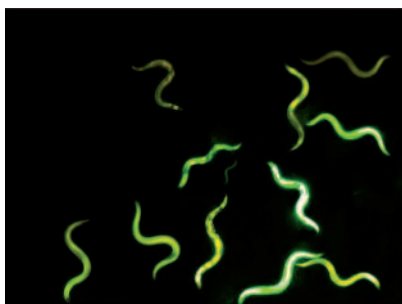


Du nématode *Caenorhabditis elegans* et de son utilisation en laboratoire



■ C. Couillault^{1,2,3}
C. Léopold Kurz^{1,2,3,*}

¹Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Université de la Méditerranée, Case 906, 13288 Marseille cedex 9, France

²INSERM, U631, 13288 Marseille, France

³CNRS, UMR6102, 13288 Marseille, France

*Correspondance: kurz@ciml.univ-mrs.fr

Résumé

Le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) est un invertébré combinant simplicité et complexité. Cette dualité permet de l'utiliser comme modèle pour étudier rapidement et relativement aisément d'importants processus biologiques relevant pour tous les eucaryotes. Dans cette revue seront présentés les aspects majeurs de l'anatomie et de la physiologie de ce nématode ainsi que certains des principaux outils utilisés en laboratoire. Des expériences marquantes tant du point de vue méthodologique qu'historique seront décrites pour illustrer les possibilités de l'animal. Finalement, l'étude de l'immunité antifongique de ce ver sera utilisée comme exemple pratique pour présenter les ressources de *C. elegans* et mettre en contexte les outils décrits.

Introduction

De l'humus à la gélose

Les premières publications qui parlent de *C. elegans* datent de la fin du 19^{ème} siècle et sont le fruit du travail du biologiste français Emile Maupas (http://wormbase.sanger.ac.uk/papers/1900-maupas/Maupas_1900.pdf). Cet archiviste de formation passionné de sciences naturelles, consacre son temps libre à l'étude d'animaux microscopiques présents dans le sol. L'académie des sciences remarque la qualité de ses travaux et le nomme en 1901 correspondant pour l'institut en Algérie. Ce naturaliste est particulièrement intrigué par le mode de reproduction hermaphrodite de certains vers et il est le premier à décrire précisément l'anatomie de *C. elegans* qu'il isole d'un humus en Algérie. C'est ainsi que ce ver fut sorti de terre !

A partir des années 1940, des travaux de différents biologistes sur les nématodes dont *C. elegans* vont permettre de mieux connaître ce petit invertébré. On peut relever les travaux d'Eilsworth Dougherty (Dougherty and Calhoun, 1948) et de Victor Nigon (Nigon and Dougherty, 1949) qui décriront respectivement le mode de nutrition et la croissance des nématodes *Caenorhabditis* ainsi que le mode de reproduction de *C. elegans*.

C'est à partir de 1960 que la carrière de cet animal en tant que modèle en biologie va prendre son essor. En effet, le biologiste moléculaire Sydney Brenner à qui nous devons déjà des avancées remarquables sur la nature du code génétique (Crick et al., 1961) obtient de E. Dougherty des spécimens de *C. ele-*

Remerciements

À Jonathan Ewbank et Olivier Zugasti pour les commentaires et discussions.

ARTICLES

gans (la souche N2) isolée quelques années plus tôt à Bristol en Angleterre. Il en fait son modèle d'étude de prédilection car il recherche un animal anatomiquement simple et facile à manipuler pour pouvoir établir les bases génétiques et moléculaires du développement. Dans son laboratoire au Medical Research Council (MRC) de Cambridge, S. Brenner va développer les outils génétiques permettant d'utiliser *C. elegans* comme modèle. En 1967 il expose des nématodes à l'EMS (Ethyl Methane Sulfonate), un puissant agent chimique mutagène et commence ce qu'il appelle sa première « chasse aux mutants ! » (Brenner, 1974). A partir des nombreuses constantes qui caractérisent cet animal, il isole de nombreux mutants dont le premier est nommé dumpy (signifie *boulot*) car il est plus petit et plus large que la souche sauvage. Il publiera en 1974 « The genetics of *Caenorhabditis elegans* » (http://wormbase.sanger.ac.uk/papers/31_Brenner74.pdf) (Brenner, 1974), où il décrit la méthode qui lui permet l'étude de près de 300 mutants et la cartographie de 100 gènes. Ces travaux sont toujours cités comme LA référence en génétique de *C. elegans* car ils posent les bases de l'analyse génétique chez ce nématode. La force dans le travail de S. Brenner tient au fait qu'il va parvenir à mobiliser autour de ce modèle toute une communauté de biologistes qui vont, grâce aux atouts de cet animal, rapidement faire avancer la compréhension de ce nématode mais aussi de certains processus communs aux eucaryotes. La généalogie des chercheurs qui dans les laboratoires à travers le monde travaillent sur *C. elegans* a été faite et la racine commune les ramène à S. Brenner.

Anatomie et physiologie**Un animal au mode de vie adapté au travail en laboratoire**

C. elegans est un organisme modèle utilisé en biologie depuis plus de 40 ans. L'étendue des connaissances obtenues grâce à cet animal va des mécanismes de l'apoptose (Ellis and Horvitz, 1986) jusqu'à la machinerie moléculaire de l'ARN interférence (Fire et al., 1998) en passant par les neurosciences (Bargmann, 1993), le développement (Rocheleau et al., 1997), les voies de signalisation (Shen et al., 2001), la résistance aux stress (Freedman et al., 1993), les maladies génétiques humaines (Driscoll and Gerstbrein, 2003) et plus récemment les interactions hôte-pathogène (Sifri et al., 2005, Irazoqui et al., 2010, Kurz and Ewbank, 2003).

Dans la nature, ce ver qui mesure environ 1 mm de long à l'âge adulte se trouve dans le sol ainsi que sur les fruits en décomposition où il se nourrit de microorganismes (Barrière and Felix, 2006).

Son mode de nutrition et sa petite taille font qu'il est facile à cultiver. En laboratoire, les animaux sont élevés

dans des boîtes de pétri sur un milieu gélosé ensemencé avec une souche de bactéries *Escherichia coli* souche OP50 (Riddle et al., 1997) (Figure 1). Les températures optimales de culture de ces nématodes sont comprises entre 15 °C et 25 °C. *C. elegans* a un mode de reproduction particulier ; c'est un animal hermaphrodite autofécondant. Cette spécificité est extrêmement précieuse au laboratoire car il est ainsi possible d'obtenir une population clonale à partir d'un seul individu homozygote pour un caractère considéré. Bien que majoritairement hermaphrodite (figure 2), il existe néanmoins des mâles dont la fréquence dans la nature est estimée entre 0.1 et 0.2 % (figure 3). Les mâles sont le produit d'une « erreur » dans la répartition des chromosomes X à la méiose.

Sous la lumière du microscope, *C. elegans* apparaît relativement transparent et son anatomie est à première vue simple (figures 2 et 3). La bouche de l'animal donne sur le pharynx dont le rôle est d'aspirer pour amener la nourriture vers le broyeur. Constitué de chitine, il transforme la

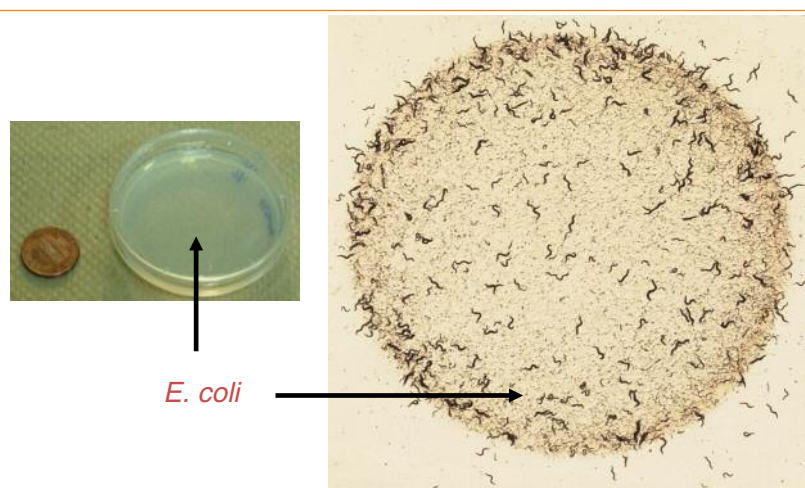


Figure 1 : Culture de *C. elegans*. A gauche ; boîte de Pétri contenant un milieu gélosé ensemencé avec *E. coli*, la bactérie qui sert de nourriture à *C. elegans*. A droite ; vue grossie du tapis bactérien sur lequel *C. elegans* est cultivé.

nourriture en un lysat qui passe ensuite dans l'intestin où il est assimilé. Les bactéries ingérées sont donc détruites et ne passent pas intactes la barrière du broyeur. La fin de l'intestin débouche sur le rectum dans la

partie postérieure du nématode. Chez l'hermaphrodite, la gonade possède deux bras qui sont réparties dans la partie antérieure et postérieure de l'animal. Chacune débouche sur une poche contenant le sperme produit

par l'animal : la spermathèque qui elle-même est reliée à l'utérus (figure 2). Par conséquent, les oocytes se différencient en progressant dans la gonade puis entrent en contact avec le sperme de l'animal. L'œuf ainsi fécondé démarre son développement avant d'être pondus moins de 10 heures plus tard. En ce qui concerne le mâle, son système reproducteur présente une gonade unique qui contient le sperme (figure 3). Elle aboutit sur un cloaque commun avec l'anus. Des excroissances dans la partie postérieure forment un éventail criblé de terminaisons nerveuses qui facilite la reproduction avec l'hermaphrodite. Malgré le caractère autofécondant, la reproduction entre les mâles et les hermaphrodites donne une descendance à la ségrégation Mendélienne car les gamètes du mâle prennent le dessus sur le sperme de l'hermaphrodite. Cette particularité permet des approches en routine de génétique classique.

Une coupe transversale d'un hermaphrodite adulte révèle une structure en tubes intriqués (figure 4). L'animal est entouré et protégé par une cuticule faite d'un maillage de collagènes, protéines sécrétées par un tissu sous-jacent, l'épiderme de *C. elegans*. Sous et contre cet épiderme se trouvent des faisceaux de muscles ainsi que des cordes nerveuses. L'intestin et les gonades sont relativement au centre, baignés dans un fluide appelé liquide pseudocoelomique.

La prolifération de cet animal est importante et rapide. A 20 °C, il ne faut que 3 jours à un œuf pondus par un adulte pour donner à son tour un adulte capable de pondre des œufs. La croissance d'un individu se fait au travers de mues successives qui rythment les

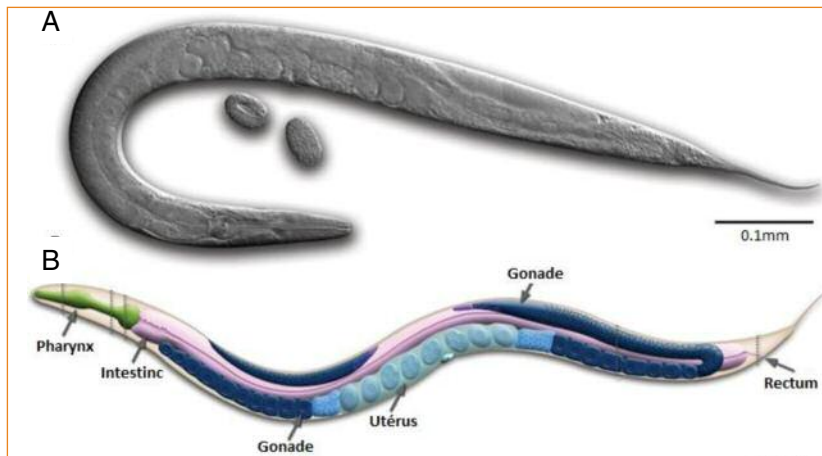


Figure 2 : Anatomie d'un hermaphrodite adulte. (A) Image en microscopie Nomarski d'un hermaphrodite adulte et de deux embryons. (B) Schéma de l'anatomie d'un hermaphrodite adulte (vue latérale gauche). Adapté de wormatlas (<http://www.wormatlas.org/>).

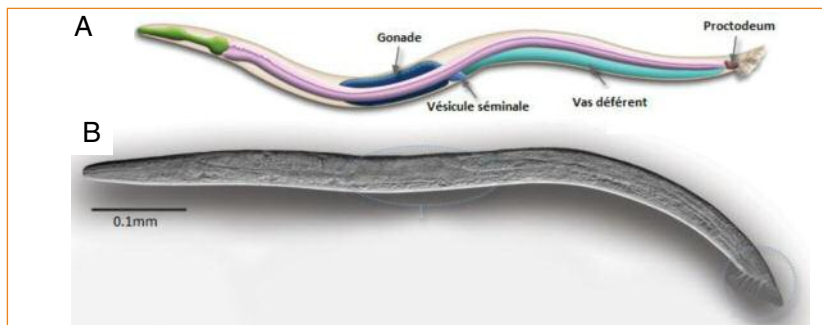


Figure 3 : Anatomie d'un mâle adulte. (A) Schéma de l'anatomie d'un mâle adulte (vue latérale gauche). (B) Image en microscopie Nomarski d'un mâle adulte. Adapté de wormatlas (<http://www.wormatlas.org/>).

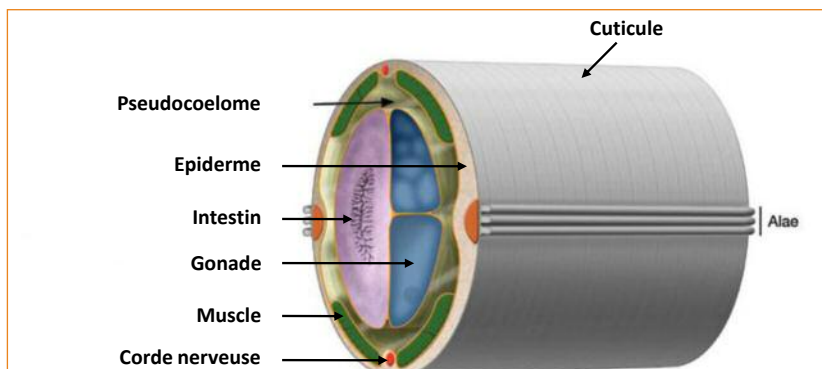


Figure 4 : Schéma d'une coupe transversale d'un hermaphrodite adulte. Adapté de wormatlas (<http://www.wormatlas.org/>).

ARTICLES

4 stades larvaires. Chaque adulte peut pondre environ 300 œufs et ceci en seulement 5 jours. Par conséquent, un nématode peut engendrer en 10 jours une population de 90 000 animaux génétiquement identiques.

Dans les conditions standards de laboratoire, les vers de génotype sauvage peuvent vivre jusqu'à 20 jours mais il existe des mutations poussant cette limite à plus de 100 jours. Le plus remarquable est que les gènes dont les mutations accroissent la durée de vie du ver sont conservés chez les mammifères (Kenyon, 2010) ce qui rend ce domaine de recherche très actif dans la communauté des utilisateurs de *C. elegans*.

De nombreuses constantes servent de repères

Un des intérêts majeur de ce nématode provient de sa constance tant d'un point de vu anatomique qu'au niveau de ses cycles. L'hermaphrodite contient exactement 959 noyaux de cellules somatiques dont précisément 302 appartiennent à des neurones. Le lignage cellulaire est invariant et a été identifié (Sulston et al., 1983). Cela signifie que la parenté ainsi que la position de chaque cellule sont identiques d'un individu à un autre. Cette particularité a permis à John White (collaborateur de S. Brenner) et son équipe de reconstruire le système nerveux du nématode à partir de coupes sériées de vers et d'observations en microscopie électronique (White et al., 1986). Les positions et les connexions entres chaque neurones ont été déterminées même si la densité de ces derniers au niveau du pharynx a rendu la tâche complexe. Ces cartes du système nerveux de *C. elegans*, auxquelles

s'ajoute la possibilité de faire des ablations spécifiques de cellules à l'aide d'un laser, sont des outils précieux pour étudier et comprendre des mécanismes liés à la locomotion, la mécanosensation, la chémosensation ou encore la thermosensation de cet animal. Il n'y a pas que d'un point de vue morphologique que ces animaux sont constants. La vie d'un ver est en effet régie par de nombreux cycles qui sont autant de standards qui attestent de la bonne santé de l'animal. Par exemple, le broyeur se contracte 3 fois par seconde pour casser les particules de nourriture et la défécation se produit 1 fois toute les 45 secondes. L'hermaphrodite, à un certain âge, pond 6 œufs par heure et le mouvement de l'animal dans un liquide implique 120 ondulations par minute (Wong et al., 1995). De même, le temps de développement, les périodes entre chaque mues ainsi que la durée de vie sont aussi des constantes extrêmement utiles pour caractériser un mutant ou une réponse à de nouvelles conditions. De part la régularité dans son développement, il est possible de synchroniser des populations à très grande échelle de manière à s'astreindre des différences d'âge entre individus. A plus petite échelle, il est aussi possible de sélectionner des individus d'un stade spécifique car ils présentent des particularités morphologiques tel que le quatrième stade larvaire qui possède une zone plus claire en forme de croissant de lune qui préfigure la vulve en devenir.

Techniques et outils

De nombreux mutants présentent des phénotypes remarquables

Les constantes de forme, d'activité

ou de temps de développement ont été dès le début de l'utilisation du nématode des atouts précieux pour démarrer la génétique. De nombreux mutants ont rapidement été isolés sur la base de phénotypes flagrants tels que des défauts locomoteurs (mutants *unc* : UNCoordinated), des tailles aberrantes (mutants *sma* : SMALL ou *lon* : LONG) ou encore un rythme de ponte anormal (mutants *egl* : EGG Laying defective). Ces mutants aux phénotypes évidents en comparaison avec les standards des animaux sauvages sont devenus autant de marqueurs génétiques localisés sur les 6 chromosomes de *C. elegans* (5 autosomes et 1 chromosome sexuel). Les travaux de S. Brenner que nous avons déjà évoqué ont permis d'initier l'élaboration d'une carte génétique qui a été la pierre angulaire faisant de *C. elegans* un modèle précieux en biologie. Cette ressource ouvre la porte aux approches génétiques par mutagenèse qui font parties de ces techniques de choix permettant d'aborder une problématique biologique de manière non-biaisée.

Les vers se conservent par congélation

Un avantage plus que conséquent du modèle nématode concerne la conservation et le maintient à long terme des souches ou des mutants obtenus. En effet, les nématodes peuvent être congelés et sont conservés à -80 °C ou dans de l'azote liquide. Mise au point par John Sulston, la congélation se fait dans une solution à base de glycérol. Même si les résistances au procédé varient, tous les stades larvaires sont congelables et seuls les œufs ne résistent pas. Après décongélation certains animaux vont

se réveiller en à peine quelques minutes et pondre le jour suivant. Le rythme de ponte de l'animal suffit à reformer des populations complètes en quelques jours à partir d'un seul animal. Si cette méthode est correctement mise en œuvre elle permet de récupérer la majorité des animaux traités. Les possibilités de stockage des souches de nématodes sont poussées à leur extrême au Caenorhabditis Genetic Center (CGC) qui possède plus de 12,000 souches de *C. elegans* (mutants, lignées transgéniques,...). De plus, tout laboratoire peut envoyer ses souches au CGC qui se chargera de les stocker et de les distribuer aux autres équipes selon leurs demandes (<http://www.cbs.umn.edu/CGC/strains/>). Cette centralisation, lisibilité et libre distribution du matériel biologique est un immense avantage pour accélérer le travail et éviter les redondances.

Plus de mutants générés que de gens pour les caractériser

Le criblage génétique est une approche très précieuse pour la compréhension globale d'un mécanisme biologique. Cette technique, qui vise à modifier le génome pour altérer le phénotype des organismes, permet d'identifier les gènes requis pour un processus déterminé mais aussi les séquences promotrices, les enhanceurs, les sites d'épissage ou encore les régions 3' UTR nécessaires à la bonne expression et à la régulation du gène ciblé. De manière à obtenir une vision complète du mécanisme d'intérêt, il faut en théorie pouvoir modifier chacun des gènes de l'organisme ce qui implique de manipuler une très grande quantité d'animaux. L'idéal est d'atteindre un niveau théorique de

mutation de l'ordre de la saturation du génome. Le nématode est particulièrement adapté à ces approches par son caractère hermaphrodite autofécondant, sa taille et son faible coût. En effet, 1 million d'animaux mutagénisés et prêts à être testés pour un phénotype donné sont aisément obtenus en quelques semaines, contenus dans seulement 20 boîtes de Pétri et ceci pour un coût équivalent à celui d'une souris. De plus, les très bonnes connaissances dont nous disposons sur l'anatomie et la physiologie de cet animal favorisent le développement de cribles génétiques qui portent notamment sur la locomotion, le comportement ou le développement. Cette facilité de mutagenèse et de crible incite très souvent les laboratoires à utiliser ces techniques dans leurs projets de recherche. L'animal pouvant se congeler, les congélateurs de ces laboratoires contiennent de nombreux mutants qui nécessiteront le travail de beaucoup de collaborateurs sur plusieurs années. Les études réalisées par l'équipe de Robert Horvitz, qui travailla un temps avec S. Brenner, sont une bonne illustration de l'utilisation des cribles génétiques. C'est à partir de la connaissance du lignage cellulaire de *C. elegans* qu'ils ont identifié par mutagenèse des animaux avec des défauts de différenciation ou des cellules surnuméraires. Parmi ces nombreux mutants se trouvaient une lésion dans le gène *ced-3* qui s'est avéré être un homologue du gène humain codant la *caspase-1*. Cette découverte chez le ver a démontré le contrôle génétique de l'apoptose et a grandement éclairé les découvertes de ces voies de signalisation chez les mammifères (Yuan et al., 1993).

Des animaux transgéniques en une semaine

La transparence des animaux est un atout majeur pour l'observation de patrons d'expression cellulaire. Il est relativement aisé de créer des animaux génétiquement modifiés qui contiennent tout ou partie du gène concerné ainsi qu'un fluorochrome comme la Green Fluorescent Protein (GFP) (Chalfie et al., 1994). De plus, de nombreuses expériences nécessitent le sauvetage d'une mutation par réintroduction de la version sauvage ou plus simplement la surexpression d'un gène d'intérêt ou son expression ectopique. Toutes ces approches, qui nécessitent l'introduction de matériel génétique pour établir des lignées transgéniques, sont effectuées en routine avec *C. elegans*. Différentes méthodes existent mais la plus courante, développée en 1991 par Craig Mello (Mello et al., 1991), consiste, à l'aide d'un fin capillaire de verre, à injecter le matériel génétique directement dans les gonades des hermaphrodites. Moins d'une heure est nécessaire à l'injection d'une vingtaine d'animaux et une semaine d'attente est requise pour l'identification de lignées stables issues de la deuxième génération. Tous les types d'acides nucléiques allant des ARN au produit PCR en passant par les chromosomes artificiels peuvent être injectés. L'ADN injecté est transformé par le nématode en un extrachromosome contenant de multiples copies du produit. De part l'absence de zone centromérique spécialisée sur les chromosomes du ver, l'extrachromosome est reconnu comme matériel endogène à la mitose par la machinerie répliquative du nématode.

ARTICLES

Les constructions portées par les lignées ne sont généralement pas intégrées et l'association d'un marqueur de co-injection est nécessaire pour attester de la présence du transgène d'intérêt. Ces marqueurs sont généralement des modificateurs de la morphologie du ver ou permettent de produire de la fluorescence. Récemment, des marqueurs de co-injection procurant une résistance à un antibiotique ont été développés. Ceci permet une sélection tout comme avec les bactéries ou les cellules eucaryotes (Giordano-Santini et al., 2010, Semple et al., 2010). Une étude récente illustre particulièrement bien la facilité d'obtention des lignées transgéniques ainsi que les avantages associés à la transparence du ver. Denis Dupuy et ses collaborateurs ont généré 900 souches transgéniques comportant les promoteurs de 900 gènes fusionnés à celui codant la GFP. Par l'analyse de l'expression de la GFP le long des animaux au cours du temps (voir plus bas l'explication concernant le trieur de nématode), ils ont déterminé non seulement le patron d'expression spatial mais aussi temporel de ces différents promoteurs (Dupuy et al., 2007). Un transgène étant rarement transmis à 100 % de la descendance, il est possible d'intégrer les constructions dans le génome du ver pour pleinement utiliser ces animaux. Cette intégration se fait de manière aléatoire en exposant les nématodes transgéniques à des rayonnements gammas qui provoquent d'importants dommages dans l'ADN. Si l'animal survit après réparation de son matériel génétique, il est possible que le transgène soit intégré au génome. Tout n'est qu'une histoire de nombre et plusieurs lignées intégrées sont généralement obtenues à partir de 500 animaux analysés. Les muta-

tions provoquées par le traitement sont ensuite éliminées par des croisements successifs avec des vers de génotype sauvage. Les lignées ainsi stabilisées avec un fond génétique nettoyé sont obtenues en 1 mois et peuvent être utilisées pour des applications à grande échelle.

***C. elegans* est un organisme multicellulaire au génome séquencé et annoté**

Le nématode étant rapidement devenu un modèle reconnu et relevant pour la biologie, d'importants efforts ont été fournis au sein de la communauté des laboratoires utilisant le nématode pour finaliser le séquençage de cet invertébré et fournir une annotation compréhensive de ses 6 chromosomes. Initiée par le biologiste anglais J. Sulston en collaboration avec Robert Waterston, qui a dirigé le travail de séquençage à l'université de Washington, la séquence complète du génome de *C. elegans* fut publiée en 1998 (T. C. S. C., 1998). Ce travail constitue le premier décryptage de l'ADN d'un métazoaire, les séquençages précédents ayant concerné la bactérie *Haemophilus influenzae* en 1995 et la levure *Saccharomyces cerevisiae* en 1997. En terme de chiffres, le génome du nématode est constitué de 100 Méga bases (3 Giga bases pour l'homme) avec environ 20 000 gènes (30 000 pour l'homme) annotés. Les comparaisons entre les différentes séquences disponibles ont rapidement souligné la relevance du modèle nématode pour la compréhension de la biologie des mammifères car 74% des protéines humaines présentent des homologues chez le ver (T. C. S. C., 1998). Certaines de ces ressemblances sont telles qu'elles stimulent

des approches qui portent sur la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson chez le ver (Driscoll and Gerstbrein, 2003). Ces maladies humaines sont en partie liées à une accumulation de protéines qui forment des agrégats toxiques pour la cellule et de tels symptômes peuvent être induits chez le ver en surexprimant dans certaines cellules le prototype de ces molécules. Ces protéines sont fusionnées à la GFP et la transparence du nématode permet de visualiser directement la formation ou la dissolution de ces agrégats chez les animaux transgéniques. Il est ainsi possible d'effectuer des cribles génétiques pour identifier des facteurs aggravants ou protecteurs ainsi que d'utiliser ces nématodes comme plateforme *in vivo* pour tester l'effet de certaines molécules ou drogues (Choe and Strange, 2008).

Inactivation direct d'un gène ou de son produit, oui ; KO ciblé, non

Une autre approche qui découle directement de l'obtention de la séquence génomique de *C. elegans* est la génétique inverse. Les comparaisons de gènes entre espèces et le recoupement des travaux effectués chez différents organismes permettent d'attribuer une fonction putative à de très nombreux produits de gènes du nématode. Pour tester la fonction d'un gène dans l'animal, il faut pouvoir supprimer ce gène ou le produit de ce gène. L'approche reine qui chez la souris consiste à enlever tout ou partie d'un gène ciblé (Knock Out) n'est que très peu efficace chez le ver. Par contre, des couples d'oligonucléotides peuvent être définis pour tester la présence et l'état du gène d'intérêt par PCR (Polymerase Chain Reaction). Il est donc possible de contrôler la pré-

sence de délétions dans une population traitée aux rayons ultraviolets. Certains laboratoires (<http://www.shigen.nig.ac.jp/c.elegans/index.jsp> et <http://celeganskoconsortium.omrf.org/>) dédient une part de leur temps à la génération de population de mutants qu'ils testent pour la présence de délétions spécifiques selon demande. Ces mutants sont envoyés au laboratoire demandeur ainsi qu'au CGC (voir plus haut). Néanmoins, il n'y a aucune garantie de délai concernant l'identification d'une délétion dans le gène d'intérêt. De plus, une banque de mutants composée d'animaux avec un transposon inséré dans le génome a été générée (Duverger et al., 2007). La position des transposons est identifiée et les nématodes congelés sont envoyés sur demande (<http://pbil.univ-lyon1.fr/segalat/data/mos.php>). Récemment, une technique de recombinaison homologue a été développée à partir de ces mutants dans le but d'insérer un fragment d'ADN à proximité du site d'insertion du transposon (Robert and Bessereau, 2007). En complément, il existe une méthode rapide pour supprimer spécifiquement des transcrits ; l'ARN interférence (ARNi). Ce mécanisme initialement identifié chez les plantes (Ecker and Davis, 1986) a été compris d'un point de vue mécanistique grâce aux travaux chez le nématode (Tabara et al., 1999). Son utilisation pour inactiver spécifiquement le produit de n'importe quel gène a révolutionné l'étude de la biologie de *C. elegans* ainsi que d'autres espèces. Il fallait initialement injecter dans la gonade des vers de l'ARN double brins spécifique d'un gène pour observer une disparition des transcrits correspondants dans les animaux traités ainsi que leur descendance et ainsi

simuler une mutation perte de fonction (Timmons and Fire, 1998). Une autre alternative consistait à tremper les nématodes dans une solution enrichie en ARN double brins. Finalement, une troisième technique a été mise au point pour laquelle il suffit de nourrir les vers avec des bactéries qui produisent l'ARN double brins pour observer une très forte diminution de la quantité de transcrits correspondants (Fraser et al., 2000). Sur ce principe et en utilisant les ressources associées au séquençage, le laboratoire de Julie Ahringer (Cambridge, Angleterre) a construit des banques de bactéries où chaque clone permet de cibler spécifiquement un gène de *C. elegans*. Des banques qui couvrent plus de 80 % du génome du nématode sont disponibles et permettent de faire des criblages de perte de fonction « génome complet » (Kamath and Ahringer, 2003). Les travaux récents de l'équipe de Todd Lamitina sur le stress osmotique illustrent bien les outils décrits précédemment. A partir d'animaux transgéniques qui deviennent fluorescents uniquement dans un contexte de stress, ce groupe de recherche a effectué l'ARNi de 16,000 gènes sur ces nématodes. Ils ont identifié des gènes dont la perte de fonction induit un stress chez l'animal (animal fluorescent) alors que l'environnement n'est pas stressant. Les gènes mis en évidence codent des protéines de systèmes régulateurs impliqués dans le maintien de l'homéostasie protéique du nématode (Lamitina et al., 2006).

De nombreuses ressources sur internet pour partager découvertes et matériels

Toujours dans l'esprit de la diffusion des ressources et des connaissances

au sein de la communauté des utilisateurs de *C. elegans* et au-delà, de nombreux sites sur internet sont dédiés à la recherche sur le nématode. Le plus utilisé d'entre eux est certainement le site « wormbase » (<http://www.wormbase.org>) qui présente la carte physique du génome de *C. elegans* ainsi que quantité d'informations sur les mutants disponibles, les expériences effectuées ainsi que la bibliographie correspondante. Ce site est le point d'entrée vers d'autres ressources telles que « wormbook » (<http://www.wormbook.org/>) ou « wormatlas » (<http://www.wormatlas.org/>). Le premier est un livre numérique qui traite de nombreux aspects de la biologie ou de l'utilisation de *C. elegans* tandis que le second est un atlas numérique de l'anatomie du ver conçu à partir de coupes sériées analysées par microscopie électronique. Les patrons d'expression de nombreux gènes sont aussi décrits et aident à l'identification cellulaire. Dans cette thématique, il est intéressant de noter le site d'un consortium qui détermine systématiquement les patrons d'expressions des gènes de *C. elegans* et dont les images sont accessibles au travers d'un moteur de recherche qui tri par tissu, stade de développement ou nom de gène (<http://gfpweb.aecom.yu.edu/index>).

Divers aspects de la biologie sont étudiables avec *C. elegans*

Des possibilités rapidement démontrées

La simplicité de ce modèle a favorisé l'émergence d'incroyables découvertes biologiques et technologiques qui ont bénéficié à des usages qui s'étendent bien au-delà du nématode. A ce jour ce ne sont pas moins de

ARTICLES

3 prix Nobel qui ont récompensés 6 scientifiques et leurs équipes pour leurs travaux directs sur *C. elegans*. Le prix Nobel de physiologie ou de médecine attribué en 2002 à S. Brenner, J. Sulston et R. Horvitz a souligné les atouts du modèle nématode à travers leurs découvertes qui concernent la régulation génétique du développement des organes et la mort cellulaire. Ce prix prend en compte les efforts ayant permis l'établissement de l'animal comme modèle en biologie, l'étendue des connaissances sur sa physiologie et les découvertes ayant une relevance pour tous les animaux, résultats qui découlèrent en grande partie de cribles génétiques. En 2006, ce fut au tour d'Andrew Fire et C. Mello de se voir décerner ce prix pour leurs travaux sur l'interférence par ARN. Bien qu'observée depuis longtemps chez les plantes, sous le terme de co-suppression, lors notamment de la surexpression de transgènes (Ecker and Davis, 1986), la compréhension des bases moléculaires de ce phénomène attendit l'utilisation du nématode. Partant du principe que l'ARNi est très efficace chez le nématode, C. Mello et A. Fire ont mis en place des cribles génétiques pour identifier des animaux résistants à l'ARNi. Pour avoir un phénotype robuste, ils ont traité des populations mutagénisées par l'EMS avec un ARNi qui entraîne une létalité embryonnaire. Par conséquent, seuls les mutants résistants à l'ARNi sont capables d'avoir une progéniture. Cette approche astucieuse et les études qui en ont découlé ont posé les bases moléculaires de l'ARNi, processus qui s'est révélé hautement conservé chez les eucaryotes (Tabara et al., 1999). Plus récemment en 2008 Martin Chalfie,

Osamu Shimon et Roger Y. Tsien ont reçu le prix Nobel de chimie, pour la découverte et le développement de la Green Fluorescent Protein (GFP) comme outils en biologie. Découverte dans les années 1970 par O. Shimura la GFP n'a été clonée et séquencée qu'en 1992. Le laboratoire de R.Y. Tsien n'a cessé d'améliorer et de modifier la GFP pour créer de très nombreux fluorochromes actuellement utilisés par tous les laboratoires. M. Chalfie qui travaillait déjà sur *C. elegans* a compris le potentiel de la combinaison entre cette molécule et le nématode transparent. Il a alors effectué les premières expériences d'expression hétérologue de cette protéine chez l'animal et ouvert la voie aux études de patrons d'expression et aux approches par gène rapporteur (Chalfie et al., 1994).

D'autres résultats obtenus grâce à ce modèle sont tout aussi remarquable tel que l'identification des microARN (miARN). Ils furent découverts en 1993 par Victor Ambros, Rosalind Lee et Rhonda Feibaum lors d'une étude sur un mutant de *C. elegans* présentant un défaut dans son lignage cellulaire. Ce défaut était lié à une mutation dans la partie non codante d'un gène (3' UTR du gène *lin-14*), séquence nécessaire à l'interaction avec un miARN (Lee et al., 1993). Le miARN correspondant (*lin-4*) fut le premier découvert mais il fallut attendre l'année 2000 et l'identification du miARN *let-7* dont la séquence est conservée dans de nombreuses espèces pour réaliser que le mécanisme de régulation par les miARN est aussi présent chez les mammifères (Pasquinelli et al., 2000). Le monde des miARN est désormais en pleine effervescence tant ces petits acides nucléiques semblent impliqués

dans de nombreux mécanismes de régulations transcriptionnelles ou traductionnelles (Bartel, 2009).

Vers une meilleure compréhension des infections grâce au nématode

Comme décrit précédemment, *C. elegans* est un modèle de choix pour décrypter les mécanismes du développement embryonnaire, de l'apoptose ou encore de la signalisation neuronale. Deux types d'approches vont étendre le spectre d'utilisation des invertébrés dont le nématode aux maladies infectieuses ainsi qu'à la dissection de l'immunité innée. Le premier type de travaux est effectué avec la drosophile et a pour cadre la réponse immunitaire innée. L'équipe de Jules Hoffmann à Strasbourg détermine en 1996 que le récepteur transmembranaire TOLL identifié 10 ans auparavant pour son rôle dans l'orientation de l'axe dorso-ventrale de l'embryon de drosophile (Anderson et al., 1985) est crucial pour la synthèse de peptides antimicrobiens chez cette mouche suite à une infection fongique (Lemaitre et al., 1996). Cette découverte va trouver un écho retentissant auprès des immunologistes avec la découverte de récepteurs équivalents chez les mammifères, les TLR (Toll Like Recepteurs) (Medzhitov et al., 1997). Chez la souris et l'homme notamment, ce sont ces récepteurs qui perçoivent les pathogènes, activent l'immunité innée et orchestrent la réponse adaptative qui suivra à travers la régulation de la synthèse d'interférons ou de cytokines (Palm and Medzhitov, 2009). Les travaux qui ont suivi ont démontré des similitudes inattendues entre les cascades de signalisation qui aboutissent à la synthèse des peptides anti-

microbiens chez cet invertébré et les voies de signalisation en aval des TLRs des mammifères. Ces résultats obtenus avec un insecte et leur relevance pour les mammifères ont ouvert les yeux des biologistes sur la conservation inter-espèces de processus autres que la transcription, la traduction ou la réplication. Dans le même temps, l'équipe de Frederick Ausubel à Boston travaille à l'identification de facteurs de virulence bactériens. Cette équipe part du principe que des pathogènes avec un large spectre d'hôtes allant des plantes aux mammifères utilisent certainement un même lot de facteurs de virulence et ceci quel que soit l'hôte ; c'est le principe des facteurs de virulence universels. L'équipe de F. Ausubel par exemple détermine qu'il est possible d'utiliser la plante comme premier modèle hôte pour identifier par crible génétique des facteurs de virulence de la bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa* qui sont aussi requis pour l'infection chez la souris (Rahme et al., 1995). Ce groupe décide ensuite d'utiliser le nématode comme hôte pour l'identification de facteurs de virulence microbiens, travaux qui s'avèrent relevant pour les mammifères (Mahajan-Miklos et al., 1999). Ces découvertes, associées à l'existence d'une importante famille de pathogènes humains avec un large spectre d'hôtes (*P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia pseudomallei*,...), ont ouvert la voie à de nombreuses études (Kurz et al., 2003, Gan et al., 2002) dont les cribles de molécules potentiellement antimicrobiennes avec le ver comme modèle hôte pour l'infection (Breger et al., 2007). Finalement, les modèles d'infections caractérisés avec le néma-

tode ont permis d'analyser la réponse du ver et de mettre en évidence une immunité innée inductible dont les éléments des voies de signalisation sont conservés inter-espèces (Kim et al., 2002, Mallo et al., 2002).

Cas pratique : étude de l'immunité antifongique de *C. elegans*

Pour comprendre à quel point *C. elegans* est un modèle pratique et robuste, nous allons utiliser l'historique des expériences menées sur l'immunité antifongique de *C. elegans* dans le laboratoire de Jonathan Ewbank (CIML, Marseille). Les étapes qui ont permis les évolutions dans ce domaine seront illustrées par des détails sur les protocoles types ainsi que par quelques exemples de résultats marquants. En effet, même si le questionnement change selon le sujet de recherche qui motive l'utilisation du modèle *C. elegans*, les outils employés restent sensiblement constants et sont le reflet du potentiel de ce modèle.

L'exploitation qui peut être faite de *C. elegans* en tant que modèle pour l'étude de l'immunité innée nécessite tout d'abord que l'on définisse quels types de microorganismes peuvent infecter ce ver (Couillault and Ewbank, 2002). Depuis bien longtemps des champignons qui infectent des nématodes (nématophages) sont connus et décrits comme pathogènes naturels des nématodes (Barron, 1976, van den Boogert et al., 1992). Leur variété est grande, leurs stratégies infectieuses tout aussi variées et dans tous les cas les nématodes sont pour eux une source nutritive. Certains de ces champignons sont capables de capturer les nématodes grâce à de véritables lassos constricteurs, d'autres via de petites structures adhésives qui piègent les

nématodes qui s'en approchent. Le choix du laboratoire de J. Ewbank s'est porté en 1999 sur le champignon *Drechmeria coniospora* car quelques études décrivaient déjà ce champignon comme pathogène des nématodes tels que *C. elegans* (Coles et al., 1989). L'objectif était d'obtenir une infection standardisée pour effectuer des approches de génétique et de transcriptomique sur l'hôte. *D. coniospora* est défini comme un champignon nématophage strict qui infecte grâce à des spores d'environ 8µm de long. Ces spores ont une forme de massue et présentent à leur extrémité apicale une structure adhésive qui leur permet d'adhérer à la cuticule des nématodes (figure 5). Chez *C. elegans*, l'adhésion se produit préférentiellement autour de la bouche et de la vulve. Ainsi collées aux vers, les spores vont germer pour permettre la croissance des hyphes (système végétatif du champignon) qui vont perforer sa cuticule puis traverser l'épiderme sous-jacent pour finir par envahir le corps entier de l'animal ce qui entraîne sa mort. Après 24h, l'animal ne constitue plus une source nutritive suffisante pour le champignon qui entre alors dans un nouveau cycle de sporulation pour permettre sa dissémination. Pour mettre en évidence les mécanismes de défense de *C. elegans*, l'utilisation de *D. coniospora* présente plusieurs avantages. D'une part,



Figure 5 : Image en microscopie optique de spores de *Drechmeria coniospora*. La flèche montre l'extrémité adhésive de la spore

ARTICLES

ce système infectieux est non problématique pour le manipulateur puisque ce champignon n'est pathogène que des nématodes. D'autre part, l'infection par ce champignon implique que le régime alimentaire du ver ne change pas à la différence des modèles infectieux qui utilisent les bactéries. En effet, les infections bactériennes se produisent majoritairement suite à une administration par ingestion ce qui peut rendre difficile la distinction entre mécanismes de défenses et ce qui peut être imputé à des problèmes nutritifs.

Méthodes pour évaluer la pathogénicité d'un microorganisme envers le nématode

Une méthode simple pour évaluer la virulence d'un microbe potentiellement pathogène (bactérie, champignon) est de mesurer le temps de survie des vers en contact avec cette souche. Cette survie suite à l'exposition au microbe d'intérêt est comparée avec celle obtenue en nourrissant les vers avec la souche d'*E. coli* (OP50) de référence utilisée dans les laboratoires pour la culture de *C. elegans*. Comme *D. coniospora* ne sert pas de nourriture au nématode, des spores sont mélangées à la nourriture du ver qui est infecté par simple contact avec celles-ci. Ces études de survie sont facilitées par le grand nombre de nématode que l'on peut utiliser, par leur homogénéité en termes de génotype ainsi que par leur synchronisation. Ces cinétiques de survie nous ont permis de déterminer que l'infection par *D. coniospora* tue tous les vers en moins de 3 jours alors que les nématodes non infectés peuvent vivre 20 jours (Couillault et al., 2004). Au-delà de la survie qui est le résultat d'une combinaison de nombreux facteurs, il est possible d'utiliser

les connaissances sur la physiologie du nématode pour détecter des perturbations durant l'exposition à certains microorganismes. Ces changements dans les cycles ou les comportements sont autant de phénotypes qui renseigneront sur la pathophysiologie.

Analyser le transcriptome pour avoir une vue globale de la réponse de l'hôte

L'une des caractéristiques de la réponse d'un organisme à un stress ou à une infection réside dans l'induction de la transcription d'un certain nombre de gènes dont le produit va aider à l'adaptation à cette nouvelle situation. L'étude du transcriptome par puces à ADN qui permet de définir le niveau d'expression des gènes dans des conditions définies est possible chez le nématode car l'usage de *C. elegans* permet la production d'ARN par les techniques les plus courantes telles que des extractions au phénol-Chloroforme. Ces techniques d'analyses de transcriptomes s'effectuent aujourd'hui en routine avec des puces à ADN désormais considérées comme « génome complet ». Combinées avec la richesse des banques de données qui concernent *C. elegans*, ces approches sont globales, efficaces et robustes. Nous avons déjà entrepris ce type d'approche pour mettre en évidence l'immunité antibactérienne du nématode (Mallo et al., 2002) et nous avons réutilisé la stratégie lors des infections par *D. coniospora* (Couillault et al., 2004, Wong et al., 2007). Plusieurs séries de puces à ADN, répétées à différents temps d'infection (12 et 24h post-infection) ont été réalisées et les résultats obtenus ont permis de classer les gènes

selon deux catégories principales : les gènes qui sont surexprimés et ceux qui sont sous-exprimés au cours de l'infection. L'analyse des gènes surexprimés a mis au jour entre autre des gènes codant des peptides d'une cinquantaine d'acides aminés. Ces peptides ont des séquences relativement identiques et ils sont codés par des gènes organisés sur deux loci distincts, le locus NLP pour Neuropeptides Like Peptides et le locus CNC pour CaeNaCin (nommé ainsi par le laboratoire Ewbank) (Pujol et al., 2008b, Couillault et al., 2004).

Certains gènes induits durant l'infection codent des peptides antimicrobiens

Pour déterminer la fonction biologique de ces peptides au cours de l'infection, l'un d'entre eux, NLP-31, a été synthétisé et la capacité de ce peptide d'inhiber la croissance de certains champignons et de bactéries a été mise en évidence par des tests *in-vitro* (Couillault et al., 2004). Un autre test a consisté à incuber des nématodes infectés par *D. coniospora* avec ce peptide de synthèse. Nous avons ainsi démontré que selon les concentrations de peptide utilisées, ce dernier pouvait permettre de stopper la croissance du champignon dans le nématode mais aussi bloquer sa sporulation. Cet exemple montre qu'il est tout à fait possible d'utiliser les modèles infectieux qui impliquent *C. elegans* comme hôte pour le criblage de molécules d'intérêts thérapeutiques telles que des drogues aux capacités antimicrobiennes (Moy et al., 2006). Pour preuve *in-vivo* de l'effet protecteur de ces peptides, des copies supplémentaires du locus codant la famille des NLPs ont été injectées chez le nématode.

Les animaux transgéniques ainsi générés sont capables de produire ces peptides en plus grande quantité. Nous avons ainsi mis en évidence *in-vivo* que cette surexpression augmente la survie des nématodes suite à une infection par le champignon *D. conio- spora* (Zugasti and Ewbank, 2009, Pujol et al., 2008b).

L'induction de ces peptides renseigne sur l'état d'activation de l'immunité

Nous l'avons dit, la transparence de ce ver permet une visualisation précise

de marqueurs tels que la GFP ce qui rend la stratégie d'utilisation des gènes rapporteurs particulièrement instructive. Pour cela la GFP est clonée en aval d'un promoteur d'intérêt puis cette construction est injectée chez le nématode pour créer des animaux transgéniques chez lesquels la synthèse de la GFP dépend de l'utilisation de ce promoteur (Chalfie et al., 1994). Après vérification par RT-PCR des résultats obtenus par puce à ADN, différentes lignées transgéniques furent générées que ce soit pour un peptide de la famille NLP (gène de la GFP sous

le contrôle du promoteur du gène *nlp-29* : *pnlp-29::GFP*) ou pour la famille CNC (gène de la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *cnc-2* : *pcnc-2::GFP*). Dans les deux cas, nous avons constaté que la GFP est exprimée faiblement et de manière constitutive chez les animaux transgéniques. Cette expression se fait dans l'épiderme du vers situé sous la cuticule, premières cellules en contact avec le pathogène. Enfin, comme espéré, la fluorescence des animaux transgéniques augmente fortement dans ce tissu suite à l'infection par le champignon (figure 6) (Couillault et al., 2004, Pujol et al., 2008a, Zugasti and Ewbank, 2009).

Tout l'intérêt de posséder ce type d'animaux transgéniques réside dans le système rapporteur qui indique de manière robuste l'état d'activation d'une partie de l'immunité antifongique de l'animal. En effet, nous pouvons supposer que les gènes qui codent les peptides antimicrobiens sont les éléments les plus en aval d'une cascade de signalisation activée suite à une infection. Le champignon *D. conio- spora* est l'activateur et les peptides antimicrobiens les effecteurs. Basé sur le principe d'une quantification de la GFP produite, ces animaux transgéniques sont donc des outils précieux pour la dissection des voies de régulation de l'immunité car ils présentent un phénotype robuste et reproductible. L'inactivation d'un gène, situé dans cette cascade de signalisation doit empêcher l'induction du transgène promoteur::GFP suite à l'infection. En revanche, si ce gène est un régulateur négatif de cette cascade, les animaux transgéniques seront fluorescents avant même leur infection (figure 7).

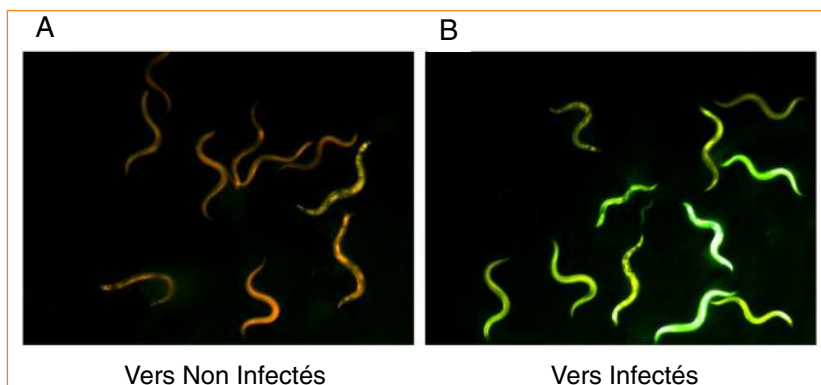


Figure 6 : Rapporteur fluorescent de l'immunité antifongique de *C. elegans*. Image de vers transgéniques non infectés (A) et infectés (B) en fluorescence. Ces animaux produisent constitutivement un fluorochrome rouge qui sert de marqueur de co-injection pour cette transgénèse. Les vers infectés expriment fortement la GFP qui est sous le contrôle d'un promoteur induit par l'infection.

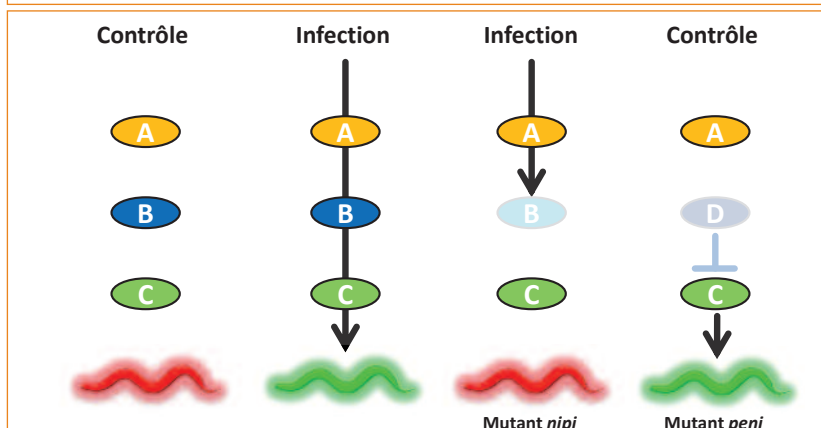


Figure 7 : Principe de l'utilisation d'un rapporteur pour disséquer les voies de signalisation situées en amont. Les animaux transgéniques non-infectés sont rouges et deviennent verts suite à l'infection et à l'activation de leur immunité innée. Des cribles génétiques peuvent permettre à partir de cet outil d'isoler des mutants qui ne répondent plus à l'infection (*nipi*) ainsi que des mutants ayant une immunité constitutivement active (*peni*).

ARTICLES

Commencer la dissection des voies de signalisation avec une étude par gènes candidats

Un génome séquencé et annoté, des bases de données en libre accès, des banques de mutants disponibles et une bibliographie minutieuse du domaine d'intérêt sont plus que suffisant pour réaliser une étude par gènes candidats (génétique « reverse »). A ce stade du projet, plusieurs groupes de recherche avaient déjà clairement identifié de nombreuses protéines comme des éléments clés de l'immunité innée des invertébrés ou des vertébrés. L'analyse du génome de *C. elegans* a révélé quelques homologues de la voie TOLL présente chez la drosophile et conservée chez les mammifères pour son rôle dans l'immunité (voies de signalisation des TLRs). Ces protéines et les gènes qui les codent ont donc été de bons candidats pour tester leur rôle dans la synthèse des NLPs et des CNCs au travers de mutants existants ou d'ARNi et des rapporteurs fluorescents (Couillault et al., 2004). Une recherche bioinformatique en utilisant comme sonde le domaine TIR qui est une caractéristique des récepteurs TOLL a révélé deux protéines chez le nématode. La première est la protéine TOL-1 (Pujol et al., 2001), équivalente au récepteur transmembranaire TOLL de la drosophile et aux TLRs de mammifères et la deuxième est la protéine adaptatrice TIR-1, équivalente chez la drosophile à dSARM et chez les mammifères à la protéine SARM (Stérile Alpha and aRmadillo Motifs) pour laquelle l'implication dans une voie de signalisation des TLRs n'avait pas été démontrée. Par conséquent, un mutant homozygote de *tol-1* a été croisé avec des nématodes transgéniques contenant le rapporteur *pnlp-29::GFP*

et suite à l'infection de la souche obtenue nous avons montré que le niveau d'expression du rapporteur GFP est équivalent à celui des vers transgéniques infectés de fond génétique sauvage. De plus, suite à une infection par *D. coniospora*, la cinétique de survie des vers sauvages est comparable à celle des vers mutants *tol-1*. Nous avons ainsi démontré que chez le nématode et dans nos conditions expérimentales, le récepteur TOL-1 n'est pas impliqué dans la synthèse des peptides antimicrobiens.

Concernant TIR-1, aucun mutant n'existait et nous avons donc choisi une approche par ARNi. Le génome de *C. elegans* code plusieurs isoformes de cette protéine et la technologie d'ARNi permet d'inactiver l'ensemble de ces isoformes à condition qu'ils aient des régions codantes communes. Nous avons donc réalisé une construction capable d'inactiver tous les isoformes de TIR-1 pour faire de l'ARNi par ingestion (voir précédemment). L'ARNi de *tir-1* sur des lignées contenant la construction *pnlp-29::GFP* a montré que ce gène est requis pour l'activation du rapporteur GFP suite à l'infection. En revanche, ce n'est pas le cas concernant les rapporteurs du locus *cnc*. De plus des nématodes traités par un ARNi de *tir-1* survivent moins longtemps que des nématodes contrôles (Couillault et al., 2004, Zugasti and Ewbank, 2009). Nous avons ainsi démontré pour la première fois l'implication d'une protéine à domaine TIR dans la signalisation de peptides antimicrobiens de *C. elegans*. Suite à ces travaux publiés en 2004, une équipe américaine mit en évidence pour la première fois le rôle de la protéine SARM (équivalente à TIR de

C. elegans) en tant que régulateur négatif dans la signalisation des TLRs chez les mammifères (Carty et al., 2006). C'est principalement par ces approches directes et ciblées que les éléments connus et impliqués dans l'immunité antibactérienne du ver tels que les voies de la p38 MAPkinase (Kim et al., 2002) et du TGF-beta (Mallo et al., 2002) furent démontrés comme nécessaires à la réponse antifongique chez le nématode (Couillault et al., 2004, Zugasti and Ewbank, 2009).

Criblage ARNi « génome complet » et mutagenèse pour une vue globale des voies de signalisation

Afin d'avoir une approche moins biaisée envers les éléments déjà identifiés chez d'autres espèces, le laboratoire de J. Ewbank a initié en 2004 des cribles par mutagenèse EMS à partir de la souche transgénique possédant la construction *pnlp-29::GFP*. Les vers transgéniques mutagenés par l'EMS permettent de réaliser des criblages basés sur la recherche de deux phénotypes majeurs. D'une part des animaux dits *nipi* (*no induction of peptides after Drechmeria infection*) qui ne produisent pas de GFP suite à l'infection par *D. coniospora* et d'autre part des animaux dits *peni* (*peptide expression no infection*) qui sur-expriment la GFP sans qu'il y ait infection par le champignon (figure 7). La première catégorie représente en théorie des régulateurs positifs des voies de signalisation tandis que la deuxième regroupe a priori des régulateurs négatifs des voies de transduction du signal. A ce jour ces différents criblages nous ont permis d'obtenir une centaine d'allèles différents de vers *nipi* ou *peni*

et seuls quelques uns ont été caractérisés et mis en évidence en tant qu'acteurs essentiels dans la signalisation des peptides antimicrobiens (Pujol et al., 2008a, Ziegler et al., 2009, Lee et al., 2010).

L'identification du gène muté chez ces animaux peut se faire par deux méthodes. La première implique les principes de Mendel et Morgan et les techniques de cartographie génétique classique qui utilisent soit des marqueurs génétiques, soit des polymorphismes génétiques, soit les deux (voir http://www.wormbook.org/toc_wormmethods.html). Le résultat est que le gène muté est généralement identifié au bout de 3 à 12 mois. L'autre possibilité pour caractériser une mutation obtenue par EMS est de faire du séquençage direct à haut débit de tout le génome (Sarin et al., 2008). Cette technique récente nécessite un important travail d'analyse *in-silico* car même après avoir fait ce que l'on appelle un nettoyage du fond génétique suite à la mutagenèse, plusieurs mutations qui sont restées silencieuses pour le phénotype recherché peuvent être détectées. Néanmoins, le positionnement de la mutation peut être confirmé par cette méthode en 1 mois.

En complément des techniques de mutagenèse, la disponibilité de banque d'ARN interférents « génome complet » permet une approche qui même si elle ne cible que les gènes annotés reste néanmoins prometteuse. En effet, l'ARNi et la mutagenèse sont deux approches complémentaires car une mutagenèse peut affecter un gène essentiel à la croissance du ver et les animaux mutagenés ne seront pas viables alors que l'ARNi permet de travailler à différents

stades de développement ce qui permet de s'affranchir de ce type d'effets létaux. Par contre, une mutagenèse chimique va générer des mutants subtils par changement d'un acide aminé tandis que l'ARNi entraîne essentiellement des pertes de fonction. Travailler à l'échelle du génome avec l'ARNi nécessite de pouvoir réaliser des analyses à hauts débits. Pour cela, un outil très performant existe qui n'est autre qu'un trieur automatique de nématodes, machine développée par la société Union Biometrica (Etats-Unis). Ce trieur peut être comparé à un FACS car il permet d'analyser différents paramètres chez le ver tels que sa taille, son opacité ou sa fluorescence (Vert, Jaune, Rouge) et ceci à un rythme de plusieurs milliers d'individus à la minute. Cette machine permet ainsi de trier des populations, d'analyser leur niveau de fluorescence ou encore de distribuer des individus dans des plaques 96 puits. Cet instrument permet de grandement faciliter la sélection et le tri d'individus d'intérêt après une mutagenèse et va surtout s'avérer crucial pour l'analyse automatisée de nématodes exposés aux différents clones d'une banque d'ARNi. L'intérêt majeur de cette semi-automatisation réside dans le fait que toutes les données d'un animal concernant sa taille, son opacité ou sa fluorescence sont stockées et peuvent être analysées de diverses manières en temps voulu. Une telle approche par ARNi à grande échelle est actuellement en cours dans notre laboratoire et devrait permettre de tester avec notre rapporteur de l'immunité antifongique les 18 000 gènes du ver représentés par les clones ARNi en moins de 4 mois.

Un bon modèle, un complément ou une alternative ?

Cette revue qui peut paraître comme un plaidoyer en la faveur du nématode ne saurait être objective sans une présentation des approches qui ne fonctionnent pas, ne sont pas envisageables ou sont fastidieuses avec *C. elegans*. Tout d'abord, l'anatomie du ver limite les études aux fonctions des organes présents. Il faut en effet garder à l'esprit qu'en dépit de son caractère multicellulaire l'animal n'est pas composé de plus de 1000 cellules somatiques avec une absence de système circulatoire, de reins, de cœur ou de poumons. Il y a en revanche des muscles, des neurones ainsi que des épidermes. Cette anatomie simplifiée et compacte rend paradoxalement certaines analyses des organes présents plus difficiles car il est délicat d'extraire spécifiquement des cellules d'un tissu. Certains protocoles permettent d'isoler l'intestin ou les noyaux d'embryon mais la dissection d'autres tissus ou cellules reste hasardeuse. Cette lacune peut dans certains cas tels que des purifications d'ARN ou de protéines devenir problématique si le gène d'intérêt ou son produit est exprimé dans plusieurs tissus à la fois. Il peut alors y avoir une importante perte de résolution dans l'analyse. Cette difficulté pour extraire spécifiquement des cellules est accompagnée par une absence totale de lignées cellulaires. Certaines cultures primaires sont possibles mais aucune lignée immortalisée n'a été générée. Le seul modèle de prolifération non-contrôlée est celui qui implique des cellules germinales ce qui aboutit à la rupture de la gonade et à la dissémination des gamètes dans l'organisme (Francis et al., 1995). En revanche, les voies de signalisation

ARTICLES

impliquées dans des processus cancéreux tel que la voie de l'EGF sont présentes chez le ver et peuvent servir de modèle pour une étude moléculaire (Kirienko et al., 2010).

En termes de protocoles et comme décrit précédemment, les recombinaisons homologues sont difficilement utilisables chez le ver pour générer Knock Out ou Knock In. Récemment, une méthode a été développée pour permettre l'insertion d'un fragment d'ADN en un endroit précis mais il faut pour cela utiliser des animaux ayant un transposon présent à proximité du site visé (Robert et al., 2006). Finalement, malgré l'essor important des études portant sur les interactions nématode-pathogène, de nombreuses limitations existent. La plus évidente concerne la température de culture des nématodes qui ne peut excéder 25 °C alors que les pathogènes de mammifères effectuent leurs cycles au sein d'un hôte dont la température est supérieure. Cette dif-

férence affecte tout le microbe, de son métabolisme général à son pouvoir pathogène. Ensuite se pose le problème de la spécificité de certains pathogènes qui réduit fortement le spectre d'hôtes envisageables. Finalement, certaines stratégies microbiennes visent à contrecarrer directement les systèmes de défenses adaptatifs de l'hôte. Etant donné que le nématode ne possède qu'un système immunitaire inné, le ver est inutilisable pour l'étude de ces processus. Néanmoins, il faut noter que de manière remarquable des facteurs de virulence relevant pour les mammifères produits par des bactéries telles que *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae* ou *Salmonella typhimurium* ont pu être étudiés ou identifiés à partir de travaux qui utilisent le nématode comme hôte (Styer et al., 2005, Vaitkevicius et al., 2006, Tenor et al., 2004).

Pour conclure, *C. elegans* est devenu un modèle incontournable en biologie et a une place de choix dans le cadre du réseau français EFOR (réseau d'Etudes Fonctionnelles chez les Organismes modèles) (<http://www.efor.fr/>). De plus, il est important de rappeler qu'actuellement, une partie de la recherche en biologie ne peut se justifier qu'au travers de son impact à moyen ou long terme sur la société humaine. Dans ce contexte et même si le nématode tire son épingle du jeu grâce à de nombreuses similitudes avec l'homme, cet invertébré n'est qu'un complément voir une alternative aux mammifères mais en aucun cas un modèle de remplacement. Par contre, d'un point de vue fondamental, il faut garder à l'esprit que les atouts de cet animal lui ont permis de faire partie des métazoaires les mieux décrits et les mieux compris et ceci en moins de 50 ans, ce qui en soi est extrêmement enrichissant pour la biologie en général.

Bibliographie

ANDERSON, K. V., BOKLA, L. & NUSSLEIN-VOLHARD, C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*, 42, 791-8.

BARGMANN, C. I. 1993. Genetic and cellular analysis of behavior in *C. elegans*. *Annu Rev Neurosci*, 16, 47-71.

BARRIÈRE, A. & FELIX, M. A. 2006. Isolation of *C. elegans* and related nematodes. In: COMMUNITY", T. C. E. R. (ed.) *Worm-Book*.

BARRON, G. L. 1976. Nematophagous fungi: three new species of *Myzocyttium*. *Can J Microbiol*, 22, 752-62.

BARTEL, D. P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136, 215-33.

BREGER, J., FUCHS, B. B., APERIS, G., MOY, T. I., AUSUBEL, F. M. & MYLONAKIS, E. 2007. Antifungal Chemical Compounds Identified Using a *C. elegans* Pathogenicity Assay. *PLoS Pathog*, 3, e18.

BRENNER, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77, 71-94.

CARTY, M., GOODBODY, R., SCHRODER, M., STACK, J., MOYNAGH, P. N. & BOWIE, A. G. 2006. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol*, 7, 1074-81.

CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W. W. & PRASHER, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263, 802-5.

CHOE, K. P. & STRANGE, K. 2008. Genome-wide RNAi screen and in vivo protein aggregation reporters identify degradation of

damaged proteins as an essential hypertonic stress response. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295, C1488-98.

COLES, G. C., DICKLOW, M. B. & ZUCKERMAN, B. M. 1989. Protein changes associated with the infection of the nematode *Caenorhabditis elegans* by the nematophagous fungus *Drechmeria coniospora*. *Int J Parasitol*, 19, 733-6.

COUILLAULT, C. & EWBANK, J. J. 2002. Diverse Bacteria Are Pathogens of *Caenorhabditis elegans*. *Infect Immun*, 70, 4705-7.

COUILLAULT, C., PUJOL, N., REBOUL, J., SABATIER, L., GUICHOU, J. F., KOHARA, Y. & EWBANK, J. J. 2004. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol*, 5, 488-494.

- CRICK, F. H., BARNETT, L., BRENNER, S. & WATTS-TOBIN, R. J. 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192, 1227-32.
- DOUGHERTY, E. C. & CALHOUN, H. G. 1948. Possible significance of free-living nematodes in genetic research. *Nature*, 161, 29.
- DRISCOLL, M. & GERSTBREIN, B. 2003. Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration. *Nat Rev Genet*, 4, 181-94.
- DUPUY, D., BERTIN, N., HIDALGO, C. A., VENKATESAN, K., TU, D., LEE, D., ROSENBERG, J., SVRZIKAPA, N., BLANC, A., CARNEC, A., CARVUNIS, A. R., PULAK, R., SHINGLES, J., REECE-HOYES, J., HUNT-NEWBURY, R., VIVEIROS, R., MOHLER, W. A., TASAN, M., ROTH, F. P., LE PEUCH, C., HOPE, I. A., JOHNSEN, R., MOERMAN, D. G., BARABASI, A. L., BAILLIE, D. & VIDAL, M. 2007. Genome-scale analysis of *in vivo* spatiotemporal promoter activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Biotechnol*, 25, 663-8.
- DUVERGER, Y., BELOUGNE, J., SCAGLIONE, S., BRANDLI, D., BECLIN, C. & EWBANK, J. J. 2007. A semi-automated high-throughput approach to the generation of transposon insertion mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res*, 35, e11.
- ECKER, J. R. & DAVIS, R. W. 1986. Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 5372-6.
- ELLIS, H. M. & HORVITZ, H. R. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44, 817-29.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- FRANCIS, R., BARTON, M. K., KIMBLE, J. & SCHEDL, T. 1995. *gld-1*, a tumor suppressor gene required for oocyte development in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 139, 579-606.
- FRASER, A. G., KAMATH, R. S., ZIPPERLEN, P., MARTINEZ-CAMPOS, M., SOHRMANN, M. & AHRINGER, J. 2000. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, 408, 325-30.
- FREEDMAN, J. H., SLICE, L. W., DIXON, D., FIRE, A. & RUBIN, C. S. 1993. The novel metallothionein genes of *Caenorhabditis elegans*. Structural organization and inducible, cell-specific expression. *J Biol Chem*, 268, 2554-64.
- GAN, Y. H., CHUA, K. L., CHUA, H. H., LIU, B., HIL, C. S., CHONG, H. L. & TAN, P. 2002. Characterization of *Burkholderia pseudomallei* infection and identification of novel virulence factors using a *Caenorhabditis elegans* host system. *Mol. Microbiol.*, 44, 1185-97.
- GIORDANO-SANTINI, R., MILSTEIN, S., SVRZIKAPA, N., TU, D., JOHNSEN, R., BAILLIE, D., VIDAL, M. & DUPUY, D. 2010. An antibiotic selection marker for nematode transgenesis. *Nat Methods*, 7, 721-3.
- IRAZOQUI, J. E., URBACH, J. M. & AUSUBEL, F. M. 2010. Evolution of host innate defence: insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. *Nat Rev Immunol*, 10, 47-58.
- KAMATH, R. S. & AHRINGER, J. 2003. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*, 30, 313-21.
- KENYON, C. J. 2010. The genetics of ageing. *Nature*, 464, 504-12.
- KIM, D. H., FEINBAUM, R., ALLOING, G., EMERSON, F. E., GARSIN, D. A., INOUE, H., TANAKA-HINO, M., HISAMOTO, N., MATSUMOTO, K., TAN, M. W. & AUSUBEL, F. M. 2002. A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science*, 297, 623-6.
- KIRIENKO, N. V., MANI, K. & FAY, D. S. 2010. Cancer models in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn*, 239, 1413-48.
- KURZ, C. L., CHAUVET, S., ANDRES, E., AUROUZE, M., VALLET, I., MICHEL, G. P., UH, M., CELLI, J., FILLoux, A., DE BENTZMANN, S., STEINMETZ, I., HOFFMANN, J. A., FINLAY, B. B., GORVEL, J. P., FERRANDON, D. & EWBANK, J. J. 2003. Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by *in vivo* screening. *EMBO J.*, 22, 1451-1460.
- KURZ, C. L. & EWBANK, J. J. 2003. *Caenorhabditis elegans*: an emerging genetic model for the study of innate immunity. *Nat. Rev. Genet.*, 4, 380-390.
- LAMITINA, T., HUANG, C. G. & STRANGE, K. 2006. Genome-wide RNAi screening identifies protein damage as a regulator of osmoprotective gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 12173-8.
- LEE, K. Z., KNIAZEVA, M., HAN, M., PUJOL, N. & EWBANK, J. J. 2010. The fatty acid synthase *fasn-1* acts upstream of WNK and Ste20/GCK-VI kinases to modulate antimicrobial peptide expression in *C. elegans* epidermis. *Virulence*, 1, 113 - 122.
- LEE, R. C., FEINBAUM, R. L. & AMBROS, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-54.
- LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J. A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86, 973-83.
- MAHAJAN-MIKLOS, S., TAN, M. W., RAHME, L. G. & AUSUBEL, F. M. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell*, 96, 47-56.
- MALLO, G. V., KURZ, C. L., COUILLAULT, C., PUJOL, N., GRANJEAUD, S., KOHARA, Y. & EWBANK, J. J. 2002. Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Curr Biol*, 12, 1209-14.
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P. & JANEWAY, C. A., JR. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity [see comments]. *Nature*, 388, 394-7.
- MELLO, C. C., KRAMER, J. M., STINCHCOMB, D. & AMBROS, V. 1991. Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *Embo J*, 10, 3959-70.
- MOY, T. I., BALL, A. R., ANKLESARIA, Z., CASADEI, G., LEWIS, K. & AUSUBEL, F. M. 2006. Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 10414-9.
- NIGON, V. & DOUGHERTY, E. C. 1949. Reproductive patterns and attempts at reciprocal crossing of *Rhabditis elegans* Maupas, 1900, and *Rhabditis briggsae* Dougherty and Nigon, 1949 (Nematoda: Rhabditidae). *J Exp Zool*, 112, 485-503.

ARTICLES

- PALM, N. W. & MEDZHITOV, R. 2009. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev*, 227, 221-33.
- PASQUINELLI, A. E., REINHART, B. J., SLACK, F., MARTINDALE, M. Q., KURODA, M. I., MALLER, B., HAYWARD, D. C., BALL, E. E., DEGNAN, B., MULLER, P., SPRING, J., SRINIVASAN, A., FISHMAN, M., FINNERTY, J., CORBO, J., LEVINE, M., LEAHY, P., DAVIDSON, E. & RUVKUN, G. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408, 86-9.
- PUJOL, N., CYPOWYJ, S., ZIEGLER, K., MILLET, A., ASTRAIN, A., GONCHAROV, A., JIN, Y., CHISHOLM, A. D. & EWBANK, J. J. 2008a. Distinct innate immune responses to infection and wounding in the *C. elegans* epidermis. *Curr Biol*, 18, 481-9.
- PUJOL, N., LINK, E. M., LIU, L. X., KURZ, C. L., ALLOING, G., TAN, M. W., RAY, K. P., SOLARI, R., JOHNSON, C. D. & EWBANK, J. J. 2001. A reverse genetic analysis of components of the Toll signalling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.*, 11, 809-21.
- PUJOL, N., ZUGASTI, O., WONG, D., COUILLAUD, C., KURZ, C. L., SCHULENBURG, H. & EWBANK, J. J. 2008b. Anti-fungal innate immunity in *C. elegans* is enhanced by evolutionary diversification of antimicrobial peptides. *PLoS Pathog*, 4, e1000105.
- RAHME, L. G., STEVENS, E. J., WOLFORTH, S. F., SHAO, J., TOMPKINS, R. G. & AUSUBEL, F. M. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, 268, 1899-902.
- RIDDLE, D. L., BLUMENTHAL, T., MEYER, B. J. & PRIESS, J. R. (eds.) 1997. *C. elegans II*, Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ROBERT, V. & BESSEREAU, J. L. 2007. Targeted engineering of the *Caenorhabditis elegans* genome following Mos1-triggered chromosomal breaks. *Embo J*, 26, 170-83.
- ROBERT, V., JORGENSEN, E. & BESSEREAU, J. L. 2006. MosTIC: A Novel Tool to Engineer the *C. elegans* Genome by Homologous Recombination. *European Worm Meeting*.
- ROCHELEAU, C. E., DOWNS, W. D., LIN, R., WITTMANN, C., BEI, Y., CHA, Y. H., ALI, M., PRIESS, J. R. & MELLO, C. C. 1997. Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell*, 90, 707-16.
- SARIN, S., PRABHU, S., O'MEARA, M. M., PE'ER, I. & HOBERT, O. 2008. *Caenorhabditis elegans* mutant allele identification by whole-genome sequencing. *Nat Methods*, 5, 865-7.
- SEMPLE, J. I., GARCIA-VERDUGO, R. & LEHNER, B. 2010. Rapid selection of transgenic *C. elegans* using antibiotic resistance. *Nat Methods*, 7, 725-7.
- SHEN, X., ELLIS, R. E., LEE, K., LIU, C. Y., YANG, K., SOLOMON, A., YOSHIDA, H., MORIMOTO, R., KURNIT, D. M., MORI, K. & KAUFMAN, R. J. 2001. Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell*, 107, 893-903.
- SIFRI, C. D., BEGUN, J. & AUSUBEL, F. M. 2005. The worm has turned--microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Microbiol*, 13, 119-27.
- STYER, K. L., HOPKINS, G. W., BARTRA, S. S., PLANO, G. V., FROTHINGHAM, R. & ABALLAY, A. 2005. *Yersinia pestis* kills *Caenorhabditis elegans* by a biofilm-independent process that involves novel virulence factors. *EMBO Rep*, 6, 992-7.
- SULSTON, J. E., SCHIERENBERG, E., WHITE, J. G. & THOMSON, J. N. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 100, 64-119.
- TABARA, H., SARKISSIAN, M., KELLY, W. G., FLEENOR, J., GRISHOK, A., TIMMONS, L., FIRE, A. & MELLO, C. C. 1999. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, 99, 123-32.
- TENOR, J. L., MCCORMICK, B. A., AUSUBEL, F. M. & ABALLAY, A. 2004. *Caenorhabditis elegans*-based screen identifies Salmonella virulence factors required for conserved host-pathogen interactions. *Curr Biol*, 14, 1018-24.
- THE *C. elegans* SEQUENCING CONSORTIUM 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 282, 2012-8.
- TIMMONS, L. & FIRE, A. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395, 854.
- VAITKEVICIUS, K., LINDMARK, B., OU, G., SONG, T., TOMA, C., IWANAGA, M., ZHU, J., ANDERSSON, A., HAMMARSTROM, M. L., TUCK, S. & WAI, S. N. 2006. A *Vibrio cholerae* protease needed for killing of *Caenorhabditis elegans* has a role in protection from natural predator grazing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 9280-5.
- VAN DEN BOOGERT, P. H., DIJKSTERHUIS, J., VELVIS, H. & VEENHUIS, M. 1992. Adhesive knob formation by conidia of the nematophagous fungus *Drechmeria coniospora*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 61, 221-9.
- WHITE, J. G., SOUTHGATE, E., THOMSON, J. N. & BRENNER, S. 1986. The structure of the nervous system of the nematode *C. elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 314B, 1-340.
- WONG, A., BOUTIS, P. & HEKIMI, S. 1995. Mutations in the clk-1 gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics*, 139, 1247-59.
- WONG, D., BAZOPOULOU, D., PUJOL, N., TAVERNARAKIS, N. & EWBANK, J. J. 2007. Genome-wide investigation reveals pathogen-specific and shared signatures in the response of *Caenorhabditis elegans* to infection. *Genome Biol*, 8, R194.
- YUAN, J., SHAHAM, S., LEDOUX, S., ELLIS, H. M. & HORVITZ, H. R. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75, 641-52.
- ZIEGLER, K., KURZ, C. L., CYPOWYJ, S., COUILLAUD, C., POPHILLAT, M., PUJOL, N. & EWBANK, J. J. 2009. Antifungal innate immunity in *C. elegans*: PKCdelta links G protein signaling and a conserved p38 MAPK cascade. *Cell Host Microbe*, 5, 341-52.
- ZUGASTI, O. & EWBANK, J. J. 2009. Neuroimmune regulation of antimicrobial peptide expression by a noncanonical TGF-beta signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* epidermis. *Nat Immunol*, 10, 249-256.