnol* 2010,.
- Qadota, H., Mercer, K.B., Miller, R.K., Kaibuchi, K., and Benian, G.M. (2007). Two LIM domain proteins and UNC-96 link UNC-97/pinch to myosin thick filaments in *Caenorhabditis elegans* muscle. *Mol. Biol. Cell* 18, 4317–4326.
- Quyyumi, A.A., Dakak, N., Andrews, N.P., Gilligan, D.M., Panza, J.A., and Cannon, R.O., 3rd (1995). Contribution of nitric oxide to metabolic coronary vasodilation in the human heart. *Circulation* 92, 320–326.
- Rand, M.J., and Li, C.G. (1995). Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 659–682.
- Rando, T.A. (2001). The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24, 1575–1594.
- Raue, U., Trappe, T.A., Estrem, S.T., Qian, H.-R., Helvering, L.M., Smith, R.C., and Trappe, S. (2012). Transcriptome signature of resistance exercise adaptations: mixed muscle and fiber type specific profiles in young and old adults. *J. Appl. Physiol.* 112, 1625–1636.
- Rayavarapu, S., Coley, W., Kinder, T.B., and Nagaraju, K. (2013). Idiopathic inflammatory myopathies: pathogenic mechanisms of muscle weakness. *Skelet Muscle* 3, 13.
- Rebolledo, D.L., Minniti, A.N., Grez, P.M., Fadic, R., Kohn, R., and Inestrosa, N.C. (2008). Inclusion body myositis: a view from the *Caenorhabditis elegans* muscle. *Mol. Neurobiol.* 38, 178–198.
- Rentschler, S., Linn, H., Deininger, K., Bedford, M.T., Espanel, X., and Sudol, M. (1999). The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol. Chem.* 380, 431–442.
- Rifai, Z., Welle, S., Moxley, R.T., 3rd, Lorenson, M., and Griggs, R.C. (1995). Effect of prednisone on protein metabolism in Duchenne dystrophy. *Am. J. Physiol.* 268, E67–74.
- Roberts, R.G. (2001). Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biol.* 2, REVIEWS3006.
- Roberts, R.G., Freeman, T.C., Kendall, E., Vetrie, D.L., Dixon, A.K., Shaw-Smith, C., Bone, Q., and Bobrow, M. (1996). Characterization of DRP2, a novel human dystrophin homologue. *Nat. Genet.* 13, 223–226.

- Röckl, K.S.C., Hirshman, M.F., Brandauer, J., Fujii, N., Witters, L.A., and Goodyear, L.J. (2007). Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. *Diabetes* 56, 2062–2069.
- Rogalski, T.M., Mullen, G.P., Gilbert, M.M., Williams, B.D., and Moerman, D.G. (2000). The UNC-112 gene in *Caenorhabditis elegans* encodes a novel component of cell-matrix adhesion structures required for integrin localization in the muscle cell membrane. *J. Cell Biol.* 150, 253–264.
- Rogalski, T.M., Williams, B.D., Mullen, G.P., and Moerman, D.G. (1993). Products of the *unc-52* gene in *Caenorhabditis elegans* are homologous to the core protein of the mammalian basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *Genes Dev.* 7, 1471–1484.
- Rolland, Y., and Pillard, F. (2009). Validated treatments and therapeutic perspectives regarding physical activities. *J Nutr Health Aging* 13, 742–745.
- Romanello, V., Guadagnin, E., Gomes, L., Roder, I., Sandri, C., Petersen, Y., Milan, G., Masiero, E., Del Piccolo, P., Foretz, M., et al. (2010). Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J.* 29, 1774–1785.
- Rouger, K., Larcher, T., Dubreil, L., Deschamps, J.-Y., Le Guiner, C., Jouvion, G., Delorme, B., Lieubeau, B., Carlus, M., Fornasari, B., et al. (2011). Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am. J. Pathol.* 179, 2501–2518.
- Rubin, B.P., Nishijo, K., Chen, H.-I.H., Yi, X., Schuetze, D.P., Pal, R., Prajapati, S.I., Abraham, J., Arenkiel, B.R., Chen, Q.-R., et al. (2011). Evidence for an unanticipated relationship between undifferentiated pleomorphic sarcoma and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* 19, 177–191.
- Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.H., and Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351–1359.
- Le Rumeur, E., Fichou, Y., Pottier, S., Gaboriau, F., Rondeau-Mouro, C., Vincent, M., Gallay, J., and Bondon, A. (2003). Interaction of dystrophin rod domain with membrane phospholipids. Evidence of a close proximity between tryptophan residues and lipids. *J. Biol. Chem.* 278, 5993–6001.
- Le Rumeur, E., Hubert, J.-F., and Winder, S.J. (2012). A new twist to coiled coil. *FEBS Lett.* 586, 2717–2722.
- Rybakova, I.N., Patel, J.R., and Ervasti, J.M. (2000). The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J. Cell Biol.* 150, 1209–1214.
- Sacco, A., Doyonnas, R., Kraff, P., Vitorovic, S., and Blau, H.M. (2008). Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature* 456, 502–506.
- Sadoulet-Puccio, H.M., Khurana, T.S., Cohen, J.B., and Kunkel, L.M. (1996). Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane. *Hum. Mol. Genet.* 5, 489–496.
- Sadoulet-Puccio, H.M., Rajala, M., and Kunkel, L.M. (1997). Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12413–12418.
- Sakurai, H., Okawa, Y., Inami, Y., Nishio, N., and Isobe, K. (2008). Paraxial mesodermal progenitors derived from mouse embryonic stem cells contribute to muscle regeneration via differentiation into muscle satellite cells. *Stem Cells* 26, 1865–1873.
- Salih, M.A., Sunada, Y., Al-Nasser, M., Ozo, C.O., Al-Turaiki, M.H., Akbar, M., and Campbell, K.P. (1996). Muscular dystrophy associated with beta-Dystroglycan deficiency. *Ann. Neurol.* 40, 925–928.
- Sander, M., Chavoshan, B., Harris, S.A., Iannaccone, S.T., Stull, J.T., Thomas, G.D., and Victor, R.G. (2000). Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13818–13823.
- Schiaffino, S., Gorza, L., Sartore, S., Saggin, L., Ausoni, S., Vianello, M., Gundersen, K., and Lømo, T. (1989). Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 10, 197–205.
- Schienda, J., Engleka, K.A., Jun, S., Hansen, M.S., Epstein, J.A., Tabin, C.J., Kunkel, L.M., and Kardon, G. (2006). Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 945–950.
- Schmalbruch, H. (1984). Regenerated muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy: a serial section study. *Neurology* 34, 60–65.
- Seto, J.T., Lek, M., Quinlan, K.G.R., Houweling, P.J., Zheng, X.F., Garton, F., MacArthur, D.G., Rafferty, J.M., Garvey, S.M., Hauser, M.A., et al. (2011). Deficiency of α -actinin-3 is associated with increased susceptibility to contraction-induced damage and skeletal muscle remodeling. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2914–2927.

- Sharp, N.J., Kornegay, J.N., Van Camp, S.D., Herbstreith, M.H., Secore, S.L., Kettle, S., Hung, W.Y., Constantinou, C.D., Dykstra, M.J., and Roses, A.D. (1992). An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13, 115–121.
- Sheikh, F., Bang, M.-L., Lange, S., and Chen, J. (2007). “Z”eroing in on the role of Cypher in striated muscle function, signaling, and human disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 17, 258–262.
- Shelton, G.D., and Engvall, E. (2005). Canine and feline models of human inherited muscle diseases. *Neuromuscul. Disord.* 15, 127–138.
- Shen, X.N., Sznitman, J., Krajacic, P., Lamifina, T., and Arratia, P.E. (2012). Undulatory locomotion of *Caenorhabditis elegans* on wet surfaces. *Biophys. J.* 102, 2772–2781.
- Shirokova, N., Shirokov, R., Rossi, D., González, A., Kirsch, W.G., García, J., Sorrentino, V., and Ríos, E. (1999). Spatially segregated control of Ca²⁺ release in developing skeletal muscle of mice. *J. Physiol. (Lond.)* 521 Pt 2, 483–495.
- Shyy, J.Y., and Chien, S. (1997). Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 707–713.
- Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A.S., Barnard, E.A., Darlison, M.G., and Barnard, P.J. (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 244, 1578–1580.
- Singhal, N., and Martin, P.T. (2011). Role of extracellular matrix proteins and their receptors in the development of the vertebrate neuromuscular junction. *Dev Neurobiol* 71, 982–1005.
- Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R.V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., et al. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* 144, 402–413.
- Sironi, M., Bardoni, A., Felisari, G., Cagliani, R., Robotti, M., Comi, G.P., Moggio, M., and Bresolin, N. (2001). Transcriptional activation of the non-muscle, full-length dystrophin isoforms in Duchenne muscular dystrophy skeletal muscle. *J. Neurol. Sci.* 186, 51–57.
- Sleigh, J.N., Buckingham, S.D., Esmaeili, B., Viswanathan, M., Cuppen, E., Westlund, B.M., and Sattelle, D.B. (2011). A novel *Caenorhabditis elegans* allele, *smn-1(cb131)*, mimicking a mild form of spinal muscular atrophy, provides a convenient drug screening platform highlighting new and pre-approved compounds. *Hum. Mol. Genet.* 20, 245–260.
- Somlyo, A.V., Bond, M., Somlyo, A.P., and Scarpa, A. (1985). Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 5231–5235.
- Spencer, M.J., and Mellgren, R.L. (2002). Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2645–2655.
- Spuler, S., and Engel, A.G. (1998). Unexpected sarcolemmal complement membrane attack complex deposits on nonnecrotic muscle fibers in muscular dystrophies. *Neurology* 50, 41–46.
- St-Pierre, S.J.G., Chakkalakal, J.V., Kolodziejczyk, S.M., Knudson, J.C., Jasmin, B.J., and Megeney, L.A. (2004). Glucocorticoid treatment alleviates dystrophic myofiber pathology by activation of the calcineurin/NF-AT pathway. *FASEB J.* 18, 1937–1939.
- Straub, V., Duclos, F., Venzke, D.P., Lee, J.C., Cutshall, S., Leveille, C.J., and Campbell, K.P. (1998). Molecular pathogenesis of muscle degeneration in the delta-sarcoglycan-deficient hamster. *Am. J. Pathol.* 153, 1623–1630.
- Sulston, J.E., and Horvitz, H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56, 110–156.
- Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., and Thomson, J.N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100, 64–119.
- Suzuki, A., Yoshida, M., Yamamoto, H., and Ozawa, E. (1992). Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain. *FEBS Lett.* 308, 154–160.
- Tabara, H., Grishok, A., and Mello, C.C. (1998). RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 282, 430–431.
- Taghli-Lamalle, O., Akasaka, T., Hogg, G., Nudel, U., Yaffe, D., Chamberlain, J.S., Ocorr, K., and Bodmer, R. (2008). Dystrophin deficiency in *Drosophila* reduces lifespan and causes a dilated cardiomyopathy phenotype. *Aging Cell* 7, 237–249.
- Tajbakhsh, S., and Buckingham, M. (2000). The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr. Top. Dev. Biol.* 48, 225–268.

- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Tavernarakis, N., Wang, S.L., Dorovkov, M., Ryazanov, A., and Driscoll, M. (2000). Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat. Genet.* 24, 180–183.
- Thomas, G.D., Ye, J., De Nardi, C., Monopoli, A., Ongini, E., and Victor, R.G. (2012). Treatment with a nitric oxide-donating NSAID alleviates functional muscle ischemia in the mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS ONE* 7, e49350.
- Tidball, J.G. (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R345–353.
- Timmons, L., and Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854.
- Tinsley, J.M., Blake, D.J., and Davies, K.E. (1993). Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Hum. Mol. Genet.* 2, 521–524.
- Tinsley, J.M., Potter, A.C., Phelps, S.R., Fisher, R., Trickett, J.I., and Davies, K.E. (1996). Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* 384, 349–353.
- Tokarz, S.A., Duncan, N.M., Rash, S.M., Sadeghi, A., Dewan, A.K., and Pillers, D.A. (1998). Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy. *Mol. Genet. Metab.* 65, 272–281.
- Torrente, Y., Belicchi, M., Marchesi, C., Dantona, G., Cogiamanian, F., Pisati, F., Gavina, M., Giordano, R., Tonlorenzi, R., Fagiolari, G., et al. (2007). Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant* 16, 563–577.
- Tortora G.J. (2007). *Principes d'Anatomie et de Physiologie.* (De Boeck),.
- Tremblay, J.P., Bouchard, J.P., Malouin, F., Théau, D., Cottrell, F., Collin, H., Rouche, A., Gilgenkrantz, S., Abbadi, N., and Tremblay, M. (1993). Myoblast transplantation between monozygotic twin girl carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 3, 583–592.
- Tucker, M., and Han, M. (2008). Muscle cell migrations of *C. elegans* are mediated by the alpha-integrin INA-1, Eph receptor VAB-1, and a novel peptidase homologue MNP-1. *Dev. Biol.* 318, 215–223.
- Tuffery-Giraud, S., Bérout, C., Leturcq, F., Yaou, R.B., Hamroun, D., Michel-Calemard, L., Moizard, M.-P., Bernard, R., Cossée, M., Boisseau, P., et al. (2009). Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum. Mutat.* 30, 934–945.
- Valentine, B.A., Cooper, B.J., de Lahunta, A., O'Quinn, R., and Blue, J.T. (1988). Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. *J. Neurol. Sci.* 88, 69–81.
- Vandebrouck, C., Duport, G., Raymond, G., and Cognard, C. (2002). Hypotonic medium increases calcium permeant channels activity in human normal and dystrophic myotubes. *Neurosci. Lett.* 323, 239–243.
- Vastenhouw, N.L., and Plasterk, R.H.A. (2004). RNAi protects the *Caenorhabditis elegans* germline against transposition. *Trends Genet.* 20, 314–319.
- Verdijk, L.B., Gleeson, B.G., Jonkers, R.A.M., Meijer, K., Savelberg, H.H.C.M., Dendale, P., and van Loon, L.J.C. (2009). Skeletal muscle hypertrophy following resistance training is accompanied by a fiber type-specific increase in satellite cell content in elderly men. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 64, 332–339.
- Viveiros, R., Hutter, H., and Moerman, D.G. (2011). Membrane extensions are associated with proper anterior migration of muscle cells during *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *Dev. Biol.* 358, 189–200.
- Ward, S., Thomson, N., White, J.G., and Brenner, S. (1975). Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Comp. Neurol.* 160, 313–337.
- Warner, A., Xiong, G., Qadota, H., Rogalski, T., Vogl, A.W., Moerman, D.G., and Benian, G.M. (2013). CPNA-1, a copine domain protein, is located at integrin adhesion sites and is required for myofilament stability in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* 24, 601–616.
- Waterston, R.H., Epstein, H.F., and Brenner, S. (1974). Paramyosin of *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 90, 285–290.
- Waterston, R.H., Thomson, J.N., and Brenner, S. (1980). Mutants with altered muscle structure of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 77, 271–302.
- Webster, C., Silberstein, L., Hays, A.P., and Blau, H.M. (1988). Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 52, 503–513.

- Welch, E.M., Barton, E.R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W.J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C.R., Hwang, S., et al. (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447, 87–91.
- White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., and Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 314, 1–340.
- Whitehead, N.P., Yeung, E.W., and Allen, D.G. (2006). Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 657–662.
- Williams, B.D., and Waterston, R.H. (1994). Genes critical for muscle development and function in *Caenorhabditis elegans* identified through lethal mutations. *J. Cell Biol.* 124, 475–490.
- Willmann, R., Possekkel, S., Dubach-Powell, J., Meier, T., and Ruegg, M.A. (2009). Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 19, 241–249.
- Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., et al. (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis* 1, e18.
- Witt, C.C., Burkart, C., Labeit, D., McNabb, M., Wu, Y., Granzier, H., and Labeit, S. (2006). Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *EMBO J.* 25, 3843–3855.
- Xiong, G., Qadota, H., Mercer, K.B., McGaha, L.A., Oberhauser, A.F., and Benian, G.M. (2009). A LIM-9 (FHL)/SCPL-1 (SCP) complex interacts with the C-terminal protein kinase regions of UNC-89 (obscurin) in *Caenorhabditis elegans* muscle. *J. Mol. Biol.* 386, 976–988.
- Ben-Yair, R., and Kalcheim, C. (2008). Notch and bone morphogenetic protein differentially act on dermomyotome cells to generate endothelium, smooth, and striated muscle. *J. Cell Biol.* 180, 607–618.
- Yamashiro, S., Cox, E.A., Baillie, D.L., Hardin, J.D., and Ono, S. (2008). Sarcomeric actin organization is synergistically promoted by tropomodulin, ADF/cofilin, AIP1 and profilin in *C. elegans*. *J. Cell. Sci.* 121, 3867–3877.
- Yamashiro, S., Gimona, M., and Ono, S. (2007). UNC-87, a calponin-related protein in *C. elegans*, antagonizes ADF/cofilin-mediated actin filament dynamics. *J. Cell. Sci.* 120, 3022–3033.
- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 93, 23–67.
- Yiu, E.M., and Kornberg, A.J. (2008). Duchenne muscular dystrophy. *Neurol India* 56, 236–247.
- Ylänne, J., Scheffzek, K., Young, P., and Saraste, M. (2001). Crystal structure of the alpha-actinin rod reveals an extensive torsional twist. *Structure* 9, 597–604.
- Zhou, S., and Chen, L. (2011). Neural integrity is maintained by dystrophin in *C. elegans*. *J. Cell Biol.* 192, 349–363.
- Zordan, P., Sciorati, C., Campana, L., Cottone, L., Clementi, E., Querini, P.-R., and Brunelli, S. (2013). The nitric oxide-donor molsidomine modulates the innate inflammatory response in a mouse model of muscular dystrophy. *Eur. J. Pharmacol.*

Les dystrophies musculaires sont des maladies génétiques rares qui se caractérisent par une dégénérescence musculaire progressive. La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) qui est la plus sévère d'entre elles est due à des mutations dans le gène de la dystrophine. Les mécanismes cellulaires impliqués dans le processus de dégénérescence des muscles restent peu compris et aucun traitement efficace n'existe à ce jour.

Notre équipe a développé un modèle de la DMD chez le nématode *C. elegans* qui présente une dégénérescence musculaire progressive. Pendant ma thèse, j'ai caractérisé le processus de dégénérescence musculaire chez ce modèle par microscopie électronique. J'ai également contribué à une étude du rôle des mitochondries dans la dégénérescence musculaire dystrophine-dépendante chez le nématode. Par ailleurs, j'ai étudié l'effet de suppresseurs pharmacologiques et génétiques de la dégénérescence musculaire dystrophine-dépendante. Enfin, j'ai pu mettre en évidence que la force exercée par le muscle influence le taux de dégénérescence musculaire.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse, suggèrent que la perte de fonction de la dystrophine affecte chez le nématode l'intégrité du sarcolemme et des structures d'ancrage des sarcomères et déclenche ainsi une cascade d'évènements intracellulaires conduisant *in fine* à la mort de la cellule musculaire. Ainsi, mes travaux de thèse mettent en évidence de nouveaux mécanismes cellulaires impliqués dans la dégénérescence musculaire et ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement de thérapies visant à cibler les défauts primaires ou secondaires induits par la perte de fonction de la dystrophine.

Muscle dystrophies are genetic diseases characterized by progressive muscle degeneration. Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is the most severe and is due to a mutation in the gene coding the dystrophin protein. The cellular mechanisms implicated in the degenerating process are not understood yet and there is still no efficient treatment to cure the disease.

Our group developed a DMD model in *C. elegans* that presents progressive muscle degeneration. During my PhD thesis, I characterized the process of muscle degeneration in this model by electron microscopy. I also contributed to an investigation of the role of mitochondria in dystrophin-dependant muscle degeneration. I also studied the effect of pharmacological and genetic suppressors of muscle degeneration. Finally, I showed that the force developed by the worm to move influences the level of muscle degeneration.

Altogether, the results I obtained during my PhD thesis, suggest that the loss of function of the dystrophin protein affects the integrity of the muscle plasma membrane and the sarcomeres anchoring structures triggering a cascade of intracellular events leading to the muscle cell death in *C. elegans*. Therefore, my results highlight new cellular mechanisms implicated in the phenomenon of muscle degeneration and open new perspectives for the development of therapies targeting primary and secondary defects induced by the dystrophin loss of function.