

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA RÉGULATION MÉCANOSENSIBLE DE LA DYNAMIQUE
JONCTIONNELLE PAR RGA-7 CHEZ CAENORHABDITIS ELEGANS

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR
BARBARA JEANNE OLIMPIA DA ROCHA

MARS 2020

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier chacun des membres du jury pour avoir évalué mon travail de doctorat.

J'aimerais ensuite remercier ma famille et plus particulièrement mes parents pour leur soutien tout au long de ces années de doctorat. Un grand merci également à mes amis d'ici, qui sont devenus une deuxième famille, pour m'avoir soutenue et avoir partagé cette aventure.

Merci également à toutes les personnes de l'UQÀM qui ont été à l'écoute et m'ont aidé, du corps professoral aux employés administratifs en passant par les étudiants ainsi que mes anciens collègues du laboratoire.

Merci à Steve qui fut un co-directeur intérimaire très présent et à l'écoute ainsi qu'à son équipe.

Enfin j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Sarah, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse dans son laboratoire, qui m'a appris bien plus que toutes mes attentes.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xi
LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS	xiv
RÉSUMÉ	xv
CHAPITRE I INTRODUCTION	1
1.1 Les jonctions cellulaires	4
1.1.1 Généralités	4
1.1.2 Conservation des complexes jonctionnels	7
1.1.3 Les jonctions adhérentes	8
1.2 Les GTPases Rho	13
1.2.1 Généralités	13
1.2.2 Régulateurs des GTPases Rho	14
1.2.3 Fonctions des GTPases Rho.....	18
1.3 Détection mécanique et transduction du signal par les jonctions adhérentes.....	26
1.3.1 Méthodes d'étude du stress mécanique.....	26
1.3.2 Détection du stress mécanique par les jonctions adhérentes	28
1.3.3 Transduction du signal par les jonctions adhérentes.....	31

1.4	Les modèles d'étude de la dynamique jonctionnelle.....	33
1.4.1	Les modèles <i>in vitro</i>	33
1.4.2	Les modèles <i>in vivo</i>	35
1.5	La fermeture ventrale du <i>C. elegans</i>	37
1.5.1	Généralités	37
1.5.2	Régulation de l'adhésion cellule-cellule lors de la fermeture ventrale....	38
1.6	RGA-7	40
1.6.1	Structure de la RhoGAP RGA-7	40
1.6.2	RGA-7 dans la fermeture ventrale	41
1.6.3	RGA-7 comme capteur de tension dans la spermathèque du <i>C. elegans</i>	43
1.7	Hypothèse et objectifs	44
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES		46
2.1	Entretien des souches et génération de mâles	46
2.1.1	Entretien des souches	46
2.1.2	Génération des mâles et leur maintien	47
2.2	Souches utilisées et générées dans cette étude	48
2.2.1	Souches utilisées et précédemment obtenues ou générées	48
2.2.2	Souches générées par croisement.....	50
2.3	Génotypage.....	56
2.4	Transformation des bactéries.....	57
2.5	Synchronisation des vers	58
2.6	Génération des nématodes transgéniques.....	59
2.6.1	Génération et amplification du plasmide pour bombardement.....	59
2.6.2	Amplification de la souche <i>unc-119(ed3)</i>	62

2.6.3 Bombardement	63
2.6.4 Sélection des lignées transgéniques	66
2.7 Congélation des souches de vers et des bactéries.....	66
2.7.1 Souches de vers.....	66
2.7.2 Congélation des bactéries	67
2.8 Léthalité embryonnaire.....	67
2.9 Montage des embryons de <i>C. elegans</i>	68
2.10 Microscopie confocale	68
2.10.1 Caractérisation de la jonction lors de la fermeture ventrale	68
2.10.2 Caractérisation de la jonction en phase tardive d'extension	72
2.10.3 Redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP).....	73
2.11 Statistiques.....	74
CHAPITRE III RÉSULTATS	75
3.1 <i>rga-7</i> , régulateur de l'exocytose et/ou du recyclage de HMR-1 de façon mécanosensible.....	75
3.1.1 <i>rga-7</i> régule l'accumulation et la structuration de HMR-1 en phase tardive d'extension de la jonction	75
3.1.2 <i>rga-7</i> inhibe l'exocytose ou le recyclage de HMR-1 en phase tardive d'extension de la jonction	80
3.1.3 <i>rga-7</i> possède une fonction mécanosensible et régule la structure de la jonction en phase tardive d'extension	84
3.2 Régulation par <i>rga-7</i> sous stress mécanique des composants jonctionnels lors de la phase tardive d'extension de la jonction.....	92
3.2.1 L'accumulation des régulateurs de l'accumulation de HMR-1 à la jonction et leur localisation varient selon le contexte mécanique.....	92
3.2.2 L'augmentation du stress mécanique modifie l'accumulation de HMR-1 et de ses régulateurs à la jonction et dans le cytoplasme.....	97
3.2.3 <i>rga-7</i> régule positivement l'accumulation de NMY-2 et CDC-42 actif à la jonction et négativement dans le cytoplasme à stress mécanique élevé	102

3.3 Rôles des domaines de RGA-7 dans la régulation de l'accumulation de HMR-1 et RGA-7 dans un contexte de stress mécanique	108
3.3.1 Les domaines de RGA-7 jouent un rôle dans l'accumulation de HMR-1 à la jonction selon le stress mécanique	109
3.3.2 Rôle des domaines de RGA-7 dans la régulation de son accumulation à la jonction et dans le cytoplasme	117
3.4 Étude de la distance entre les clusters chez l'ensemble des souches	125
CHAPITRE IV DISCUSSION	130
4.1 <i>rga-7</i> régule les complexes jonctionnels apicaux.....	130
4.2 <i>rga-7</i> régule l'exocytose et /ou le recyclage de HMR-1/E-Cadhérine	133
4.3 <i>rga-7</i> régule la localisation de l'accumulation de HMR-1 de manière mécanosensible.....	135
4.4 La composition des jonctions entre les cellules meneuses en cours de maturation varie selon le contexte mécanique	137
4.5 <i>rga-7</i> contrôle l'accumulation de NMY-2 et CDC-42 actif.....	139
4.6 Les domaines de RGA-7 participent à la distribution spatiale de l'accumulation de HMR-1 et de sa propre distribution spatiale.....	141
4.7 Régulation de la symétrie d'accumulation de protéines de signalisation entre les cellules meneuses par RGA-7	145
4.8 Le changement de stress mécanique ou de génotype influence la densité de cluster en phase tardive d'extension de la jonction.....	148
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	150
BIBLIOGRAPHIE.....	154

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Cycle de vie du nématode <i>C. elegans</i> à 20°C	3
1.2 Les différents types de jonctions cellulaires épithéliales chez les mammifères ..	5
1.3 Conservation des différents complexes jonctionnels chez les vertébrés, la drosophile et le <i>C. elegans</i>	7
1.4 Structure du complexe Cadhérine-Caténine	9
1.5 Mise en place de clusters de E-cadhérines associée au recrutement du cytosquelette d'actine.....	12
1.6 Régulation des GTPases Rho.....	15
1.7 Régulation des RhoGAPs par leur domaine F-BAR.....	18
1.8 Voies de signalisation contrôlant la formation des jonctions adhérentes et le cytosquelette d'actine.....	21
1.9 Régulation de l'endocytose des E-cadhérines.....	24
1.10 Exemples d'approches expérimentales <i>in vitro</i> pour l'étude du stress mécanique appliqué sur des cellules	27
1.11 Techniques de génération de tension <i>in situ</i> et <i>in vivo</i>	28
1.12 Changement de conformation de l'alpha-caténine sous tension et transduction du signal	30
1.13 Immobilisation des clusters de E-cadhérine par la dynamique du cytosquelette d'actine sous tension.....	32

1.14	Formation des jonctions dans des modèles cellulaires <i>in vitro</i>	34
1.15	Formation des jonctions lors de la fermeture dorsale chez <i>D. melanogaster</i> et la fermeture ventrale du <i>C. elegans</i>	36
1.16	La morphogénèse épithéliale chez l'embryon de <i>C. elegans</i>	38
1.17	Organisation du gène <i>rga-7</i> et la structure des isoformes de RGA-7	41
1.18	Régulation de la localisation de CDC-42 actif par RGA-7 au cours de l'extension des jonctions	43
2.1	Génération et maintien de mâles <i>C. elegans</i>	48
2.2	Diagramme illustrant la génération d'une souche mutante exprimant une protéine fluorescente	51
2.3	Principe du clonage Gateway BP et LR.....	61
2.4	Amplification de la souche <i>unc-119(ed3)</i> pour le bombardement biolistique..	64
2.5	Génération d'une souche transgénique	65
2.6	Identification de la jonction lors de la fermeture ventrale	70
2.7	Méthodes de mesure caractérisant la structuration de la jonction	71
2.8	Les deux protocoles d'analyse utilisés pour étudier la jonction	73
3.1	<i>rga-7</i> régule l'accumulation et la structuration de HMR-1 en phase tardive d'extension de la jonction	78
3.2	<i>rga-7</i> inhibe l'exocytose et/ou le recyclage de HMR-1 en phase tardive d'extension de la jonction	77
3.3	<i>rga-7</i> possède une fonction mécanosensible et régule la structure de la jonction en phase tardive d'extension	86
3.4	<i>rga-7</i> régule l'accumulation de HMR-1 à des zones jonctionnelles spécifiques selon le contexte mécanique	89

3.5	<i>rga-7</i> ne régule pas la structure de la jonction en phase précoce d'extension ..	91
3.6	Modification de l'accumulation le long de la jonction en extension des régulateurs de la dynamique jonctionnelle de HMR-1 selon le contexte mécanique	95
3.7	L'augmentation du stress mécanique modifie l'accumulation de HMR-1 et de ses régulateurs à la jonction et dans le cytoplasme	101
3.8	<i>rga-7</i> régule positivement l'accumulation de NMY-2 et CDC-42 actif à la jonction sous condition de stress mécanique élevé	104
3.9	<i>rga-7</i> régule l'accumulation à la jonction et dans le cytoplasme de NMY-2 et de CDC-42 actif inversement en fonction du stress mécanique	107
3.10	RGA-7 régule l'accumulation de HMR-1 à la jonction par son domaine F-BAR à haut stress mécanique	112
3.11	Les domaines N-terminal et F-BAR de RGA-7 régulent l'accumulation de HMR-1 à la jonction	115
3.12	Les 3 domaines de RGA-7 régulent la localisation de RGA-7 le long de la jonction à haut stress mécanique	119
3.13	Les domaines N-terminal et F-BAR inhibent la localisation de RGA-7 à la jonction	122
3.14	<i>rga-7</i> joue un rôle dans la régulation de la distance entre cluster de HMR-1 dans un contexte de stress mécanique élevé	126
3.15	Distribution de la distance entre clusters des différents régulateurs sous les deux conditions de stress mécanique	128
4.1	HMR-1 et SAX-7 possèdent un domaine transmembranaire et s'expriment chez les embryons de <i>C. elegans</i>	132
4.2	Prédiction de la structure du domaine N-terminal de RGA-7 montrant une homologie à une des structures de l'alpha-caténine	143
4.3	Modèle de régulation de l'exocytose ou du recyclage de HMR-1 par RGA-7 selon le stress mécanique lors de la fermeture ventrale du <i>C. elegans</i>	151

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1	Souches générées par croisement.....52
2.2	Tableau des souches générées par bombardement.....54
2.3	Tableau des plasmides rapporteurs GFP fusionnés aux isoformes de RGA-7 .55
2.4	Amorces pour le génotypage de <i>rga-7(ok1498)</i>57

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ABD	Actin Binding Domain
ADN	Acide Déoxyribonucléique
AJM-1	Adherens Junction Maker 1
AJ	Adherens Junction -vJonction adhérente
ArhGAP	Rho GTPase Activating Protein
Arp2/3	Actine-related protein 2/3extraite
BAR	Bin/Amphyphysin/Rvs
CCC	cadherin-catenin complexe - Complexe Cadhérine Caténine
Cdc42	Cell division control protein 42 (<i>C. elegans</i> : CDC-42)
CIP4	Cdc42 interacting protein 4
CRIB	Cdc42- and Rac-interactive domain
DAC	DLG-1/AJM-1 complex
DLG-1	Drosophila Discs Large homologue 1
dsRed	Red Fluorescent protein from <i>Discosoma</i> sp.
E-cadhérine	Epithelial Cadherin (<i>C. elegans</i> : HMR-1)
Ena/VASP	Enabled-Vasodilator-Stimulated phosphoprotein (<i>C. elegans</i> : UNC-34)
FCH	F-Bin/Ampiphysin

FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching-redistribution de fluorescence après photoblanchiment
GAP	GTPase Activating Protein
GDI	Guanosine nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GMIP	Gem Interacting Protein
GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	Guanosine triphosphatase
HMHA1	Histocompatibility (minor) HA-1
HMP-1/2	Humpback dorsal lumps 1/2
HMR-1	Hammerhead embryonic lethal 1
L1-CAM	L1 cell adhesion molecule (<i>C. elegans</i> : SAX-7)
MAGI-1	Membrane associated guanylate kinase inverted homolog
mCherry	monomeric cherry fluorescent protein
mDia	Mammalian Diaphenous-related formin
MLC	Myosin Light Chain
N-terminal	amine terminus- terminaison aminée
NMY-2	Non-muscle myosin 2
ORF	Open Reading Frame
Par3/Par6	Partitioning defective protein 3/6

PARG1	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLC-1	Phosphatidylinositol phospholipase C
Rac1	Ras related C3 botulinum toxin substrate 1 (<i>C. elegans</i> : CED-10)
RFP	Red Fluorescent protein
RGA-7	Rho GTPase Activating Protein 7
RhoA	Ras homolog gene family, member A (<i>C. elegans</i> : RHO-1)
ROCK	Rho-Associated Protein Kinase (<i>C. elegans</i> : LET-502)
SAX-7	sensory axon guidance 7
SPV-1	Spermatheca physiology variant 1
TOCA-1/2	Tansducer of Cdc42-dependent Actin assembly homolog 1/2
UNC	Uncoordinated protein
VAB-10	Variable Abnormal morphology 10
WAVE	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member (<i>C. elegans</i> : WVE-1)
Wasp	Wiskott-Aldrich syndrome protein homolog (<i>C. elegans</i> : WSP-1)
YAP	Yes activating protein (<i>C. elegans</i> : YAP-1)

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS

°C	degré Celsius
bp	base pair- paires de base
cm	centimètre
g	gramme
g	gravité
h	heure
kb	kilobase
L	Litre
µg	microgramme
µL	microlitre
µm	micromètre
mg	milligramme
mL	millilitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
ng	nanogramme
nm	nanomètre
rpm	rotation par minute

RÉSUMÉ

Les processus clés du développement embryonnaire, tels que la morphogénèse et la formation des épithéliums, reposent sur la migration cellulaire ainsi que la création et le remodelage de jonctions cellule-cellule. Ces processus sont modulés par la détection des tensions mécaniques exercées sur la membrane des cellules impliquant, entre autres, les jonctions. Reconnues récemment comme capteur mécanique, les jonctions adhérentes sont localisées à la jonction apicale des cellules épithéliales et contrôlent le remodelage de la jonction en réponse à des forces d'aspiration par la modulation de la dynamique des E-cadhérines. Cependant, la base moléculaire de cette adaptation demeure encore mal comprise. La fermeture ventrale du nématode *C. elegans* consiste en la migration des cellules épithéliales de part et d'autre de l'embryon vers sa ligne médiane ventrale. En résulte, la formation d'une nouvelle jonction qui permet la suture d'un feuillet d'épiderme recouvrant l'embryon. Ce processus de la phase tardive de la morphogénèse épithéliale constitue un système idéal pour étudier la formation et l'extension des jonctions cellule-cellule en temps réel et *in vivo*. Nous avons récemment identifié une nouvelle RhoGAP pour CDC-42/Cdc42 et RHO-1/RhoA, soit la protéine RGA-7 (*Rho GTPase-activating protein* 7) qui est impliquée dans la régulation de la fermeture ventrale ainsi que dans la formation et l'extension de la jonction entre les cellules meneuses. De plus, une étude parallèle a récemment montré que RGA-7 est une protéine mécanosensible, *i.e.* sensible à l'étirement des membranes. Ce projet de recherche a pour but d'élucider la régulation mécanosensible par *rga-7* de la réorganisation des jonctions entre les cellules de l'épiderme lors de la fermeture ventrale du *C. elegans*. Nos résultats montrent que *rga-7* régule l'accumulation et la structuration de HMR-1/E-cadhérine à la jonction pendant l'extension de la jonction. En outre, cette fonction de *rga-7* semble reposer sur la régulation de la dynamique de HMR-1 via l'inhibition de son exocytose et/ou de son recyclage et ce, de manière mécanosensible lors de l'extension de la jonction. Dans un second temps, l'étude des régulateurs de la dynamique des E-cadhérines, soit le cytosquelette d'actine-myosine et la GTPase CDC-42 liée au GTP, suggère que *rga-7* régule l'accumulation à la jonction de NMY-2 et de CDC-42 sous sa forme active sous conditions de stress mécanique. En outre, la fonction moléculaire de *rga-7* favorise une accumulation cytosolique asymétrique du cytosquelette d'actine-myosine quand les cellules sont soumises à une tension. Enfin, cette étude met en lumière l'importance des domaines F-BAR et N-terminal de RGA-7 dans la modulation de la localisation fonctionnelle de HMR-1 et ce, sous stress

mécanique élevé associé à un maintien de la distribution asymétrique de RGA-7. Globalement, ce projet de recherche a conduit à une meilleure compréhension de la fonction moléculaire de RGA-7 lors de la formation et de l'extension de jonctions cellule-cellule au niveau épithélial. Cette fonction mécanosensible pour une RhoGAP demeure peu décrite dans la littérature, ouvrant ainsi vers de nouvelles avenues de recherche en embryogenèse.

MOTS-CLÉS : *C. elegans*; Cytosquelette; E-Cadhérine; Embryogénèse; Jonctions adhérentes; RhoGAP.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

L'épithélium constitue l'enveloppe protectrice des organismes et des organes. Il forme une barrière de protection contre les infections tout en permettant des échanges (bio)chimiques avec le milieu extérieur. Il est composé de cellules polarisées compactes reposant sur une matrice extra cellulaire spécifique, soit la lame basale. Lors du développement, l'épithélium est mis en place par mouvement d'épibolie, permettant à deux feuillets épithéliaux à bord libre de migrer et de fusionner en un seul. L'intégrité de cet épithélium est maintenue tout au long de la vie à l'aide de processus de cicatrisation par ré-épithélialisation. Les cellules épithéliales sont soumises au cours du développement embryonnaire et à l'état adulte à de nombreux stress environnementaux, tels que les stress mécaniques. La capacité des cellules épithéliales à former et maintenir des jonctions constitue l'un des processus clé de l'intégrité des épithéliums.

Afin de mieux comprendre la mise en place des jonctions cellulaires, de nombreuses études en culture cellulaire *in vitro* ont été réalisées. Cependant, l'environnement cellulaire et tissulaire au sein d'un organisme n'est que peu pris en compte lors d'étude *in vitro* sur le contact entre deux cellules isolées. Cette composante environnementale est essentielle au comportement des cellules entre elles et à leur communication. L'étude des mécanismes de fermeture des feuillets épithéliaux *in*

vivo devient essentielle pour comprendre ce processus dans un contexte multicellulaire.

Le nématode *Caenorhabditis elegans* est un modèle clé pour étudier ce type de phénomènes complexes. En effet, il est le premier organisme multicellulaire dont le génome a été séquencé complètement (C. elegans Sequencing Consortium, 1998). Il mesure 1 mm de long à sa taille adulte et sa culture est très facile et peu coûteuse. Ce sont des nématodes hermaphrodites, permettant ainsi la conservation d'un même génome de génération en génération (Brenner, 1974). La population présente également en très faible proportion de mâles permettant de réaliser des études génétiques par croisement. Le *C. elegans* possède un cycle rapide de génération de 3 jours et demi permettant l'obtention de nombreux individus en peu de temps. Entre l'éclosion de l'œuf et l'atteinte de son état adulte, le ver passe par 4 stades larvaires (L1-L2-L3-L4) (Figure 1.1).

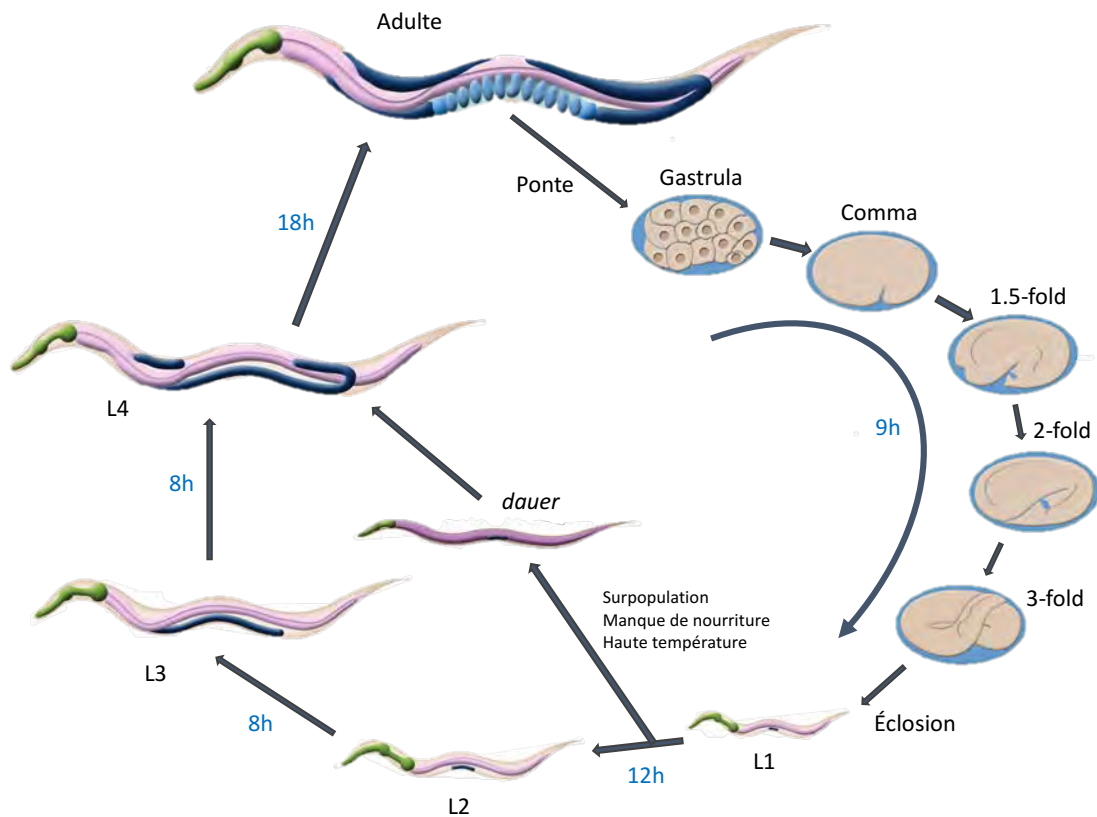


Figure 1.1 Cycle de vie du nématode *C. elegans* à 20 °C.

Le temps 0 correspond à la fécondation. Les nombres en bleu désignent le temps de passage d'un stade à l'autre. Après la ponte, les embryons vont se développer dans le milieu extérieur puis vont éclore. Ils passent par 4 stades larvaires : de L1 à L4. Une fois arrivé au stade L4, le ver va muer une dernière fois afin d'acquiesir son état adulte. Lorsque les conditions de culture ne sont plus favorables (surpopulation, manque de nourriture, haute température), la les vers ont la capacité d'entrer en phase *dauer* jusqu'à ce que les conditions redeviennent favorables. Figure adaptée de (Altun et Hall, 2009).

De plus, le *C. elegans* possède un nombre invariable de cellules à l'état adulte ainsi que dans tous les processus cellulaires et développementaux (Kimble et Hirsh, 1979 ; Sulston *et al.*, 1983). Ceci a permis de caractériser l'ensemble des lignées cellulaires des cellules formant le ver adulte à partir du zygote. Les *C. elegans* adultes et les embryons sont optiquement transparent, permettant une observation facile des processus cellulaires à l'aide de la microscopie (lumière blanche ou fluorescence)

(Williams-Masson *et al.*, 1998). Sa capacité à être facilement manipulable génétiquement, la conservation des processus développementaux d'un animal à l'autre et sa transparence optique font de lui un modèle animal de choix afin d'étudier les processus biologiques tel que la formation de jonctions cellule-cellule. Ce processus est observable chez le *C. elegans* lors d'un stade tardif de la morphogenèse épithéliale de l'embryon, la fermeture ventrale (Williams-Masson *et al.*, 1997).

1.1 Les jonctions cellulaires

1.1.1 Généralités

Les jonctions sont des structures multi-protéiques étant à l'origine de la cohésion entre les cellules et permettent la formation des épithéliums. Elles permettent également l'interaction entre les cellules et la lamina basale, ou lame basale, sur laquelle reposent ces cellules. Les jonctions peuvent être divisées en deux classes, celles permettant une interaction entre cellules et celles permettant une interaction entre les cellules et la lame basale.

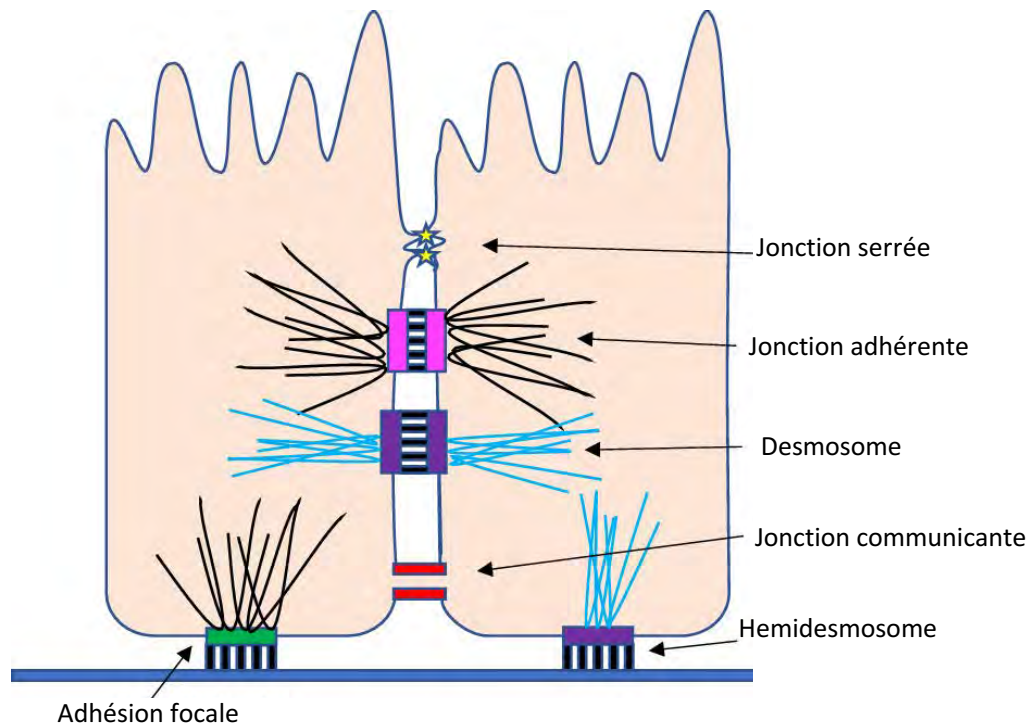


Figure 1.2 Les différents types de jonctions cellulaires épithéliales chez les mammifères.

Du pôle apical au pôle basal sont observables : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes. Du côté basal, deux complexes permettent l'adhésion à la lame basale : les complexes d'adhésion focale et les hémidesmosomes. Figure adaptée de (Orr *et al.*, 2019).

Les interactions entre les cellules et la lame basale sont médiées par les adhésions focales et les hémidesmosomes, qui font le lien entre les intégrines au contact du collagène de la lame basale et le cytosquelette intracellulaire d'actine et les filaments intermédiaires, respectivement. Les jonctions cellule-cellule se subdivisent en trois types, on retrouve du pôle apical vers le pôle basal : les jonctions serrées, les jonctions d'ancrage et les jonctions communicantes (Figure 1.2) (Giepmans et van Ijzendoorn, 2009).

Les jonctions serrées constituent une barrière permettant le passage sélectif de différents composés entre le milieu extérieur et l'épithélium. Elle délimite la partie apicale de la partie basolatérale des cellules (Zahraoui, 2004). Elles forment la *zonula occludens* et sont composées de protéines transmembranaires telles que les claudines, l'occludine et les protéines JAM (*Junctional adhesion molecule*) (Zahraoui, 2004). En plus de leur fonction de barrière chez les mammifères, les jonctions serrées participent également à la polarisation des cellules avec la protéine CRB3 (*Crumbs homolog 3*) qui y a été associée (Lemmers *et al.*, 2004).

Les jonctions d'ancrage sont constituées des jonctions adhérentes et des desmosomes. Elles permettent l'adhésion des cellules entre elles grâce à l'interaction des cadhérines classiques (par exemple : E-cadhérine) ou des cadhérines desmosomales (desmoglérine et desmocolline) (Oda et Takeichi, 2011). Dans le cytoplasme, elles sont liées au cytosquelette par l'intermédiaire de protéines appartenant à la famille armadillo. Les jonctions adhérentes par leurs cadhérines sont liées, d'une part au cytosquelette d'actine et aux microtubules via l'alpha et la bêta-caténine et, d'autre part via la caténine p120 (Harris et Tepass, 2010). Les desmosomes sont liés aux filaments intermédiaires par différentes protéines, incluant la plakoglobine, la plakophiline et la desmoplakine (Garcia *et al.*, 2018 ; Garrod et Chidgey, 2008).

Les jonctions communicantes permettent des échanges ioniques facilités ou le passage direct de petites molécules entre les cellules voisines (Goodenough *et al.*, 1996). Elles sont constituées d'un regroupement de canaux. Ces derniers sont formés à partir de l'interaction de deux connexons de cellules adjacentes.

1.1.2 Conservation des complexes jonctionnels

L'organisation jonctionnelle, décrite précédemment, est spécifique aux cellules épithéliales chez les vertébrés. En effet, la barrière formée par les jonctions serrées au pôle apical des cellules épithéliales est localisée au-dessus des jonctions adhérentes (Knust et Bossinger, 2002). En revanche, chez les invertébrés, et plus particulièrement chez la drosophile, des structures jonctionnelles s'apparentant aux jonctions serrées sont présentes sous les jonctions adhérentes et localisées au niveau de la partie basolatérale (Figure 1.3). Elles sont nommées jonctions septées. Chez le nématode *C. elegans*, un seul complexe jonctionnel a été découvert remplissant à la fois les fonctions d'adhésion et de barrière sélective que possèdent respectivement les jonctions adhérentes et serrées chez les vertébrés (Knust et Bossinger, 2002).

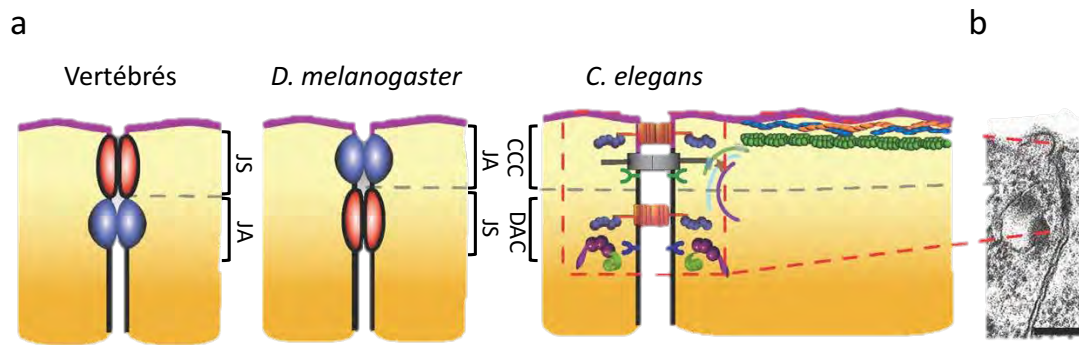


Figure 1.3 Conservation des différents complexes jonctionnels chez les vertébrés, la drosophile et le *C. elegans*.

a. Représentation schématique de la localisation des jonctions adhérentes (JA-en bleu) et des jonctions serrées/septées (JS-en rouge) des cellules épithéliales chez les vertébrés et *D. melanogaster*. Comme eux, le *C. elegans* possède deux complexes d'adhésion, soit le CCC (Catenin-Cadherin Complex) et le DAC (*DLG-1/AJM-1* Complex). b. Image de microscopie électronique de la zone apicale jonctionnelle du *C. elegans* appelée CeAJ (*C. elegans apical junction*). Échelle : 100 μ m. Image adaptée de (Pásti et Labouesse, 2014).

Les jonctions adhérentes constituent le seul complexe jonctionnel conservé à travers l'évolution. En effet, la drosophile possède un complexe DE-cadhérine/armadillo/alpha-caténine qui est l'orthologue du complexe E-cadhérine/bêta-caténine et alpha-caténine chez les mammifères (Harris, 2012). Chez le *C. elegans*, la fonction d'adhésion cellulaire est médiée par le complexe Cadhérine-Caténine (CCC) composé de HMR-1/HMP-2/HMP-1, qui sont également les orthologues du même complexe E-cadhérine/bêta-caténine/alpha-caténine (Costa *et al.*, 1998) (Figure 1.3). La fonction de barrière sélective est réalisée par le complexe DLG-1/AJM-1 (DAC). Ce complexe est spécifique au *C. elegans* tout en étant proche des jonctions septées de la drosophile (Pásti et Labouesse, 2014). Il est à noter que les desmosomes, dont les molécules d'adhésion appartiennent à la superfamille des cadhérines, sont apparus chez les vertébrés (Oda et Takeichi, 2011).

1.1.3 Les jonctions adhérentes

1.1.3.1 Structure

Les molécules d'adhésions cadhérines constituent le noyau des jonctions adhérentes (Takeichi, 1991). Elles sont nommées en fonction du type cellulaire dans lequel elles ont été identifiées comme la E-cadhérine pour les cellules épithéliales ou la N-cadhérine pour les cellules neurales (Gumbiner, 2005 ; Ratheesh et Yap, 2012). Ce sont des protéines transmembranaires possédant un domaine extracellulaire et un domaine intracellulaire. Leur domaine extracellulaire, composé de 5 répétitions pour les cadhérines classiques, permet de réaliser des interactions homotypiques *trans* médiées par le calcium avec les cadhérines des cellules voisines (Takeichi *et al.*, 1981) (Figure 1.4). Ces domaines extracellulaires sont capables d'interagir également *cis* avec les cadhérines proches de la même cellule afin de renforcer le point de cohésion entre les jonctions (Baumgartner *et al.*, 2000 ; Harrison *et al.*, 2011).

Par leur domaine intracellulaire, les cadhérines interagissent indirectement avec le cytosquelette d'actine et les microtubules grâce aux caténines. En outre, elles interagissent directement avec la bêta-caténine et la caténine p120 de manière indépendante (Figure 1.4). La caténine p120 liée aux cadhérines va réguler la dynamique de recyclage des cadhérines chez les mammifères (Miyashita et Ozawa, 2007). Elle lie également les cadhérines aux microtubules (Meng *et al.*, 2008). La bêta-caténine est liée très tôt à la cadhérine. En effet, lors de sa biosynthèse dans le réticulum endoplasmique, la bêta-caténine interagit avec la cadhérine avant même son adressage à la membrane plasmique (Hinck *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 1999). Une fois localisé à la membrane, le complexe cadhérine-bêta-caténine va se lier à l'alpha-caténine formant un complexe adaptateur impliquant les cadhérines et le cytosquelette d'actine et ses régulateurs (Mège et Ishiyama, 2017).

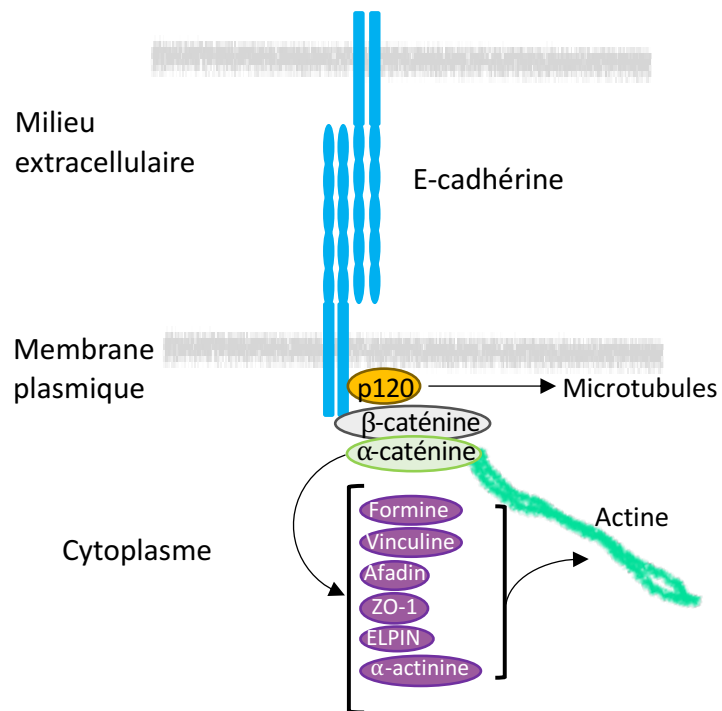


Figure 1.4 Structure du complexe Cadhérine-Caténine.

Les jonctions adhérentes permettent l'adhésion cellule-cellule grâce à une interaction en *trans* des domaines extracellulaires des E-cadhérines (bleu clair) appartenant à deux cellules

voisines. Cette interaction est médiée par le Ca^{2+} . Au niveau cytoplasmique, les E-cadhérines interagissent avec la bêta-caténine, l'alpha-caténine et la caténine p120 (p120). Celles-ci vont se lier au cytosquelette cellulaire ainsi qu'à des protéines interagissant avec l'actine (vert). Figure adaptée de (Baum et Georgiou, 2011).

1.1.3.2 Mise en place et maintien des jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes étant le lien cohésif entre les cellules, elles sont donc essentielles à de nombreux processus développementaux incluant la morphogenèse épithéliale (Costa *et al.*, 1998 ; Harris, 2012). En effet, lors de la formation des épithéliums, deux feuillets épithéliaux à bord libre vont migrer l'un vers l'autre jusqu'à entrer en contact afin de n'en former plus qu'un. À l'état adulte, ces jonctions sont indispensables au maintien de l'intégrité de l'épithélium.

Deux stratégies existent afin de former de nouvelles jonctions cellulaires : (i) soit la localisation de la jonction est mise en place en amont de sa formation, comme, lors de la génération de nouvelles cellules par mitose au sein d'un épithélium afin de maintenir la cohésion du feuillet épithélial (Herszterg *et al.*, 2014), (ii) soit la rencontre de cellules, qui ne sont pas issues d'une même division cellulaire, permet la formation de jonction entre celles-ci, *de novo*. Cette seconde stratégie est médiée par la formation de protrusions membranaires qui vont permettre la migration des cellules jusqu'à ce que les cellules se rencontrent *via* leurs protrusions (Cavey et Lecuit, 2009 ; Vasioukhin et Fuchs, 2001). Il s'agit du processus qui sera étudié lors de ce travail et qui sera détaillé ci-dessous.

Les cellules épithéliales qui ne sont pas encore cohésives possèdent des E-cadhérines à leur membrane qui vont y circuler librement (Adams *et al.*, 1998). Une fois le contact initié entre les deux cellules, les cadhérines libres sont recrutées afin de former des nanoclusters qui vont permettre de lier les deux cellules (Adams *et al.*, 1998). Après le recrutement des protéines caténines aux domaines intracellulaires des

cadhérines, le cytosquelette, principalement d'actine, va être recruté où les cadhérines se sont concentrées (Kovacs *et al.*, 2002). Au point de concentration des cadhérines, la dynamique du cytosquelette d'actine va être modulée afin de stabiliser les filaments d'actine. Cette stabilisation va fortifier les interactions cadhérine-cadhérine entre les cellules (Vasioukhin et Fuchs, 2001). Les cadhérines plus stables forment des clusters dont la taille est finement régulée. Par des études de récupération de fluorescence après photoblanchiment (FRAP), ces clusters de E-cadhérines démontrent une mobilité plus faible que les cadhérines libres (Cavey *et al.*, 2008). Néanmoins, un remodelage constant est nécessaire et met en évidence la mise en place d'une dynamique de recyclage des cadhérines qui est essentielle au maintien des jonctions (de Beco *et al.*, 2009 ; Hong *et al.*, 2010). La structuration des nanoclusters de E-cadhérines active un réarrangement du cytosquelette d'actine en contrôlant le recrutement de plusieurs régulateurs du cytosquelette d'actine (Ratheesh et Yap, 2012) (Figure 1.5). C'est ce réarrangement du cytosquelette qui permet une élongation et permet la stabilisation des jonctions adhérentes entre les deux cellules (Cavey et Lecuit, 2009). Une fois que la jonction ne s'étend plus elle devient mature et les jonctions adhérentes sont maintenues ou remodelées afin de s'adapter à l'ensemble des changements morphogéniques.

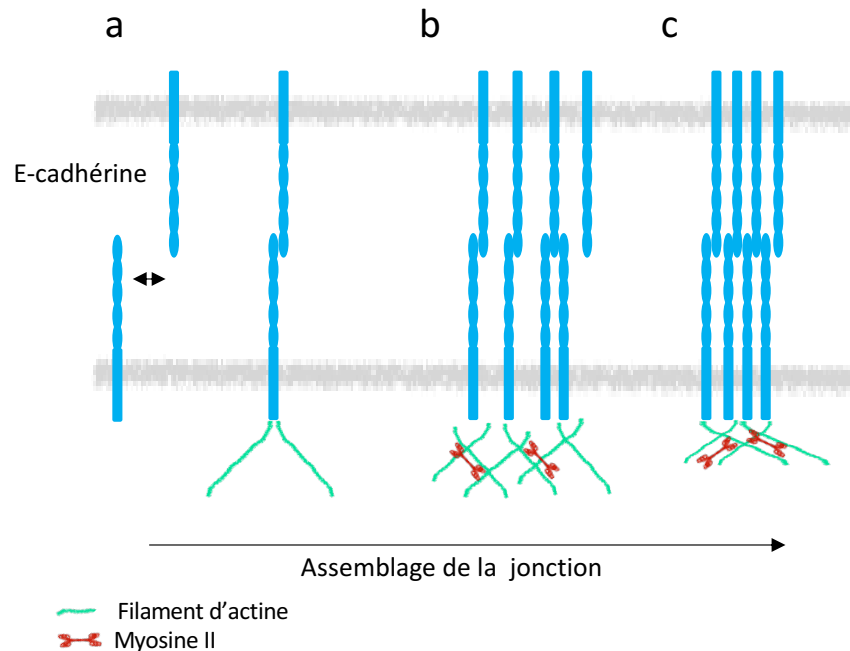


Figure 1.5 Mise en place de clusters de E-cadhérines associée au recrutement du cytosquelette d'actine.

La formation des clusters de E-cadhérines se déroule en trois étapes. a. L'interaction des cadhérines libres en *trans* va recruter le cytosquelette d'actine et s'auto-stabilise en inhibant son endocytose. b. La réorganisation du cytosquelette d'actine par NMY-2 et les protéines de remodelage tel que le complexe ARP2/3 et l'interaction en *cis* des cadhérines permettent la formation de clusters de E-cadhérines. c. Une fois stable, une coordination de l'ensemble des acteurs permet la mise en place de la tension corticale et permet la fonctionnalisation en tant que jonction adhérente. Figure adaptée de (Ratheesh et Yap, 2012)

La formation, l'extension et le maintien des jonctions par remodelage sont des étapes régulées par les GTPases Rho, une famille de petites protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires (Braga, 2002 ; Warner et Longmore, 2009 ; Harris et Tepass, 2010).

1.2 Les GTPases Rho

1.2.1 Généralités

La famille des GTPases Rho fait partie de la superfamille des GTPases Ras et constitue l'une des 5 subdivisions de cette superfamille (Ras, Arf, Rab, Ran et Rho) (Vigil *et al.*, 2010). Les 5 classes de petites GTPases sont subdivisées selon leur fonction cellulaire. Les membres de la famille GTPases *Ras Sarcoma* (Ras) sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Les GTPases *Ras-like proteins in brain* (Rab) et *ADP-ribosylation factor* (Arf) sont associées au trafic vésiculaire. Les GTPases *Ras-like nuclear* (Ran) sont, quant à elles, associées au transport nucléaire impliqué dans l'organisation du fuseau mitotique. Les GTPases *Ras homologous* (Rho) sont impliquées dans de très nombreux processus cellulaires (Vigil *et al.*, 2010). Ce sont des régulateurs centraux de la dynamique du cytosquelette d'actine et des microtubules (Etienne-Manneville, 2004). De ce fait, de nombreuses fonctions cellulaires leur sont associées, telles que la polarité cellulaire, la migration et l'adhésion cellulaire, le trafic vésiculaire ainsi que l'expression génique et la régulation du cycle cellulaire (Etienne-Manneville et Hall, 2002).

Les GTPases Rho, comme tous les membres de la superfamille des GTPases Ras, sont de petites protéines G monomériques associées à la membrane plasmique. Elles ont la capacité de lier de petites molécules de GDP ou de GTP selon leur état inactif ou actif, respectivement (Etienne-Manneville et Hall, 2002). Elles sont considérées comme des interrupteurs moléculaires cyclant entre ces deux états en fonction du nucléotide lié. Lorsque liées à une molécule de GTP, les GTPases Rho peuvent interagir avec de nombreux effecteurs et déclencher des voies de signalisation en réponse à leur activation. Alors que lorsqu'elles sont liées au GDP et sont à l'état inactif, elles ne peuvent interagir avec leurs effecteurs (Etienne-Manneville et Hall,

2002) (Figure 1.6). Ces protéines possèdent un domaine lipidique permettant leur localisation à la membrane (Primeau et Lamarche-Vane, 2008).

Les GTPases Rho étant des protéines de signalisation cruciales, le cycle entre leur état actif et inactif est étroitement régulé pour que leurs fonctions soient assurées.

1.2.2 Régulateurs des GTPases Rho

1.2.2.1 Généralités

Comme expliqué précédemment, les GTPases commutent entre un état inactif (liées au GDP) et actif (liées au GTP). Le cycle entre le GDP et GTP est étroitement régulé par trois types de protéines : GEF, GAP et GDI (Hodge et Ridley, 2016) (Figure 1.6). Les *Guanine nucleotide-Exchange Factor* (GEF) sont des régulateurs positifs des GTPases Rho. Elles catalysent l'échange du GDP en GTP des GTPases Rho en réponse à un stimulus et promeut donc leur activation. Les *GTPases Activating Proteins* (GAP) sont des régulateurs négatifs des GTPases Rho et vont permettre l'inactivation des GTPases Rho en augmentant le taux d'hydrolyse intrinsèque du GTP des GTPases. Enfin, les *Guanine nucleotide-Dissociation Inhibitors* (GDI), comme l'indique leur nom, vont inhiber l'échange entre le GDP et le GTP en séquestrant les GTPases Rho sous leur état inactif dans le cytoplasme. Cela va empêcher les GTPases séquestrées d'être transloquées à la membrane ou d'être activées par des GEF.

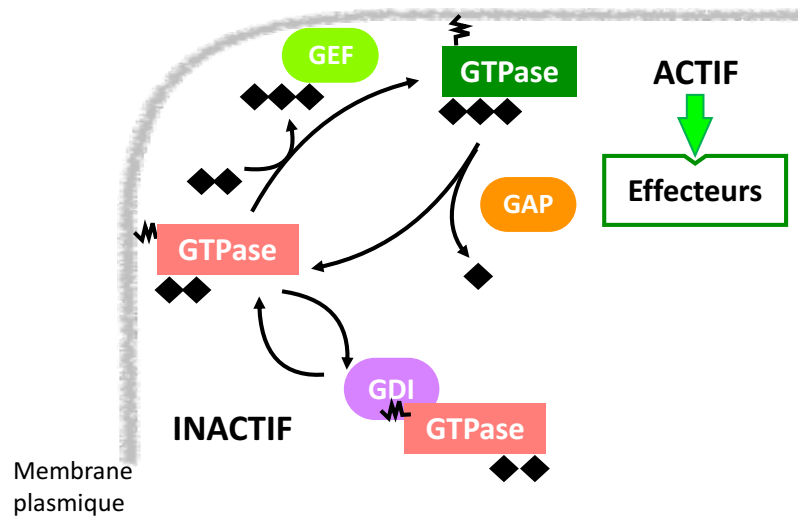


Figure 1.6 Régulation des GTPases Rho.

Les GTPases Rho cyclent entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP. Elles sont régulées par 3 régulateurs majeurs; les GEFs, les GAPs et les GDIs. Ces régulateurs sont à l'origine de l'activation, l'inactivation et la séquestration des GTPases dans le cytoplasme. Figure adaptée de (Etienne-Manneville et Hall, 2002).

1.2.2.2 Régulation des RhoGEFs et des RhoGAPs

La régulation spatio-temporelle des GTPases Rho dépend de ces trois types de régulateurs qui doivent eux-mêmes être finement régulés. La régulation des protéines RhoGEFs et RhoGAPs permet de moduler leur fonction et leur localisation intracellulaire. Elle est médiée par la composition des domaines des RhoGAPs et des RhoGEFs ainsi que des modifications post-traductionnelles.

Les RhoGEFs se divisent selon leur structure entre la famille DBL et la famille DOCK (*dedicator of cytokinesis*). Les membres de la famille DBL se caractérisent par un domaine *DBL homology domain- Pleckstrin homology domain* (DH-PH) qui est encadré par des régions conférant la spécificité des RhoGEFs envers des GTPases

particulières. Il s'agit de la famille majoritaire des RhoGEFs. Les membres de la famille DOCK possèdent principalement deux domaines : (i) le domaine DOCK homology region1 (DHR1), un domaine hautement conservé qui permet la localisation des RhoGEFs à la membrane grâce à la présence d'un domaine C2 de liaison aux lipides (ii) le domaine DHR2, associé à l'activité catalytique des RhoGEFs (Lawson et Ridley, 2018).

L'activité catalytique des RhoGEFs est modulée par des modifications post-traductionnelles ou des interactions protéiques médiées par des domaines SH2 ou SH3 (Hodge et Ridley, 2016 ; Lawson et Ridley, 2018). Les RhoGEFs sont principalement régulées par phosphorylation, ce qui va la plupart du temps activer les RhoGEFs (Hodge et Ridley, 2016). Il est cependant possible que la phosphorylation inhibe l'activité GEF en modifiant la conformation du site catalytique comme pour ECT-2 ou en formant une plateforme pour des protéines chaperonnes comme la protéine 14-3-3 (Justilien *et al.*, 2011 ; Ngok *et al.*, 2013). Cette modulation de l'activité des RhoGEFs permet donc leur régulation spatiotemporelle dans les processus cellulaires. De plus, les RhoGEFs peuvent être ubiquitinées ou encore acétylées (Song *et al.*, 2015 ; Margolis *et al.*, 2010). Ces modifications post-traductionnelles vont également participer à la régulation de leur localisation et fonction (Hodge et Ridley, 2016).

Les RhoGAPs constituent une famille de protéines à multi-domaines. On dénombre environ 4 fois plus de RhoGAPs que de GTPases Rho chez l'humain (Hodge et Ridley, 2016). Leur surabondance suggère que plusieurs RhoGAPs possèdent une fonction spécifique pour une même GTPase Rho. Par conséquent un contrôle strict de leur activité est nécessaire. Tout comme les RhoGEFs, les RhoGAPs sont régulées par phosphorylation qui va permettre l'augmentation de leur activité catalytique d'hydrolyse du GTP des GTPases Rho. Les RhoGAPs vont également, médiées par la phosphorylation, pouvoir interagir avec d'autres protéines ou changer de conformation (Hodge et Ridley, 2016). Elles sont également assujetties à la

dégradation par le protéasome suite à leur ubiquitination. En plus de son domaine GAP, les RhoGAPs possèdent une grande diversité de domaines, leur permettant d'interagir avec de nombreuses protéines régulatrices ou encore de réguler leur localisation intracellulaire. Par exemple, le domaine F-BAR de la GAP SRGP-1 (*Slit-Robo GAP homolog*), chez le *C. elegans*, permet la localisation de SRGP-1 au niveau des membranes courbées (Zaidel-Bar *et al.*, 2010). Les RhoGAPs peuvent également posséder des domaines de liaison aux membranes, tel que le domaine C1 qui permet l'interaction avec le diacylglycérol (DAG) et donc permet sa localisation à la membrane (Bernards et Settleman, 2004).

Les RhoGAPs disposent également d'une capacité auto-inhibitrice, parfois médiée par ses domaines telles que HMHA1 (de Kreuk *et al.*, 2013). Suite à son activation, elle se dimérise par son domaine F-BAR et se localise aux membranes courbées. Lorsque les membranes se tendent et ne présentent plus de courbure, la RhoGAP HMHA1 n'est plus localisée à la membrane et s'auto-inhibe par son domaine F-BAR grâce à un changement de conformation du complexe GAP au niveau cytosolique (de Kreuk *et al.*, 2013) (Figure 1.7).

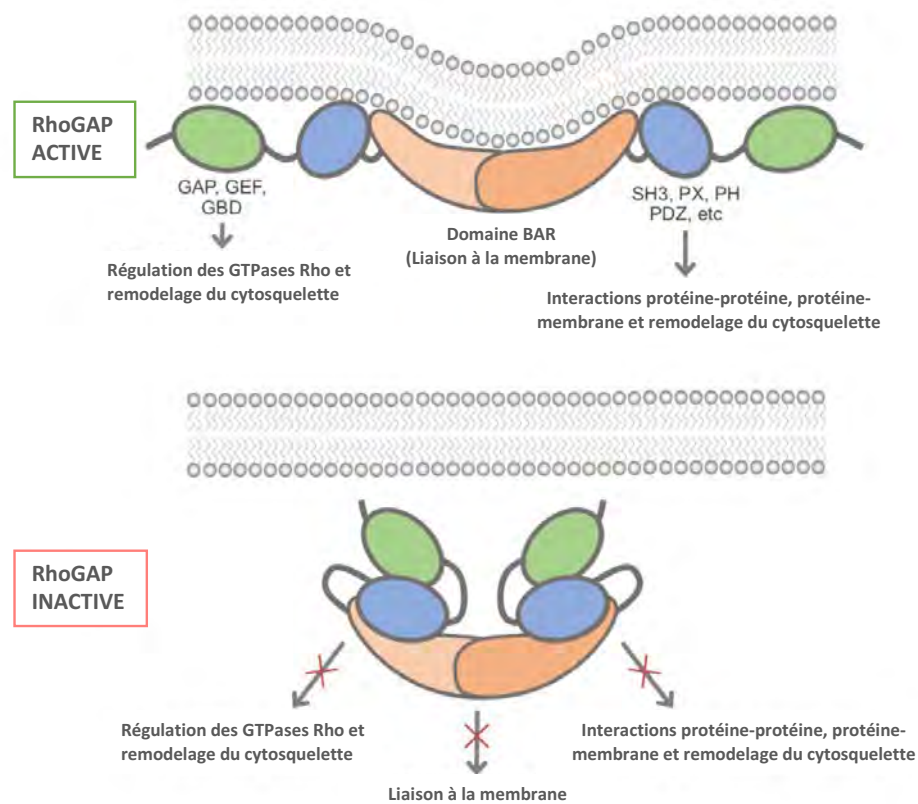


Figure 1.7 Régulation des RhoGAPs par leur domaine F-BAR.

Représentation du changement de conformation de GAP lié à la courbure des membranes et associé à l'inactivation des RhoGAPs. Lorsqu'une RhoGAP possédant un F-BAR reconnaît une zone de membrane courbée, elle se dimérise et s'y lie. Elle est alors activée et va réguler les GTPases et le remodelage du cytosquelette principalement (haut). Lorsque la membrane n'est plus courbée, la RhoGAP se détache et change de conformation, ce qui inactive sa fonction (bas). Image adaptée de (Carman et Dominguez, 2018).

1.2.3 Fonctions des GTPases Rho

La famille des GTPases Rho est constituée à ce jour de 22 membres chez les vertébrés et 6 d'entre eux possèdent un orthologue chez le *C. elegans* (Reiner et

Lundquist, 2018). Les GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 sont les GTPases Rho qui ont été étudiées le plus extensivement.

Les études séminales réalisées par le laboratoire de Alan Hall à l'aide de modèles cellulaires ont mis en évidence que la régulation de la dynamique du cytosquelette est réalisée par ces trois GTPases Rho (Ridley et Hall, 1992 ; Ridley *et al.*, 1992 ; Nobes et Hall, 1995). Celles-ci sont associées à des structures spécifiques du cytosquelette et de déformation membranaire. En effet, RhoA promeut la formation de fibres de stress et de points focaux (Ridley et Hall, 1992). En revanche, Rac1 et Cdc42 promeuvent des déformations membranaires essentielles à la migration et à la mise en contact des cellules voisines. En effet, Rac1 permet la formation de lamellipodes alors que Cdc42 active la formation de protrusions membranaires et de filopodes (Ridley *et al.*, 1992 ; Nobes et Hall, 1995).

1.2.3.1 Régulation de l'établissement et de la maturation des contacts cellulaires par les GTPases Rho

Autant dans un contexte *in vitro* qu'*in vivo*, le processus de formation de jonctions adhérentes est permis par la formation de protrusions cellulaires (Jacinto *et al.*, 2002a ; Raich *et al.*, 1999 ; Vasioukhin et Fuchs, 2001). Ces protrusions sont générées par l'activation du complexe de nucléation d'actine Arp2/3 régulée par les GTPases Rac1 et Cdc42 selon le type cellulaire (Adams *et al.*, 1996 ; Vasioukhin *et al.*, 2000). Une fois que le ou les contacts entre les cellules sont mis en place, les protrusions sont inhibées en dépolymérisant les filaments ramifiés d'actine et en favorisant la compaction du cytosquelette d'actine aux points de jonctions (Collinet et Lecuit, 2013 ; Vasioukhin et Fuchs, 2001).

Le remodelage du cytosquelette d'actine est régulé principalement par deux types de protéines liant le cytosquelette d'actine : (i) le complexe Arp2/3, qui sous le contrôle

de la GTPase Rac, favorise la nucléation et la ramification des filaments d'actine et (ii) les formines, dont l'activation dépend de la GTPase Rho, favorisent la linéarisation des filaments d'actine (Vasioukhin *et al.*, 2000 ; Kovacs *et al.*, 2002 ; Kobiela *et al.*, 2004). En outre, les jonctions jeunes sont associées à l'activité de la GTPase Rac et du complexe ARP2/3 alors que les jonctions matures sont régulées par la GTPase Rho.

L'interaction homophilique en *trans* des cadhérines des cellules voisines au point de contact permet l'activation de Rac1 par sa GEF, *T-lymphoma invasion and metastasis-inducing* (TIAM1) (Lampugnani *et al.*, 2002). Rac1 va alors activer son effecteur *Wiskott-Aldrich syndrome protein family member2* (WAVE2) afin d'activer le complexe Arp2/3. Cette cascade d'activation favorise l'apposition de nouvelle membrane et donc l'extension des jonctions (Yamazaki *et al.*, 2007) (Figure 1.8). Parallèlement, Rac1 va recruter au niveau du complexe cadhérine-caténine la RhoGAP p190RhoGAP qui va interagir de façon transitoire avec la caténine p120 et ainsi inhiber localement l'activité de RhoA aux jonctions adhérentes nouvellement formées (Wildenberg *et al.*, 2006) (Figure 1.8). Le maintien de cet antagonisme Rho/Rac et le recrutement des cadhérines à la jonction vont permettre l'extension de la jonction.

Formation du contact cellule-cellule et maturation de la jonction

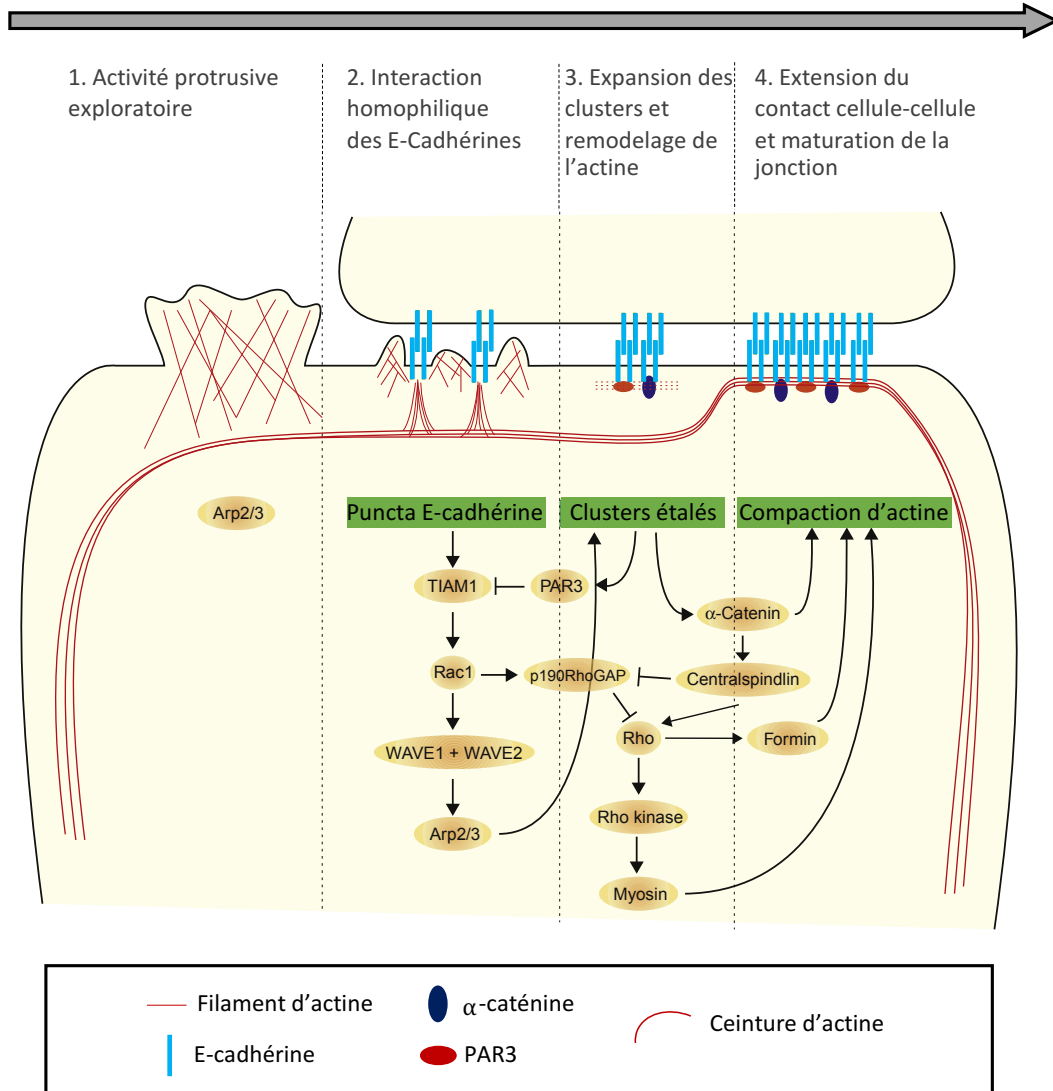


Figure 1.8 Voies de signalisation contrôlant la formation des jonctions adhérentes et le cytosquelette d'actine.

Schéma représentant les étapes de formation et d'extension de la jonction associées au remodelage du cytosquelette d'actine. Dans un premier temps, les cellules présentent une activité exploratoire protrusive (1), permettant l'interaction entre les E-cadhérines de cellules adjacentes (2). Cela permet la formation et l'expansion de clusters associées à un remodelage de l'actine (3) et par conséquent une extension de la jonction (4). La balance des voies régulées par les GTPases Rho et Rac joue un rôle majeur dans le processus de formation des contacts cellule-cellule. Image adaptée de (Collinet et Lecuit, 2013).

Une fois que l'extension des jonctions cesse, l'alpha-caténine et *Partitioning defective protein 3* (PAR3) sont recrutés aux sites de contacts intercellulaires afin d'inhiber le complexe ARP2/3 et TIAM1 respectivement et par conséquent inhiber l'activité de Rac1 (Chen et Macara, 2005 ; Drees *et al.*, 2005). La balance entre l'activité des GTPases Rho et Rac va alors favoriser l'activité de Rho et inhiber celle de Rac. En effet, la GTPase Rho joue un rôle essentiel dans la maturation et la stabilisation de la jonction. Son activité est stimulée par le recrutement de RhoGEFs, tel que p114RhoGEF (ARHGEF18) ou encore *Epithelial Cell transforming 2* (ECT-2), aux jonctions adhérentes (Ratheesh *et al.*, 2012 ; Terry *et al.*, 2011). En effet, p114RhoGEF va activer RhoA grâce à son interaction avec le complexe formé de la myosine non-musculaire II (NMII), de ROCK (effecteur de Rho) et de la cinguline, un adaptateur jonctionnel (Terry *et al.*, 2011). Pour sa part ECT-2, est recruté au complexe cadhérine-caténine par l'interaction entre l'alpha-caténine et le régulateur de la cytokinèse, centralspindline, afin d'activer RhoA. De plus, la protéine centralspindline inhibe l'activité de p190RhoGAP aux contacts cellule-cellule ce qui va favoriser l'activation de RhoA à ces contacts cellulaires (Ratheesh *et al.*, 2012). Une fois la GTPase RhoA liée au GTP, elle va activer les formines afin de promouvoir la polymérisation linéaire des filaments d'actine. Puis, RhoA va activer ROCK afin de phosphoryler la myosine 2, permettant ainsi la formation de la ceinture d'actine-myosine sous la jonction (Collinet et Lecuit, 2013).

Il est à noter que ces trois principales GTPases Rho ne sont pas les seules GTPases associées à la régulation des jonctions adhérentes. En effet, la GTPase *Ras proximate or related protein 1* (Rap1) promeut également le retrait des lamellipodes et favorise l'apposition des membranes lors de la maturation des jonctions adhérentes (Dubé *et al.*, 2008). De plus, elle contribue à la régulation de l'assemblage des jonctions adhérentes (Pannekoek *et al.*, 2009).

1.2.3.2 Régulation de l'endocytose et du recyclage des E-cadhérines par les GTPases Rho

Les jonctions une fois matures vont être assujetties à un remodelage des jonctions adhérentes de façon homéostatique afin de maintenir l'intégrité des tissus épithéliaux. Ceci est permis par le recyclage des cadhérines qui sont non seulement des molécules d'adhésion, mais également des molécules de signalisation cellulaire. Le mécanisme majeur impliqué dans ce remodelage est l'endocytose des cadhérines (Trojanovsky, 2009).

Plusieurs études ont mis en évidence que l'endocytose des cadhérines dépend de la dynamine et de la clathrine ainsi que d'adaptateurs comme la bêta-arrestine ou la protéine *Heterotetrameric adaptor protein 2* (AP2) (Gavard et Gutkind, 2006 ; Miyashita et Ozawa, 2007 ; Levayer *et al.*, 2011). La caténine p120 a également été montrée comme un régulateur potentiel de l'endocytose, mais exclusivement chez les cellules mammifères (Xiao *et al.*, 2003). En effet, chez d'autres organismes modèles, tels que la drosophile et le *C. elegans*, sa fonction s'est révélée non essentielle à l'endocytose des cadhérines, suggérant l'existence de voie alternative de régulation de l'endocytose des cadhérines (Myster *et al.*, 2003 ; Pettitt *et al.*, 2003).

Au niveau des jonctions adhérentes, deux mécanismes majeurs impliquant la GTPase Cdc42 sont associés à l'endocytose des cadhérines. Le premier mécanisme a été observé au niveau du *notum* (segment thoracique) chez la pupa de la drosophile où Cdc42 promeut la scission des vésicules d'endocytose dépendant de la dynamine en favorisant la polymérisation d'actine ramifiée. Deux effecteurs de Cdc42 sont nécessaires : les protéines *Cdc42 interacting protein 4* (Cip4) et *Partitioning defective protein 6* (PAR6) (Georgiou *et al.*, 2008 ; Leibfried *et al.*, 2008). La protéine PAR6 va recruter Cip4 aux jonctions adhérentes et lui permettre d'interagir avec la dynamine (Figure 1.9). Parallèlement, Cip4 agit de concert avec ses cibles *Wiskott-Aldrich syndrome protein homolog* (WASP) et le complexe Arp2/3 pour

favoriser la nucléation du cytosquelette d'actine au site d'internalisation des cadhérines (Georgiou *et al.*, 2008 ; Leibfried *et al.*, 2008) (Figure 1.9).

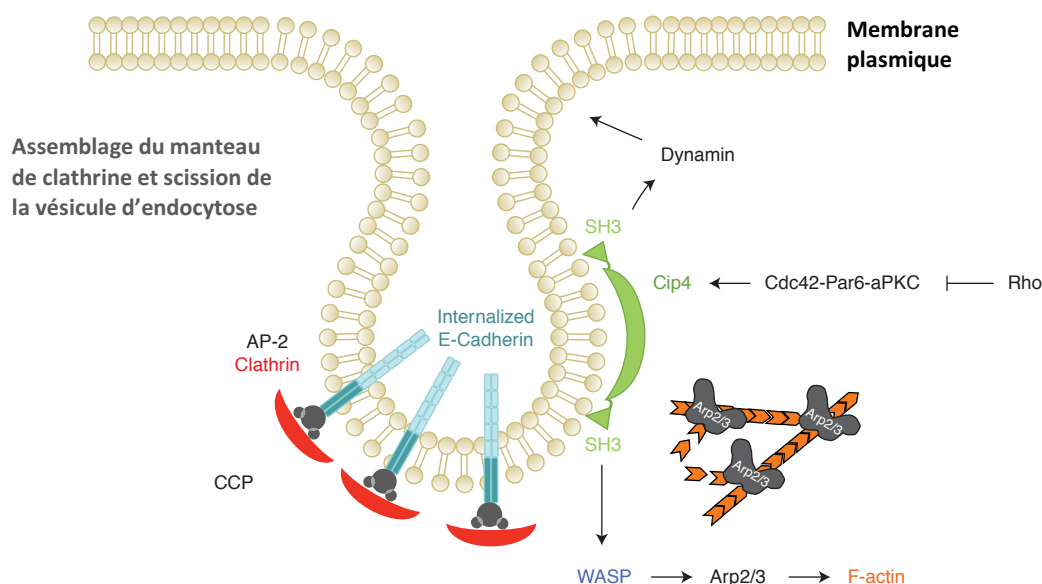


Figure 1.9 Régulation de l'endocytose des E-cadhérines.

Schéma représentant une voie de signalisation régulant la scission des vésicules d'endocytose *via* la formation d'un manteau de clathrine. Elle met en jeu la régulation de la GTPase Cdc42 et la protéine Cip4 possédant un domaine F-BAR. Image adaptée de (Brüser et Bogdan, 2017)

Les complexes de polarité sont également nécessaires à la stabilisation des jonctions adhérentes comme le complexe Crumbs et sont régulés par la GTPases Cdc42 (Duncan et Peifer, 2008). De plus, dans les cellules épithéliales de l'œil chez la *Drosophile*, Rho aide au maintien des jonctions adhérentes par l'inhibition de leur endocytose indépendamment de Crumbs en inhibant l'activité de Cdc42 et PAR6 (Warner et Longmore, 2009). Le second mécanisme, également identifié chez la *drosophile*, met en évidence une régulation de l'initiation de l'endocytose par la

stimulation de la polymérisation linéaire de filaments d'actine par mDia et l'activation de la myosine 2 par ROCK. mDia et ROCK sont des effecteurs de Rho, qui est elle-même activée par la GEF RhoGEF2 lorsque les jonctions sont soumises à une tension (Levayer *et al.*, 2011).

1.2.3.3 Régulation du cytosquelette d'actine-myosine par les GTPases Rho

Comme décrit précédemment, le cytosquelette d'actine se met en place une fois que les points de contact entre les cadhérines sont stabilisés. Il devient actif grâce à son interaction avec la myosine et est à l'origine de la tension contractile intercellulaire. La modulation de la force contractile du cytosquelette d'actine-myosine est contrôlée par l'état de phosphorylation des chaînes légères de myosine. La machinerie impliquée est composée de plusieurs kinases et d'une phosphatase, MYPT. Cette dernière permet l'hydrolyse des groupements phosphates des chaînes légères de myosine et ainsi réguler l'inhibition de la contraction du cytosquelette d'actine-myosine et la génération de tension (Zhao et Manser, 2005).

D'autre part, la phosphorylation de la myosine non-musculaire 2 est régulée par les trois principales GTPases Rho grâce à l'activation de leurs kinases effectrices telles que ROCK, *Myotonic dystrophy related*, *Cdc42-binding Kinase homolog* (MRCK) mais aussi *Myosin Light Chain Kinase* (MLCK) ou la kinase Citron (Watanabe *et al.*, 2007).

Il est indispensable d'avoir ce contrôle sur la tension corticale générée par le cytosquelette d'actine-myosine puisqu'il s'agit d'un joueur incontournable dans la mise en place des jonctions.

1.3 Détection mécanique et transduction du signal par les jonctions adhérentes

Les contacts intercellulaires sont assujettis à des forces mécaniques *in vivo* autant externes qu'internes. Ces forces font partie intégrante de la formation et du maintien de nouvelles jonctions dans les processus développementaux, mais aussi au stade adulte de façon homéostatique.

Les forces extracellulaires sont détectées par les adhésions cellulaires que ce soit celles intercellulaires (jonctions adhérentes) ou celles en contact avec la matrice extracellulaire (intégrines). Une adaptation rapide est alors nécessaire. Ceci est permis par une détection des stress par les jonctions puis une intégration des signaux permettant une réponse cellulaire liée au stress. Longtemps les jonctions adhérentes étaient considérées comme une plateforme de détection principalement. Cependant, de récentes études démontrent un nouveau rôle pour les jonctions adhérentes en tant qu'acteurs actifs de la régulation de la réponse au stress mécanique (Conway *et al.*, 2013 ; Pinheiro *et al.*, 2017 ; Sumi *et al.*, 2018).

1.3.1 Méthodes d'étude du stress mécanique

Les stress mécaniques constituent une partie intégrante de la régulation de l'homéostasie de l'épithélium et des cellules. Il est donc difficile de pouvoir étudier ces phénomènes par simple observation. Des outils sont nécessaires pour observer l'effet des forces mécaniques sur le maintien des jonctions. De nombreux systèmes ont été mis en place au cours de la dernière décennie afin d'étudier l'effet des forces mécaniques sur des jonctions adhérentes *in vitro* tel que l'utilisation de billes magnétiques, ou l'aspiration par pipette des membranes (Figure 1.10). Des techniques de *fluorescence resonance energy transfer* (FRET), afin de localiser les forces de

tensions, ont été également employées pour étudier les forces mécaniques internes (Figure 1.10).

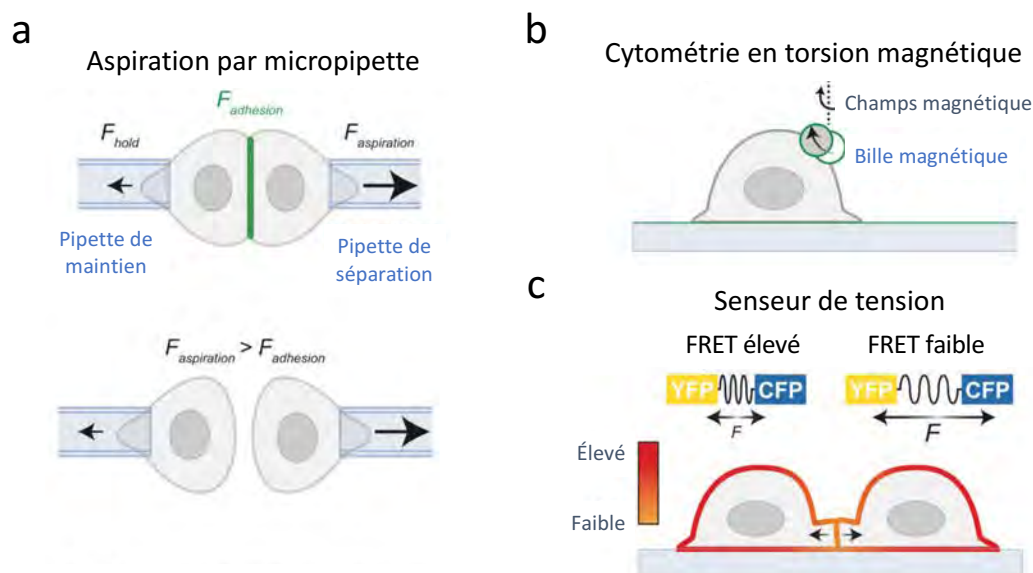


Figure 1.10 Exemples d'approches expérimentales *in vitro* pour l'étude du stress mécanique appliqué sur des cellules.

Schéma représentant les techniques d'aspiration par micropipette (a) d'utilisation de billes magnétiques (b), ainsi que la technique de FRET (c) afin de mesurer la tension *in cellulo*. Figure adaptée de (Pinheiro et Bellaïche, 2018).

A l'échelle tissulaire, d'autres systèmes ont été mis en place tel que la microfluidie afin d'imposer un stress aux cellules endothéliales ou encore l'ablation de plusieurs cellules épithéliales au sein d'une monocouche de cellules épithéliales provoquant un changement de tension mécanique aux jonctions (Pinheiro et Bellaïche, 2018) (Figure 1.11).

Afin d'assujettir des stress mécaniques externes à des organismes complets, des techniques utilisant une pression externe ont été utilisées sur des embryons de *C. elegans* ou de drosophile. Ceux-ci ont été soumis à une pression en utilisant une lamelle couplée à une pipette qui permet d'appuyer et de relâcher la pression de façon

contrôlée (Zhang *et al.*, 2011 ; Sumi *et al.*, 2018) (Figure 1.11). Un système similaire a été développé pour l'étude présente. En effet, les embryons de *C. elegans* sont soumis constamment à un stress mécanique où la même force (appui objectif-lamelle) est appliquée mais avec un milieu plus ou moins compact (différents coussins d'agarose).

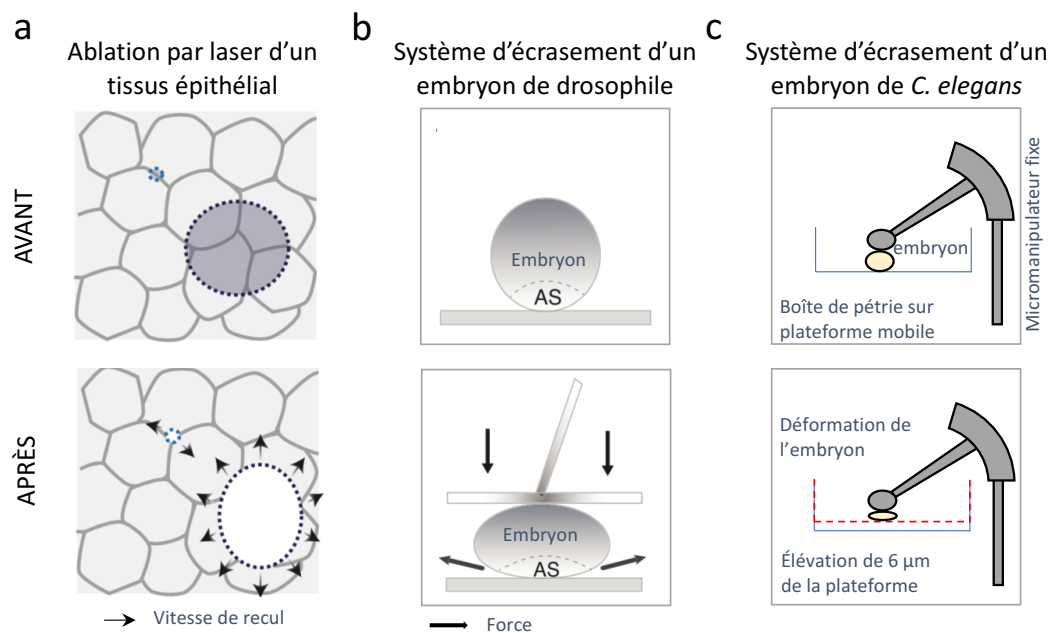


Figure 1.11 Techniques de génération de tension *in situ* et *in vivo*.

Schéma représentant la technique de génération de tension par ablation au laser dans des épithéliums (a) adapté de (Pinheiro et Bellaïche, 2018). Schéma représentant des systèmes générant un renforcement de la réponse cellulaire par pression sur des embryons de drosophile (AS *amniosera*) (b) (adapté de (Sumi *et al.*, 2018)) et de *C. elegans* (c) (adapté de (Zhang *et al.*, 2011)).

1.3.2 Détection du stress mécanique par les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont soumises de façon constitutive à des tensions internes. En effet, lorsque les jonctions sont coupées par ablation au laser, les cellules se

rétractent démontrant que les jonctions sectionnées étaient soumises à des forces de tension interne. Cette rétraction des jonctions cellulaires n'aurait pas été observable si les jonctions n'étaient que peu ou pas soumises à des forces mécaniques (Cavey *et al.*, 2008 ; Cavey et Lecuit, 2009 ; Rauzi *et al.*, 2008). Cependant, aucune preuve n'a encore été faite montrant que cette tension constitutive affecte la fonction moléculaire des cadhérines.

Les études sur l'effet des forces mécaniques sur les jonctions *in vitro* comme *in vivo* soumettent les jonctions cellulaires à une stimulation mécanique qui génère une boucle de rétroaction positive provoquant un renforcement de l'adhésion cellulaire (Yap *et al.*, 2018). Le renforcement des cadhérines au contact cellulaire, dépendant de la tension, est régulé par de nombreux mécanismes agissant directement sur les cadhérines ou via leur interaction avec le cytosquelette d'actine. Sous l'application de force mécanique externe, le renforcement des adhésions cellule-cellule dépend du changement de conformation des domaines extracellulaires des cadhérines. Parallèlement, la stabilisation du cytosquelette à la jonction est provoquée par la stabilisation de la myosine aux filaments d'actine ainsi qu'au recrutement de protéines capable de se lier à l'actine au contact cellulaire telles que la vinculine, Dia et *Enabled/Vasodilator-Stimulated phosphoprotein* (Ena/VASP). Le recrutement de ces protéines est médié par l'alpha-caténine qui fait également le lien entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine (Mège et Ishiyama, 2017). En effet, l'alpha-caténine est une protéine mécanosensible qui sous l'effet de tension change de conformation. Cela permet son interaction avec la vinculine (Chen *et al.*, 2006 ; Ishiyama *et al.*, 2013) (Figure 1.12). En outre, la vinculine a aussi été montrée interagissant directement avec la protéine Ena/VASP sous tension (Leerberg *et al.*, 2014). Cette dernière promeut la polymérisation de filaments d'actine et donc leur stabilisation.

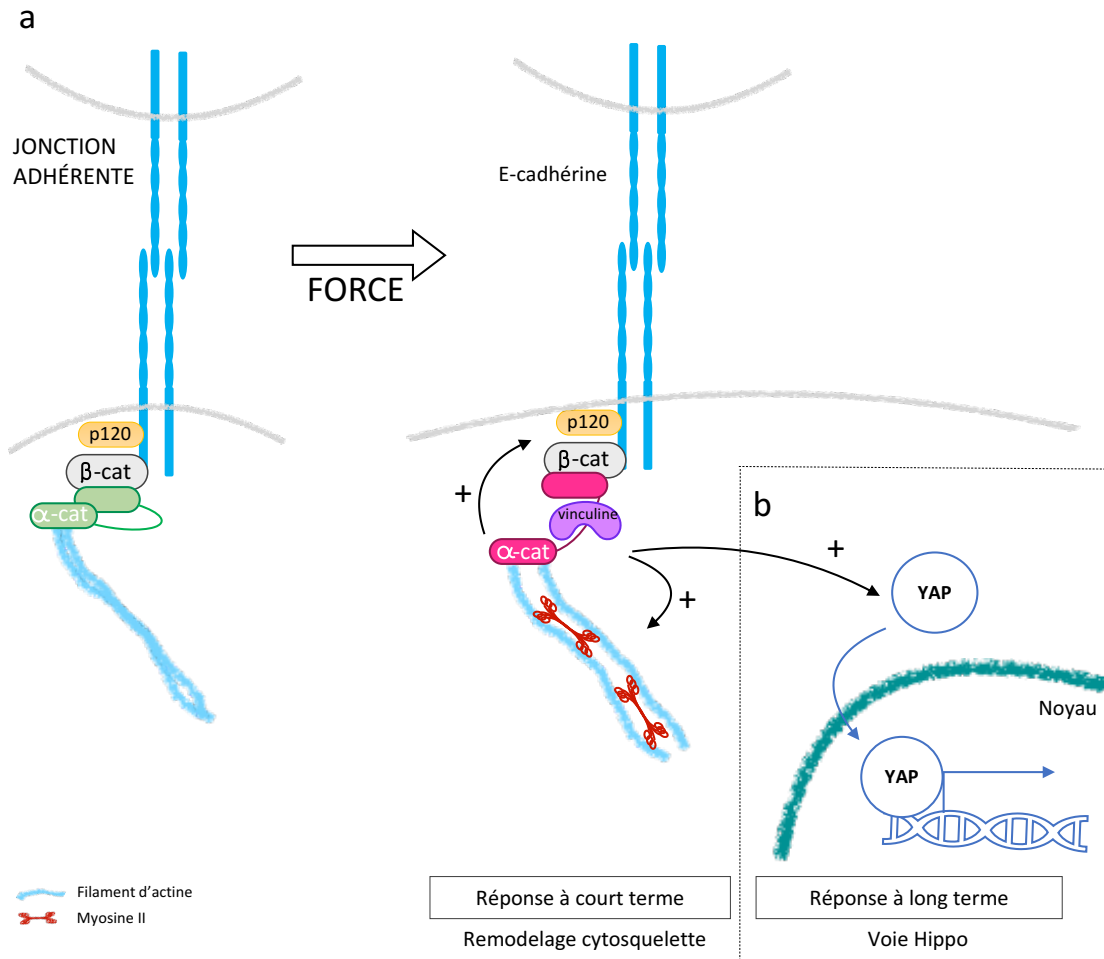


Figure 1.12 Changement de conformation de l'alpha-caténine sous tension et transduction du signal.

Schéma représentant l'ouverture du bras mécanique de l'alpha-caténine sous la tension lui permettant d'interagir alors avec la vinculine et permet un renforcement du cytosquelette (a). À plus long terme, une régulation par la voie Hippo est possible (b). Figure adaptée de (Collinet et Lecuit, 2013, Yap *et al.*, 2018).

Le cytosquelette cellulaire possède de nombreux éléments mécanosensibles. L'application de force sur les jonctions adhérentes génère une modulation du cytosquelette d'actine (le Duc *et al.*, 2010 ; Barry *et al.*, 2015). Elle se réalise en deux phases de réponses selon le modèle actuel. Dans un premier temps, l'application de

forces provoquerait un changement rapide des propriétés mécaniques des filaments d'actine eux-mêmes en favorisant la polymérisation linéaire du cytosquelette d'actine dépendant des formines (Kozlov et Bershadsky, 2004) et en inhibant l'interaction avec la cofiline, dont le rôle est de promouvoir la dépolymérisation du cytosquelette d'actine (Hayakawa *et al.*, 2011). Par la suite, une seconde vague de réponses plus tardives serait associée au recrutement de la vinculine et de Ena/VASP (Leerberg *et al.*, 2014).

Un autre acteur important du cytosquelette est le moteur moléculaire myosine II. En effet, l'interaction de la myosine II avec les filaments d'actine a été démontrée comme mécanosensible (Chanet *et al.*, 2017). Il permet également le recrutement d'autres protéines. Par exemple, ROCK1, effecteur de RhoA, va stabiliser l'activation de RhoA dépendamment de la présence de la myosine II (Priya *et al.*, 2015).

1.3.3 Transduction du signal par les jonctions adhérentes

Suite à la détection de stress mécanique, la cellule peut s'adapter en générant une réponse dans un premier temps à court terme puis une à plus long terme. Une réponse potentielle au stress mécanique à court terme consiste en une adaptation des propriétés mécaniques du cytosquelette au cortex et, conséquemment, ceci affecte l'adhésion cellulaire. Par exemple, l'augmentation de la contractilité médiée par la myosine II dans des doublets de cellules isolées stabilise la dynamique corticale des filaments d'actine et immobilise les clusters de E-cadhérines à la jonction (Engl *et al.*, 2014) (Figure 1.13). De même, la myosine II stabilise la E-cadhérine au niveau de la *zonula adherens* dans les feuilletts monocellulaires épithéliaux (Ratheesh *et al.*, 2012). Ces modifications coordonnent la dynamique du cytosquelette d'actine et des jonctions adhérentes contribuant ainsi au maintien de l'intégrité des jonctions en présence d'un stress mécanique.

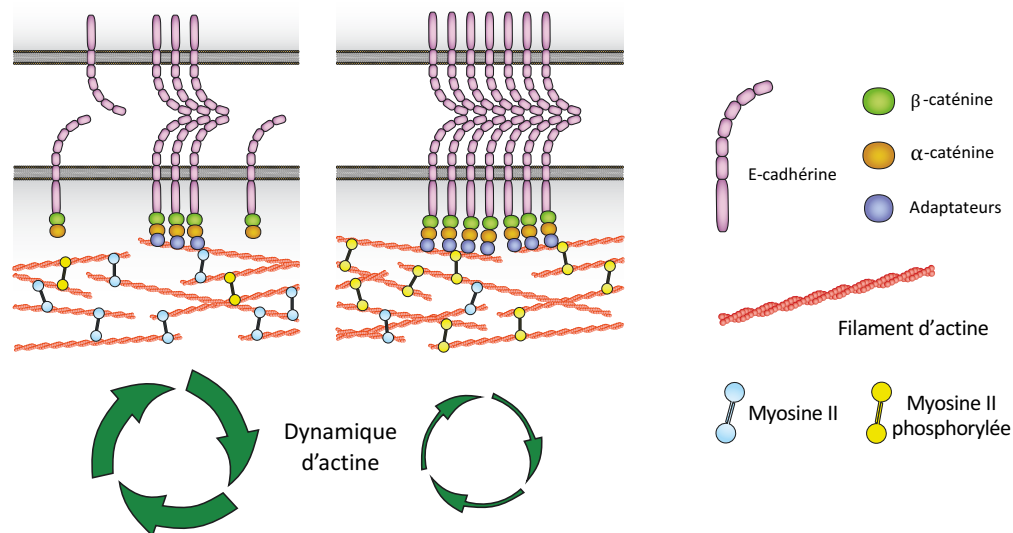


Figure 1.13 Immobilisation des clusters de E-cadhérine par la dynamique du cytosquelette d'actine sous tension.

Schéma représentant comment la dynamique des cadhérines est régulée par la dynamique du cytosquelette d'actine. Lorsque la tension corticale est élevée, il y a une présence accrue de myosine II à la jonction qui stabilise les filaments d'actine et stabilise les clusters de E-cadhérines. Figure adaptée de (Engl *et al.*, 2014).

La réponse cellulaire à long terme à la suite d'un stress mécanique repose sur la transcription de gènes régulée par la voie de signalisation Hippo. Cette dernière régule la prolifération cellulaire et la taille des organes (Tapon et Harvey, 2012). Il a été montré que les adhésions cellulaires participent à la régulation de cette voie de signalisation (Yap *et al.*, 2018) (Figure 1.12.b).

La génération de tension corticale par le cytosquelette d'actine-myosine et son maintien est indispensable à l'extension des jonctions (Cavey *et al.*, 2008 ; Rauzi *et al.*, 2008 ; Cavey et Lecuit, 2009) et au maintien des jonctions adhérentes matures (Levayer *et al.*, 2011). D'autre part, dans notre système d'étude ciblant les cellules épithéliales, la vinculine n'est pas exprimée (Barstead et Waterston, 1991). Ceci met

en avant une plus grande importance de la régulation du cytosquelette d'actine-myosine au cours de la fermeture ventrale du *C. elegans*.

1.4 Les modèles d'étude de la dynamique jonctionnelle

1.4.1 Les modèles *in vitro*

Les études séminales portant sur la dynamique de formation des jonctions ont été réalisées par l'équipe par James Nelson et ses collègues en employant des cellules MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*). Par des techniques de fluorescence, ils ont suivi la dynamique du cytosquelette d'actine et des E-cadhérines lors de la formation d'un feuillet épithélial (Adams *et al.*, 1996, 1998).

Lors du contact primordial des cellules, les E-cadhérines forment des points de contact où elles se concentrent au niveau des zones d'apposition des membranes. Chacun de ces points de contact est lié à un regroupement de filaments d'actine issus de la ceinture de filaments d'actine au cortex et d'orientation perpendiculaire. Au fur et à mesure que la jonction s'étend, l'accumulation et la densité de E-cadhérines reste constante. Une fois les jonctions matures, les groupes de filaments d'actine situés à chaque zone concentrée de E-cadhérines fusionnent au niveau de la ceinture du cytosquelette localisée sous la membrane plasmique (Adams *et al.*, 1996, 1998) (Figure 1.14). Cette dynamique jonctionnelle a également été observée chez les cellules IAR-2, une lignée cellulaire d'hépatocytes (Krendel et Bonder, 1999).

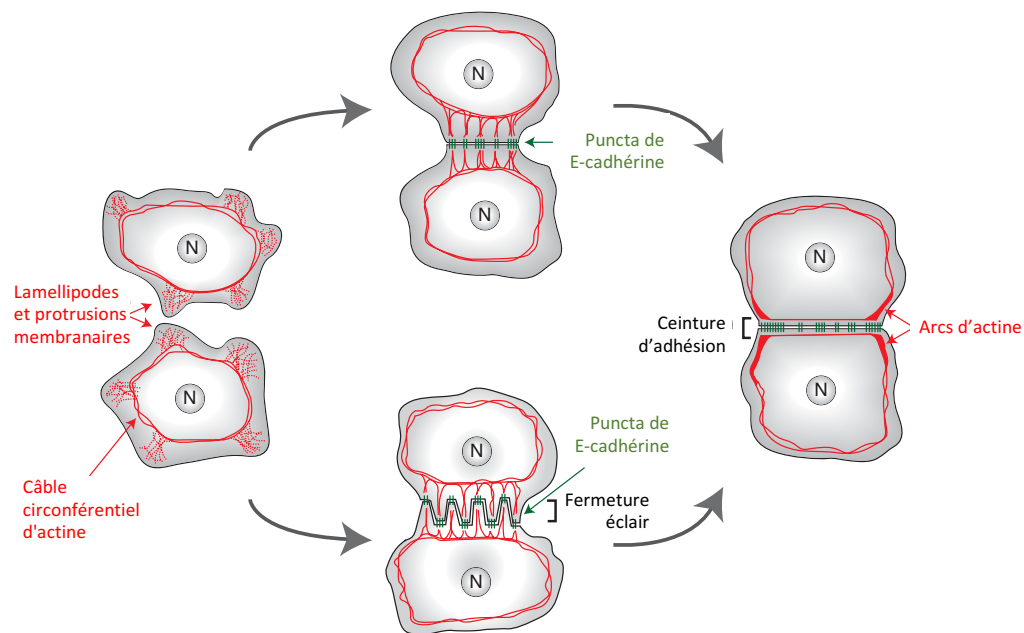


Figure 1.14 Formation des jonctions dans des modèles cellulaires *in vitro*.

Schéma représentant le mécanisme de formation des jonctions chez les cellules MDCK (haut) et les kératinocytes primaires de souris (en bas). Les deux commencent par la formation de protrusions membranaires qui vont former des points de contact droits ou en fermeture éclair. Par la suite, la jonction va s'étendre et former une jonction forte composée de jonctions adhérentes couplée à une ceinture corticale d'actine. Image adaptée de (Cavey et Lecuit, 2009).

Les kératinocytes primaires de souris démontrent une autre dynamique de formation de jonction (Vasioukhin *et al.*, 2000). Les protrusions membranaires à l'origine du contact entre les deux cellules sont de nombreux filopodes concentrés en cytosquelette d'actine. Lorsque les filopodes d'une cellule entrent en contact avec les invaginations (créées par la formation de filopodes) de l'autre cellule, les complexes cadherine/caténine se localisent à l'extrémité des filopodes et s'agrègent au point de contact. Par immunofluorescence, la structure formée consiste en deux rangées alignées de point de contact (Figure 1.14). Cette forme est appelée la fermeture éclair d'adhésion et est dépendante de la myosine II. Dans les deux cas, lorsque la jonction

devient mature, l'actine se concentre aux extrémités de la frontière jonctionnelle. Ce remodelage du cytosquelette d'actine permet la formation de la ceinture d'adhésion.

1.4.2 Les modèles *in vivo*

1.4.2.1 La fermeture dorsale de *Drosophila melanogaster*

Le stade de la fermeture dorsale lors de l'embryogenèse chez la drosophile, consiste au recouvrement de la partie dorsale de l'embryon d'un feuillet épidermique (Jacinto *et al.*, 2002a, 2002b). Elle se déroule en 4 phases : l'initiation, le recouvrement de l'*amniosera*, la fermeture éclair et la terminaison (Figure 1.15).

L'initiation commence avant la rétraction de bande germinale. Cela provoque la contraction de l'*amniosera* qui est le tissu sous-jacent aux cellules épidermiques. Cette contraction est à l'origine du début de la migration des deux feuillets épidermiques opposés (Jacinto *et al.*, 2002b). Lors de la seconde étape, les cellules épithéliales face au bord libre vont former un câble autour du trou par un remodelage du cytosquelette d'actine-myosine (Jacinto *et al.*, 2002a). Celui-ci va permettre de générer la force nécessaire à rapprocher les cellules opposées de l'épiderme. Cette étape est également associée à une élongation des cellules ventrales vers le côté dorsal afin de fermer le trou par un mécanisme de *purse string*. Une fois les bords opposés rapprochés, les cellules aux bords libres vont étendre des filopodes aux pôles antérieur et postérieur (Jacinto *et al.*, 2002b). La rencontre des filopodes entre les deux membranes libres va générer une structure en fermeture éclair et la jonction va s'étendre des deux pôles jusqu'au milieu. La formation des filopodes est alors inhibée et les points de contact se stabilisent et deviennent des jonctions adhérentes (Jacinto *et al.*, 2002a). Ce mécanisme est similaire à celui observé lors de la formation de jonctions entre les kératinocytes primaires de souris (Vasioukhin et Fuchs, 2001).

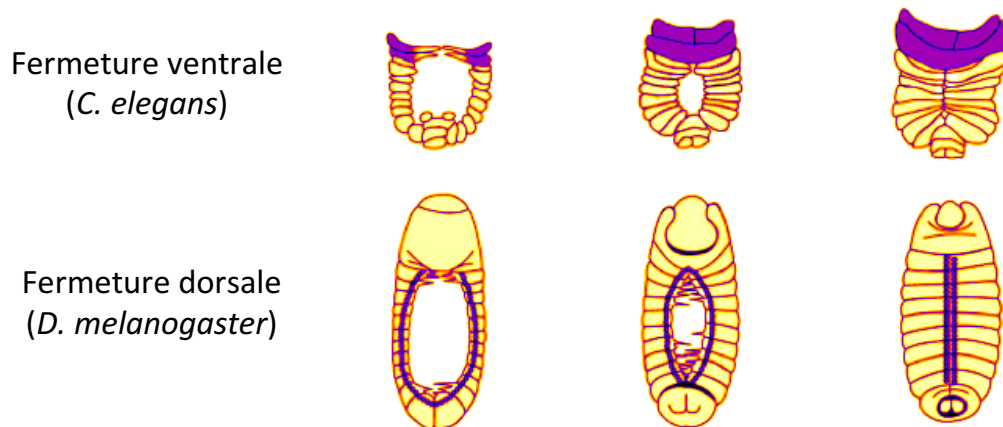


Figure 1.15 Formation des jonctions lors de la fermeture dorsale chez *D. melanogaster* et la fermeture ventrale chez le *C. elegans*.

Schéma représentant les étapes de la fermeture ventrale chez le *C. elegans* (haut) et dorsale chez *D. melanogaster*. Tout d'abord, les cellules meneuses entrent en contact (gauche). La jonction s'étend par apposition des membranes pour le *C. elegans* et en fermeture éclair pour la drosophile (centre). Le dernier stade représente les embryons recouverts de leur couche d'épiderme (droite). Figure adaptée de (Martín-Blanco et Knust, 2001)

1.4.2.2 La fermeture ventrale chez le *C. elegans*

Lors de la morphogénèse épithéliale, l'embryon du *C. elegans*, subit un processus de recouvrement de l'embryon par un feuillet épithéliale se déroulant en 2 étapes (Chisholm et Hardin, 2005) (Figure 1.15). D'abord les cellules meneuses au pôle apical vont migrer à l'aide de protrusions membranaires de type lamellipode, initiant le contact entre les deux bords de l'embryon. Une fois la jonction formée, les cellules postérieures vont migrer afin de fermer totalement le trou grâce à un système différent de la migration des cellules meneuses (Williams-Masson *et al.*, 1997). Elles utilisent le système de *purse string* équivalent à celui de la fermeture dorsale chez la

drosophile. Ce stade de développement sera détaillé plus en profondeur dans la section suivante.

1.5 La fermeture ventrale du *C. elegans*

1.5.1 Généralités

La fermeture ventrale est l'une des trois étapes majeures de la morphogénèse épithéliale lors du développement embryonnaire du *C. elegans*. La morphogénèse épithéliale est constituée de trois principales étapes : l'intercalation dorsale, la fermeture ventrale et l'élongation (Chisholm et Hardin, 2005) (Figure 1.16).

Le processus d'intercalation dorsale est la première étape de la morphogénèse épithéliale et permet la mise en place de la ligne cellulaire dorsale. L'intercalation dorsale est suivie par la fermeture ventrale, constituant une étape clé, qui permet le recouvrement de l'embryon d'un feuillet épidermique. Il s'en suit une rotation latérale de l'embryon qui va permettre l'accomplissement de la dernière étape de la morphogénèse épithéliale, l'élongation. Elle se divise en deux étapes (précoce et tardive) et permet à l'embryon de s'allonger afin d'obtenir sa morphologie vermiciforme (Figure 1.16).

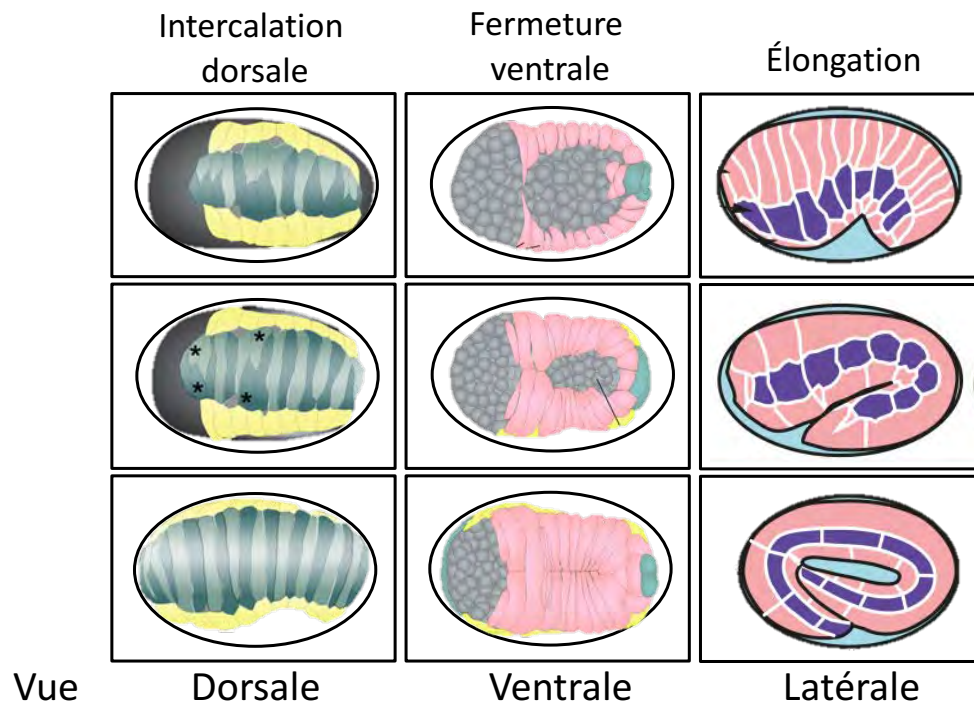


Figure 1.16 La morphogénèse épithéliale chez l'embryon de *C. elegans*.

Schéma représentant les trois étapes tardives majeures de la morphogénèse épithéliale : l'intercalation dorsale qui permet de définir les cellules dorsales de l'embryon (gauche); la fermeture ventrale qui permet le recouvrement de l'embryon d'une couche d'hypoderme (milieu) et l'élongation qui va permettre à l'embryon d'obtenir son aspect vermiforme (droite). Figure adaptée de (Chisholm et Hardin, 2005 ; Vuong-Brender *et al.*, 2017).

1.5.2 Régulation de l'adhésion cellule-cellule lors de la fermeture ventrale

La fermeture ventrale décrite brièvement précédemment consiste au recouvrement de l'embryon d'une monocouche de cellules épithéliales se déroulant en deux étapes. Dans un premier temps, au niveau de la partie antérieure de l'embryon, les cellules ventrales meneuses vont migrer vers la ligne médiane ventrale de l'embryon. Une fois les cellules meneuses en contact, la migration des cellules postérieures commence par un processus de *purse string* qui va permettre de fermer l'épiderme de l'embryon

(Williams-Masson *et al.*, 1997). Cette seconde étape est un processus encore peu compris, mais le guidage des neuroblastes est essentiel à la migration des cellules épithéliales sur lesquelles elles reposent (Wernike *et al.*, 2016).

La première étape est régulée par l'orthologue de Rac1, CED-10, qui promeut la nucléation de l'actine par le complexe ARP2/3, permettant la formation de protrusions membranaires à l'origine de la migration des cellules meneuses antérieures. Ceci est médié par les effecteurs WSP-1 et UNC-34 appartenant aux familles WASP et Ena/VASP respectivement (Sawa *et al.*, 2003 ; Withee *et al.*, 2004 ; Sheffield *et al.*, 2007). Il a également été montré que la voie de signalisation médiée par l'inositol triphosphate (IP3) contribue à la régulation des protrusions membranaires générées par l'activation de RHO-1 (Thomas-Virnig *et al.*, 2004). De plus, une étude a mis en évidence l'importance de la mise en place du complexe jonctionnel dans la formation de la jonction issue de la migration des cellules meneuses. Les embryons manquant les composants du complexe jonctionnel cadherine/caténine (CCC) génèrent des protrusions membranaires, mais sont incapables de générer des contacts à la ligne médiane ventrale (Costa *et al.*, 1998 ; Raich *et al.*, 1999). En utilisant des embryons transgéniques, l'analyse de la localisation de HMP-1::GFP, orthologue de l'alpha-caténine chez le *C. elegans*, indique que HMP-1 s'accumule aux protrusions des cellules meneuses et est rapidement recrutée aux jonctions naissantes à la ligne médiane. Ce processus est nommé *filopodial priming* (Raich *et al.*, 1999). Il s'agit du même mécanisme observé dans un modèle *in vitro* des cellules MDCK (Adams *et al.*, 1996, 1998). Par contre, l'absence du complexe DLG-1/AJM-1 n'a pas d'effet majeur sur l'adhésion cellule-cellule (Köppen *et al.*, 2001 ; McMahon *et al.*, 2001). De plus, en absence du DAC et du CCC, l'adhésion cellulaire n'est pas maintenue (Pásti et Labouesse, 2014). Notre laboratoire a récemment identifié un nouveau régulateur de la fermeture ventrale et de l'extension de la jonction, la RhoGAP RGA-7 (Ouellette *et al.*, 2016).

1.6 RGA-7

La protéine *Rho GTPase-Activating protein 7* (RGA-7), aussi appelée SPV-1, est une RhoGAP qui est principalement impliquée au niveau de deux processus cellulaires chez le *C. elegans*. Chez des vers adultes, RGA-7 participe à la contraction de la spermathèque en régulant RHO-1, mais également CDC-42 (Tan et Zaidel-Bar, 2015 ; Bouffard *et al.*, 2019). D'autre part, notre laboratoire a mis en évidence sa fonction GAP chez l'embryon du *C. elegans*, dans un contexte de morphogenèse épithéliale, lors de la fermeture ventrale (Ouellette *et al.*, 2016).

1.6.1 Structure de la RhoGAP RGA-7

RGA-7 est une RhoGAP envers CDC-42 et RHO-1 donc son domaine GAP permet de faciliter l'hydrolyse du GTP en GDP de CDC-42 et RHO-1. RGA-7 possède deux autres domaines connus : un domaine F-BAR qui serait capable d'interagir avec les membranes courbées et un domaine C1 qui pourrait interagir avec les lipides DAG (DiAcylGlycérol). Il est à noter que le domaine N-terminal de RGA-7 ne présente pas de séquence consensus connues mais est riche en poly-sérine (Tan et Zaidel-Bar, 2015).

Le gène *rga-7* code pour trois isoformes de RGA-7 : une forme courte *rga-7s*, une forme moyenne *rga-7m* et une forme longue *rga-7l*. Les formes *rga-7m* et *rga-7l* sont sous le contrôle d'un même promoteur *rga-7lp* alors que la forme courte *rga-7s* aurait son propre promoteur *rga-7sp*. La forme longue RGA-7l contient l'ensemble des domaines. La forme moyenne ne code pas pour la partie N-terminale et la forme courte ne présente que le domaine C1 et le domaine RhoGAP (Ouellette *et al.*, 2016) (Figure 1.17).

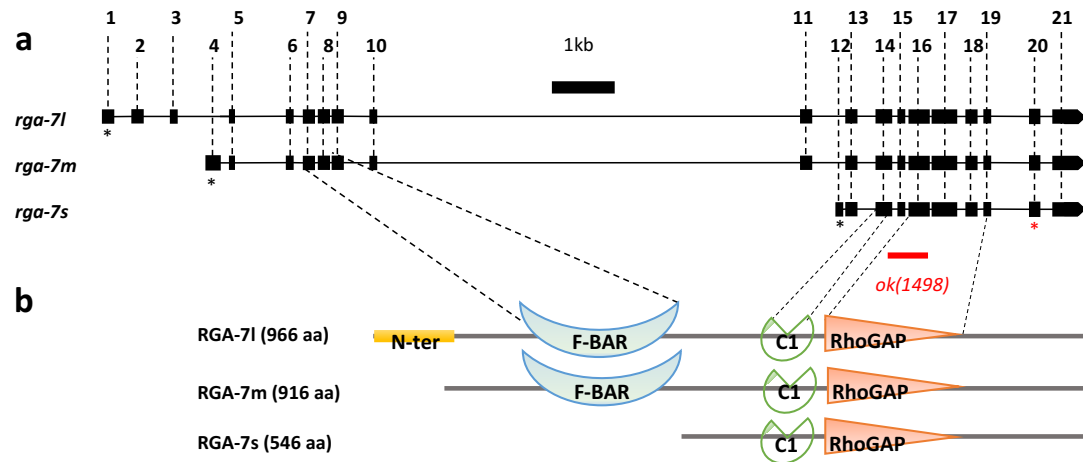


Figure 1.17 Organisation du gène *rga-7* et la structure des isoformes de RGA-7.

a. Le gène *rga-7* code pour trois isoformes : la forme courte *rga-7s*, la forme moyenne *rga-7m* et la forme longue *rga-7l*. La localisation de la mutation associée à *rga-7(ok1498)* est indiqué en rouge. Les étoiles indiquent les potentiels site d'initiation des trois isoformes (*).
 b. Les protéines associées à chaque isoforme sont représentées avec leurs différents domaines (N-ter, F-BAR, C1 et RhoGAP). Figure adaptée de (Ouellette *et al.*, 2016).

1.6.2 RGA-7 dans la fermeture ventrale

Une étude antérieure dans notre laboratoire a montré que lors de la fermeture ventrale, RGA-7 régule la distribution spatiale de CDC-42 actif ainsi que la dynamique du cytosquelette d'actine au cours de la migration des cellules meneuses et de l'extension de la jonction (Ouellette *et al.*, 2016). En effet, comme décrit dans la section des régulateurs des GTPases Rho, les RhoGAP catalysent l'hydrolyse du GTP en GDP et ainsi inactivent les GTPases Rho.

Dans un premier temps, lors de la migration des cellules meneuses, RGA-7 est recrutée aux jonctions entre les cellules meneuses adjacentes. Elle y promeut l'accumulation concentrée de la forme active de CDC-42 proche de la jonction des

protrusions et l'inhibe loin des protrusions (Ouellette *et al.*, 2016). RGA-7 régule également la dynamique du cytosquelette d'actine. En effet, elle empêche la formation de protrusions riches en actine de façon antagoniste à WSP-1 et TOCA-1/2. La fonction de RGA-7, WSP-1 et TOCA-1/2 est également essentielle à l'accumulation de filaments d'actine (F-actine) le long des jonctions adjacentes entre les cellules meneuses. Il a été montré que RGA-7 régule la migration collective de concert avec l'effecteur de CDC-42, WSP-1 et son partenaire TOCA-1/2 (Ouellette *et al.*, 2016).

La caractérisation des rôles de RGA-7, WSP-1 et TOCA-1/2 a également été étudiée pendant la formation d'une nouvelle jonction entre les cellules meneuses. Elle montre que WSP-1 régule l'accumulation des filaments d'actine avant l'accumulation des protéines jonctionnelles au contact cellule-cellule indépendamment de TOCA-1/2 et RGA-7 (Figure 1.18). Une fois que les protéines jonctionnelles s'accumulent à la nouvelle jonction, les fonctions de RGA-7, WSP-1 et TOCA-1/2 semblent réduire la vitesse d'extension de la jonction au cours du temps de façon antagoniste. Une voie parallèle encore inconnue semble également réguler la vitesse d'extension. Parallèlement, RGA-7 promeut l'accumulation de clusters de CDC-42 liée au GTP *i.e.* sous sa forme active à la nouvelle jonction et favorise une accumulation localisée en régulant négativement son étalement au cours de l'extension (Ouellette *et al.*, 2016) (Figure 1.18).

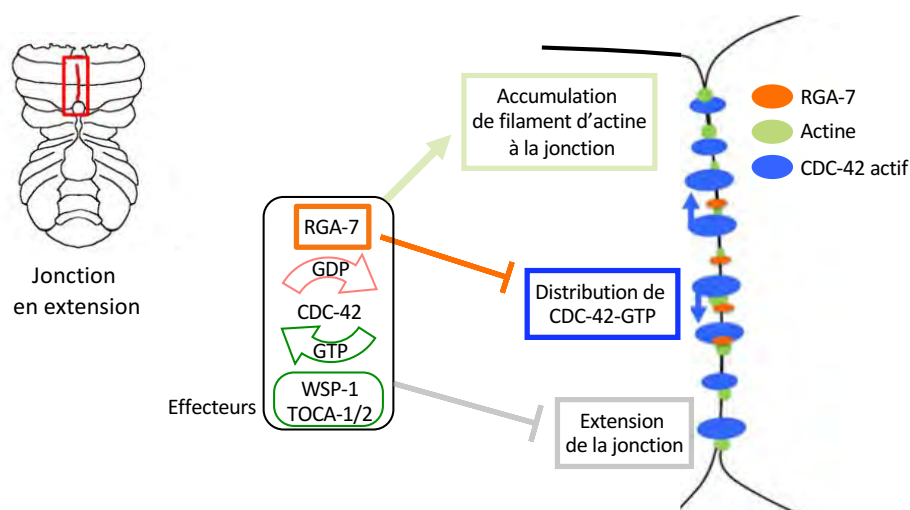


Figure 1.18 Régulation de la localisation de CDC-42 actif par RGA-7 au cours de l'extension des jonctions.

Schéma représentant les rôles de RGA-7 et les effecteurs de CDC-42, WSP-1 et TOCA-1/2, sur la régulation de la distribution de la GTPase CDC-42 liée au GTP et du cytosquelette d'actine lors l'extension de la jonction. Figure adaptée de (Ouellette *et al.*, 2016).

1.6.3 RGA-7 comme capteur de tension dans la spermathèque du *C. elegans*

Chez le *C. elegans* adulte, la spermathèque est un organe faisant partie du système reproducteur qui permet la fécondation des oocytes (Kimble et Hirsh, 1979 ; McCarter *et al.*, 1999). Pour ce faire, la spermathèque se dilate afin de faciliter le passage d'oocyte suite à l'ovulation. La spermathèque présente donc deux états, dilaté ou contracté. L'équipe de Ronan Zaidel-Bar a utilisé cet organe reproducteur en tant que système de stress mécanique *in vivo*. Dans ce contexte, l'équipe a identifié la protéine SPV-1/RGA-7 comme une RhoGAP pour RHO-1/RhoA et montré que RGA-7 agit comme un senseur de stress mécanique lorsque la spermathèque se dilate au passage d'un oocyte (Tan et Zaidel-Bar, 2015). En réponse au changement de courbure de la membrane de la spermathèque, RGA-7 régule le niveau d'activation de

RHO-1, ce qui permet de coordonner le niveau de contraction de la spermathèque. Sachant que RhoA régule la contraction du cytosquelette d'actine-myosine par Dial et ROCK en réponse à un stress mécanique externe (Lessey *et al.*, 2012 ; Sahai et Marshall, 2002 ; Marjoram *et al.*, 2014), le niveau de contraction de la spermathèque serait contrôlé par cette voie. En outre, cette même étude sur le rôle de RGA-7 au niveau de la spermathèque a mis en évidence que le domaine F-BAR de RGA-7 est à l'origine de cette réponse mécanosensible (Tan et Zaidel-Bar, 2015). De plus, il a récemment été montré que RGA-7 en réponse à la contraction de la spermathèque régule le flux de calcium nécessaire à la contraction, soit directement ou soit en régulant l'activité de CDC-42 (Bouffard *et al.*, 2019). Ces deux études mettent en avant une fonction mécanosensible de RGA-7 dans la régulation de l'état de contraction de la spermathèque par sa fonction GAP envers RHO-1 et CDC-42.

1.7 Hypothèse et objectifs

Nous avons précédemment mis en avant que RGA-7 est recrutée aux jonctions et que cette RhoGAP s'accumule sous forme tubulaire ou de *puncta* dans le cytoplasme. Ce type de localisation nous suggère que RGA-7 pourrait contrôler les voies d'endocytose ou d'exocytose associées à une accumulation cytoplasmique concentrique ou de forme tubulaire. De plus, en considérant que RGA-7 régule la distribution spatiale de CDC-42 sous sa forme active et que cette dernière régule l'endocytose de protéines jonctionnelles, cette régulation des voies d'endocytose ou d'exocytose par RGA-7 pourrait être sous le contrôle de CDC-42. D'autre part, la dynamique des E-cadhérines est régulée de façon mécanosensible par le cytosquelette d'actine-myosine. Finalement, une étude récente a montré que RGA-7 peut agir en tant que senseur de tension (Tan et Zaidel-Bar, 2015). En considérant l'ensemble de ces études, l'objectif global de ce projet de thèse consiste à élucider le rôle de la

RhoGAP RGA-7 dans la régulation mécanosensible de la dynamique jonctionnelle lors de la fermeture ventrale du *C. elegans*. Pour ce faire, les 3 objectifs spécifiques suivants seront ciblés :

Objectif spécifique 1 : Évaluer le rôle de RGA-7 dans la régulation de la dynamique jonctionnelle des protéines HMR-1, HMP-1, DLG-1 et AJM-1 lors de la fermeture ventrale.

- o Étudier la régulation de l'accumulation de la protéine transmembranaire HMR-1, le plus proche homologue de la E-cadhérine chez le *C. elegans*, par RGA-7.
- o Élucider la fonction mécanosensible de RGA-7 dans la régulation de la dynamique jonctionnelle de HMR-1 lors de la phase tardive d'extension de la jonction.

Objectif spécifique 2 : Comprendre le rôle de RGA-7 dans la modulation de la composition des jonctions adhérentes (cytosquelette d'actine-myosine, CDC-42 sous sa forme active).

- o Étudier l'impact de modulation du stress mécanique sur l'accumulation des régulateurs de la dynamique jonctionnelle de HMR-1 (cytosquelette d'actine-myosine, CDC-42 sous sa forme active et RGA-7) ainsi que HMR-1.
- o Investiguer l'implication mécanosensible de RGA-7 dans la modulation de ces régulateurs.

Objectif spécifique 3 – Évaluer la contribution des domaines de la RhoGAP RGA-7 dans sa fonction mécanosensible lors de la phase tardive d'extension de la jonction.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Entretien des souches et génération de mâles

2.1.1 Entretien des souches

Les souches de nématodes sont cultivées sur des plaques de *Nematode Growth Medium* (NGM) (1 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 ; 1 mM KH_2PO_4 ; Cholestérol 5 mg/L; Agar 16 g/L; Peptone 2,5 g/L; NaCl 3 g/L) (Brenner, 1974)ensemencées avec la souche de bactérie *Escherichia coli* (OP-50) comme source de nourriture. Deux types de plaques sont utilisés : les plaques d'entretien dont l'ensemencement de bactéries OP-50 est étalé et les plaques de croisement, qui ont un site concentré de bactéries pour favoriser la rencontre entre les mâles et les hermaphrodites et donc la reproduction sexuée.

Les souches sont maintenues à 20 °C ou 25 °C, selon les souches, et en transférant une vingtaine de vers sur une nouvelle plaque d'entretien de NGM. L'ensemble des croisements est maintenu à 20 °C.

2.1.2 Génération de mâles et leur maintien

Afin de générer les souches nécessaires à la présente étude, la génération de vers mâles de différentes souches est nécessaire ainsi que le maintien d'un pool de mâles pour faciliter les croisements.

Pour cela, 10 hermaphrodites au stade L4, *i.e.* dont les gonades ne sont pas encore matures sont transférés sur des plaques d'entretien. Environ 3 à 6 plaques par souches sont préparées et sont incubées pendant 1h30 à 37 °C générant un stress et favorisant la ponte de mâles. Par la suite, les plaques induites à 37 °C sont transférées pendant 1 semaine à 20 °C et quelques mâles sont normalement générés. Si l'induction n'a pas fonctionnée, il est possible d'induire à nouveau les plaques pour augmenter la chance d'obtenir des mâles; sinon de nouvelles plaques de L4 doivent être induites.

Une fois que la quantité de mâles est suffisante, 6 à 7 mâles sont transférés sur une plaque de croisement avec 2 hermaphrodites du même génotype. Le pool de mâles généré à partir de ce croisement sera beaucoup plus grand que la proportion de mâles générée par stress thermique et permettra de maintenir les mâles pour les croisements futurs (Figure 2.1).

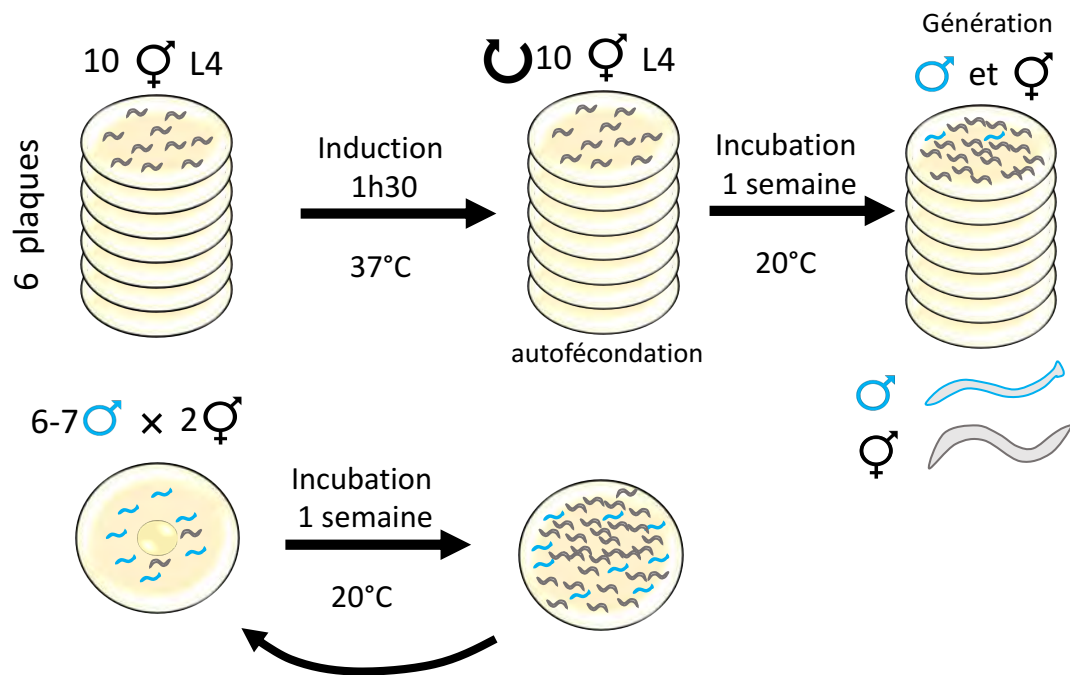


Figure 2.1 Génération et maintien de mâles *C. elegans*.

Afin de générer des mâles, 6 plaques de 10 hermaphrodites au stade L4 sont stressées à 37°C. Une semaine plus tard, la population devrait présenter des hermaphrodites et des mâles. Pour maintenir un pool constant de mâles ceux-ci sont croisés avec des hermaphrodites de la même souche à chaque semaine. Les vers mâles (♂) possèdent le bout de la queue en forme d'hameçon alors que les vers hermaphrodites (♀) présentent une queue de type flagellaire.

2.2 Souches utilisées et générées dans cette étude

2.2.1 Souches utilisées et précédemment obtenues ou générées

2.2.1.1 Pour l'étude de la régulation de l'accumulation de protéines jonctionnelles lors de la fermeture ventrale du *C. elegans*

Les souches suivantes ont été obtenues du *Caenorhabditis Genetic Center* (CGC) :
 N2, VC992 *rga-7(ok1498)II*, FT250 *unc-119(ed3)III*; *xnIs96 [pJN455 (hmr-1p::hmr-1::GFP::unc-54 3'UTR) + unc-119(+)]*, SU265 *jcIs17 [hmp-1p::hmp-*

1::GFP + dlg-1p::dlg-1::dsRed + rol-6(su1006)], SU93 *jcIs1 [ajm-1::GFP + unc-29(+)+ rol-6(su1006)] IV*.

La souche VC992, *rga-7(ok1498)*, est la souche mutante principale de l'étude et présente une létalité embryonnaire caractéristique de 25-30 %. La létalité embryonnaire a été vérifiée tout au long de l'étude. Lorsque le phénotype n'était plus associé au génotype, la souche *rga-7(ok1498)* a été rétrocroisée avec des mâles N2 minimalement deux fois. La létalité embryonnaire a été quantifiée de nouveau. Puis, la souche a été congelée quand le phénotype associé au génotype a été retrouvé.

2.2.1.2 Pour l'étude de la régulation par *rga-7* sous stress mécanique sur les composants jonctionnels

Les souches utilisées suivantes ont été obtenues du *Caenorhabditis Genetic Center* (CGC) : (i) VC992 *rga-7(ok1498)II*, (ii) ML916 *mcIs40 [lin-26p::VAB-10(ABD)::mCherry + myo-2p::GFP, pBluescript]*, (iii) ML1735 *mcIs50 [lin-26p::VAB-10(ABD)::mCherry myo-2p::GFP, pBluescript]*.

La souche *cp7 [nmy-2::GFP + LoxP unc-119(+)+ LoxP]*; *mcIs46 [dlg-1::RFP + unc-119]* a été donnée par A. Piekny (Université de Concordia, Montréal, QC, Canada).

Les souches suivantes ont été générées précédemment dans le laboratoire (Ouellette *et al.*, 2016):

-UQM410 *sajIs31 [lin-26p::wsp-1(CRIB)::mCherry; unc-119^R]; mcIs50 [lin-26p::VAB-10(ABD)::GFP + myo-2p::GFP, pBluescript]*

-UQM420 *sajIs31 [lin-26p::wsp-1(CRIB)::mCherry; unc-119^R]; mcIs50 [lin-26p::VAB-10(ABD)::GFP + myo-2p::GFP, pBluescript]; rga-7(ok1498)II*

-UQM430 *sajIs20 [lin-26p::rga-7m::GFP; unc-119^R]; mcIs40 [lin-26p::VAB-10(ABD)::mCherry+myo-2p::GFP, pBluescript]*

2.2.1.3 Pour l'étude des rôles des domaines de RGA-7 dans la régulation de l'accumulation de HMR-1 et RGA-7

Les souches suivantes ont été obtenues du *Caenorhabditis Genetic Center* (CGC) : (i) VC992 *rga-7(ok1498)II* et (ii) FT778 *unc-119(ed3); xnls299 [hmr-1-mCherry, unc-119(+)]*.

La souche UQM340 *sajIs22 [rga-7lp::rga-7m::GFP; unc-119^R]; rga-7(ok1498)II* a été générée précédemment dans le laboratoire (Ouellette *et al.*, 2016).

2.2.2 Souches générées par croisement

2.2.2.1 Pour l'étude de la régulation de l'accumulation de protéines jonctionnelles lors de la fermeture ventrale du *C. elegans*

Les souches exprimant les protéines jonctionnelles transgéniques dans un fond génétique *rga-7(ok1498)* ont été générées par croisement entre des hermaphrodites des différentes souches transgéniques avec des mâles *rga-7(ok1498)*. Pour cela, dans un premier temps, les souches sont sélectionnées pour la mutation *rga-7* par PCR puis, dans un second temps, sélectionnées pour la fluorescence des transgènes (Figure 2.2). La mutation et la fluorescence sont vérifiées sur deux progénies après isolement des lignées stables (Figure 2.2). Trois souches sont issues de ces croisements : UQM500, UQM510 et UQM520. Leur génotype et les souches utilisées pour les croisements sont répertoriés dans le tableau 2.1.

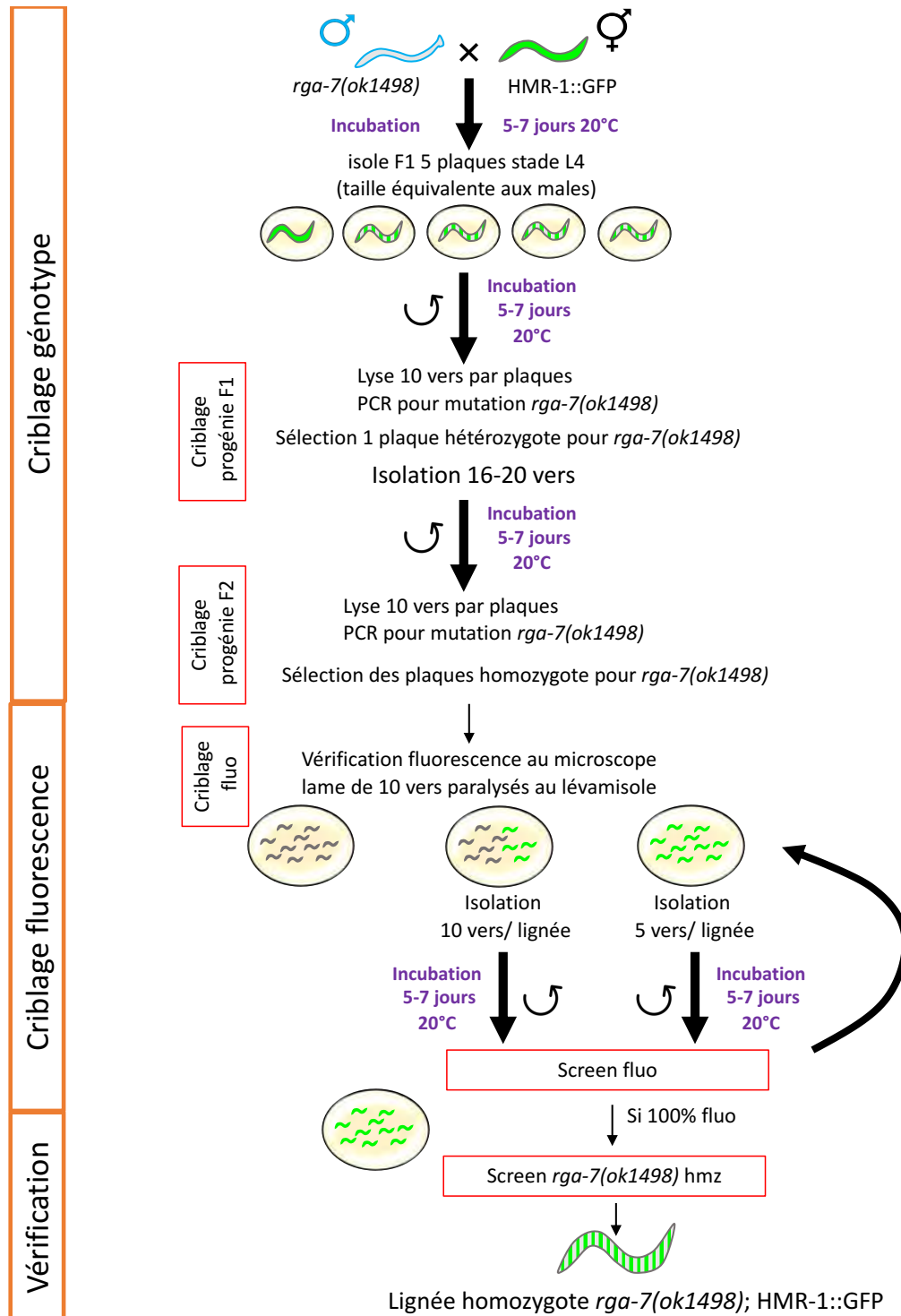


Figure 2.2 Diagramme illustrant la génération d'une souche mutante exprimant une protéine fluorescente.

La génération se divise en trois étapes; (i) croisement avec criblage du génotype, (ii) sélection par la fluorescence et (iii) vérification du génotype et de la fluorescence suivie de la congélation de la souche.

Tableau 2.1 Souches générées par croisement.

Indication du nom de souche, du génotype ainsi que des souches dont sont issues les mâles et les hermaphrodites utilisées pour les croisements.

souche	génotype	Male	Hermaphrodite
UQM500	<i>rga-7(ok1498)II; unc-119(ed3)III; xnl596 [pJN455 (hmr-1p::hmr-1::GFP::unc-54 3'UTR) + unc-119(+)]</i>	VC992	FT250
UQM510	<i>rga-7(ok1498)II; jcl517 [hmp-1p::hmp-1::GFP + dlglp::dlg-1::dsRed + rol-6(su1006)]</i>	VC992	SU265
UQM520	<i>rga-7(ok1498)II; jcl51 [ajm-1::GFP + unc-29(+)] + rol-6(su1006) IV</i>	VC992	SU93
UQM530	<i>unc-119(ed3)III; xnl596 [pJN455 (hmr-1p::hmr-1::GFP::unc-54 3'UTR) + unc-119(+)]; mcl540 [lin-26p::VAB-10(ABD)::mCherry+myo-2p::GFP, pBluescript]</i>	ML916	FT250
UQM540	<i>rga-7(ok1498)II; cp7 [nmy-2::GFP + LoxP unc-119(+)] LoxP]; mcl546 [dlg-1::RFP + unc-119]</i>	VC992	cp7;mcl546
UQM550	<i>rga-7(ok1498)II; unc-119(ed3); xnl5299 [hmr-1-mCherry, unc-119(+)]</i>	VC992	FT778
UQM590	<i>rga-7(ok1498)II; unc-119(ed3)III; sajls52[rga-7lp::rga-7l/mΔN::GFP; unc-119^R]</i>	VC992	UQM560
UQM600	<i>rga-7(ok1498)II; unc-119(ed3)III; sajls53[rga-7lp::rga-7l/mΔF-BAR::GFP; unc-119^R]</i>	VC992	UQM570
UQM610	<i>rga-7(ok1498)II; unc-119(ed3)III; sajls54[rga-7lp::rga-7l/mΔC1::GFP; unc-119^R]</i>	VC992	UQM580
UQM620	<i>rga-7(ok1498)II; unc-119(ed3); sajls22[rga-7lp::rga-7m::GFP; unc-119^R]; xnl5299 [hmr-1-mCherry, unc-119(+)]</i>	UQM340	UQM550
UQM630	<i>rga-7(ok1498)II; unc-119(ed3); sajls52[rga-7lp::rga-7l/mΔN::GFP; unc-119^R], xnl5299 [hmr-1-mCherry, unc-119(+)]</i>	UQM590	UQM550
UQM640	<i>rga-7(ok1498)II; unc-119(ed3); sajls53[rga-7lp::rga-7l/mΔF-BAR::GFP; unc-119^R], xnl5299 [hmr-1-mCherry, unc-119(+)]</i>	UQM600	UQM550
UQM650	<i>rga-7(ok1498)II; unc-119(ed3); sajls54[rga-7lp::rga-7l/mΔC1::GFP; unc-119^R]; xnl5299 [hmr-1-mCherry; unc-119(+)]</i>	UQM610	UQM550

2.2.2.2 Pour l'étude de la régulation par *rga-7* sous stress mécanique sur les composants jonctionnels

La souche UQM530 a été générée en croisant des hermaphrodites exprimant HMR-1::GFP avec des mâles exprimant VAB-10(ABD)::mCherry. La souche UQM540 a été générée en croisant des hermaphrodites de la souche exprimant NMY-2; DLG-1 avec des mâles *rga-7(ok1498)* (Tableau 2.1). Le génotype de ces deux souches est décrit dans le tableau 2.1.

La mutation du gène *rga-7* a été identifiée par PCR avec amorces spécifiques. La progénie issue de croisements avec des souches transgéniques ont été isolées par la détection de marqueurs fluorescents spécifiques pour chaque transgène.

2.2.2.3 Pour l'étude des rôles des domaines de RGA-7 dans la régulation de l'accumulation de HMR-1 et RGA-7

Les souches transgéniques UQM560 *unc-119(ed3)III; sajls52 [rga-7lp::rga-7l/mΔN::GFP; unc-119^R]*, UQM570 *unc-119(ed3)III; sajls53 [rga-7lp::rga-7l/mΔF-BAR::GFP; unc-119^R]* et UQM580 *unc-119(ed3)III; sajls54 [rga-7lp::rga-7l/mΔC1::GFP; unc-119^R]* ont été générées par bombardement biolistique dans le laboratoire (Tableau 2.2 et 2.3).

Tableau 2.2 Tableau des souches générées par bombardement.

Indication du nom de souche, du génotype et de la contribution des membres du laboratoire.

Souche	Génotype	Contribution
UQM560	<i>unc-119(ed3)III; sajls52[rga-7lp::rga-7l/mΔN::GFP; unc-119^R]</i>	Barbara Da Rocha (plasmide et bombardement) et Marie-Hélène Ouellette (ADN)
UQM570	<i>unc-119(ed3)III; sajls53[rga-7lp::rga-7l/mΔF-BAR::GFP; unc-119^R]</i>	Karim Hamiche (bombardement) et Marie-Hélène Ouellette (ADN et plasmide)
UQM580	<i>unc-119(ed3)III; sajls54[rga-7lp::rga-7l/mΔC1::GFP; unc-119^R]</i>	Karim Hamiche (bombardement) et Marie-Hélène Ouellette (ADN et plasmide)

Tableau 2.3 Tableau des plasmides rapporteurs GFP fusionnés aux isoformes de RGA-7.

Cinq plasmides ont été générés; *sajls20* et *sajls22* codent pour la forme sauvage de RGA-7 sous contrôle de son promoteur endogène *rga-7lp* ou promoteur spécifique de l'hypoderme *lin-26p*. Les plasmides codent pour deux formes protéiques de RGA-7: les formes longue (RGA-7l) et moyenne (RGA-7m) possédant la région N-terminale ou non, respectivement. Excluant le domaine N-terminal (jaune), la protéine RGA-7 présente 3 autres domaines : F-bar (bleu), C1 (vert) et RhoGAP (orange). *sajls52*, *sajls53* et *sajls54* sont sous contrôle de *rga-7lp*, RGA-7 avec des domaines tronqués pour le domaine N-terminal, F-BAR et C1, respectivement.

Nom	Séquence ADN	Produit protéique attendu/prédit
<i>sajls20</i> [<i>lin-26p::rga-7l/m::GFP</i> ; <i>unc-119R</i>]		
<i>sajls22</i> [<i>rga-7lp::rga-7l/m::GFP</i> ; <i>unc-119R</i>]		
<i>sajls52</i> [<i>rga-7lp::rga-7l/mΔN::GFP</i> ; <i>unc-119R</i>]		
<i>sajls53</i> [<i>rga-7lp::rga-7l/mΔF-BAR::GFP</i> ; <i>unc-119R</i>]		
<i>sajls54</i> [<i>rga-7lp::rga-7l/mΔC1::GFP</i> ; <i>unc-119R</i>]		

La souche UQM550 (génotype : Tableau 2.1) a été générée par croisement entre des hermaphrodites *unc-119(ed3); xnl5299 [hmr-1-mCherry, unc-119(+)]* et des mâles *rga-7(ok1498)*. De la même façon, les souches UQM590-600-610 (génotypes : Tableau 2.1) ont été générées en croisant des hermaphrodites des différentes souches transgéniques exprimant RGA-7ΔN::GFP, RGA-7ΔF-BAR::GFP ou RGA-7ΔC1::GFP (UQM560, UQM570, UQM580) avec des mâles *rga-7(ok1498)*.

Des mâles des souches *rga-7(ok1498)* exprimant les 4 transgènes RGA-7::GFP sous contrôle du promoteur *rga-7lp* ont été générés, et ont été croisés avec des

hermaphrodites de la souche *rga-7(ok1498)II; unc-119(ed3); xnl5299 [hmr-1-mCherry, unc-119(+)]* afin de créer les souches UQM620, UQM630, UQM640 et UQM650 permettant ainsi de localiser les différents transgènes de *rga-7* le long de la jonction. Le génotype de ces souches est répertorié dans le Tableau 2.1.

Comme précédemment, la mutation du gène *rga-7* a été identifiée par PCR avec amorces spécifiques. La progénie issue de croisements avec des souches transgéniques a été isolée par détection de marqueurs fluorescents spécifiques pour chaque transgène.

2.3 Génotypage

Dix hermaphrodites au stade L4 par plaques sont isolés puis transférés dans des tubes PCR contenant 10 µL de tampon de lyse (KCl 50 mM, TrisHCl 10 mM, Triton X-100 0,1 %, MgCl₂ 2 mM, Protéinase K 100 µg/mL). Les tubes sont ensuite incubés à 65 °C pendant 60 minutes puis 15 minutes à 95 °C. Un volume de 3 µL par tube est utilisé par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Les réactions d'amplification ont été réalisées sur le mélange suivant : 3 µL de produit de lyse, 2 µL du tampon de Taq (KCl 50 mM, TrisHCl 10 mM, Triton X-100 0,1 %, MgCl₂ 2 mM), 0,4 µL de nucléotides dNTPs à 10 mM, 0,4 µL du mélange d'amorces à 20 mM, 0,6 µL de MgCl₂ 50 mM, 12,1 µL d'eau et 1,5 µL de Taq polymérase.

Tableau 2.4 Amorces pour le génotypage de *rga-7(ok1498)*.

Amorces sens (S) et antisens (AS) utilisées pour l'identification de la mutation lors du génotypage des souches croisées et la taille en paire de base des fragments (pb) entre un génotype sauvage ou mutant pour *rga-7*. Le couple d'amorce S1-AS1 permet de détecter la bande mutante pour *rga-7* à 890 pb et une bande sauvage à 1500 pb. Le couple d'amorce S2-AS1 permet, seulement, de détecter une bande sauvage à 1250 pb car l'amorce sens S2 s'hybride dans la région absente (origine de la mutation).

Souche	Amorces	Fragment sauvage (pb)	Fragment mutant (pb)
<i>rga-7(ok1498)</i>	S1 : TAATTCGCGCAATCTATGATCATC AS1 : GTTTGTGCTCACGGAGTTTAT S2 : AGCTTGCTTTCCAAGGGTTTG	1500 1250	980

Les amplifications ont été réalisées selon le programme suivant : dénaturation de l'ADN 5 minutes à 94 °C ; déshybridation des amorces à chaque cycle 45 secondes à 95° C ; *annealing* (hybridation des amorces) 30 secondes à 59 °C pour le mélange d'amorces pour *rga-7*; élongation 2 minutes à 72 °C, pendant 30 cycles puis 7 minutes à 72 °C. La Taq polymérase est toujours ajoutée après la dénaturation de l'ADN et possède une vitesse de polymérisation de 1000 pb/min.

Les produits issus des PCR sont analysés par migration sur gel d'agarose-TAE 1 % dans un tampon TAE 1X à 110 V pendant 30 à 45 minutes. L'ADN est marqué grâce au colorant GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10 000 x (Biotium, CA), préalablement incorporé dans le gel d'agarose, et est révélé aux UV.

2.4. Transformation des bactéries

Un tube contenant 50 µL de bactéries compétentes chimiques *E. coli* DH5alpha est décongelé sur glace. Lorsque les bactéries compétentes sont dégelées, 50 ng d'ADN plasmidique généré à partir d'une réaction Gateway (BP ou LR) est ajouté. Le

mélange bactéries-ADN est incubé pendant 30 minutes sur glace. Le mélange subit un choc thermique favorisant l'entrée du plasmide dans les bactéries à 42 °C pendant 90 secondes. Le tube est ensuite incubé pendant 10 minutes sur glace et 450 µL de milieu SOC (peptone 20 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 2,5 mM, NaOH 0,1 mM, Glucose 20 mM, MgCl₂ 10 mM) est ajouté pour favoriser la récupération des bactéries. Le tube est ensuite incubé à 37 °C sous agitation pendant 1h. Le tube est ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 2 minutes. Le surnageant est retiré et le culot est homogénéisé à la micropipette puis transféré sur une plaque LB-agar (peptone 10 g/L, NaCl 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, agar 10 g/L) avec les antibiotiques requis et distribué sur l'ensemble de la surface de la plaque à l'aide de billes en verre stériles. Une fois sèche, la plaque est incubée pendant toute la nuit à 37° C. Les colonies bactériennes ayant intégré le plasmide codant pour le transgène, mais également un gène de résistance à l'antibiotique (kanamycine pour BP et ampicilline pour LR), seront observables. Celles-ci sont ensuite isolées et amplifiées pour purification de l'ADN et réalisation de stock bactériologique.

2.5 Synchronisation des vers

Une plaque contenant une population de vers ayant principalement des hermaphrodites au stade adulte et ne manquant pas de nourriture est lavée avec du tampon M9 (1 mL) et transférée dans un microtube. Afin de concentrer les vers, le microtube est centrifugé pendant 3 minutes à 3500 g. Le surnageant est enlevé et le culot est suspendu dans la solution de synchronisation de vers (NaOH 0,5 mM, hypochloride de sodium 0,8 %, qsp. H₂O). Le mélange est agité à la main pendant 3 minutes à température pièce. À la fin des 3 minutes, le mélange est centrifugé (3 minutes, 3500 g), suivi par trois étapes de lavages au M9 stérile. Le culot est

finalement suspendu dans 700 µL de M9 et incubé sous agitation à 20 °C entre 8 et 48 heures.

2.6 Génération des nématodes transgéniques

Les souches transgéniques *unc-119(ed3)III; sajls52 [rga-7lp::rga-7l/mΔN::GFP; unc-119^R]*, *unc-119(ed3)III; sajls53 [rga-7lp::rga-7l/mΔF-BAR::GFP; unc-119^R]*, *unc-119(ed3)III; sajls54 [rga-7lp::rga-7l/mΔC1::GFP; unc-119^R]* ont été générées par bombardement biolistique.

Le bombardement des plasmides *sajls53 [rga-7lp::rga-7l/mΔF-BAR::GFP; unc-119^R]*, *unc-119(ed3)III; sajls54 [rga-7lp::rga-7l/mΔC1::GFP; unc-119^R]* a été réalisé par Karim Hamiche.

La souche *unc-119(ed3)III; sajls52 [rga-7lp::rga-7l/mΔN::GFP; unc-119^R]* a été générée depuis la recombinaison de la séquence *rga-7l/mΔN* dans le plasmide pDONR201 jusqu'à la génération de la souche par bombardement biolistique et son isolation par Barbara Da Rocha. (Tableau 2.4)

Elle sera la souche référence pour illustrer le protocole de génération d'une souche transgénique. D'autre part, le plasmide intégrant *rga-7lp::rga-7l/mΔGAP::GFP* a également été généré pour cette étude mais il n'a pas été possible de générer une lignée transgénique stable.

2.6.1 Génération et amplification du plasmide pour bombardement

La technologie de clonage *Gateway* (Invitrogen) a été utilisée afin de créer les différents vecteurs d'expression (Boulin *et al.*, 2006). Chacun d'entre eux est issu de

la recombinaison du vecteur de destination pMB14 contenant la protéine fluorescente GFP avec le vecteur pDONR-P4-P1R contenant 5 kb du promoteur endogène de *rga-7* (*rga-7lp*) et les vecteurs pDONR201 respectifs contenant les séquences codantes pour *rga-7l/mΔN*, *rga-7l/mΔF-BAR* et *rga-7l/mΔC1*, séquences générées par Marie-Hélène Ouellette (Figure 2.3).

Le produit de LR est transformé dans des bactéries compétentes chimiques *E. coli* DH5alpha. Les souches ayant intégré le plasmide sont amplifiées. Le plasmide est ensuite purifié par kit QIAminiPrep (centrifugation, Qiagen) en suivant les instructions du fabricant et vérifié par séquençage. La conservation du cadre de lecture de la protéine a été également vérifiée.

Le plasmide est purifié par kit QIAmidiPrep (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant afin d'obtenir un plasmide pur et hautement concentré. La concentration en plasmide doit être minimalement de 180-200 ng/μL.

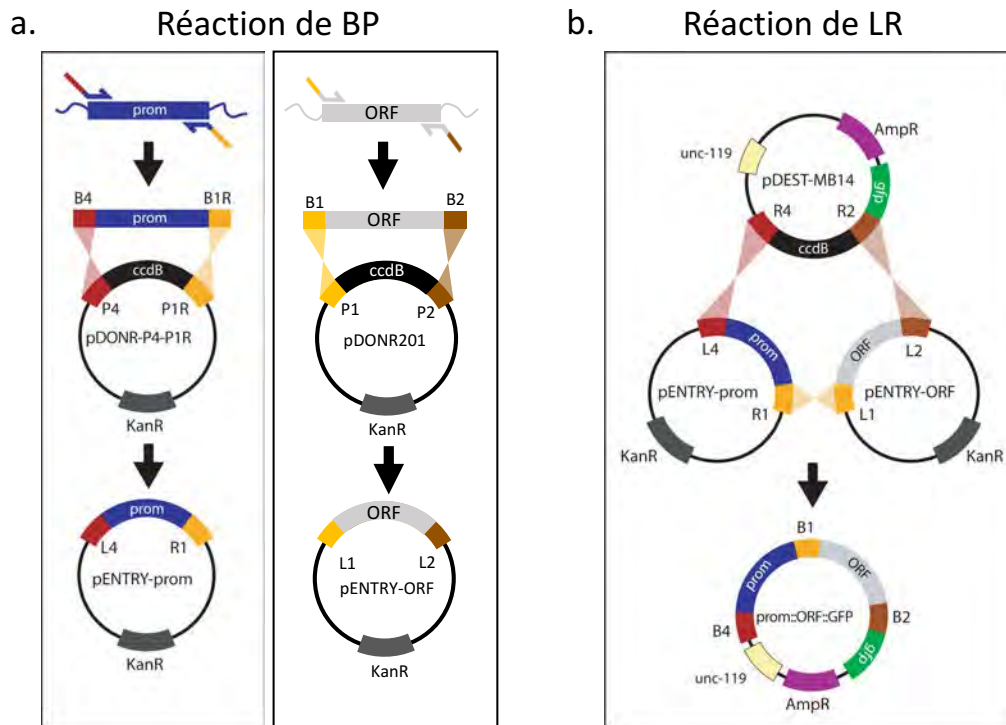


Figure 2.3 Principe du clonage Gateway BP et LR.

a. Schéma illustrant la réaction de BP pour insérer le promoteur d'une part et l'ORF d'autre part dans les plasmides donneurs pDONR-P4-P1R et pDONR201, respectivement. Des amorces spécifiques ont été utilisées pour amplifier les séquences cibles pour permettre la recombinaison favorisée par la BP clonase. Les clones dont la recombinaison a fonctionné sont sélectionnés par croissance de colonies bactériennes transformées sur des plaques LB agar-kanamycine. b. Schéma illustrant la réaction de LR. Elle va permettre d'insérer le promoteur et l'ORF suivi de la protéine GFP à l'aide de recombinaison par amorces spécifiques grâce à la LR clonase. Les clones dont la recombinaison a fonctionné sont sélectionnés par croissance de colonies bactériennes transformées sur des plaques de LB agar-ampicilline. Adapté de (Boulin *et al.*, 2006)

2.6.2 Amplification de la souche *unc-119(ed3)*

Les larves L1 de *C. elegans* possèdent la capacité d'entrer en phase *dauer* où le ver change complètement de métabolisme afin de survivre en cas de manque de nourriture ou de condition de culture stressante (Figure 1.1). Les *dauer* sont aussi caractérisées par une locomotion plus rapide que des adultes. Afin de pouvoir déterminer si le transgène est intégré dans le génome à la suite du bombardement, la souche *unc-119(ed3)* est utilisée. Cette souche possède une mutation dans un gène essentiel à la locomotion et présente un phénotype de paralysie. De plus, les L1 *unc-119(ed3)* ne sont pas capables d'entrer en phase *dauer*. Le plasmide bombardé, pMB14, contient la séquence codante *rga-7lp::rga-7l/mΔN::GFP* mais code également pour une copie sauvage du gène *unc-119*. Ainsi, si le vecteur plasmidique est intégré dans le génome, un sauvetage fonctionnel de locomotion sera observable ainsi que la présence de *dauer*.

La première étape du bombardement biolistique est d'amplifier la quantité de vers *unc-119(ed3)*. Pour le bombardement d'un plasmide, 6 plaques d'entretien de 6 cm de diamètre sur lesquelles sont transférés des vers *unc-119(ed3)* sont incubées pendant 8 à 10 jours à 15 °C. Ensuite, l'ensemble des vers *unc-119(ed3)* est récupéré par lavage au M9, concentré et synchronisé en L1. Les L1 *unc-119(ed3)* synchronisées sont transférées et réparties sur 10 plaques d'œufs, de 10 cm de diamètre, très riche en nutriment (10 jaunes d'œufs, 2 volumes de milieu LB, bactérie *E. coli* OP50) qui ont été préparées à l'avance. Les plaques d'œufs sont incubées à 15 °C pendant 10 à 13 jours afin de favoriser la croissance des vers *unc-119(ed3)*.

2.6.3 Bombardement

2.6.3.1 Préparation des billes d'or et de l'ADN plasmidique

Dans un microtube en silicone (facilite la non-adsorption à la paroi) 15 à 20 mg de billes d'or (1 μm) sont pesés. Les billes d'or sont resuspendues dans 70 % d'éthanol (1 mL). Le mélange est agité à l'aide d'un appareil à vortex pendant 5 minutes puis reposé pendant 15 minutes à température pièce. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 1 minute à 500 g. Le surnageant est enlevé, suivi par trois étapes de lavages à l'eau stérile (1 minute d'agitation (vortex), 1 minute de repos, centrifugation). Après les lavages, le culot est de nouveau suspendu dans 250 μL de 50 % glycérol stérile. Le mélange glycérol et billes d'or est agité par vortex pendant 5 minutes et 50 μL du mélange en suspension est transféré dans un microtube. Un volume de 50 μL d'ADN plasmidique *sajls52 [rga-7lp::rga-7l/m Δ N::GFP; unc-119^R]* à 200 $\mu\text{g/mL}$ (10 à 15 μg), 50 μL de CaCl_2 (2,5 M) et 20 μL de spermidine (0,1 M) sont ajoutés dans l'ordre. Entre chaque ajout, le mélange est remis en suspension à l'aide d'une micropipette. Le mélange est ensuite incubé 30 minutes sur glace et suspendu au doigt à intervalle de 5 minutes. Après l'incubation, le mélange est centrifugé pendant 1 minute à 500 g, suivi de deux étapes de lavages où le surnageant est enlevé. Le culot est suspendu dans 300 μL puis dans 1 mL d'éthanol 70 %. Entre chaque suspension, le mélange est homogénéisé au doigt. Le culot est suspendu de nouveau dans 170 μL d'éthanol 70 % et homogénéisé au doigt. L'ADN lié aux microbilles d'or est alors prêt à être utilisé.

2.6.3.2 Préparation des vers

Les 10 plaques d'œufs, où les vers *unc-119(ed3)* ont été mis en culture, sont lavées au M9 et transférées dans des tubes coniques de 50 mL (Figure 2.4). Après décantation

le surnageant est enlevé et le culot, contenant les vers, est dilué dans 15 mL de M9. Ce lavage est répété 3 à 4 fois jusqu'à ce que la majorité des impuretés ait été enlevée. Le culot de 1 à 3 mL est transféré à l'aide d'une pipette pasteur sur une grande plaque NGM-OP50 séchée depuis une semaine. La plaque est mise sur glace pendant 15 à 30 minutes afin d'assécher plus rapidement les vers suspendus dans le M9 transféré sur la plaque (Figure 2.4).

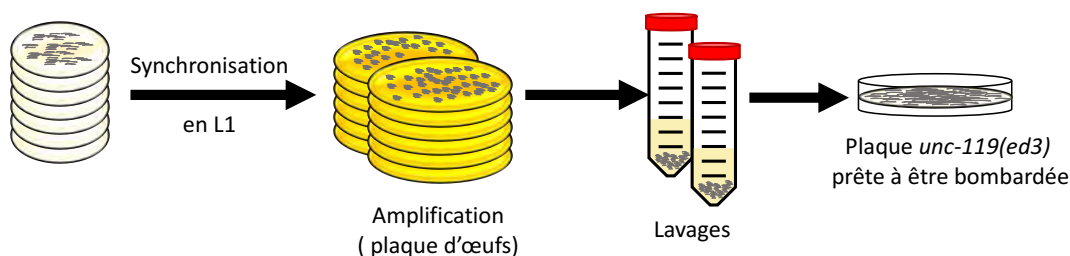


Figure 2.4 Amplification de la souche *unc-119(ed3)* pour le bombardement biolistique.

Des vers *unc-119(ed3)* sont mis en culture sur des plaques de NGM. Une fois que la quantité de vers est suffisante, ils sont synchronisés en L1 et transférés sur des plaques d'œufs (milieu très nutritif). À la suite de l'amplification de la population de *unc-119(ed3)*, ils sont lavés pour se débarrasser du milieu riche et sont concentrés sur une plaque de NGM sans bactéries qui sera bombardée.

2.6.3.3 Bombardement biolistique

Le mélange des microbilles d'or avec le plasmide contenant *sajls52[rga-7lp::rga-7l/mΔN::GFP; unc-119^R]* est intégré dans le génome de la souche *unc-119(ed3)* par bombardement utilisant le système PDS-1000/He avec adaptateur Hepta (Bio-Rad) comme décrit par Berezikov *et al.*, 2004, *i.e.* par détente d'hélium sous pression dans le cas présent.

2.6.3.4 Récupération des vers

Après le bombardement les vers sont laissés à température pièce pendant 20 à 40 minutes. La plaque est ensuite lavée avec le tampon *Egg Salts* (NaCl 118 mM, KCl 40 mM, CaCl₂ 3,5 mM, MgCl₂ 3,5 mM) et la suspension de vers est distribuée sur 25 plaques de 6 cm de diamètre. Une fois sèches, elles sont incubées pendant deux semaines à 25 °C ainsi que la grande plaque ayant été bombardée (Figure 2.5).

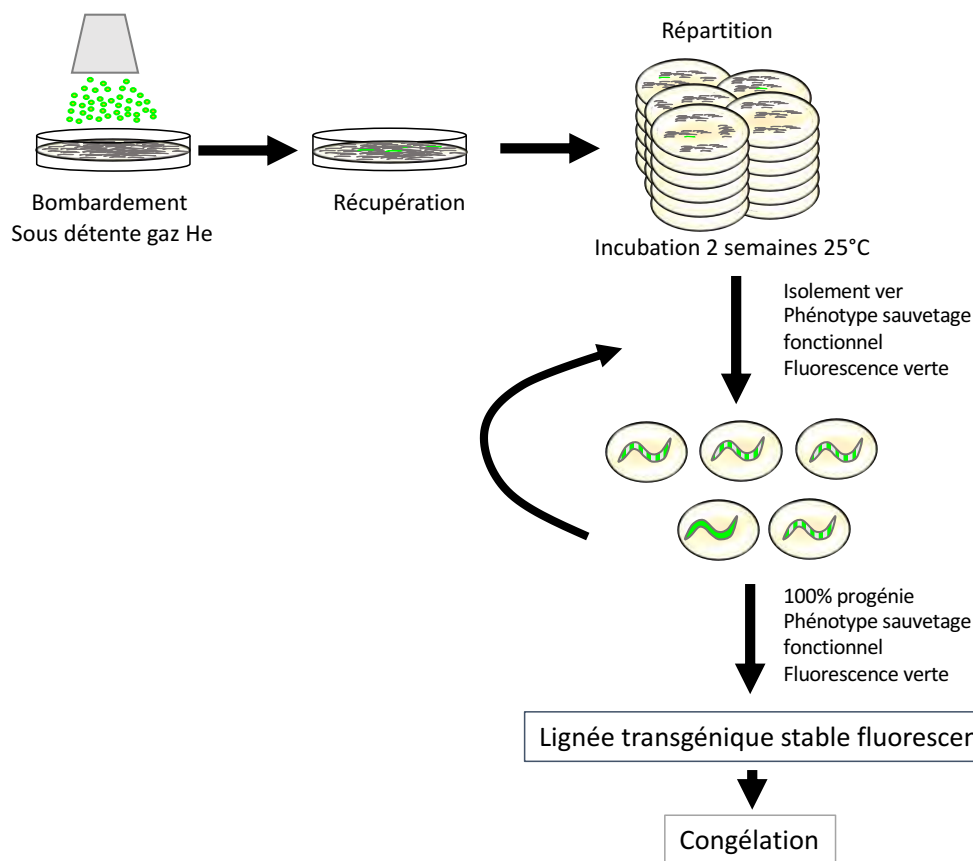


Figure 2.5 Génération d'une souche transgénique.

Une fois que les vers bombardés sont transférés dans des plaques de 6 cm et incubés à 25 °C pendant 2 semaines, la présence de *dauer* est observée. Chaque *dauer* est isolée sur une plaque de croisement et leurs progénies sont sélectionnées pour la locomotion et la fluorescence afin d'avoir une intégration stable du transgène.

2.6.4 Sélection des lignées transgéniques

Après deux semaines d'incubation, les plaques sont observées afin de trouver des vers ayant une locomotion normale. Les vers ayant ce phénotype sont isolés sur des plaques, un ver par plaque et sont incubées à 25 °C pendant 4 jours (Figure 2.5). La progénie est sélectionnée afin d'obtenir une souche transgénique homozygote stable et fluorescente. La souche est ensuite congelée (Figure 2.5).

2.7 Congélation des souches de vers et des bactéries

2.7.1 Souches de vers

2.7.1.1 Congélation avec solution de congélation (30 % glycérol)

La souche à congeler est transférée sur 3 à 6 plaques de 6 cm. Les plaques sont incubées à 20 °C jusqu'à ce que les vers manquent de nourriture (5-6 jours). À ce moment-là, les vers sont récoltés sur les plaques par lavage au M9. Un volume de 500 µL du mélange M9-vers est transféré par microtube de congélation puis 500 µL de solution de congélation (NaCl 100 mM, KPO₄ 50 mM, MgSO₄ 0,3 mM, glycérol 30 %) est ajouté. Les microtubes sont homogénéisés au doigt puis incubés sur glace pendant 15 minutes et sont transférés à -80 °C.

2.7.1.2 Congélation avec solution de Tréhalose-DMSO

La souche à congeler est transférée sur 1 plaque de 10 cm. La plaque est incubée à 20 °C jusqu'à ce qu'elle devienne en manque de nourriture (7-9 jours). Les vers sont récoltés par lavage au M9. Un volume de 1 mL du mélange M9-vers est transféré par

microtube de congélation. Les tubes sont centrifugés (3 minutes, 3500 g) et les vers lavés avec la solution de congélation (Tréhalose 80 mM, DMSO 500 mM). Le culot de vers est de nouveau suspendu dans les microtubes dans 1 mL de solution de congélation Tréhalose-DMSO. Les tubes sont homogénéisés au doigt puis incubés pendant 30 minutes à température pièce et sont transférés à -80 °C.

2.7.2 Congélation des bactéries

Une préculture liquide de la colonie bactérienne sélectionnée est réalisée dans 5 mL de LB (peptone 10 g/L, NaCl 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, qsp. H₂O). Un volume de 500 µL de préculture est transféré par microtube de congélation puis 500 µL de solution de congélation (50 % glycérol-LB) est ajouté.

Les microtubes sont homogénéisés au doigt puis incubés pendant 10 minutes sur glace et sont transférés à -80 °C.

2.8 Létalité embryonnaire

Huit à 10 plaques de croisement avec 10 hermaphrodites au stade jeune adulte par plaque sont incubés à 20 °C pendant 6 à 8 heures. Les hermaphrodites sont ensuite enlevés et le nombre d'embryons est compté. Les plaques sont de nouveau incubées à 20 °C pendant 24 h et le nombre d'embryons morts est comptabilisé. Le ratio entre les embryons totaux et les embryons morts (pas de développement embryonnaire au second jour) permet de quantifier la létalité embryonnaire associée à la mutation *rga-7(ok1498)*.

2.9 Montage des embryons de *C. elegans*

Afin de pouvoir étudier la fermeture ventrale des embryons des différentes souches de nématodes par microscopie confocale, les embryons de 30 à 50 vers au stade jeune adulte/adulte sont préparés comme décrit par Martin *et al.* (Martin *et al.*, 2016b ; Walston et Hardin, 2010). Les embryons sont montés entre lame et lamelle sur des coussins d'agarose à 1, 3 et 9 % agarose-M9 (poids/volume) (M9 tampon : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12,8 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g/L, qsp. H_2O distillée) selon les différentes expériences de l'étude. Les mélanges M9-agarose sont réalisés frais à chaque jour d'expérience. Les lamelles sont scellées à l'aide d'une solution de *drawing gum* (Pébéo, France). Celle-ci sèche relativement vite et devient hydrophobe. Elle n'est pas toxique pour les embryons présents entre lame et lamelle. Après 30 minutes de séchage les lames sont prêtes à être imagées.

2.10 Microscopie confocale

2.10.1 Caractérisation de la jonction lors de la fermeture ventrale

Les souches exprimant les protéines fluorescentes jonctionnelles HMR-1, DLG-1, HMP-1 et AJM-1 dans un fond génétique sauvage ou mutant pour *rga-7* ont été imagées par microscopie confocale de type swept-field avec un objectif 100 x oil CFI NA 1.45 Plan Apochromat λ . La fermeture ventrale a été suivie en capturant 21 z-plan avec un espacement de 400 nm toutes les 2 minutes jusqu'à la fin de la fermeture ventrale (Figure 2.6). La projection moyenne de trois plans les plus apicaux des embryons où la jonction est détectable a été réalisée afin de s'affranchir du bruit de fond des neuroblastes, notamment pour les souches exprimant HMR-1 et HMP-1, et pouvoir étudier la jonction apicale hypodermale dans son ensemble. L'ensemble des images a été acquis par le logiciel NIS-element (Nikon). Les profils d'intensité ont

tous été générés à l'aide du logiciel Fiji. Par la suite, ils ont été normalisés en enlevant mathématiquement le bruit de fond et lissés et ce, en moyennant l'intensité de fluorescence avec l'intensité de fluorescence précédant et suivant celle-ci (Figure 2.6). Le lissage de la fluorescence nous permet de mettre en avant les clusters qui sont le plus définis selon les différences d'intensité de fluorescence des points de la jonction. À partir des profils d'intensité prétraités, les caractéristiques suivantes ont été extraites : la taille de la jonction, l'accumulation de la fluorescence à la jonction, aux clusters et entre les clusters, la densité de clusters (nb cluster/ μm) et l'anisotropie (ratio entre l'intensité de fluorescence minimale et maximale de la jonction) comme décrit dans Martin *et al.* (Martin *et al.*, 2016a) (Figure 2.6, 2.7). L'ensemble des souches ont été acquises minimalement 3 fois de façon indépendante et entre 9 à 10 embryons ont été acquis pour chaque condition.

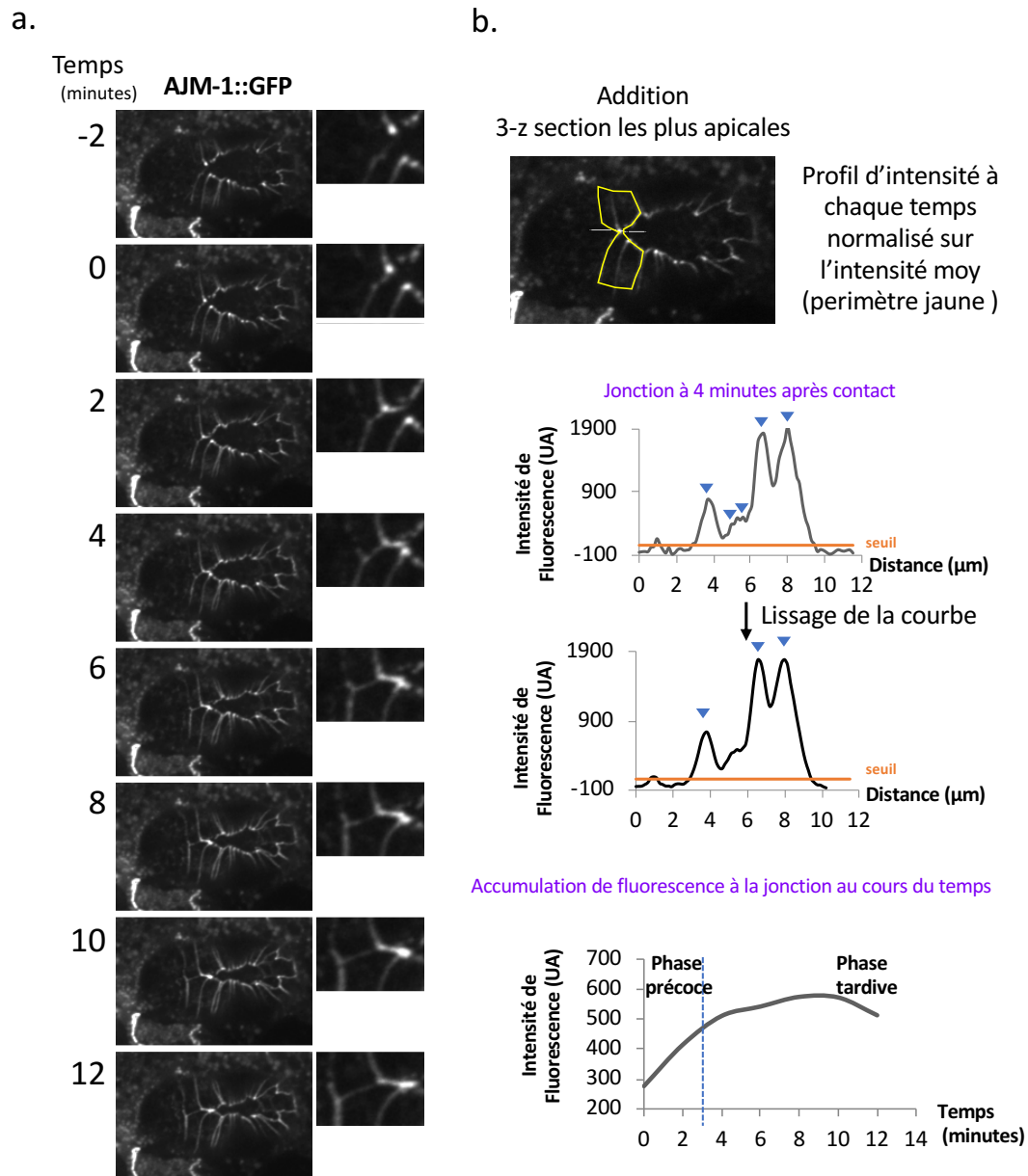


Figure 2.6 Identification de la jonction lors de la fermeture ventrale.

a. Images à intervalle de 2 minutes de la fermeture ventrale d'un embryon de *C. elegans* exprimant AJM-1::GFP. Intervalle : 2 minutes avant le contact entre les deux cellules meneuses jusqu'à 12 minutes après le contact cellule-cellule. b. Schéma illustrant le processus de détermination de la jonction et le lissage de la courbe montrant les clusters les plus définis. Après avoir tracé un trait le long de la jonction et récupéré les profils d'intensité grâce au logiciel Fiji. L'intensité de fluorescence est normalisée par rapport au bruit de fond et la moyenne de fluorescences des 4 cellules meneuses hypodermiques pour s'affranchir du

photoblanchiment au cours de l'acquisition. Le profil d'intensité est ensuite lissé et fait ressortir que les clusters les mieux définis. En suivant la moyenne d'accumulation au cours de l'extension de la jonction, deux phases sont déterminées : la phase précoce (0 à 2 minutes) caractérisée par une accumulation rapide des protéines à la jonction et la phase tardive (4 à 12 minutes) caractérisée principalement par un remodelage de la jonction et une accumulation constante.

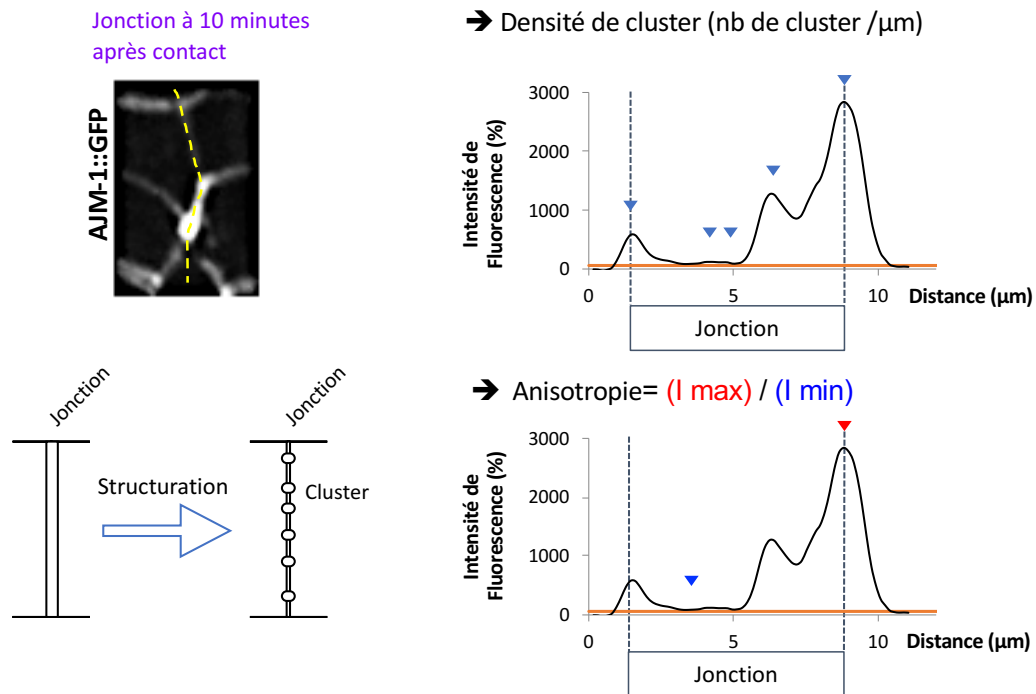


Figure 2.7 Méthodes de mesure caractérisant la structuration de la jonction.

La maturation de la jonction en phase tardive d'extension s'accompagne d'une structuration. La jonction présente des zones de forte densité de protéines jonctionnelles (cluster) et d'autre avec moins de protéines (entre les clusters). La densité de cluster (haut) démontre la quantité de clusters par μm (flèche bleue). L'anisotropie (bas) est un rapport entre l'intensité minimale (flèche bleue) et maximale d'intensité (flèche rouge) illustrant la définition de la structuration de la jonction.

2.10.2 Caractérisation de la jonction en phase tardive d'extension

Pour décrire le mécanisme en phase tardive de l'expansion de la jonction, la fermeture ventrale des souches utilisées a été suivie et 10 minutes après le contact des cellules meneuses, les embryons ont été capturés à l'aide de 16 à 31 z-plan avec un espacement de 150 nm. L'ensemble des images a été acquis par microscopie confocale de type *swept-field* avec un objectif 100 x oil CFI NA 1.45 Plan Apochromat λ à l'aide du logiciel *NIS-element* (Nikon). La projection moyenne de six plans les plus apicaux des embryons où la jonction est visible a été réalisée afin de s'affranchir du bruit de fond des neuroblastes. Les profils d'intensité de fluorescence ont tous été générés à l'aide du logiciel *ImageJ* qui ont par la suite été normalisés et lissés.

Dans un premier temps, les profils ont été réalisés le long de la jonction (Figure 2.8). À partir des profils d'intensité prétraités, les caractéristiques suivantes ont été extraites : la taille de la jonction, l'accumulation de la fluorescence à la jonction, aux clusters et entre les clusters, la densité de clusters (nb cluster/ μm) et l'anisotropie (ratio entre l'intensité de fluorescence minimale et maximale de la jonction) (Martin *et al.*, 2016a). La distribution d'alignement de clusters a également été mesurée en déterminant le nombre d'apparition de distance entre deux clusters, de deux protéines fluorescentes différentes, les plus proches. La distance entre deux clusters d'une même protéine fluorescente a aussi été mesurée. Toutes les souches ont été acquises minimalement 3 fois de façon indépendante et entre 7 à 10 embryons ont été acquis pour chaque condition. L'ensemble des embryons acquis a été analysé pour cette étude. Dans un second temps, des profils d'intensités transversaux à la jonction ont été réalisés afin d'étudier les changements de localisation des différents acteurs impliqués dans la régulation de la phase tardive d'expansion de la jonction (Figure 2.8). Pour obtenir une vision d'ensemble de la jonction, les profils d'intensité ont été

générées minimalement tous les 320 nm. Trois à 5 embryons ont été analysés par souche et condition pour l'étude de localisation.

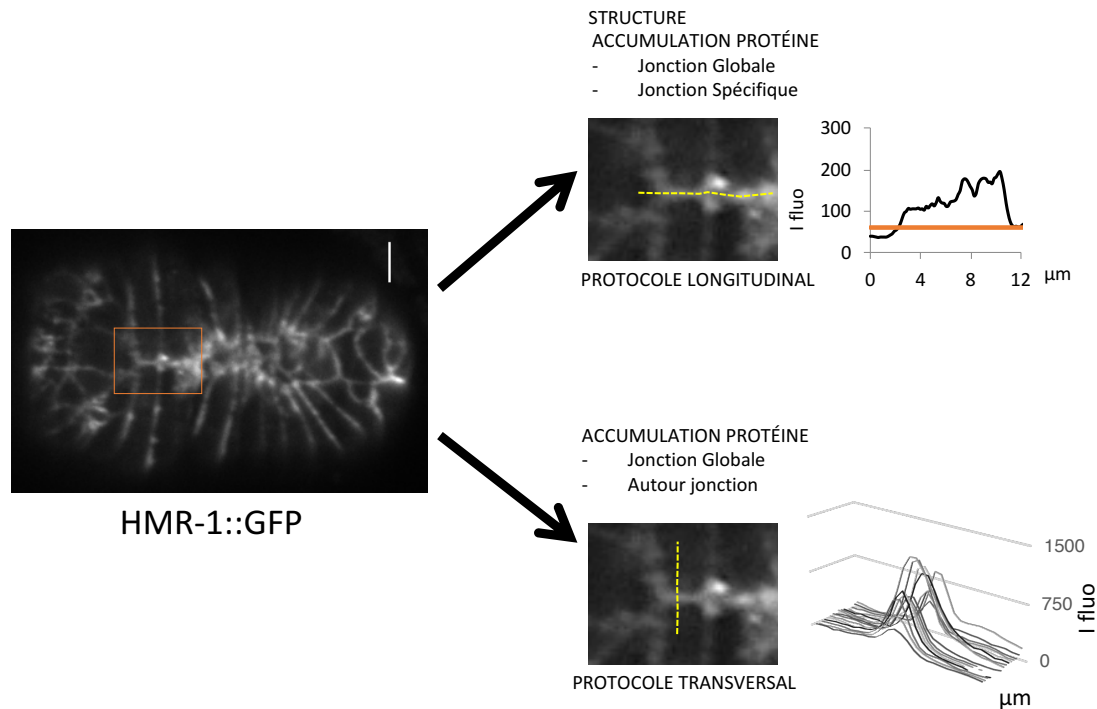


Figure 2.8 Les deux protocoles d'analyse utilisés pour étudier la jonction.

Le protocole longitudinal (le long de la jonction, haut) permet la description de la structuration et de l'accumulation des protéines de façon globale et locale au niveau de la jonction. Le protocole transversal (bas) permet de décrire l'accumulation globale des protéines à la jonction et de localiser l'accumulation cytosolique potentielle des protéines selon les conditions de l'étude.

2.10.3. Redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)

La fermeture ventrale des embryons exprimant HMR-1::GFP dans un contexte sauvage ou mutant pour *rga-7* a été suivie à l'aide du microscope confocal Nikon A1R avec un objectif 100 x oil CFI NA 1.45 Plan Apochromat λ . Aux temps 2 minutes ou 10 minutes après le contact entre les deux cellules meneuses

hypodermes, une région d'intérêt ($2\ \mu\text{m} \times 0,5\ \mu\text{m}$) a été sélectionnée au niveau de la jonction formée. Celle-ci est ensuite photoblanchie après 2 stimulations à 100 % d'efficacité de puissance des lasers 405 nm et 488 nm. Un plan apical de l'embryon est ensuite acquis à toutes les 5 secondes pendant 5 minutes afin de suivre la récupération de fluorescence. Une image avant le photoblanchiment est également acquise en tant que témoin. Il est à noter que la jonction s'allonge et bouge au cours de la fermeture ventrale. La jonction n'est donc plus centrée dans la région d'intérêt utilisée. Pour pallier ce déplacement, les acquisitions dans le temps des embryons ont été alignées à l'aide du logiciel NIS-element afin de pouvoir analyser par Fiji. L'alignement a toujours été réalisé en fonction de l'image du temps précédent. L'analyse de la récupération de la fluorescence après photoblanchiment a été réalisée à l'aide du plugin FRAP profiler dans le logiciel Fiji (laboratoire Jeff Hardin). Le temps de demi-récupération et la phase mobile ont été calculées à l'aide de l'équation $I_N(t) = F_m \times (1 - e^{-t/\tau})$, où F_m est la fraction mobile et τ est la constante de temps. La fraction mobile est calculée comme $F_i = 1 - F_m$ et le temps de demi-récupération comme $t_{1/2} = -\ln(0,5/\tau)$.

2.11 Statistiques

L'ensemble des résultats est représenté par la moyenne des données extraites sous forme d'histogramme ou de boîte à moustaches. La significativité des différences a été évaluée par des t-test bilatéraux de Welch (Excel, Microsoft). Il s'agit d'un test t de Student prenant en compte l'inégalité des variances de deux échantillons comparés.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 *rga-7*, régulateur de l'exocytose et/ou du recyclage de HMR-1 de façon mécanosensible

3.1.1 *rga-7* régule l'accumulation et la structuration de HMR-1 en phase tardive d'extension de la jonction

Les embryons de vers *rga-7(ok1498)*, mutants pour *rga-7*, présentent des défauts de fermeture ventrale. Cette mutation, localisée au niveau de la séquence codante pour le domaine RhoGAP de RGA-7, est une délétion de 577 pb à l'origine d'une modification du cadre de lecture invalidant sa fonction GAP (Figure 1.17). Une majorité des embryons mutants arrive à passer la première étape de la fermeture ventrale *i.e.* la migration des cellules meneuses ventrales controlatérales vers la ligne médiane ventrale. Cependant, ces embryons présentent également des défauts dans l'extension de la jonction avec une distribution spatiale perturbée de la GTPase Rho CDC-42 sous son état actif (Ouellette *et al.*, 2016). Cette dernière est l'un des régulateurs majeurs de l'endocytose des complexes jonctionnels (Delva et Kowalczyk, 2009 ; Georgiou *et al.*, 2008 ; Izumi *et al.*, 2004 ; Shen *et al.*, 2008).

Afin de déterminer le rôle de *rga-7* dans la formation et l'extension de la jonction formée après contact des deux cellules meneuses, nous avons suivi la fermeture

ventrale d'embryons de vers exprimant des fusions traductionnelles des protéines jonctionnelles avec des protéines fluorescentes, dans un contexte mutant pour *rga-7* ou dans un contexte sauvage. Les protéines fluorescentes utilisées sont la GFP (*Green fluorescent protein*, verte) et la protéine dsRed (rouge). Les protéines sélectionnées, pour suivre la formation et la maturation de la jonction, sont issues des deux complexes protéiques majeurs du *C. elegans* formant le complexe jonctionnel apical (*CeAJ*), soit les complexes CCC et DAC. Pour le complexe CCC, les deux protéines sont HMR-1 et HMP-1, homologues de la E-cadhérine et de l'alpha-caténine, respectivement. Pour le complexe DAC, il s'agit des protéines DLG-1 et AJM-1 qui sont spécifiques au *C. elegans*. Pour étudier ces quatre protéines jonctionnelles dans un contexte mutant pour *rga-7*, des hermaphrodites des souches exprimant chacune des protéines jonctionnelles ont été croisés avec des mâles *rga-7(ok1498)*. La progénie homozygote issue de chaque croisement a été isolée par crible PCR pour la mutation de *rga-7* et par fluorescence pour l'expression de la version fluorescente des protéines HMR-1, HMP-1, DLG-1 et AJM-1.

La fermeture ventrale a été suivie par microscopie confocale à haute vitesse de type *swept-field* afin d'éviter la cytotoxicité liée à l'observation de longue durée de processus biologiques *in vivo*. Le premier contact entre les cellules meneuses hypodermiques est considéré comme le temps 0 pour l'ensemble des analyses. Après la migration, au point de rencontre des deux cellules meneuses, les protéines jonctionnelles commencent à s'accumuler et ce jusqu'à 4 minutes; il s'agit de la phase précoce (Figure 3.1.a). À partir de ce moment, la jonction commence à se structurer. Cette structuration est associée à la formation de clusters de protéines jonctionnelles. La jonction présente des zones très concentrées en protéines (cluster) ou moins concentrée (entre clusters). Elle va ensuite se remodeler afin de maintenir la structure formée au cours de la fermeture ventrale. Cette phase est appelée la phase tardive d'extension (Figure 3.1.a). La jonction s'allonge tout au long du processus. Dans notre étude, un cluster est défini comme étant une concentration locale de

protéines, formant un *punctum* fluorescent le long de la jonction (Figure 3.1.b). Dans un premier temps, l'accumulation à la jonction des protéines jonctionnelles fluorescentes lors des deux phases a été étudiée. Dans un second temps, afin de quantifier la structuration associée à la maturation de la jonction, deux méthodes de mesures ont été évaluées : (i) la densité de clusters (nb de cluster / μm de jonction) et (ii) l'anisotropie (ratio entre l'intensité maximale et minimale de la jonction) (Figure 3.1.b). L'ensemble des résultats est divisé entre la phase précoce (0-2 minutes) et la phase tardive (4-12 minutes) d'extension (Figure 3.1.d).

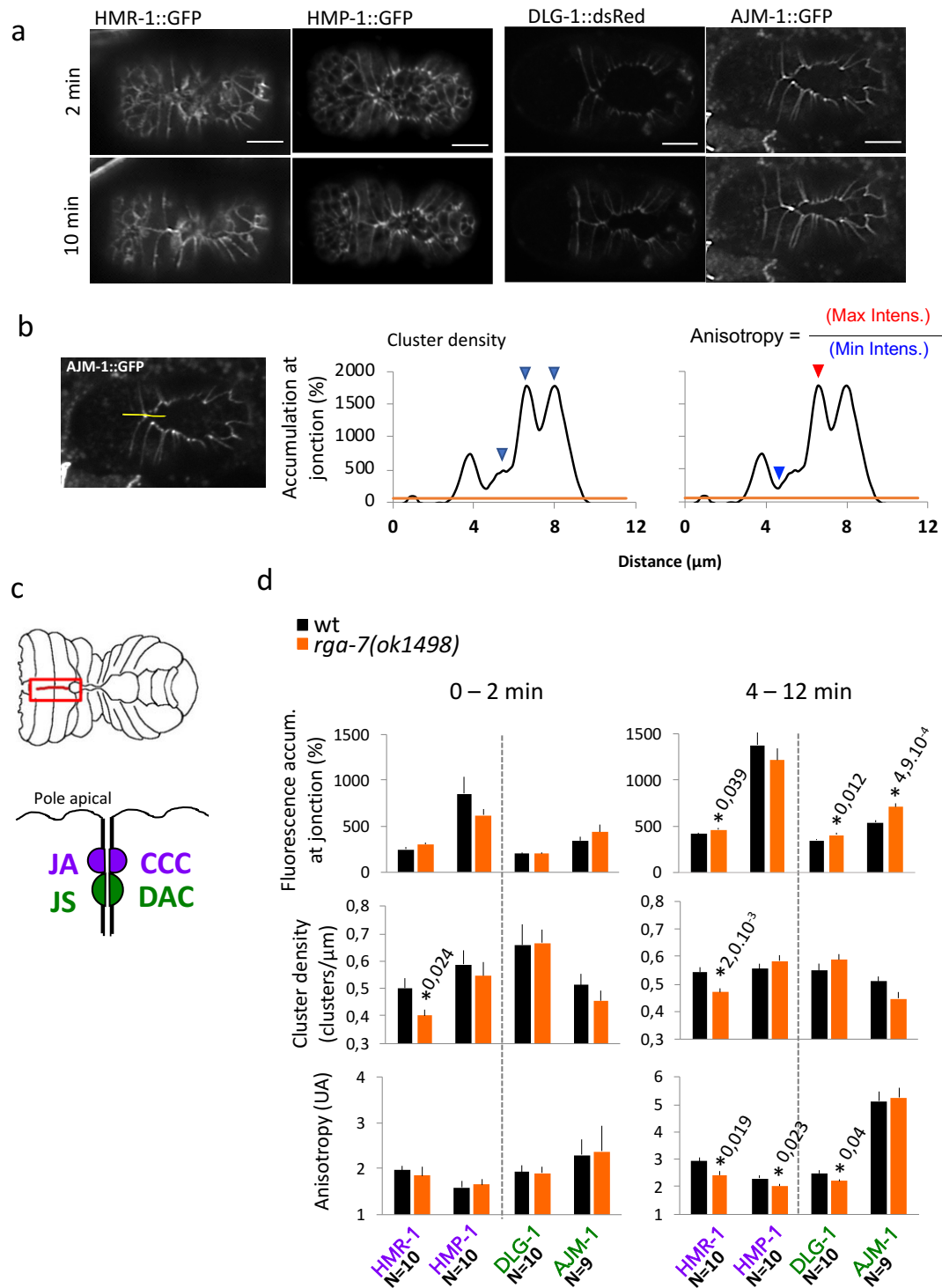


Figure 3.1 *rga-7* régule l'accumulation et la structuration de HMR-1 en phase tardive d'extension de la jonction.

a. Images représentant des embryons sauvages de *C. elegans* en phase précoce et phase tardive d'extension de la jonction exprimant les transgènes fluorescents des protéines jonctionnelles. HMR-1 et HMP-1 appartenant au complexe CCC et DLG-1 et AJM-1 appartenant au complexe DAC. Échelle : 10 μ m b. Graphique représentant les caractéristiques utilisées pour décrire la structure de la jonction : la densité de cluster et l'anisotropie. c. Schéma représentant un embryon de *C. elegans* en phase tardive d'extension de jonction. La jonction étudiée est marquée en rouge (haut). Schéma représentant la localisation des deux complexes jonctionnels CCC (vert) et DAC (violet) par rapport au pôle apical des cellules. d. Histogrammes représentant l'accumulation à la jonction, la densité de clusters et l'anisotropie en phase précoce (0-2 min) et en phase tardive (4-12 min) d'extension de la jonction pour les quatre protéines fluorescentes dans un fond génétique sauvage ou mutant pour *rga-7*. 10 embryons pour chaque condition ont été analysés excepté pour AJM-1 (N=9) *- t-test de Welch $p < 0,05$.

En phase précoce d'extension, l'absence de *rga-7* n'influence pas l'accumulation à la jonction des différentes protéines jonctionnelles et n'a aucun effet significatif sur leur distribution le long de la jonction naissante, à l'exception de la densité de cluster de HMR-1::GFP, qui est diminuée de façon significative chez le mutant *rga-7(ok1498)* lorsque comparé au sauvage (Figure 3.1.d). En revanche, en phase tardive d'extension de la jonction, une augmentation significative de l'accumulation des protéines du complexe jonctionnel DLG-1/AJM-1 ainsi que de HMR-1::GFP est observable chez les embryons *rga-7(ok1498)* par rapport aux sauvages (Figure 3.1.d). La densité de clusters, quant à elle, n'est pas affectée par l'absence de *rga-7* excepté pour HMR-1::GFP (Figure 3.1.d). D'autre part, l'anisotropie des protéines du complexe Cadherine/Caténine et de DLG-1 est significativement diminuée dans les mutants *rga-7* par rapport au sauvage (Figure 3.1.d).

L'ensemble de ces résultats suggère qu'en absence de *rga-7*, la plupart des protéines jonctionnelles s'accumuleraient plus à la jonction en phase tardive d'extension. Les résultats suggèrent également que la structuration de ces protéines jonctionnelles serait moins définie, c'est-à-dire que leurs distributions seraient plus homogènes le long de la jonction en cours de maturation. Cela permet donc d'émettre l'hypothèse que RGA-7 aurait un rôle dans la régulation soit positive de l'endocytose, soit négative des voies de recyclage/exocytose. En effet, dans les deux cas, si RGA-7

activerait l'endocytose ou inhiberait l'exocytose et/ou le recyclage de HMR-1, sa délétion fonctionnelle impliquerait une augmentation de l'accumulation de HMR-1 à la jonction. La diminution de la structure de la jonction liée à la diminution de l'anisotropie et du nombre de clusters, dans les embryons mutants *rga-7(ok1498)* en comparaison aux sauvages, suggère que les fonctions moléculaires de RGA-7 sur la régulation du trafic de HMR-1 joueraient un rôle sur la distribution spatiale de cette protéine le long de la jonction et donc sur la structure de la jonction en cours de maturation.

3.1.2 *rga-7* inhibe l'exocytose ou le recyclage de HMR-1 en phase tardive d'extension de la jonction

Pour discriminer la fonction de *rga-7* dans la régulation du trafic des protéines membranaires et donc de l'accumulation des protéines jonctionnelles à la membrane, la technique de FRAP a été utilisée. Cette technique consiste à photoblanchir une région d'intérêt fluorescente, soit la jonction, et de suivre la récupération de la fluorescence au cours du temps (Figure 3.2.a). Elle permet donc de mesurer la cinétique de diffusion moléculaire de la protéine d'intérêt et renseigne sur la dynamique de la protéine fluorescente photoblanchie dans la zone d'intérêt, soit sur les fractions mobile et immobile de la protéine photoblanchie ainsi que le temps de demi-récupération qui consiste au temps nécessaire pour parvenir à la moitié de la fluorescence atteinte au plateau (intensité finale) (Figure 3.2.a). La suite des expériences se concentre sur la protéine fluorescente HMR-1::GFP qui est l'orthologue de la E-cadhérine chez les mammifères. La cinétique de diffusion est, dans cette étude, associée à une cinétique de transport de HMR-1::GFP entre des compartiments intracellulaires et la jonction cellule-cellule.

Les jonctions cellule-cellule sont dynamiques; de leur formation à leur maintien. Cette dynamique est observable par la mobilité des cadhérines, principal constituant

des jonctions adhérentes. En outre, une étude *ex vivo*, en culture cellulaire, a montré que des jonctions cellulaires non-matures présentent une fraction immobile de E-cadhérine beaucoup plus faible que les jonctions matures qui elles sont déjà structurées (de Beco *et al.*, 2009). Afin de s'assurer que notre système *in vivo* de formation de jonction présente des caractéristiques similaires à celles précédemment décrites, des expériences de FRAP ont été réalisées sur des embryons sauvages exprimant HMR-1::GFP présentant une jonction mature (10 minutes après contact des cellules meneuses; N=18) ou non (2 minutes après contact des cellules meneuses; N=15) (Figure 3.2.b). Les jonctions non-matures et matures présentent le même temps de demi-récupération, cependant leur fraction immobile est significativement différente. En effet, la jonction mature (10 minutes) présente 37,09 % de fraction immobile de HMR-1 alors que la jonction immature (2 minutes) présente une fraction immobile de HMR-1 de 11,76 % (Figure 3.2.b). Ces résultats suggèrent que (i) la cinétique de transport de HMR-1 entre des compartiments cytoplasmiques et la jonction sont similaires en phase précoce et tardive de la formation de la membrane, et que (ii) la maturation de la jonction entraîne une immobilisation de HMR-1 à la jonction, ce qui est en accord avec la littérature concernant l'assemblage de réseau d'actine au niveau de clusters de E-cadhérine réduisant leur mobilité (Wu *et al.*, 2015). La formation de la jonction à la ligne médiane ventrale lors de la fermeture ventrale de l'embryon du *C. elegans* est donc un excellent modèle pour étudier la dynamique de formation et de maturation des jonctions par FRAP et suggère une conservation de ces mécanismes entre le *C. elegans* et d'autres modèles animaux et cellulaires.

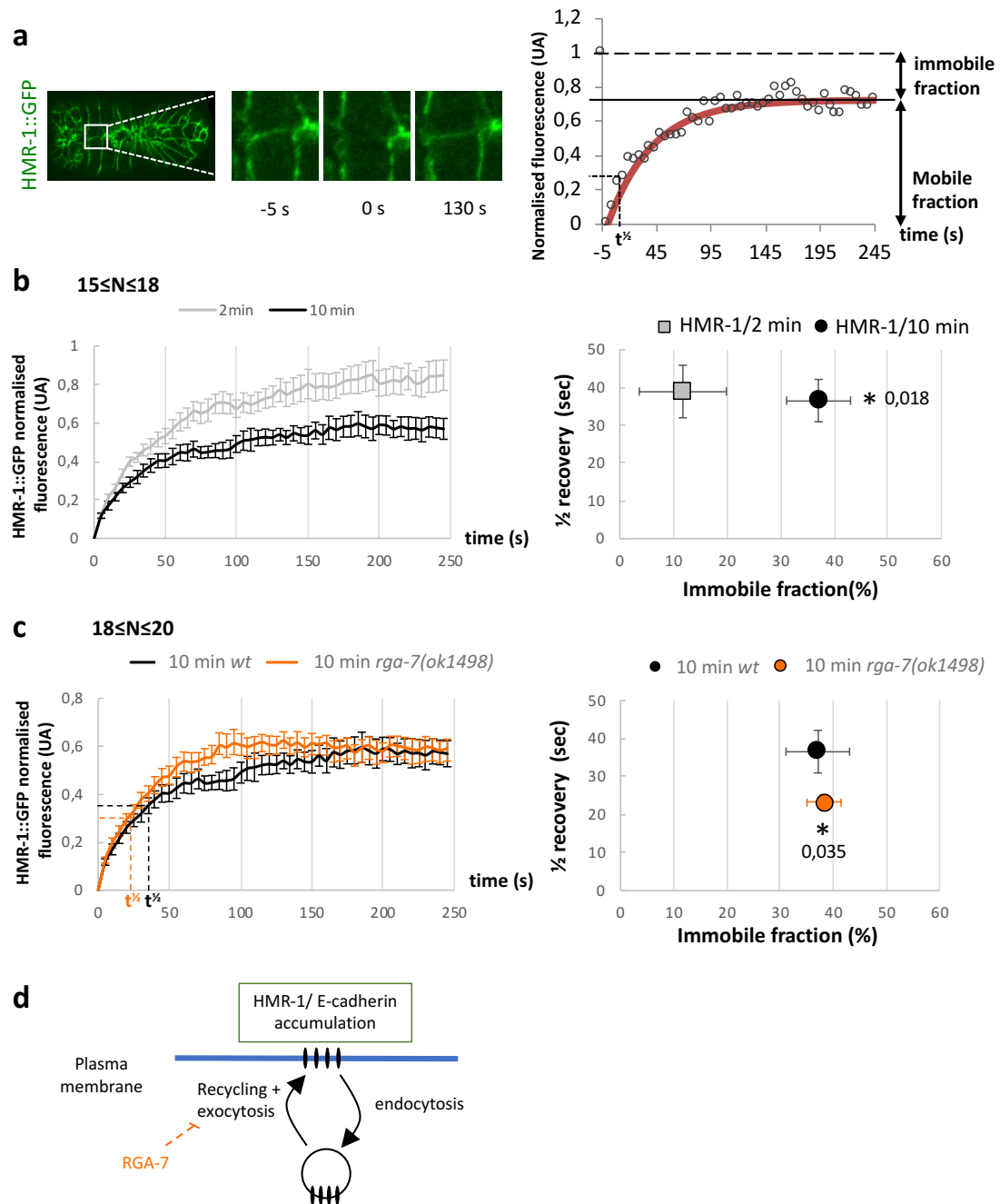


Figure 3.2 *rga-7* inhibe l'exocytose et/ou le recyclage de HMR-1 en phase tardive d'extension de la jonction.

a. Grossissement de la jonction d'un embryon exprimant HMR-1::GFP 5 secondes avant, au temps 0 et à 130 secondes après photoblanchiment (gauche). Graphique représentant une courbe de récupération après photoblanchiment et les caractéristiques extraites à partir de ce graphique les fractions mobile et immobile et le temps de demi-récupération. b. Graphique montrant la moyenne des courbes de récupération de jonctions précoces (2 min, gris) ou tardives (10 min, noir) d'embryons sauvages exprimant HMR-1::GFP (gauche). Graphique représentant le temps de demi-récupération en fonction du pourcentage de fraction immobile pour la jonction précoce (carré gris) et la jonction tardive (rond noir). c. Graphique montrant la moyenne des courbes de récupération de jonction tardive sauvage (noir) ou *rga-7(ok1498)* (orange) d'embryons exprimant HMR-1::GFP (gauche). Graphique représentant le temps de demi-récupération en fonction du pourcentage de fraction immobile pour la jonction tardive sauvage (rond noir) et *rga-7(ok1498)* (rond orange). d. Schéma représentant l'hypothèse que *rga-7* inhibe l'exocytose ou le recyclage de HMR-1 à la jonction. Entre 15 à 20 embryons ont été analysés pour chaque condition *- t-test de Welch $p < 0,05$.

À la suite de la validation de notre méthode, la fonction de *rga-7* sur la dynamique du transport de HMR-1 lors de la maturation de la jonction a été étudiée. Pour cela, les jonctions matures (10 minutes) d'embryons exprimant HMR-1::GFP (N=18) ou HMR-1::GFP dans un fond génétique *rga-7(ok1498)* (N=20) ont été photoblanchies. Ceci a révélé que le changement de fond génétique n'avait pas d'effet sur la fraction immobile de HMR-1 présente à la jonction (Figure 3.2.c). En revanche, le temps de demi-récupération de fluorescence de HMR-1 à la jonction photoblanchie est significativement plus faible pour les embryons *rga-7(ok1498)* comparés aux embryons sauvages (Figure 3.2.c). Nous avons précédemment supposé que *rga-7* pourrait soit réguler positivement l'endocytose ou négativement l'exocytose et/ou le recyclage de HMR-1. Ces deux possibilités se traduiraient par des résultats différents pour les expériences de FRAP. Soit, *rga-7* régulerait de façon positive l'endocytose, alors en son absence l'endocytose s'effectuerait de façon moins efficace ayant pour conséquence, un temps de demi-récupération plus long à la suite d'un photoblanchiment. Soit, *rga-7* régulerait de façon négative l'exocytose et/ou le recyclage des protéines jonctionnelles, c'est-à-dire qu'en son absence l'inhibition de l'exocytose de HMR-1 serait levée et le temps de demi-récupération serait plus court. Les résultats issus des expériences de FRAP suggèrent donc que *rga-7* inhiberait

l'exocytose et/ou le recyclage de HMR-1 à la membrane apicale épithéliale en phase tardive d'extension de la jonction (Figure 3.2.d).

3.1.3 *rga-7* possède une fonction mécanosensible et régule la structure de la jonction en phase tardive d'extension

Il a récemment été montré que l'accumulation à la jonction des E-cadhérines peut être régulée par des forces mécaniques appliquées à des doublets de cellules (Engl *et al.*, 2014). En effet, lorsque la jonction est sous tension, la myosine non musculaire II s'accumule à la jonction, ce qui va permettre une stabilisation des filaments d'actine et par conséquent une stabilisation de l'accumulation des cadhérines à la jonction (Figure 1.13). Un autre régulateur connu de la dynamique du cytosquelette d'actine est la protéine WASP/WSP-1, un effecteur de la GTPase CDC-42, qui va interagir avec d'autres protéines afin de moduler la stabilité du cytosquelette d'actine (Martinez-Quiles *et al.*, 2001 ; Sawa *et al.*, 2003). Sachant que nous avons précédemment montré que les fonctions de *wsp-1* et de *rga-7* régulent de façon synergique l'accumulation de filaments d'actine à la jonction lors de son extension pendant la fermeture ventrale (Ouellette *et al.*, 2016), cela suggère un rôle potentiel pour *rga-7* dans la régulation de l'accumulation des cadhérines à la jonction dans un contexte mécanique.

Comme précédemment décrit dans l'introduction (§ 1.3.1.), des systèmes d'induction de pression ont déjà été utilisés sur des embryons de *C. elegans* et de drosophile, montrant un renforcement de la réponse cellulaire aux jonctions face à un stress mécanique (Pinheiro *et al.*, 2017 ; Sumi *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2011). Dans notre étude, un nouveau système expérimental a été mis en place pour étudier le rôle de *rga-7* dans l'accumulation des E-cadhérines lors de la phase tardive d'extension de la jonction dans des conditions mécaniques différentes (Figure 3.3.a). Communément, les embryons et les vers sont imaged par microscopie entre lame et lamelle sur un

coussin d'agarose avec le milieu minimum liquide pour la survie des vers et embryons, soit le tampon M9 (§ matériel et méthodes) (Martin *et al.*, 2016b ; Walston et Hardin, 2010). Pour cela, un pourcentage d'agarose de 3 % est utilisé, il s'agit de la condition utilisée dans les deux précédentes expériences. Afin de générer deux conditions opposées de stress mécanique, des embryons ont été placés entre lame et lamelle sur un coussin d'agarose. Le pourcentage d'agarose a été diminué à 1 % formant ainsi un système avec peu de stress mécanique, ou augmenté à 9 % formant un système avec un stress mécanique élevé appliqué sur l'embryon. Les embryons maintenus sur des coussins à 1 % d'agarose sont peu écrasés entre la lamelle de verre et le coussin d'agarose (Figure 3.3.a). En outre, ils présentent une morphologie en forme de haricot, qui est la forme typique associée au stade de fermeture ventrale (Figure 3.3.a). À l'opposé, les embryons placés sur des coussins à 9 % d'agarose apparaissent très écrasés, plus aplatis et la forme en haricot n'est pas distinguable (Figure 3.3.a) indiquant qu'effectivement une pression mécanique est appliquée sur l'embryon.

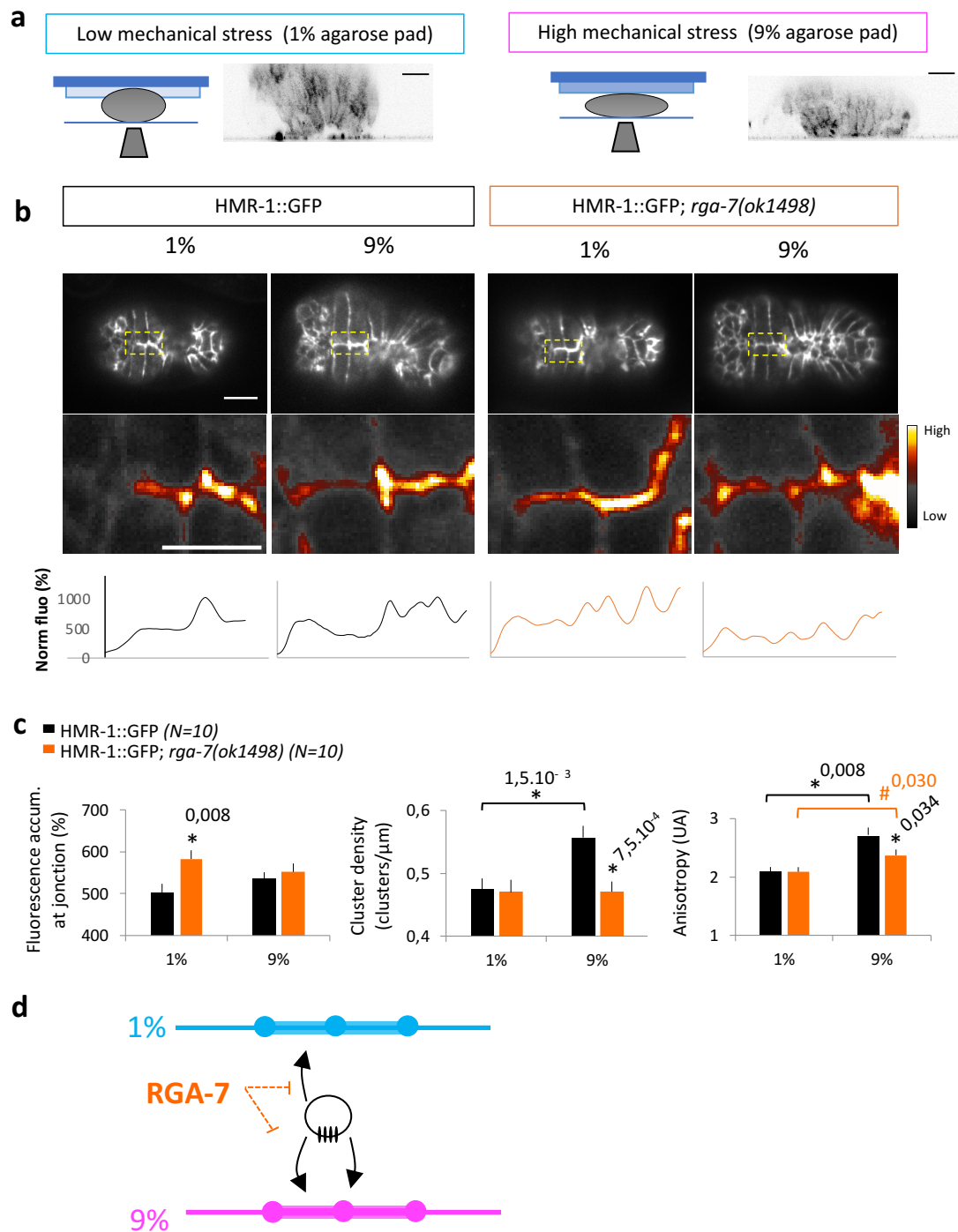


Figure 3.3 *rga-7* possède une fonction mécanosensible et régule la structure de la jonction en phase tardive d'extension.

a. Schéma du protocole expérimental utilisé pour induire un contexte de stress mécanique différent. Les embryons sont imagés sur des coussins d'agarose moins (1 %) ou plus (9 %) durs. Une projection dans le z d'embryons de *C. elegans* exprimant *lin-26p::VAB-10(ABD)::mCherry* (actine) pendant la phase tardive d'extension de la jonction dans un contexte mécanique faible ou élevé permet de visualiser la perte de morphologie typique en forme d'haricot des embryons placés sur un coussin de 9%. **b.** Grossissement de la jonction en expansion en phase tardive de HMR-1 dans un fond génétique sauvage ou *rga-7(ok1498)* dans un contexte de stress mécanique faible et élevé sous lequel le profil d'intensité de fluorescence de la jonction est montré. Échelle : 5 μ m. **c.** Histogrammes représentant l'accumulation à la jonction, la densité de clusters et l'anisotropie de HMR-1 en phase tardive d'extension d'embryons sauvages (noir) ou *rga-7(ok1498)* (orange) dans les deux contextes de stress mécanique. **d.** Schéma récapitulatif représentant l'hypothèse que *rga-7* inhibe l'accumulation de HMR-1 de façon globale à faible stress mécanique et inhibe l'accumulation probablement de manière plus spécifique à haut stress mécanique. 10 embryons ont été analysés pour chaque condition *- t-test de Welch $p < 0,05$.

La fermeture ventrale a été suivie comme précédemment et l'accumulation à la jonction, la densité de clusters et l'anisotropie ont été mesurées au cours de l'extension de la jonction dans les deux contextes de stress mécanique. En phase tardive d'extension, dans un contexte de faible stress mécanique (1 %), l'accumulation de HMR-1::GFP à la jonction est significativement plus importante en absence de *rga-7*, mais la densité de clusters et l'anisotropie ne sont pas modifiées (Figure 3.3.a, 3.3.c). L'élévation du stress mécanique (9 % agarose) sur les embryons sauvages provoquent une augmentation significative de la densité de clusters de 0,47 cluster/ μ m (1 %) à 0,56 cluster/ μ m (9 %), tandis que les embryons *rga-7(ok1498)* ne sont pas affectés (Figure 3.3.c). L'anisotropie, quant à elle, augmente de façon significative lorsque les embryons sont soumis à un stress mécanique élevé que ce soit dans un fond génétique sauvage ou *rga-7(ok1498)* (Figure 3.3.c). En absence de *rga-7*, cette augmentation est cependant moins prononcée (Figure 3.3.c).

Ces résultats suggèrent que, dans notre modèle de phase tardive d'extension de jonction au cours de la fermeture ventrale, *rga-7* aurait une fonction mécanosensible (dépendante du niveau de stress mécanique appliqué sur l'embryon). Elle inhiberait l'accumulation de HMR-1 à la jonction en condition de faible tension appliquée sur la

jonction et régulerait positivement la structuration de la jonction en condition de forte tension appliquée sur la jonction (Figure 3.3.d). L'augmentation de la structuration de la jonction se ferait en augmentant le nombre de clusters de HMR-1/E-cadhérine le long de la jonction et la concentration de HMR-1 au niveau de ces clusters. Considérant le rôle suggéré par nos résultats pour *rga-7* dans l'inhibition de la voie d'exocytose/recyclage de HMR-1 à la jonction, ces résultats suggèrent que *rga-7* augmenterait la structuration de la jonction en inhibant les voies d'exocytose/recyclage de HMR-1 à des endroits spécifiques de la jonction, donc très certainement entre les clusters (Figure 3.3.d). Il est à noter que la même étude a été effectuée pour la phase précoce de la formation de la jonction, et qu'aucune différence n'a été observée quant à la jonction de HMR-1 dans des fonds génétiques sauvage et *rga-7(ok1498)* à faible et forte condition de stress mécanique (Figure 3.5).

Afin de mieux comprendre les mécanismes permettant à *rga-7* de contrôler le niveau de structuration de la jonction en réponse à un stress mécanique appliqué sur cette jonction, l'accumulation de HMR-1 a été étudiée. D'abord, au niveau des clusters (flèche rouge) *i.e.* à chaque maximum de la jonction et entre les clusters (noir) correspondant à la fluorescence de la jonction exceptée aux clusters (Figure 3.4.a). Puis, afin d'affiner l'étude d'accumulation de HMR-1 entre les clusters, cette zone a été subdivisée en 3 zones : (i) autour des clusters (bordeaux) correspondant à la fluorescence autour des clusters sur une distance de 477 nm, (ii) au minimum de fluorescence situé entre deux clusters de la jonction (flèche bleue) et (iii) entre la limite de la zone autour du cluster et le minimum de fluorescence (vert) (Figure 3.4.a).

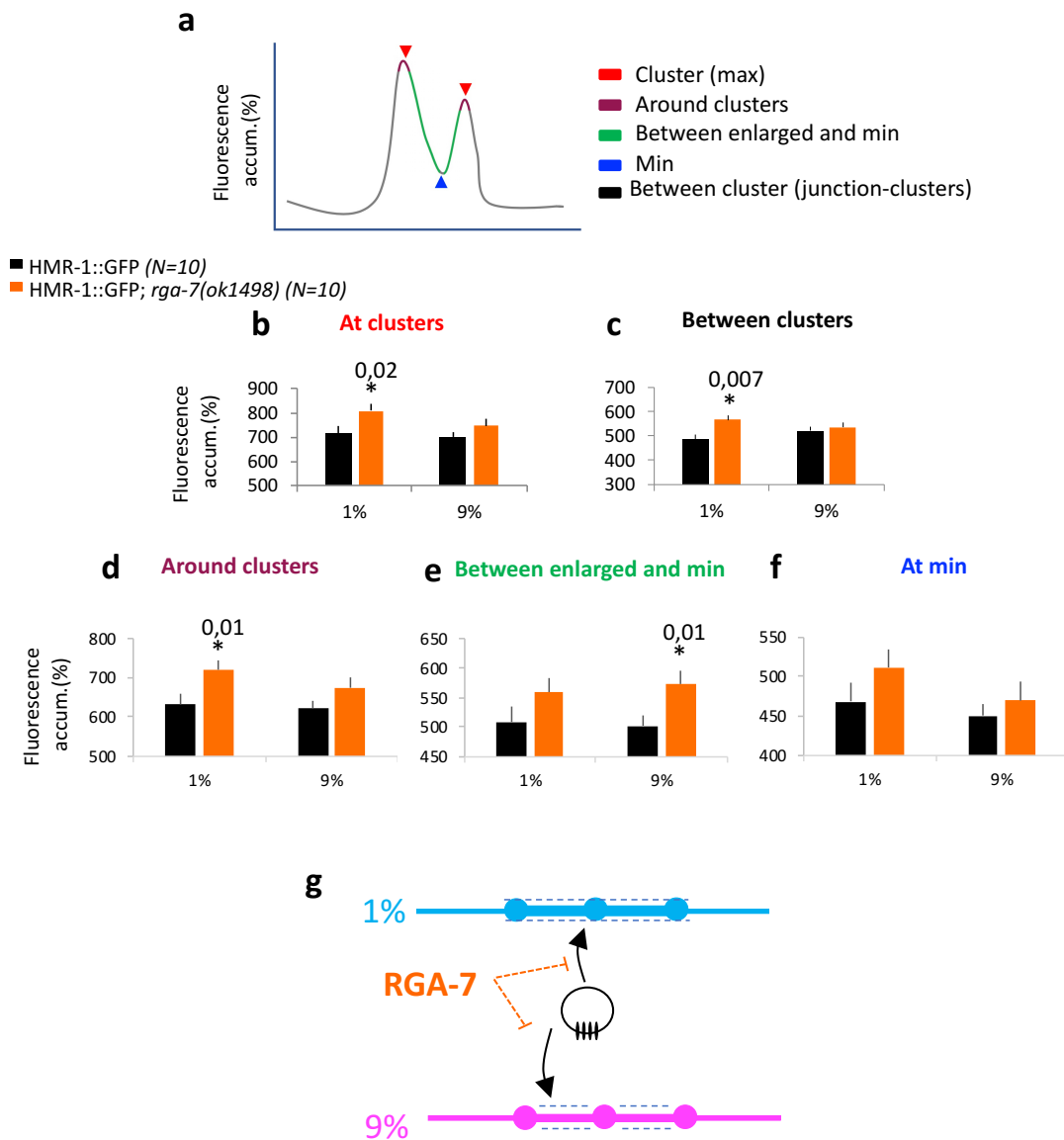


Figure 3.4 *rga-7* régule l'accumulation de HMR-1 à des zones jonctionnelles spécifiques selon le contexte mécanique.

a. Schéma localisant les différentes zones jonctionnelles étudiées *i.e.* les clusters (flèche rouge); entre les clusters (jonction – clusters = bordeaux+ vert + bleu); autour des clusters (bordeaux); au minima d'intensité de fluorescence (bleu); entre limite de la zone autour des clusters et le minimum de fluorescence (vert). b-f. Histogrammes représentant l'accumulation de fluorescence de HMR-1 de jonctions sauvages (noir) ou *rga-7(ok1498)* (orange) en phase tardive d'extension à faible (1 %) ou à haut (9 %) stress mécanique aux clusters b; entre les clusters c; autour des clusters d; entre limite de la zone autour des clusters et les minima e; aux minima f. g. Schéma représentant l'hypothèse que *rga-7* inhibe spécifiquement

l'accumulation aux clusters et entre les clusters dans un contexte de faible stress mécanique, alors que *rga-7* inhibe spécifiquement la localisation de HMR-1 entre les clusters quand le stress mécanique élevé. 10 embryons ont été analysés pour chaque condition *- t-test de Welch $p < 0,05$.

L'accumulation aux clusters et entre les clusters est augmentée de façon significative en absence de *rga-7* et ce, exclusivement en présence d'un faible stress mécanique (Figure 3.4.b, 3.4.c). En étudiant des localisations plus spécifiques de la jonction, l'augmentation significative entre les clusters à 1 % dans les mutants *rga-7(ok1498)* par rapport aux embryons sauvages, est principalement due à l'augmentation significative de l'accumulation autour des clusters de HMR-1::GFP passant de 632,53 % (sauvage) à 720,44 % (*rga-7(ok1498)*) (Figure 3.4.d). Aucune différence d'accumulation n'est observable aux minima de fluorescence des jonctions quel que soit le contexte mécanique et fond génétique étudié (Figure 3.4.f). Cependant, dans un contexte élevé de stress mécanique, l'accumulation de HMR-1::GFP est significativement augmentée en absence de *rga-7*, lorsque comparé aux embryons sauvages, entre les minima et la limite de la zone autour des clusters (Figure 3.4.d). Les analyses pour la phase précoce ont également été effectuées mais aucune différence significative n'est observée (Figure 3.5).

L'ensemble de ces résultats suggère qu'en phase tardive d'extension de la jonction, *rga-7* inhibe l'accumulation de HMR-1 aux clusters et autour de ceux-ci lorsque le stress mécanique est faible, alors que lorsque le stress mécanique augmente, *rga-7* inhibe l'accumulation de HMR-1 entre la limite de la zone autour des clusters et les minima de fluorescence le long de la jonction. Ce changement d'inhibition locale le long de la jonction, selon le stress mécanique, permettrait ainsi de mieux structurer la jonction de façon globale en définissant mieux les clusters (Figure 3.4.g). Ces résultats supportent donc notre hypothèse décrite plus haut.

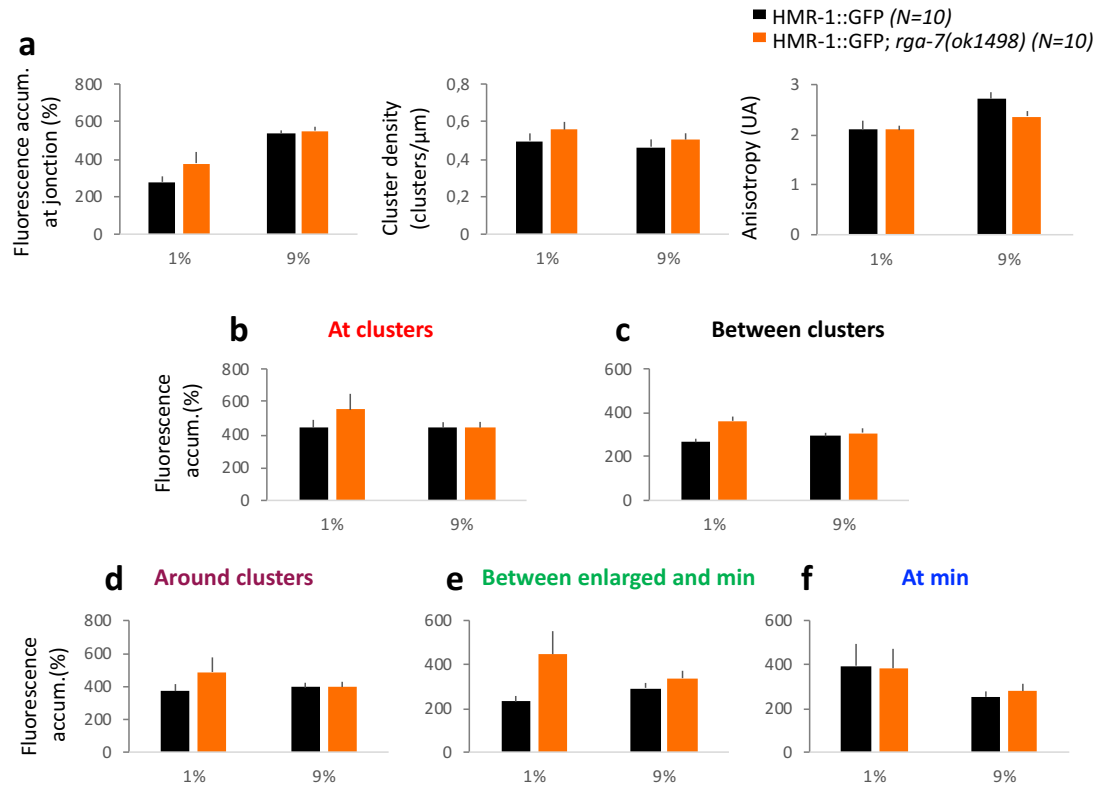


Figure 3.5 *rga-7* ne régule pas la structure de la jonction en phase précoce d'extension.

a. Histogrammes représentant l'accumulation à la jonction, la densité de clusters et l'anisotropie de HMR-1 en phase précoce d'extension d'embryons sauvages ou *rga-7(ok1498)* dans les deux contextes de stress mécanique. b-f. Histogrammes représentant l'accumulation de fluorescence de HMR-1 de jonctions sauvages (noir) ou *rga-7(ok1498)* (orange) en phase précoce d'extension à faible ou haut stress mécanique aux clusters b; entre les clusters c; autour des clusters d; entre la limite de la zone autour des clusters et le minimum de fluorescence e; aux minima f. 10 embryons ont été analysés pour chaque condition *- t-test de Welch $p < 0,05$.

3.2 Régulation par *rga-7* sous stress mécanique des composants jonctionnels lors de la phase tardive d'extension de la jonction

3.2.1 L'accumulation des régulateurs de l'accumulation de HMR-1 à la jonction et leur localisation varie selon le contexte mécanique

Afin de mieux décrire la voie de signalisation impliquée par *rga-7* dans la régulation de l'accumulation de HMR-1 dans un contexte mécanique changeant, plusieurs acteurs ont été étudiés. L'ensemble de l'étude a été réalisé à un temps spécifique de la phase tardive d'extension de la jonction, soit 10 minutes après le contact des deux cellules meneuses. Ceci permet d'étudier un plus grand nombre de conditions et d'avoir une meilleure homogénéité au niveau des résultats.

Dans un premier temps, l'impact de l'augmentation du niveau de stress mécanique sur HMR-1, NMY-2, RGA-7 et une sonde pour la forme active de CDC-42 (liée au GTP) a été étudié chez des embryons sauvages. Tel que décrit précédemment, HMR-1 est l'orthologue de la E-cadhérine chez les mammifères dont la stabilisation de clusters à la jonction est favorisée sous tension mécanique (Engl *et al.*, 2014). La protéine NMY-2 (*non-muscle myosin II*) est une chaîne légère de myosine faisant partie du cytosquelette d'actine-myosine. Elle est associée à la tension corticale et aide à la stabilisation des clusters de E-cadhérine quand la jonction est sous tension, en s'y accumulant (Engl *et al.*, 2014). Afin d'étudier la GTPase CDC-42 sous sa forme active, le domaine CRIB de WSP-1, effecteur de CDC-42, a été utilisé comme sonde. Il s'agit du domaine de WSP-1 qui permet son interaction avec CDC-42 sous sa forme active, *i.e.* liée au GTP. D'autre part, la RhoGAP RGA-7 est soit exprimée sous son promoteur endogène *rga-7lp*, soit exprimée sous un promoteur spécifique de l'hypoderme, *lin-26p*. Ce dernier implique une surexpression de *rga-7* dans l'hypoderme qui peut être associée à des effets biologiques. En effet, en général la surexpression de RhoGAPs entraîne une diminution du niveau d'activation de leurs GTPases cibles. Dans cette partie-ci, RGA-7 surexprimée dans l'hypoderme est

étudiée. Pour sa part, RGA-7 exprimée de manière endogène sera étudiée dans la troisième partie de l'étude.

Pour étudier l'impact de l'augmentation de niveau de stress mécanique à la jonction, quatre souches de vers ont été utilisées. La première, exprimant HMR-1::GFP et le domaine de liaison aux filaments d'actine de VAB-10 (VAB-10(ABD)) fusionné à la protéine fluorescente rouge mCherry sous promoteur spécifique de l'hypoderme *lin-26p*. Elle permet d'étudier les caractéristiques de HMR-1 et du cytosquelette d'actine à la jonction mature en même temps. La seconde souche co-exprime les protéines NMY-2 et DLG-1 (protéine du DAC), permettant de localiser la tension le long de la jonction et dans les cellules. La troisième souche exprime RGA-7::GFP et VAB-10(ABD)::mCherry, sous un promoteur spécifique de l'hypoderme, afin de visualiser RGA-7 à la jonction. Enfin, la dernière souche exprime également sous le même promoteur *lin-26p*, VAB-10(ABD)::GFP et WSP-1(CRIB)::mCherry, ce qui permet d'observer la forme active de CDC-42 (liée au GTP) à la jonction. La fermeture ventrale des souches utilisées a été suivie et 10 minutes après le contact initial des cellules meneuses et les embryons ont été analysés par microscopie confocale sous les deux contextes de stress mécanique (coussins de 1 % ou 9 % d'agarose). Dans un premier temps, la jonction en elle-même a été analysée à l'aide de la quantification de l'accumulation de la fluorescence à la jonction, la densité de clusters (nb cluster/ μm) et l'anisotropie ($I_{\text{max}}/I_{\text{min}}$). Il est à noter que la protéine jonctionnelle DLG-1 et la sonde VAB-10(ABD) sont utilisées comme référence pour la jonction. Par conséquent, seulement les résultats pour HMR-1, NMY-2, *lin-26p*::RGA-7m::GFP (*RGA-7_{surexp}*::GFP) et *lin-26p*::WSP-1(CRIB)::mCherry sont montrés.

Tout d'abord, à dix minutes de phase tardive d'extension, pour l'ensemble des acteurs (HMR-1, RGA-7, NMY-2 et WSP-1(CRIB)), la densité de clusters et l'anisotropie restent inchangées, quel que soit le stress mécanique appliqué (Figure 3.6.a). D'autre part, l'accumulation à la jonction de HMR-1::GFP et de *RGA-7_{surexp}*::GFP, diminue de façon significative à dix minutes après contact cellule-cellule lorsque le stress

mécanique augmente chez des embryons sauvages. À l'inverse, l'accumulation de NMY-2::GFP à la jonction est augmentée de façon significative sous un stress mécanique élevé (Figure 3.6.a). Cela montre qu'un remaniement de la composition de la jonction se produit quand la tension augmente, impliquant une diminution de RGA-7 et une augmentation de NMY-2. Il est à noter que l'accumulation de WSP-1(CRIB)::mCherry à la jonction demeure similaire à faible et haut stress mécanique (Figure 3.6.a-f), ce qui suggère que l'accumulation à la jonction de CDC-42 sous sa forme active est maintenue lorsque le stress mécanique augmente. D'autre part, lors de l'étude du rôle mécanosensible de *rga-7* en phase tardive d'extension de la jonction (4-12 minutes), l'accumulation à la jonction de HMR-1 ne différait pas significativement après l'augmentation du stress mécanique (Fig.3.3.c). Dans le contexte présent, soit spécifiquement à 10 minutes après contact cellule-cellule, une diminution de l'accumulation de HMR-1 à la jonction est observée lorsque le stress mécanique augmente, ceci est probablement dû à une réponse active de HMR-1/E-cadhérine. Il s'agit d'un phénomène qui a été déjà été montré dans des études antérieures dans des cultures cellulaires et des embryons de drosophile (Conway *et al.*, 2013 ; Sumi *et al.*, 2018 ; Yap *et al.*, 2018).

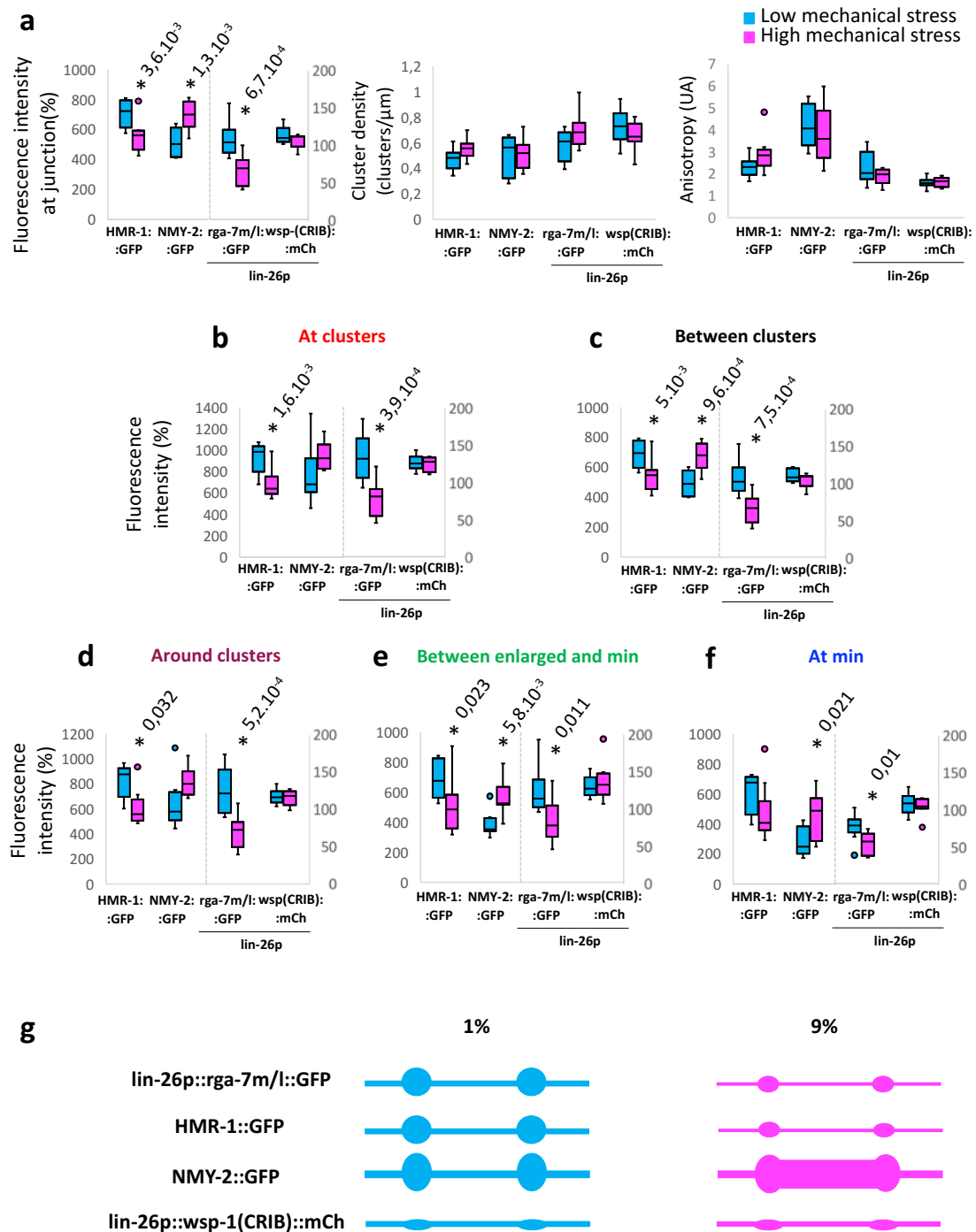


Figure 3.6 Modification de l'accumulation le long de la jonction en extension des régulateurs de la dynamique jonctionnelle de HMR-1 selon le contexte mécanique.

a. Boîte à moustaches représentant l'accumulation à la jonction, la densité de clusters et l'anisotropie de HMR-1, NMY-2, lin-26p::rga-7l-m::GFP, lin-26p::WSP-1(CRIB)::mCherry sous pression mécanique faible (bleu clair) ou élevée (fuchsia) au temps 10 minutes après le contact initial entre les cellules meneuses. b-f. Boîte à moustaches représentant l'accumulation de fluorescence de HMR-1, NMY-2, RGA-7 et WSP-1(CRIB) de jonctions sauvages en phase tardive d'extension (10 minutes) à faible (bleu clair) ou élevé (fuchsia) stress mécanique aux clusters b; entre les clusters c; autour des clusters d; entre la limite de la zone autour des clusters et les minima e; aux minima f. g. Schéma récapitulatif de l'effet de l'augmentation du stress mécanique à 10 minutes après contact entre les cellules meneuses lors de la fermeture ventrale. Entre 7 et 10 embryons ont été analysés pour chaque condition
*- t-test de Welch $p < 0,05$

Afin de mieux décrire l'accumulation des différentes protéines le long de la jonction, différentes zones jonctionnelles ont été étudiées : les clusters; entre les clusters *i.e.* la jonction complète excepté les clusters; autour des clusters (477 nm); au minimum de fluorescence et entre la limite de la zone autour des clusters et le minimum. Dans un contexte de stress mécanique élevé, l'accumulation de HMR-1::GFP aux clusters et entre ces derniers est significativement plus faible que dans un contexte de stress mécanique faible (Figure 3.4.a). L'accumulation de HMR-1 est également significativement plus faible autour des clusters et entre le minimum de fluorescence et la limite de la zone autour des clusters comparé à un faible stress mécanique (Figure 3.6.a-e). De plus, l'accumulation de HMR-1::GFP semble diminuer au minimum de fluorescence dans un contexte de tension élevée comparé à un contexte de faible tension, bien que cet effet ne soit pas significatif (Figure 3.6.f). La diminution de la différence d'accumulation entre les minima et le reste de la jonction pourrait expliquer l'absence de différence d'anisotropie de HMR-1::GFP lorsque la tension est augmentée à la jonction. L'accumulation de RGA-7_{surexp}::GFP, quant à elle, est diminuée de façon significative au niveau de toutes les zones jonctionnelles quand les embryons sont mis sur des coussins d'agarose de 9 %, donc RGA-7_{surexp}::GFP semble moins s'accumuler à la jonction quand le stress mécanique augmente (Figure 3.6.a-f). Pour sa part, lorsque la jonction est soumise à une tension élevée, NMY-2::GFP s'accumule significativement plus entre les clusters et plus spécifiquement entre la limite de la zone autour des clusters et les minima de

fluorescence et à ces mêmes minima lorsque comparé à la jonction soumise à un faible stress mécanique. De plus, il est important de noter que l'anisotropie de NMY-2::GFP est plus élevée (Anisotropie > 3) que l'anisotropie de HMR-1, RGA-7 et WSP-1(CRIB) (Anisotropie < 3), quel que soit le stress mécanique appliqué (Figure 3.6.a, droite). Ceci suggère que NMY-2 possède une grande structuration, qui est conservée malgré l'augmentation du stress mécanique (Figure 3.6 a-f). Il est également à noter que l'accumulation de WSP-1(CRIB)::mCherry n'est pas modifiée dans toutes les zones, quel que soit le contexte mécanique soumis (Figure 3.6 a-f), ce qui suggère que l'accumulation de la forme active de CDC-42 à la jonction n'est pas modifiée en condition de tension différente.

L'ensemble de ces résultats suggère que lorsque l'embryon est soumis à un stress mécanique élevé la composition de la jonction est modifiée. Plus précisément (i) HMR-1 et RGA-7_{surexp} sont moins accumulées, (ii) CDC-42 sous sa forme active est maintenue à la jonction alors que (iii) NMY-2 est plus accumulée au niveau de zones jonctionnelles moins denses en NMY-2 (Figure 3.6.g).

3.2.2 L'augmentation du stress mécanique modifie l'accumulation de HMR-1 et de ses régulateurs à la jonction et dans le cytoplasme

Considérant que nos résultats montrent que *rga-7* inhibe l'exocytose et/ou le recyclage de HMR-1 de façon spécifique aux clusters et autour des clusters dans un contexte de faible stress mécanique et entre la limite de la zone autour des clusters et les minima d'accumulation de HMR-1 dans un contexte de stress mécanique élevé, il devient crucial d'étudier la localisation des différents acteurs non seulement à la jonction, mais également leur distribution entre le cytoplasme (et les potentielles vésicules qu'il contient) et la membrane plasmique. Ceci permettra d'obtenir une vue d'ensemble du mécanisme impliqué. Pour cela, les embryons exprimant les protéines de fusions décrites plus haut (§ 3.2.1.), ont été analysés de nouveau, mais cette fois-

ci, en réalisant des profils d'intensité de fluorescence transversaux à la jonction à différents endroits de cette jonction. Ils sont espacés minimalement de 320 nm entre chaque profil et le premier profil est toujours le côté le plus antérieur de la jonction par rapport à l'embryon. Ainsi, l'ensemble de la jonction a pu être reconstituée en alignant l'ensemble des profils d'intensité par rapport au pic de fluorescence du profil d'intensité qui désigne la jonction. Les protéines de références, en fonction des souches utilisées, sont la sonde des filaments d'actine ou DLG-1. La moyenne d'intensité de fluorescence est représentée dans les deux conditions de tension par des graphiques où l'origine est le pic de la jonction (Figure 3.7.a-d). De plus, afin d'avoir une meilleure lecture de la différence d'accumulation des protéines de fusion entre les deux conditions de stress mécanique (Δ_{exp} (élevé-faible)), un histogramme représentant cette différence se situe sous chaque graphique de moyenne de profil d'intensité de fluorescence (Figure 3.7.a-d). Lorsque la différence d'accumulation est négative, les protéines s'accumulent moins à haut stress mécanique par rapport à un faible stress mécanique (barre bleue). De façon inverse lorsque la différence est positive (barre rouge), l'accumulation des protéines de fusion est plus grande quand la tension augmente. Une autre représentation, sous forme de *heatmap* a également été utilisée pour mettre en avant les différences d'accumulation entre la jonction et le cytoplasme (Figure 3.7.f). En outre, la jonction y est délimitée par une zone grise correspondant à une distance de 5 pixels (Figure 3.7.a-d).

Comme précédemment, l'accumulation de HMR-1::GFP à la jonction est significativement diminuée à la jonction lorsque les embryons sont soumis à un stress mécanique élevé (Figure 3.7.a). En revanche, au niveau du cytoplasme, HMR-1::GFP s'accumule de façon significative quand le stress mécanique augmente (Figure 3.7.a). De façon similaire, RGA-7::GFP surexprimée dans l'hypoderme est peu présent à la jonction sous tension mécanique élevée et s'accumule spécifiquement dans le cytoplasme d'une des deux cellules meneuses (Figure 3.7.c). La forme active de CDC-42 (WSP-1(CRIB)), quant à elle, est légèrement plus accumulée à la jonction

lorsque les embryons sont placés sur des coussins d'agarose à 9 %. Elle s'accumule également de façon spécifique dans le cytoplasme dans l'une des cellules meneuses (Figure 3.7.d). Pour sa part NMY-2, la myosine II, s'accumule plus à la jonction dans des conditions de stress mécanique élevé. Elle s'accumule aussi dans le cytoplasme proximal à la jonction mais de façon plus restreinte sur l'une des deux cellules meneuses lorsque comparé à la condition de faible stress mécanique (Figure 3.7.b). L'accumulation cytosolique de NMY-2, de RGA-7_{surexp} et de WSP-1(CRIB) (forme active de CDC-42) semble se retrouver dans la même cellule meneuse dans un contexte élevé de tension (Figure 3.7.b-d). Or, les protéines de référence pour la jonction des souches exprimant les trois régulateurs diffèrent. En effet la protéine de référence pour NMY-2 est DLG-1 alors que pour RGA-7_{surexp} et WSP-1(CRIB) il s'agit de la sonde de filaments d'actine VAB-10(ABD). DLG-1 est une protéine jonctionnelle qui s'accumule symétriquement de part et d'autre de la jonction contrairement aux filaments d'actine. Le côté présentant le moins d'accumulation de filaments d'actine (VAB-10(ABD)) a toujours été pris comme origine pour tracer les profils d'intensité de fluorescence transversaux (Figure 3.7.f). Cette différence de symétrie d'accumulation cytosolique des protéines de référence pour la jonction pourrait influencer la localisation de l'accumulation des régulateurs et plus particulièrement NMY-2.

Afin de mieux décrire cette asymétrie qui est révélée par l'étude des accumulations des protéines de fusion, un ratio entre la moyenne d'intensité de fluorescence de part et d'autre du pic de la jonction (point 0) a été réalisé et ce, pour les deux conditions de stress mécanique. Un ratio de 1 signifie que les protéines s'accumulent de façon symétrique alors qu'un ratio supérieur ou inférieur à 1 signifie une accumulation asymétrique des protéines à gauche (inférieur à 1) ou à droite (supérieur à 1) de la jonction (Figure 3.7.e). Les trois souches étudiées avec la sonde d'actine ont affiché un ratio d'environ 1,5, montrant une asymétrie de leur expression dans les cellules meneuses, quel que soit le stress mécanique appliqué sur les embryons (Figure 3.7.e).

Comme discuté plus haut, DLG-1 présente des ratios entre les intensités de fluorescence de part et d'autre de la jonction proche de 1 et ce, sous les deux conditions de stress mécanique. Ce résultat confirme l'expression symétrique de DLG-1 dans les deux cellules meneuses, quel que soit la tension de la jonction (Figure 3.7.e). Tout comme DLG-1, HMR-1 présente un ratio proche de 1 qui demeure conservé quand le stress mécanique change (Figure 3.7.e). NMY-2 présente un ratio supérieur à 1 qui est conservé lorsque le stress mécanique augmente (Figure 3.7.e), donc l'asymétrie d'expression dans les cellules meneuses est conservée même si la tension aux jonctions est différente. Le phénotype le plus marquant est celui de RGA-7 surexprimée dans l'hypoderme dont le ratio d'intensité de fluorescence augmente de façon significative lorsque le stress mécanique augmente (Figure 3.7.e). Ceci suggère que l'augmentation du stress mécanique promeut une expression non symétrique de RGA-7_{surexp}. Pour sa part, la forme active de CDC-42 conserve son asymétrie. Toutefois, un changement de cellule meneuse est observé lorsque le stress mécanique augmente; le ratio étant inférieur à 1 à faible stress mécanique et devient supérieur à 1 (Figure 3.7.e). Ceci suggère une conservation de l'asymétrie d'accumulation, mais dans différentes cellules meneuses. De plus, il est à noter que l'actine présente des profils d'expression différents selon la souche étudiée à faible niveau de stress mécanique, mais ceux-ci sont semblables à haut niveau de stress mécanique. Ceci suggère que l'augmentation du stress mécanique va stabiliser l'accumulation des filaments d'actine à la jonction.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'augmentation du stress mécanique joue un rôle dans la régulation de l'accumulation des protéines régulatrices de la dynamique jonctionnelle de HMR-1 à des zones spécifiques de la jonction. Elle permet également l'accumulation de RGA-7 et de la forme active de CDC-42 de façon non symétrique dans le cytoplasme proximal à la membrane dans une des deux cellules meneuses.

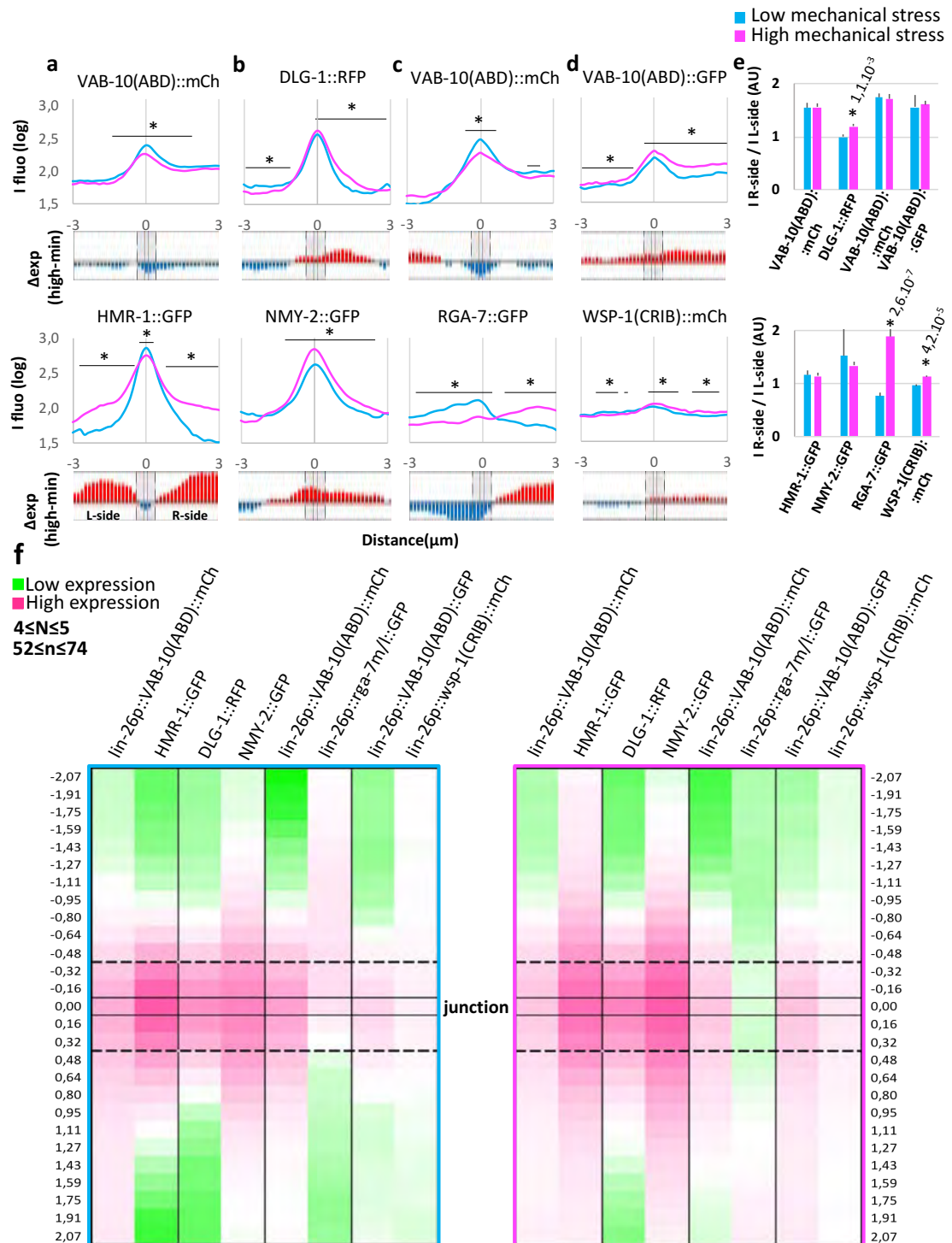


Figure 3.7 L'augmentation du stress mécanique modifie l'accumulation de HMR-1 et de ses régulateurs à la jonction et dans le cytoplasme.

a-d. Graphiques représentant la moyenne d'intensité de fluorescence des profils d'intensité transversaux réalisés manuellement le long de la jonction de lin-26p::VAB-10(ABD)::mCherry et HMR-1::GFP a, de NMY-2 et DLG-1 b, lin-26p::VAB-10(ABD)::mCherry et lin-26p::rga-7m/1::GFP c, lin-26p::VAB-10(ABD)::GFP et lin-26p::WSP-1(CRIB)::mCherry d, à faible (bleu clair) ou élevé (fuchsia) stress mécanique. Sous chaque graphique, différence d'expression entre les deux conditions de stress mécanique (élevé-faible) soit positif (rouge) soit négatif (bleu). La zone grise délimite la jonction. e. Histogrammes représentant la moyenne des ratios de d'intensité de fluorescence des protéines fusions entre le côté droit (R-side) et le côté gauche (L-side) de la jonction (0 μ m) quand les embryons à un stress mécanique faible (bleu clair) ou élevé (fuchsia). f Heatmap d'expression de l'ensemble des transgéniques qui sont divisés par souche à faible (cadre bleu clair) ou élevé (cadre fuchsia) stress mécanique. L'expression variant du vert (faible expression) au rose (forte expression) en passant par le blanc. 3 embryons ont été analysés pour chaque condition *- t-test de Welch $p < 0,05$

3.2.3 *rga-7* régule positivement l'accumulation de NMY-2 et CDC-42 actif à la jonction et négativement dans le cytoplasme à stress mécanique élevé

Afin de déterminer le rôle de *rga-7* dans l'accumulation ou la structuration des protéines à la jonction précédemment étudiées, nous avons croisés nos différentes souches co-exprimant les protéines fluorescentes avec des mâles *rga-7(ok1498)*. Cependant, le transgène lin-26p::VAB-10(ABD)::mCherry est situé sur le même chromosome que la mutation *ok1498* du gène *rga-7*. Par conséquent, les croisements entre les souches exprimant lin-26p::VAB-10(ABD)::mCherry et portant la mutation *rga-7(ok1498)* sont très difficiles. Seules les souches *rga-7(ok1498);NMY-2::GFP;DLG-1::RFP* et *rga-7(ok1498);WSP-1(CRIB)::mCherry;VAB-10(ABD)::GFP* ont donc été étudiées. Comme précédemment, DLG-1 et VAB-10(ABD) sont utilisées comme références pour la jonction et ne sont pas présentées pour les caractéristiques jonctionnelles (Figure 3.8).

À faible niveau de stress mécanique (1% agarose), l'absence de *rga-7* ne modifie pas l'accumulation à la jonction de NMY-2::GFP (Figure 3.8.a). En revanche, l'anisotropie de NMY-2::GFP est significativement plus faible chez des embryons *rga-7(ok1498)* mis sur des coussins d'agarose à 1 % par rapport aux embryons

sauvages (Figure 3.8.a). À haut stress mécanique, la densité de clusters et l'anisotropie de NMY-2 ne sont pas modifiées chez des embryons *rga-7(ok1498)* versus ceux sauvages (Figure 3.8.a). Cependant, l'accumulation de NMY-2 à la jonction est significativement diminuée seulement entre les clusters de NMY-2 chez des embryons *rga-7(ok1498)* versus ceux sauvages (Figure 3.8.d, 3.8.c-f. 3.8.g).

L'accumulation à la jonction de WSP-1(CRIB)::mCherry, quant à elle, n'est pas affectée chez des embryons *rga-7(ok1498)*, à faible niveau de stress mécanique (1 % agarose) (Figure 3.8.h). En revanche, l'accumulation jonctionnelle de WSP-1(CRIB)::mCherry est diminuée aux clusters et autour des clusters de CDC-42 sous sa forme active dans les embryons *rga-7(ok1498)* par rapport aux embryons sauvages à stress mécanique élevé (9% agarose; 3.8.h, 3.8.i-m. 3.8.n). Les caractéristiques de structuration (densité de clusters et anisotropie) ne sont pas modifiées en absence de *rga-7* lorsque le stress mécanique augmente (Figure 3.8.h).

Ces résultats suggèrent que *rga-7* régulerait de façon positive l'accumulation de NMY-2 dans les zones de la jonction où NMY-2 est moins concentrée (entre les clusters de NMY-2) lorsque la jonction est soumise à une tension élevée (Figure 3.8.g). Dans ce même contexte de tension, *rga-7* régulerait aussi de façon positive l'accumulation de la forme active de CDC-42 dans des zones de la jonction où elle est déjà accumulée, soit au niveau et autour des clusters de CDC-42 sous sa forme active (Figure 3.8.n).

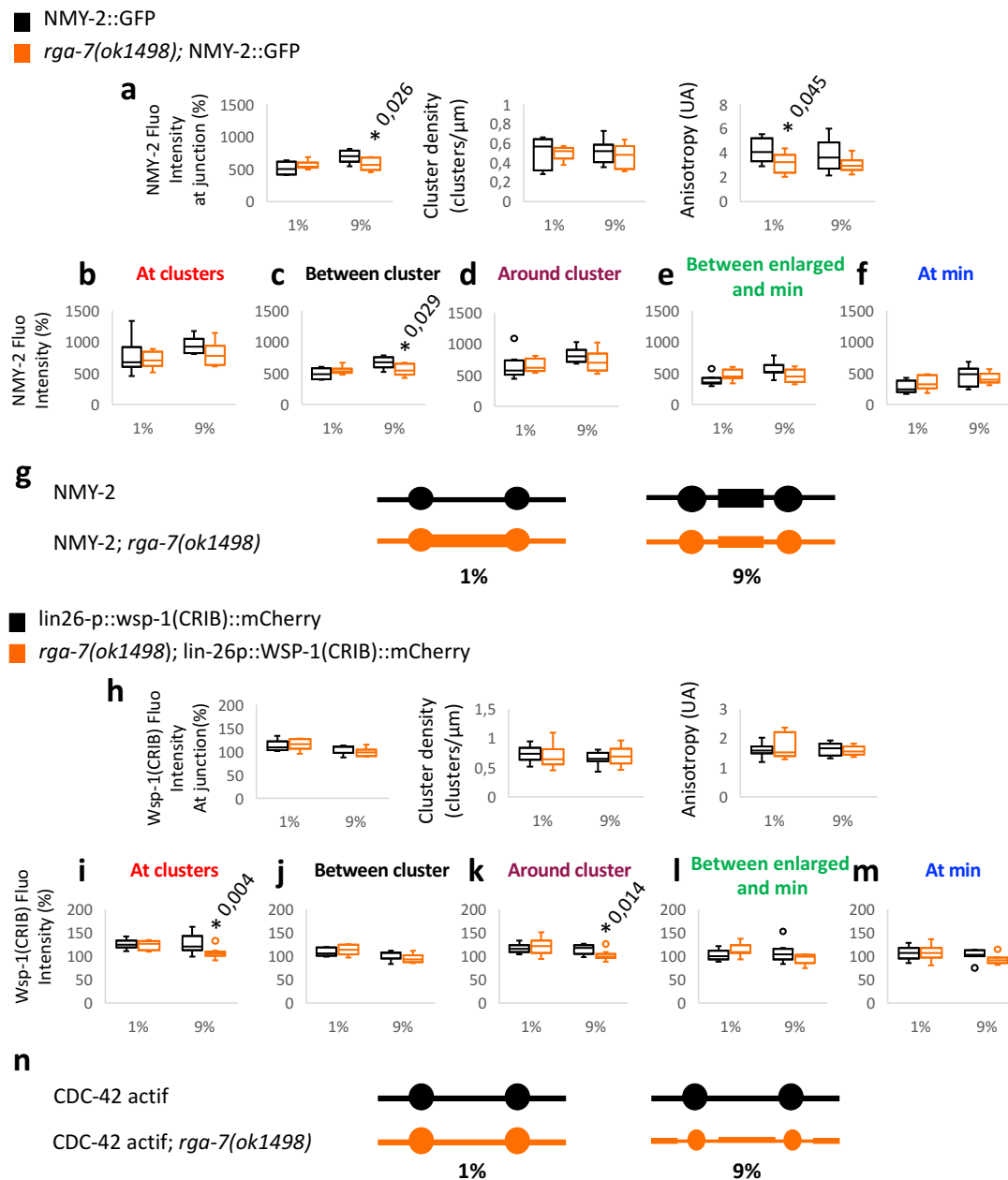


Figure 3.8 *rga-7* régule positivement l'accumulation de NMY-2 et CDC-42 actif à la jonction sous conditions de stress mécanique élevé.

a. Boîte à moustaches représentant l'accumulation à la jonction, la densité de clusters et l'anisotropie de NMY-2 dans un contexte de tension mécanique faible (1%) ou élevé (9%) 10 minutes après le contact initial entre les cellules meneuses chez des embryons sauvages (noir) ou *rga-7(ok1498)* (orange). b-f. Boîte à moustaches représentant l'accumulation de fluorescence de NMY-2 de jonctions sauvages (noir) ou *rga-7(ok1498)* (orange) en phase

tardive d'extension (10 minutes) à faible (1%) ou élevé (9%) stress mécanique aux clusters b; entre les clusters c; autour des clusters d; entre la limite de la zone autour des clusters et les minima e; aux minima f. g. Schéma récapitulatif de l'effet de l'augmentation du stress mécanique à 10 minutes après contact entre les cellules meneuses lors de la fermeture ventrale sur NMY-2 dans un contexte mutant ou non. h. Boîte à moustaches représentant l'accumulation à la jonction, la densité de clusters et l'anisotropie de WSP-1(CRIB)::mCherry (sonde CDC-42 actif) dans un contexte faible (1%) ou élevé (9%) au temps 10 minutes après contact entre les cellules meneuses chez des embryons sauvages (noir) ou *rga-7(ok1498)* (orange). i-m. Boîte à moustaches représentant l'accumulation de fluorescence de WSP(CRIB) de jonctions (noir) ou *rga-7(ok1498)* (orange) en phase tardive d'extension (10 minutes) à faible (1%) ou élevé (9%) stress mécanique aux clusters i; entre les clusters j; autour des clusters k; entre la limite de la zone autour des clusters et les minima l; aux minima m. n. Schéma récapitulatif de l'effet de l'augmentation du stress mécanique à 10 minutes après contact entre les cellules meneuses lors de la fermeture ventrale sur CDC-42 actif dans un contexte mutant ou non. Entre 7 et 10 embryons ont été analysés pour chaque condition. *- t-test de Welch $p < 0,05$.

Nous avons montré préalablement que l'augmentation du stress mécanique modulait l'accumulation de NMY-2 et de la forme active de CDC-42 (WSP-1(CRIB)) à la jonction. Nous avons également montré que l'accumulation cytoplasmique de NMY-2 et de la forme active de CDC-42 étaient non symétriques. Cette asymétrie est conservée quel que soit le stress appliqué, nonobstant le changement observé pour l'accumulation de WSP-1(CRIB) dans les cellules meneuses (Figure 3.7). Nos expériences suivantes visaient donc à déterminer le rôle de RGA-7 dans ces changements en utilisant les vers mutants *rga-7(ok1498)*. Sous des conditions de stress mécanique faible, NMY-2::GFP et WSP-1(CRIB)::mCherry s'accumulent plus à la jonction chez le mutant *rga-7(ok1498)*, en comparaison aux embryons sauvages (Figure 3.9.a, 3.9.b, 3.9.f). De plus, sous les mêmes conditions de stress mécanique, NMY-2::GFP et WSP-1(CRIB)::mCherry s'accumulent autour de la jonction, mais plus faiblement et de manière plus restreinte pour WSP-1(CRIB)::mCherry dans les cellules meneuses chez le mutant *rga-7(ok1498)* par rapport au sauvage (Figure 3.9.a, 3.9.b, 3.9.f). Sous haut stress mécanique, NMY-2::GFP et WSP-1(CRIB)::mCherry s'accumulent moins à la jonction en absence de *rga-7* (Figure 3.9.c, 3.9.d, 3.9.f). Dans les mêmes conditions, NMY-2::GFP est surexprimé dans le cytoplasme des

cellules meneuses d'un côté spécifiquement, alors que WSP-1(CRIB)::mCherry ne varie pas entre les cellules meneuses (Figure 3.9.c, 3.9.d, 3.9.f).

Ceci suggère que *rga-7* joue un rôle dans la régulation positive de l'accumulation à la jonction de NMY-2 et de la forme active de CDC-42. En outre, *rga-7* inhiberait l'accumulation asymétrique de NMY-2 dans le cytoplasme des cellules meneuses dans des conditions de stress mécanique élevé (Figure 3.9.a, 3.9.c, 3.9.e). En revanche, en cas de faible stress mécanique, *rga-7* semble inhiber l'accumulation NMY-2 à la jonction et donc réguler de façon positive son accumulation dans le cytoplasme (Figure 3.9.a, 3.9.c, 3.9.e). De même, la forme active de CDC-42 serait déplacée de la jonction vers le cytoplasme, et ce de façon symétrique, par *rga-7* lorsque la jonction est soumise à un faible stress mécanique (Figure 3.9.b, 3.9.c, 3.9.e).

Ces résultats suggèrent que *rga-7* régule l'accumulation asymétrique de NMY-2 et des filaments d'actine mais pas celle de la forme active de CDC-42 dans les cellules meneuses de l'hypoderme, et ce, uniquement dans des conditions de stress mécanique élevé.

a-d. Graphiques représentant la moyenne d'intensité de fluorescence des profils d'intensité transversaux réalisés manuellement le long de la jonction de NMY-2 et DLG-1 a et lin-26p::VAB-10(ABD)::GFP et lin-26p::wsp-1(CRIB)::mCherry b, à faible (carré bleu clair) stress mécanique et la jonction de NMY-2 et DLG-1 c et lin-26p::VAB-10(ABD)::GFP et lin-26p::wsp-1(CRIB)::mCherry d, à stress mécanique élevé (carré fuchsia) chez des embryons sauvages (noir) ou *rga-7(ok1498)* (orange). En dessous de chaque graphique un graphique représentant la différence d'expression entre les deux fonds génétiques (*rga-7(ok1498)* - *wt*) soit positif (rouge) soit négatif (bleu). La zone grise délimite la jonction. e. Histogrammes représentant la moyenne des ratios de d'intensité de fluorescence des protéines fusions entre le côté droit (R-side) et le côté gauche (L-side) de la jonction (0µm) quand les embryons sauvages (noir) ou *rga-7(ok1498)* (orange) à un stress mécanique faible (haut-bleu clair) ou élevé (bas-fuchsia). f Heatmap d'expression de l'ensemble des transgéniques qui sont divisés par à faible (cadre bleu clair) ou élevé (cadre fuchsia) stress mécanique ainsi que par fond génétique sauvage ou *rga-7(ok1498)*. L'expression variant du vert (faible expression) au rose (forte expression) en passant par le blanc. 4 embryons ont été analysés pour chaque condition *- t-test de Welch $p < 0,05$.

3.3 Rôles des domaines de RGA-7 dans la régulation de l'accumulation de HMR-1 et RGA-7 dans un contexte de stress mécanique

La protéine RGA-7 est connue pour être une RhoGAP pour RHO-1 et CDC-42. En plus de son domaine RhoGAP, RGA-7 possède trois autres domaines, soit (i) le domaine F-BAR qui pourrait se fixer aux membranes courbées, (ii) le domaine C1 qui interagit potentiellement avec les lipides Diacylglycérol (DAG) et (iii) le domaine N-terminal dont la fonction demeure inconnue. La mutation *rga-7(ok1498)* consiste en une délétion de la partie C-terminale de la protéine contenant le domaine GAP. Elle modifie le cadre de lecture et invalide la fonction catalytique d'hydrolyse du GTP en GDP de RGA-7. Toutefois, l'expression de la protéine tronquée sans son domaine GAP n'est pas confirmée.

Nos résultats suggèrent une régulation mécanosensible de l'accumulation de HMR-1 à la jonction par *rga-7* en phase tardive d'extension de la jonction. En revanche, le rôle des différents domaines de RGA-7 dans cette régulation n'est pas connu. Pour comprendre le rôle de chacun de ces domaines, 4 lignées transgéniques ont été générées par bombardement biolistique de plasmide exprimant la forme complète de

RGA-7 ou RGA-7 avec chacun de ses domaines délétés (Tableau 2.3). Ces formes de RGA-7 sont fusionnées à la protéine fluorescente verte GFP et leur expression est sous la régulation du promoteur endogène *rga-7lp*. Les protéines ainsi exprimées sont nommées RGA-7 sauvage, RGA-7 Δ N, RGA-7 Δ F-BAR et RGA-7 Δ C1. Des mâles de ces quatre lignées ont été générés, puis croisés avec des hermaphrodites de la lignée HMR-1::mCherry; *rga-7(ok1498)*, également générée pour cette étude. Ainsi 4 nouvelles lignées de vers ont été générées exprimant toutes HMR-1::mCherry dans un fond génétique *rga-7(ok1498)* et co-exprimant soit *rga-7lp::rga-7l-m::GFP*, soit *rga-7lp::rga-7l-m Δ N::GFP*, soit *rga-7lp::rga-7l-m Δ F-BAR::GFP*, soit *rga-7lp::rga-7l-m Δ C1::GFP*. Deux autres lignées ont été utilisées : la version sauvage de la souche, soit HMR-1::mCherry seule, et HMR-1::mCherry dans un fond génétique *rga-7(ok1498)*.

3.3.1 Les domaines de RGA-7 jouent un rôle dans l'accumulation de HMR-1 à la jonction selon le stress mécanique

L'accumulation de HMR-1::mCherry entre la jonction et le cytoplasme a été étudiée par l'analyse des profils d'intensité de fluorescence transversaux dans les six génotypes (§ 3.3) et ce, sous les deux conditions de stress mécanique (Figure 3.11). Pour cela, la moyenne des profils d'intensité de fluorescence transversaux a été réalisée le long des jonctions d'embryons de six souches exprimant HMR-1::mCherry : sauvage, *rga-7(ok1498)*, *rga-7(ok1498)* exprimant RGA-7 sauvage ou les mutants RGA-7 Δ N, RGA-7 Δ F-BAR et RGA-7 Δ C1 (Figure 3.11.a-f). L'ensemble des tests statistiques et des comparaisons d'accumulation est réalisé par rapport à la souche *rga-7(ok1498);HMR-1::mCherry;rga-7lp::rga-7l-m::GFP* qui sera nommée souche contrôle (gris; Figure 3.10).

Dans un premier temps, l'accumulation à la jonction exclusivement a été extraite à partir de la moyenne des profils transversaux des six génotypes. En effet, chaque

tracé de profil d'intensité de fluorescence commence au niveau du cytoplasme d'une cellule meneuse, coupe perpendiculairement la jonction entre les deux cellules et se termine dans le cytoplasme de l'autre cellule meneuse. Il est possible d'observer sur le graphique un pic de fluorescence à 0 μm qui consiste au centre de la jonction. La jonction consiste en une zone grise correspondant à une distance de 5 pixels (Figure 3.10.a). L'accumulation au niveau de la zone jonctionnelle en gris a été comparée pour les six génotypes dans les deux conditions de stress mécanique (Figure 3.10.a-b).

Les embryons mutants *rga-7(ok1498)*, présentent une augmentation significative d'accumulation de HMR-1::mCherry à la jonction par rapport aux embryons sauvages, que ce soit à faible ou haut stress mécanique (Figure 3.10.b). Lorsque RGA-7, sous sa forme sauvage, est exprimée de nouveau chez les embryons de la souche contrôle (*rga-7(ok1498)*; HMR-1::mCherry; RGA-7::GFP), l'accumulation de HMR-1::mCherry revient à la normale (Figure 3.10.b). En effet, les embryons contrôles accumulent significativement moins HMR-1 à la jonction que les embryons *rga-7(ok1498)* exprimant HMR-1::mCherry (Figure 3.10.b). Leur accumulation est semblable à celle des embryons sauvages exprimant seulement HMR-1::mCherry. En effet, il n'y pas de différence significative d'accumulation de HMR-1 entre les embryons sauvages et les embryons de la souche contrôle (*rga-7(ok1498)*; HMR-1::mCherry; RGA-7::GFP) (Figure 3.10.a). De plus, les souches de vers utilisées dans cette étude, exprimant soit RGA-7 sauvage soit RGA-7 surexprimée dans l'hypoderme fusionnée à la GFP, ont déjà été utilisées dans une étude précédente (Ouellette *et al.*, 2016). Cette étude montre que l'expression de ces deux transgènes chez des embryons *rga-7(ok1498)* restaure l'accumulation de la forme active de CDC-42 aux jonctions lors de la fermeture ventrale ainsi que le défaut de létalité embryonnaire associé à la mutation *rga-7(ok1498)* (Ouellette *et al.*, 2016). Dans ce contexte, nos résultats suggèrent que la mutation *rga-7(ok1498)* est bien associée à la

différence d'accumulation de HMR-1 observée à la jonction en phase tardive d'extension selon le stress mécanique.

L'implication des domaines de RGA-7 dans la fonction de régulation de l'accumulation de HMR-1 par RGA-7 a été investiguée. À faible stress mécanique, les souches exprimant les mutants RGA-7 Δ N, RGA-7 Δ F-BAR et RGA-7 Δ C1 présentent une accumulation de HMR-1 significativement plus élevée que la souche contrôle exprimant RGA-7 sauvage (Figure 3.10.b). Donc, la réexpression de RGA-7 sans ces domaines ne permet pas de revenir à une accumulation normale de HMR-1. Ceci suggère que les trois domaines de RGA-7 sont nécessaires à sa fonction à faible stress mécanique. Lorsque qu'une tension élevée est appliquée sur les embryons, seuls les embryons exprimant RGA-7 Δ F-BAR présentent une accumulation de HMR-1 significativement plus élevée lorsque comparé aux embryons contrôles exprimant RGA-7 sauvage (Figure 3.10.b). Cela suggère que le domaine F-BAR de RGA-7 est nécessaire dans l'inhibition de l'accumulation de HMR-1 à la jonction à haut stress mécanique par RGA-7. Cependant, ces résultats n'excluent pas la potentielle implication des domaines N-terminal et C1 dans cette fonction de RGA-7.

Il est également important de noter que l'accumulation de HMR-1 à la jonction dans la souche exprimant RGA-7 Δ F-BAR est significativement plus élevée que celle des mutants *rga-7(ok1498)* sous les deux conditions de stress mécanique. L'absence du domaine F-BAR semble amplifier le phénotype du mutant *rga-7(ok1498)*, ce qui suggère une interaction entre le domaine GAP et le domaine F-BAR jouant sur la fonction de RGA-7 dans l'inhibition de l'exocytose/recyclage de HMR-1 à la jonction.

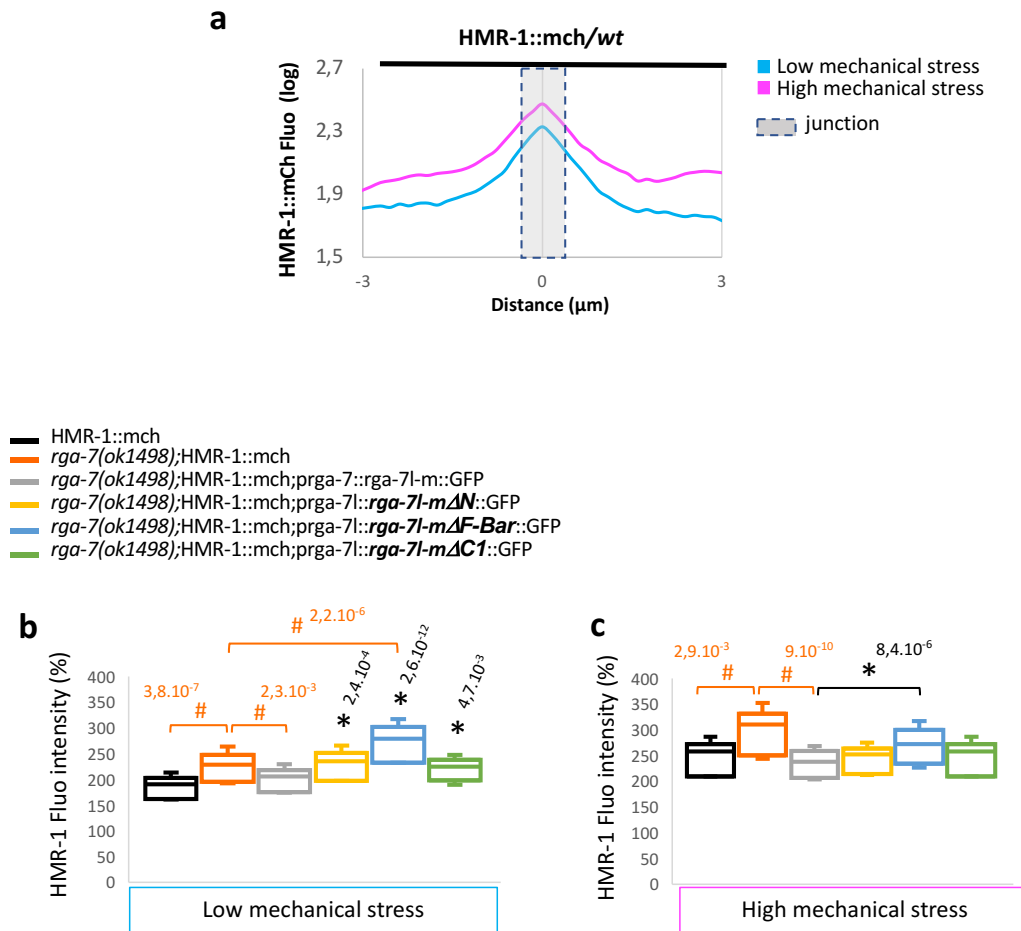


Figure 3.10 RGA-7 régule l'accumulation de HMR-1 à la jonction par son domaine F-BAR à haut stress mécanique.

a. Graphiques représentant la moyenne d'intensité de fluorescence des profils d'intensité transversaux réalisés manuellement le long de la jonction de HMR-1::mCherry chez des embryons sauvages (*wt*) à faible (bleu clair) ou élevé (fuchsia) stress mécanique. La zone grise délimite la jonction. b-c. Boîte à moustaches représentant l'accumulation à la jonction de HMR-1 à la jonction chez des embryons sauvages (noir), *rga-7(ok1498)* (orange), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-m::GFP* (gris), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔN::GFP* (jaune), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔF-BAR::GFP* (bleu), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔC1::GFP* (vert) dans un contexte faible (b) ou élevé (c) de stress mécanique au temps 10 minutes après le contact initial entre les cellules meneuses. # t-test de Welch par rapport à la souche *rga-7(ok1498)* (orange) $p < 0,05$. * t-test de Welch par rapport à la souche exprimant RGA-7 sauvage (gris) $p < 0,05$.

Il est tout de même important de souligner qu'il existe une différence d'expression entre deux souches exprimant HMR-1 fusionnée à une protéine fluorescente différente. En effet, les embryons de la souche de vers exprimant HMR-1::mCherry présentent une faible expression au stade de morphogénèse épithéliale étudié, autour de 250 % d'accumulation de fluorescence à la jonction (Figure 3.10.a). Dans les exactes mêmes conditions d'étude la fluorescence de HMR-1::GFP s'accumule à 700 % (Figure 3.6.a). Les deux souches ont été générées par le même laboratoire de la même façon *i.e.* la protéine fluorescente a été intégrée dans le génome par bombardement biolistique. Cette technique permet l'intégration de transgène de façon stochastique dans le génome du *C. elegans*. La localisation de ce transgène pourrait être à l'origine de cette différence d'expression. Une autre possibilité est la capacité accrue de la protéine fluorescente mCherry à s'agréger par rapport à la GFP.

Dans un second temps, la distribution de l'accumulation de HMR-1::mCherry entre la jonction et le cytoplasme a été étudiée par l'analyse des profils d'intensité de fluorescence transversaux dans les six génotypes et ce, sous les deux conditions de stress mécanique (Figure 3.11). Les moyennes des intensités de fluorescence sont compilées sous formes de graphiques par génotypes dans les deux conditions de stress mécanique (Figure 3.11.a-f). Tel que précédemment, sous chaque graphique de profils d'intensité se trouve un diagramme représentant la différence entre l'accumulation de HMR-1 à stress mécanique élevé et faible. De plus, afin de mieux apprécier le changement d'expression de HMR-1 lorsque le stress mécanique augmente, deux *heatmap* représentant la moyenne d'intensité de fluorescence des profils transversaux de HMR-1, pour les six génotypes, à faible stress mécanique (encadré fuchsia) et à haut stress mécanique (encadré bleu) sont incluses à la Figure 3.11. Une faible accumulation de HMR-1 se traduit par une couleur verte alors que le rose représente une suraccumulation de HMR-1 (Figure 3.11.h).

Dans un contexte de changement de stress mécanique, la localisation de l'accumulation de HMR-1::mCherry varie selon les fonds génétiques. En effet, chez

des embryons sauvages, quand le stress mécanique est élevé, l'accumulation de HMR-1::mCherry est significativement plus élevée à la jonction, autour de la jonction et dans le cytoplasme par rapport à des conditions de faible stress mécanique (Figure 3.11.a). De même, les embryons *rga-7(ok1498)* présentent une accumulation significativement plus élevée de HMR-1::mCherry à la jonction ainsi qu'à une zone spécifique du cytoplasme située sur la *heatmap* vers -2,07 μm (encadré noir) (Figure 3.11.b, 3.11.h) par rapport aux mêmes embryons soumis à un stress mécanique faible. Les embryons de la souche contrôle, exprimant RGA-7 sauvage, présentent une accumulation de HMR-1 à la jonction mais pas dans le cytoplasme lorsque le stress mécanique augmente (Figure 3.11.c, 3.11.h). En revanche, chez les embryons exprimant les mutants RGA-7 ΔN , RGA-7 ΔF -BAR et RGA-7 ΔC1 , HMR-1::mCherry n'est pas significativement plus accumulé à la jonction, mais s'accumule au niveau de zones spécifiques du cytoplasme (Figure 3.11.d-f, 3.11.h) lorsque le stress mécanique augmente en comparaison à la souche contrôle. Plus précisément, chez les souches exprimant RGA-7 ΔN et RGA-7 ΔF -BAR, HMR-1::mCherry s'accumule significativement dans deux zones cytoplasmiques, une proximale à la jonction et l'autre à 1 μm de la jonction, lorsque le stress mécanique augmente (Figure 3.11.d-e, 3.11.h). Quant à la souche exprimant RGA-7 ΔC1 , HMR-1::mCherry s'accumule plus dans le cytoplasme à 2 μm de la jonction dans un contexte de tension élevée *versus* un contexte de faible tension (Figure 3.11.f, 3.11.h). Ces résultats suggèrent que seuls les domaines N-terminal et F-BAR de RGA-7 ont un rôle dans la régulation de l'accumulation cytoplasmique proximale de HMR-1 par RGA-7 et ce, sous un stress mécanique élevé.

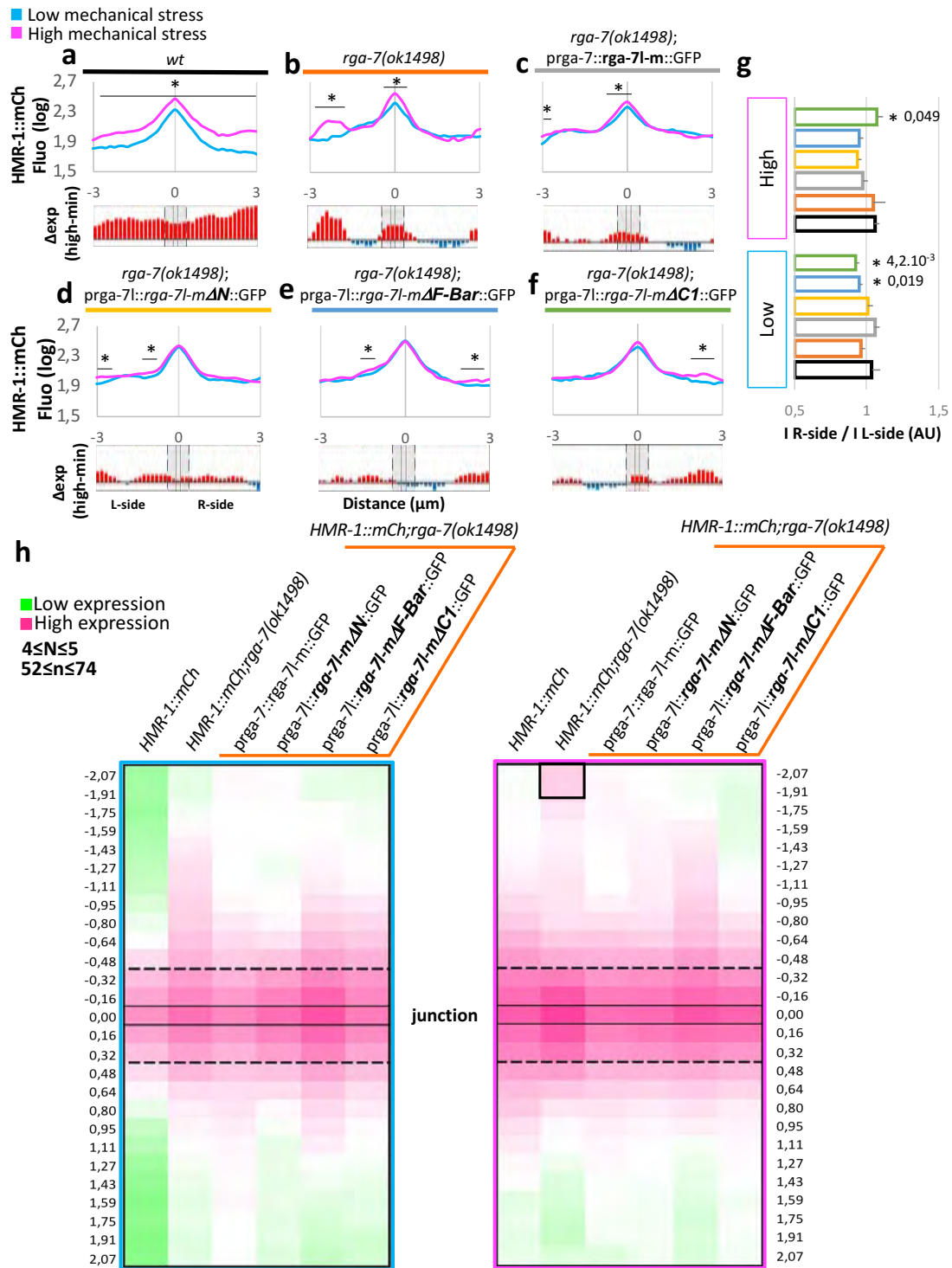


Figure 3.11 Les domaines N-terminal et F-BAR de RGA-7 régulent l'accumulation de HMR-1 à la jonction.

a-e. Graphiques représentant la moyenne d'intensité de fluorescence des profils d'intensité transversaux réalisés manuellement le long de la jonction de HMR-1::mCherry chez des embryons sauvage(*wt*) a, *rga-7(ok1498)* b, *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-m::GFP* c, *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔN::GFP* d, *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔF-BAR::GFP* e, *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔC1::GFP* f, à faible (bleu clair) ou élevé (fuchsia) stress mécanique. En dessous de chaque graphique un graphique représentant la différence d'expression entre les deux conditions de stress mécanique (élevé-faible) soit positif (rouge) soit négatif (bleu). La zone grise délimite la jonction. g. Histogrammes représentant la moyenne des ratios d'intensité de fluorescence de HMR-1 entre le côté droit (R-side) et le côté gauche (L-side) de la jonction (0μm) quand les embryons sont soumis à un stress mécanique faible (bleu clair) ou élevé (fuchsia) chez les embryons des 6 génotypes décrits en a-e. h. Heatmap d'expression de HMR-1::mCherry dans l'ensemble des transgéniques à faible (cadre bleu clair) ou élevé (cadre fuchsia) stress mécanique. L'expression varie du vert (faible expression) au rose (forte expression) en passant par le blanc. 3 embryons ont été analysés pour chaque condition. *- t-test de Welch $p < 0,05$.

Considérant les modifications d'accumulation de HMR-1 à la jonction et à des zones spécifiques du cytoplasme selon les souches exprimant les mutants transgéniques de RGA-7, l'impact de ces accumulations sur la symétrie d'accumulation de HMR-1 a été étudiée.

La symétrie de l'accumulation de HMR-1 dans tous les fonds génétiques n'est pas modifiée, à l'exception de la souche exprimant RGA-7ΔC1 lorsque le stress mécanique augmente (Figure 3.11.g). En effet, chez les embryons mutants RGA-7ΔC1 (*rga-7 (ok1498); RGA-7ΔC1; HMR-1::mCherry*), le ratio des intensités de fluorescence de HMR-1::mCherry de part et d'autre de la jonction est inférieur à 1 quand le stress mécanique est faible alors que lorsque le stress augmente le ratio devient significativement supérieur à 1. L'accumulation de HMR-1 semble demeurer asymétrique chez les mutants RGA-7ΔC1. Ceci suggère que le domaine C1 de RGA-7 aurait un rôle dans le maintien de l'accumulation symétrique de HMR-1 dans le cytoplasme.

3.3.2 Rôle des domaines de RGA-7 dans la régulation de son accumulation à la jonction et dans le cytoplasme

L'accumulation et la structuration de RGA-7 aux jonctions chez les souches exprimant RGA-7 sauvage ou les mutants RGA-7 Δ N, RGA-7 Δ F-BAR et RGA-7 Δ C1 s'exprimant sous le promoteur endogène *rga-7lp* ont été étudiées (Figure 3.12). Chaque souche étudiée possède un fond génétique *rga-7 (ok1498)* et exprime également HMR-1::mCherry. HMR-1 dans cette étude est la référence pour la jonction.

La structuration jonctionnelle de RGA-7 (anisotropie et densité de clusters) n'est pas modifiée quel que soit le transgène ou le stress mécanique imposé (Figure 3.12.a). À faible stress mécanique, seul le transgène RGA-7 Δ N::GFP présente une diminution significative de son accumulation entre les clusters et plus spécifiquement entre la limite de la zone autour des clusters et les minima de fluorescence à la jonction (Figure 3.12.c, 3.12.g) en comparaison avec la souche exprimant RGA-7 sauvage. Ceci suggère que le domaine N-terminal de RGA-7 est nécessaire à son recrutement à la jonction. En revanche, à niveau élevé de stress mécanique, les embryons exprimant RGA-7 Δ N, RGA-7 Δ F-BAR et RGA-7 Δ C1 présentent une accumulation significativement plus élevée de RGA-7 à la jonction que des embryons exprimant RGA-7 sauvage (Figure 3.12.a). RGA-7 Δ N::GFP s'accumule au niveau et autour des clusters ainsi qu'entre les clusters, plus précisément entre la limite de la zone autour des clusters et les minima de fluorescence (Figure 3.12.b-e). RGA-7 Δ F-BAR::GFP s'accumule significativement plus entre les clusters, plus spécifiquement entre la limite de la zone autour des clusters et les minima ainsi qu'aux minima de fluorescence par rapport aux embryons contrôles exprimant RGA-7 sauvage (Figure 3.12.c, 3.12.e). RGA-7 Δ C1::GFP présente un profil d'accumulation similaire à celui de RGA-7 Δ N::GFP. En effet, RGA-7 Δ C1::GFP s'accumule significativement plus autour des clusters et entre la limite de la zone autour des clusters et entre les minima

de fluorescence, mais pas aux clusters (Figure 3.12.b-e). Ceci suggère que les domaines N-terminal et C1 de RGA-7 participent à l'inhibition de l'adressage de RGA-7 aux zones dans lesquelles RGA-7 est déjà densément présente et le domaine F-BAR entre les zones concentrées de RGA-7.

Afin d'étudier si les domaines de RGA-7 régulent sa concentration aux clusters de HMR-1, l'accumulation de RGA-7 sauvage et des mutants RGA-7 Δ N, RGA-7 Δ F-BAR et RGA-7 Δ C1 a été analysée aux clusters de HMR-1 et aux minima de fluorescence de HMR-1. Seuls RGA-7 Δ N::GFP et RGA-7 Δ C1::GFP présentent une accumulation significativement plus élevée aux clusters et aux minima de HMR-1 dans un contexte de haut stress mécanique par rapport aux embryons contrôles exprimant RGA-7 sauvage (Figure 3.12.g-h). Il est à noter que RGA-7 Δ N::GFP est significativement moins accumulé aux minima de fluorescence de HMR-1 à faible niveau de stress mécanique lorsque comparé aux embryons contrôles (Figure 3.12.h). Ceci suggère que le domaine N-terminal favorise l'accumulation de RGA-7 où HMR-1 est moins accumulé lorsque le stress mécanique est faible. De plus, lorsque le stress mécanique augmente, les domaines N-terminal et C1 de RGA-7 participeraient à l'inhibition de l'accumulation de RGA-7 aux clusters et aux minima de HMR-1.

L'ensemble des résultats suggère que le domaine N-terminal de RGA-7 est nécessaire pour la localisation de RGA-7 à la jonction dans un contexte de stress mécanique faible. Les différents domaines de RGA-7 régulent sa localisation spécifique à la jonction dans un contexte de stress mécanique élevé. En effet, aux minima de fluorescence seulement le domaine F-BAR jouerait ce rôle. En remontant vers les clusters le long de la jonction, aucun domaine spécifique régulerait l'accumulation de RGA-7 entre les minima et la limite de la zone autour des clusters. Puis, autour du maximum de concentration de RGA-7, les domaines N-terminal et C1 réguleraient son accumulation. Pour les clusters, seul le domaine N-terminal régulerait l'accumulation de RGA-7 au maximum de concentration de RGA-7 à la jonction.

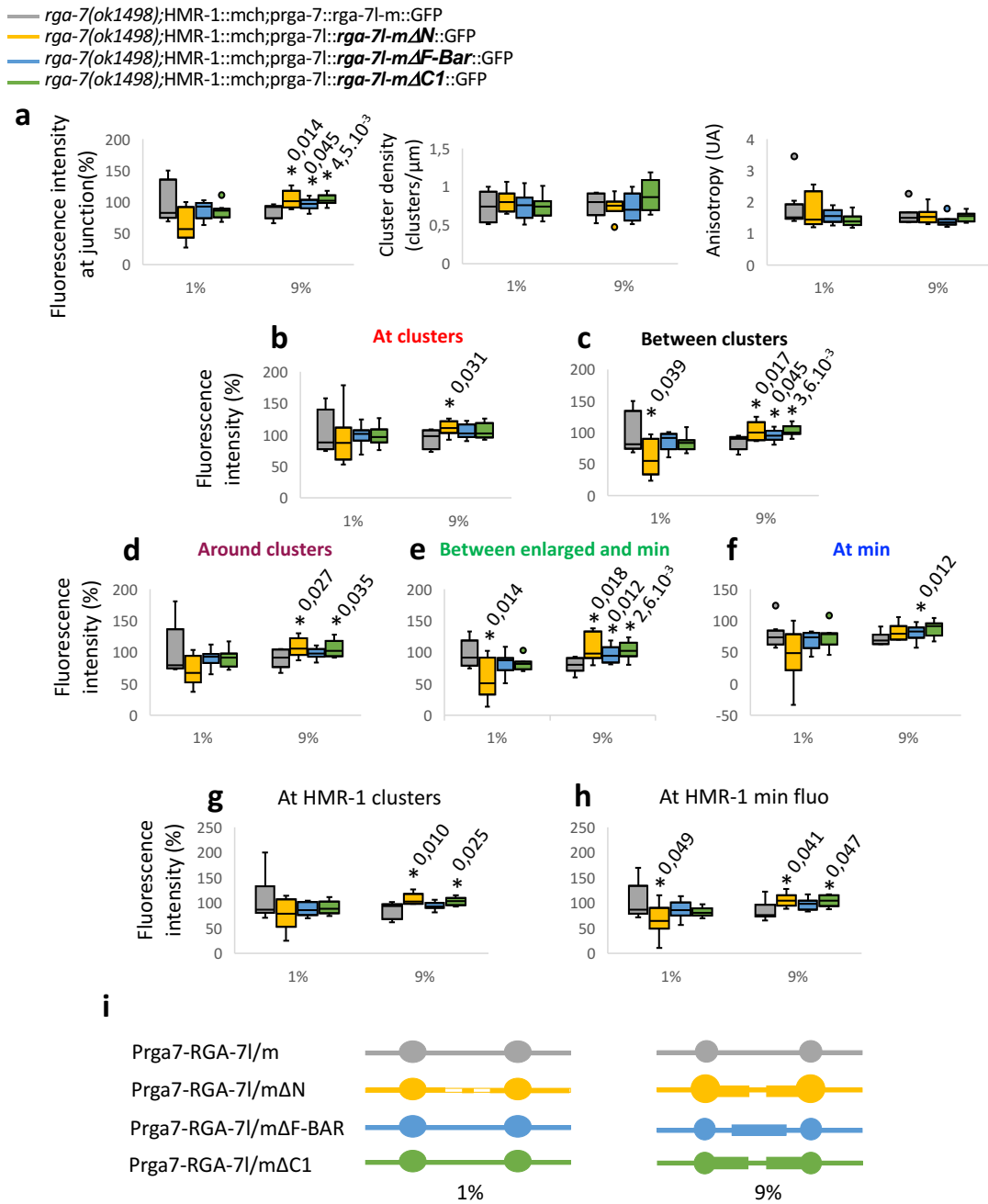


Figure 3.12 Les 3 domaines de RGA-7 régulent la localisation de RGA-7 le long de la jonction à haut stress mécanique.

a. Boîte à moustaches représentant l'accumulation à la jonction, la densité de clusters et l'anisotropie de RGA-7 chez des embryons *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-m::GFP* (gris), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔN::GFP* (jaune), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔF-*

BAR::GFP (bleu), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔC1::GFP* (vert) dans un contexte faible (1%) ou élevé (9%) de stress mécanique au temps 10 minutes après contact entre les cellules meneuses. b-f. Boîte à moustaches représentant l'accumulation de fluorescence de RGA-7 chez des embryons *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-m::GFP* (gris), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔN::GFP* (jaune), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔF-BAR::GFP* (bleu), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔC1::GFP* (vert) dans un contexte faible (1%) ou élevé (9%) de stress mécanique aux clusters des transgènes RGA-7 b; entre les clusters des transgènes RGA-7 c; autour des clusters des transgènes RGA-7 d; entre la limite de la zone autour des clusters et les minima de fluorescence des transgènes RGA-7 e; aux minima f. mais également aux clusters de HMR-1 g et au minimum de fluorescence de HMR-1 h. i. Schéma récapitulatif de l'effet de l'augmentation du stress mécanique à 10 minutes après contact entre les cellules meneuses lors de la fermeture ventrale dans l'accumulation de RGA-7 selon les domaines délétés. Entre 7 et 10 embryons ont été analysés pour chaque condition *- t-test de Welch $p < 0,05$ par rapport, *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-m::GFP* (gris).

La distribution de l'accumulation de RGA-7 entre la jonction et le cytoplasme a ensuite été étudiée pour les embryons contrôles et les embryons exprimant les trois transgènes mutants de RGA-7 (Figure 3.13). Il s'agit des embryons des souches décrites précédemment qui ont un fond génétique *rga-7 (ok1498)* co-exprimant les transgènes HMR-1::mCherry avec RGA-7 sauvage ou mutant RGA-7ΔN, RGA-7ΔF-BAR et RGA-7ΔC1 fusionnée à la GFP. Les embryons contrôles sont toujours ceux exprimant RGA-7 sauvage *i.e.* RGA-7::GFP sous son promoteur endogène *rga-7lp*. Les mêmes techniques d'analyse que précédemment ont été utilisées en employant les profils transversaux d'intensité le long de la jonction.

Chez les embryons contrôles exprimant RGA-7 sauvage, RGA-7 s'accumule significativement moins de part et d'autre de la jonction à niveau élevé de stress mécanique par rapport à un faible stress mécanique (Figure 3.13.a). Au contraire, chez des embryons exprimant RGA-7ΔN::GFP, RGA-7 s'accumule significativement plus à la jonction et spécifiquement dans un côté des cellules meneuses comparé aux embryons contrôles exprimant RGA-7 sauvage sous conditions de stress mécanique élevé (Figure 3.13.b, 3.13.f). Les embryons exprimant RGA-7ΔF-BAR, pour leur part, présentent une accumulation significativement plus importante de RGA-7 à la jonction en comparaison aux embryons contrôles, lorsque le stress mécanique

augmente. Le transgène RGA-7 Δ F-BAR est également plus accumulé au niveau de zones spécifiques du cytoplasme à 2 μ m de la jonction lorsque le stress mécanique augmente (Figure 3.13.c, 3.13.f). RGA-7 Δ C1::GFP présente un profil d'expression similaire à celui des embryons contrôles lorsque le stress mécanique augmente, *i.e.* RGA-7 Δ C1 s'accumule moins dans le cytoplasme des cellules meneuses comparé au profil d'expression de RGA-7 Δ C1 à faible stress mécanique (Figure 3.13.d, 3.13.f). Ceci suggère que les domaines N-terminal et F-BAR de RGA-7 participent à l'inhibition de la localisation de RGA-7 à la jonction et proche de la jonction lorsque le stress mécanique augmente.

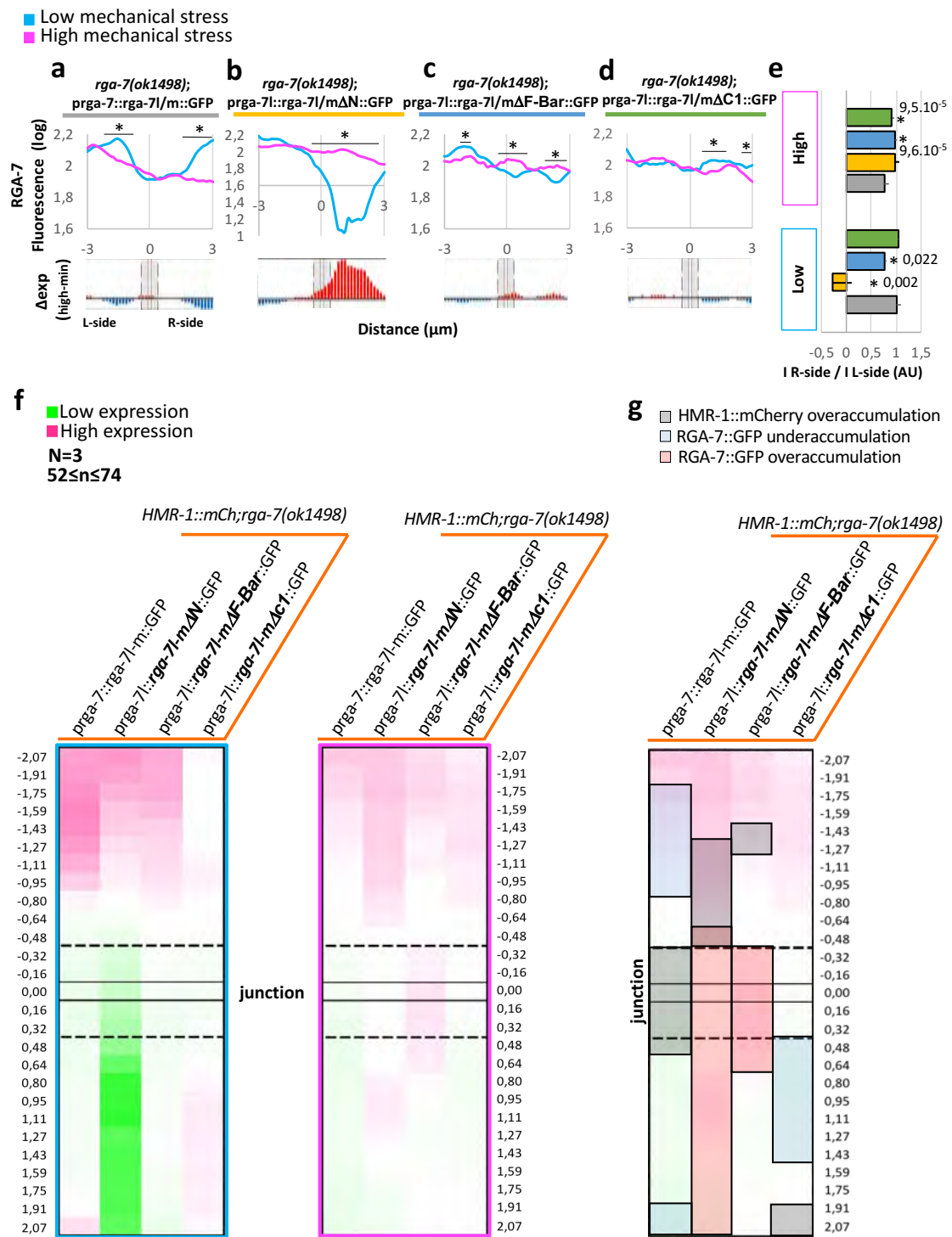


Figure 3.13 Les domaines N-terminal et F-BAR inhibent la localisation de RGA-7 à la jonction.

a-d. Graphiques représentant la moyenne d'intensité de fluorescence, des profils d'intensité transversaux réalisés manuellement le long de la jonction, de RGA-7 chez des embryons *rga-7(ok1498)* co-exprimant HMR-1::mCherry et *rga-7lp::rga-7l-m::GFP* a, *rga-7lp::rga-7l-mΔN::GFP* b, *rga-7lp::rga-7l-mΔF-BAR::GFP* c, *rga-7lp::rga-7l-mΔC1::GFP* d, à faible (bleu clair) ou haut (fuchsia) stress mécanique. La jonction de HMR-1::mCherry a été utilisée comme référence. En dessous de chaque graphique, la différence d'expression entre les deux conditions de stress mécanique (élevé-faible) est représentée, soit positif (rouge) soit négatif (bleu). La zone grise délimite la jonction. e. Histogrammes représentant la moyenne des ratios d'intensité de fluorescence des transgènes entre le côté droit (R-side) et le côté gauche (L-side) de la jonction (0μm) quand les embryons sont soumis à un stress mécanique faible (bleu clair) ou élevé (fuchsia) f. Heatmap d'expression de RGA-7 dans l'ensemble des transgéniques tronqués pour un domaine ou non à faible (cadre bleu clair) ou élevé (cadre fuchsia) stress mécanique. L'expression variant du vert (faible expression) au rose (forte expression) en passant par le blanc. 3 embryons ont été analysés pour chaque condition. g. Heatmap d'expression de RGA-7 sauvage ou des mutants RGA-7ΔN, RGA-7ΔF-BAR et RGA-7ΔC1 sous stress mécanique élevé Les zones de surexpression de HMR-1(carré gris) et les zones de sur- (rouge) ou sous-expression (bleu) de RGA-7 sont également représentées. L'expression variant du vert (faible expression) au rose (forte expression) en passant par le blanc. 3 embryons ont été analysés pour chaque condition. *- t-test de Welch $p < 0,05$.

Sachant la variation d'accumulation de RGA-7 à la jonction et à des zones spécifiques du cytoplasme selon les délétions des domaines de RGA-7, l'impact de ces variations sur la symétrie d'accumulation de RGA-7 entre les cellules meneuses a été étudié (Figure 3.13.e).

La symétrie d'accumulation de RGA-7 varie selon le contexte du stress mécanique, quel que soit le transgène RGA-7 exprimé. Chez des embryons exprimant RGA-7 sauvage, le ratio entre l'intensité de fluorescence du cytoplasme des cellules meneuses de part et d'autre de la jonction augmente avec le stress mécanique, passant d'une distribution de RGA-7 symétrique à une distribution non-symétrique de RGA-7 (Figure 3.13.e - gris). De façon inverse, RGA-7ΔN et RGA-7ΔF-BAR passe d'une distribution asymétrique à une distribution symétrique lorsque le stress mécanique augmente (Figure 3.13.e - jaune et bleu). Pour sa part, RGA-7ΔC1 conserve une distribution asymétrique faible lorsque le stress mécanique augmente (Figure 3.13.e - vert).

À faible stress mécanique, la distribution de l'accumulation de RGA-7 sauvage et RGA-7 Δ C1 sont symétriques. En effet, leur ratio est proche de 1 (Figure 3.13.e - *Low*). En revanche, lorsque comparé au ratio d'expression de RGA-7 sauvage, les ratios de RGA-7 Δ N et RGA-7 Δ F-BAR sont significativement plus faibles, *i.e.* inférieurs à 1 sous faible stress mécanique. Les embryons exprimant RGA-7 Δ N et RGA-7 Δ F-BAR présentent donc une asymétrie d'accumulation de RGA-7 entre les cellules meneuses pour ces deux transgènes lorsque le stress mécanique est faible (Figure 3.13.e - *Low*). À haut stress mécanique, les mutants RGA-7 Δ N, RGA-7 Δ F-BAR et RGA-7 Δ C1 ont un ratio proche de 1. Seul celui du transgène RGA-7 Δ N n'est pas significativement plus élevé que celui des embryons contrôles exprimant RGA-7 sauvage (Figure 3.13.e - *High*). Ceci suggère que les domaines N-terminal et F-BAR de RGA-7 sont nécessaires au maintien de la symétrie d'accumulation de RGA-7 à faible stress mécanique. En revanche, l'asymétrie de distribution d'accumulation de RGA-7 induit par l'augmentation de stress mécanique serait régulée par les trois domaines de RGA-7.

De façon intéressante, lorsque l'on recoupe les zones d'accumulation de HMR-1::mCherry avec les zones de sur- ou sous-accumulation de transgènes RGA-7 sur une *heatmap* (Figure 3.13.g), les zones d'accumulation de HMR-1::mCherry sont toujours localisées à côté de zones d'accumulation des transgènes RGA-7 lorsque le stress mécanique augmente, et cela, pour chaque souche co-exprimant HMR-1::mCherry et un transgène de RGA-7. En effet, dans un contexte mécanique élevé chez des embryons contrôles, HMR-1 s'accumule plus à la jonction alors que RGA-7 est moins accumulée dans le cytoplasme de part et d'autre de la zone d'accumulation de HMR-1 (jonction) (Figure 3.13.g). En revanche, lorsque le stress mécanique augmente chez les embryons RGA-7 Δ N et RGA-7 Δ F-BAR, HMR-1 s'accumule plus autour de la jonction et dans le cytoplasme alors que RGA-7 Δ N et RGA-7 Δ F-BAR sont plus accumulés à la jonction (Figure 3.13.g). Ces observations suggèrent un

potentiel équilibre entre la localisation de RGA-7 et HMR-1 médié par les domaines de RGA-7 lorsque la tension mécanique augmente.

3.4 Étude de la distance entre les clusters chez l'ensemble des souches

L'étude à 10 minutes de la phase tardive de l'extension de l'ensemble des souches n'a pas révélé de différence au niveau de la quantification de la densité de cluster de HMR-1 et RGA-7. Pour mieux comprendre l'absence de différence des densités de clusters, la distance entre clusters a été étudiée. En outre, la taille des jonctions n'est pas modifiée quel que soit le contexte mécanique. Donc la différence observée, au niveau des distances entre les clusters, serait liée directement au stress mécanique et/ou aux fonds génétiques. La distance entre les clusters formés d'une même protéine fluorescente ou entre les deux protéines co-exprimées (HMR-1 et RGA-7) dans la même souche ont été quantifiées. La distance entre clusters de HMR-1 (H-H), est significativement plus élevée, pour les vers sauvages exprimant HMR-1::mCherry, dans un contexte de stress mécanique élevé (Figure 3.14.a). En revanche, les embryons *rga-7(ok1498)* ne présentent pas d'augmentation de la distance entre clusters HMR-1::mCherry (H-H) (Figure 3.14.a). La distance entre clusters H-H dans la souche contrôle qui permet le sauvetage fonctionnel semble augmenter, mais pas de façon significative (Figure 3.14.a). La distance entre clusters H-H dans les différentes souches co-exprimant les transgènes de RGA-7 ne varie pas non plus de façon significative (Figure 3.14.a). Ceci suggère que *rga-7* pourrait réguler la distance entre clusters de HMR-1 mais que les domaines N-terminal, F-BAR et C1 ne seraient pas nécessaires à cette fonction (Figure 3.14.a).

La distance entre cluster de transgène de RGA-7 (R-R) ne change pas de façon significative (Figure 3.14.b). De même, la distance de clusters entre HMR-1 et RGA-7 (H-R) dans les quatre souches transgéniques ne présente pas de différence

significative (Figure 3.14.c). La distribution de la distance entre cluster a été quantifiée (Figure 3.14.d), mais rien de significatif ne ressort malgré certaines variations observables.

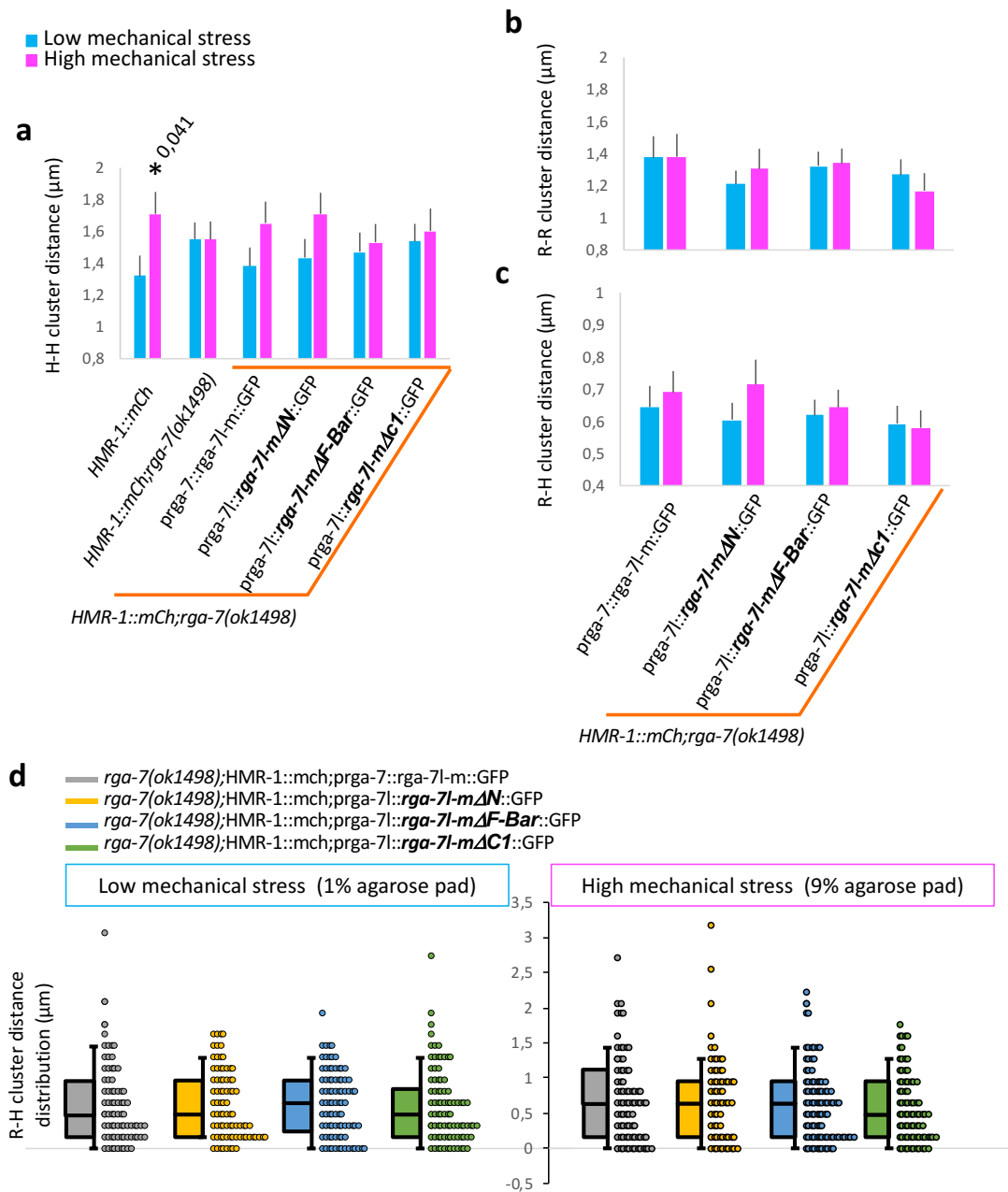


Figure 3.14 *rga-7* joue un rôle dans la régulation de la distance entre cluster de HMR-1 dans un contexte de stress mécanique élevé.

a. Histogramme représentant la distance entre cluster de HMR-1 (H-H) dans un contexte faible (bleu clair) ou élevé (fuchsia) de stress mécanique au temps 10 minutes après contact initial entre les cellules meneuses chez des embryons sauvages (noir), *rga-7(ok1498)* (orange), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-m::GFP* (gris), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔN::GFP* (jaune), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔF-BAR::GFP* (bleu), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔC1::GFP* (vert). b. Histogramme représentant la distance entre cluster de RGA-7 transgénique (R-R) dans un contexte faible (bleu clair) ou élevé (fuchsia) de stress mécanique au temps 10 minutes après contact entre les cellules meneuses chez des embryons *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-m::GFP* (gris), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔN::GFP* (jaune), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔF-BAR::GFP* (bleu), *rga-7(ok1498);rga-7lp::rga-7l-mΔC1::GFP* (vert). c. Histogramme représentant la distance entre cluster de HMR-1 et RGA-7 (H-R) dans un contexte faible (bleu clair) ou élevé (fuchsia) de stress mécanique au temps 10 minutes après contact entre les cellules meneuses chez des embryons *rga-7(ok1498)* co exprimant HMR-1::mCherry et *rga-7lp::rga-7l-m::GFP* (gris), *rga-7lp::rga-7l-mΔN::GFP* (jaune), *rga-7lp::rga-7l-mΔF-BAR::GFP* (bleu), *rga-7lp::rga-7l-mΔC1::GFP* (vert). d. Boîte à moustaches représentant la distance entre cluster de HMR-1 et RGA-7 (H-R) et sa distribution chez des embryons *rga-7(ok1498)* co exprimant HMR-1::mCherry et *rga-7lp::rga-7l-m::GFP* (gris), *rga-7lp::rga-7l-mΔN::GFP* (jaune), *rga-7lp::rga-7l-mΔF-BAR::GFP* (bleu), *rga-7lp::rga-7l-mΔC1::GFP* (vert) dans un contexte faible (carré bleu clair) ou élevé (carré fuchsia) de stress mécanique au temps 10 minutes après contact entre les cellules meneuses. Entre 7 et 10 embryons ont été analysés pour chaque condition *-t-test de Welch $p < 0,05$.

La distribution de la distance entre deux protéines fluorescentes différentes chez l'ensemble des souches, utilisées pour répondre à l'objectif spécifique 2, a également été étudiée et aucune différence significative n'a été observée (Figure 3.15).

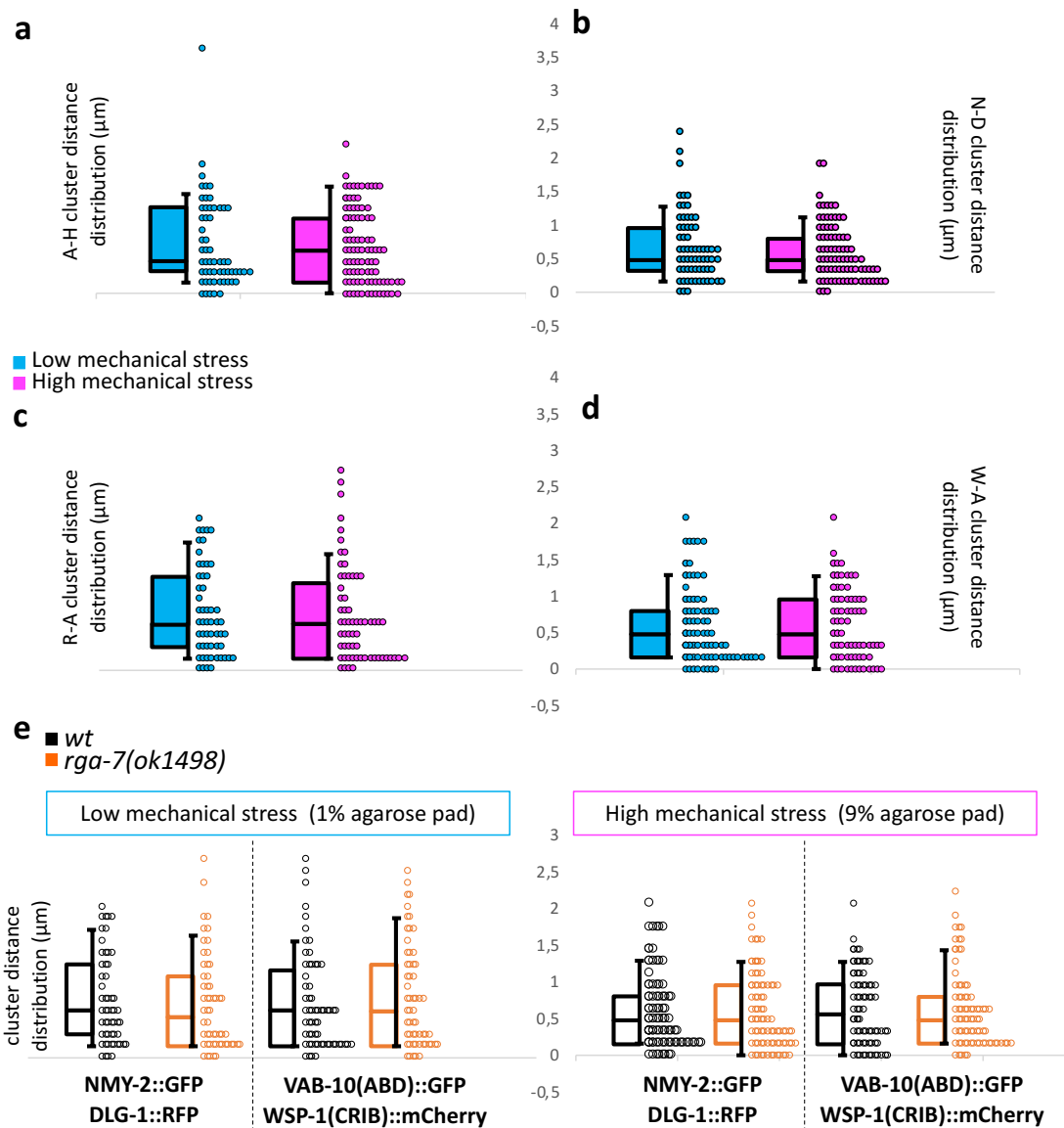


Figure 3.15 Distribution de la distance entre clusters de régulateurs différents sous différentes conditions de stress mécanique.

a. Boîte à moustaches représentant la distance entre cluster de HMR-1 et VAB-10(ABD) (H-A) et sa distribution dans un contexte faible (bleu clair) ou élevé (fuchsia) de stress mécanique au temps 10 minutes après contact entre les cellules meneuses. b. Boîte à moustaches représentant la distance entre cluster de NMY-2 et DLG-1 (N-D) et sa distribution dans un contexte faible (bleu clair) ou élevé (fuchsia) de stress mécanique au temps 10 minutes après contact entre les cellules meneuses. a. Boîte à moustaches représentant la distance entre cluster de RGA-7 et VAB-10(ABD) (R-A) et sa distribution dans un contexte faible (bleu clair) ou élevé (fuchsia) de stress mécanique au temps 10

minutes après contact entre les cellules meneuses. a. Boîte à moustaches représentant la distance entre cluster de WSP-1(CRIB) et VAB-10(ABD) (W-A) et sa distribution dans un contexte faible (bleu clair) ou élevé (fuchsia) de stress mécanique au temps 10 minutes après contact entre les cellules meneuses. a. Boîte à moustaches représentant la distance entre cluster de NMY-2;DLG-1 et WSP-1(CRIB);VAB-10(ABD) et les distributions chez des embryons sauvages et *rga-7(ok1498)* dans un contexte faible (carré bleu clair) ou élevé (carré fuchsia) de stress mécanique au temps 10 minutes après contact entre les cellules meneuses. Entre 7 et 10 embryons ont été analysés pour chaque condition *- t-test de Welch $p < 0,05$.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 *rga-7* régule les complexes jonctionnels apicaux

La fermeture ventrale du *C. elegans* constitue un excellent modèle pour étudier la formation des jonctions cellulaires, leurs maturation et maintien au cours du temps. La distinction de deux phases lors de l'extension de la jonction a permis d'étudier de façon spatio-temporelle la fermeture ventrale par des techniques de microscopie confocale. Il s'agit de la phase précoce, constituant le début de la formation de la jonction, et la phase tardive, décrivant principalement l'étape de maturation de la jonction. Les caractéristiques principales de la jonction ont été analysées, soit, l'accumulation de protéines à la jonction, l'anisotropie et la densité de clusters. Dans un premier temps, nos résultats suggèrent que *rga-7* régule l'accumulation et la structuration des protéines jonctionnelles des complexes Cadhérine/Caténine et DLG-1/AJM-1 (CCC et DAC respectivement), en phase tardive d'extension de la jonction pendant la fermeture ventrale du *C. elegans*. Plus précisément, *rga-7* semble réguler l'accumulation de DLG-1 et AJM-1, appartenant au complexe DAC, et de HMR-1/E-cadhérine du complexe CCC. RGA-7 serait importante également pour la distribution de HMR-1 à la jonction, tant au niveau de son anisotropie que de sa densité de clusters. L'adressage et la distribution de HMR-1 à la jonction semblent donc être contrôlés par RGA-7 lors de la maturation de la jonction cellule-cellule.

La formation de cette jonction est la conséquence de la migration des cellules latérales vers la ligne médiale ventrale de l'embryon. Cette migration collective des cellules latérales est dépendante du complexe jonctionnel CCC (Costa *et al.*, 1998). En outre, les embryons *rga-7(ok1498)* présentent des défauts de fermeture ventrale, allant de l'absence de migration à l'arrêt de l'extension de la jonction après le contact cellule-cellule ((Ouellette *et al.*, 2016), données non publiées). En tenant compte du contexte présenté et considérant le rôle démontré lors de cette étude de RGA-7 dans la régulation de l'accumulation de HMR-1 et de sa distribution spatiale, ceci suggère que RGA-7 pourrait réguler la distribution spatiale de HMR-1 au front de migration des cellules meneuses afin d'optimiser le contact cellule-cellule et l'extension conforme de la jonction formée, étapes critiques du développement embryonnaire.

Comme décrit dans l'introduction, le DAC, soit le complexe DLG-1/AJM-1, s'apparente aux jonctions septées retrouvées chez *Drosophila melanogaster* (Pásti et Labouesse, 2014). DLG-1 et AJM-1 sont les deux principales protéines jonctionnelles connues pour le DAC mais, étonnamment, la protéine transmembranaire d'ancrage à la jonction demeure inconnue. En revanche, le CCC, second complexe jonctionnel qui est le plus apical chez l'hypoderme du *C. elegans*, est ancré à la membrane par la protéine transmembranaire HMR-1, orthologue de la E-cadhérine chez les vertébrés (Pásti et Labouesse, 2014). Dans cette étude, il fut montré que *rga-7* possédait un rôle clé dans la régulation de HMR-1/E-cadhérine à la jonction en inhibant son accumulation à la jonction, mais également en régulant son agencement au cours de la phase tardive d'extension de la jonction (4-12 minutes). Récemment, un nouveau complexe jonctionnel chez le *C. elegans* a été identifié, il s'agit du SMAC pour *SAX-7/MAGI-1/AFD-1 complex* (Lynch *et al.*, 2012 ; Stetak et Hajnal, 2011). Celui-ci est composé (i) de la protéine transmembranaire SAX-7/L1-CaM, (ii) de MAGI-1/MAGuK, une protéine d'échafaudage possédant des domaines PDZ lui permettant de se lier à la bêta-caténine, et (iii) de la protéine adaptatrice AFD-1/Afadin (Lynch *et al.*, 2012). De plus, l'équipe de Jeff Hardin a montré que MAGI-1 régulait la

fermeture ventrale et que la localisation de MAGI-1 à la jonction est partiellement contrôlée par SAX-7 (Lynch *et al.*, 2012). Sachant le rôle de *rga-7* dans la modulation de l'accumulation et de la distribution spatiale de HMR-1 à la jonction, il serait très intéressant d'étudier si *rga-7* régule également SAX-7/L1-CaM, l'autre protéine transmembranaire connue appartenant à un complexe jonctionnel et qui s'exprime lors de la fermeture ventrale (Figure 4.1). Cela permettrait de mettre en avant un rôle potentiel de *rga-7* dans la régulation du recrutement des protéines transmembranaires jonctionnelles.

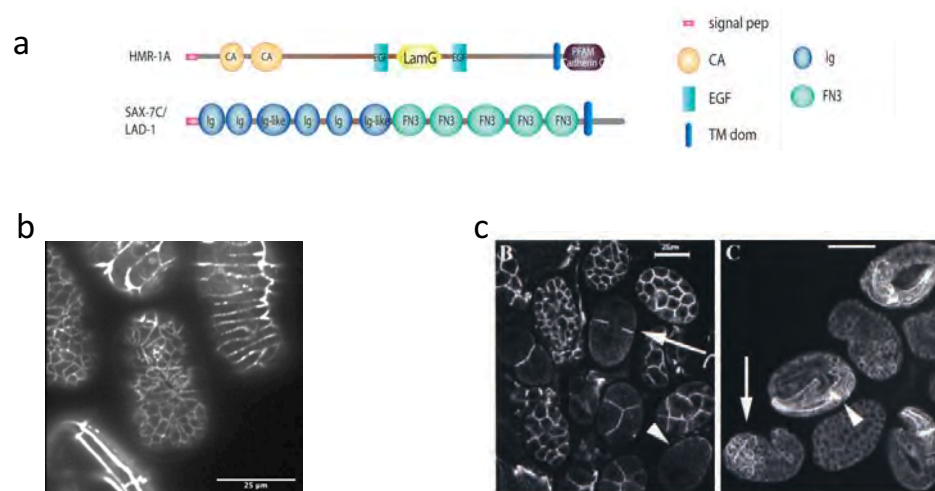


Figure 4.1 HMR-1 et SAX-7 possèdent un domaine transmembranaire et s'expriment chez les embryons de *C. elegans*.

a. Structure des protéines transmembranaires HMR-1 et SAX-7 appartenant à deux complexes jonctionnels apicaux chez le *C. elegans* adaptée de Labouesse 2016. b. Image de microscopie confocale d'embryons exprimant HMR-1::GFP. Échelle :25 μm c. Images de microscopie confocale (laser scanning) d'immunofluorescence de LAD-1/SAX-7 sur des embryons de *C. elegans*. Échelle:25 μm. Image adaptée de (Chen *et al.*, 2001).

4.2 *rga-7* régule l'exocytose et/ou le recyclage de HMR-1/E-cadhérine

Les études de FRAP en phase précoce et tardive d'extension de la jonction, soit à 2 min et 10 min respectivement après le contact initial des cellules meneuses ventrales, ont permis de valider le modèle *in vivo* de la fermeture ventrale du *C. elegans* pour suivre la dynamique et l'évolution d'une jonction cellule-cellule, de sa formation à sa maturation. En se focalisant sur la phase tardive d'extension de la jonction (10 minutes), les résultats des expériences de FRAP suggèrent que RGA-7 régulerait l'accumulation de HMR-1 à la jonction en inhibant la voie d'exocytose et/ou de recyclage de HMR-1. Sachant que la récupération de la fluorescence est homogène et que la structuration de HMR-1 est récupérée après le FRAP (données non montrées), nous avons estimé que la récupération de fluorescence à la jonction était associée à un transport entre des domaines intracellulaires et la jonction. Cependant, il n'est pas possible d'exclure totalement la diffusion. En effet, il a été montré dans différents modèles que le recrutement des cadhérines à la membrane peut également se faire par diffusion le long de la membrane, soit de manière rétrograde lors de la migration collective de cellules (Peglion *et al.*, 2014), soit de manière baso-apicale (Kametani et Takeichi, 2007). Il importe de mentionner que les expériences de FRAP ont été réalisées sur un seul plan dans le z, ce qui ne permet pas l'évaluation de la contribution de la diffusion baso-apicale des cadhérines. Réaliser des expériences de FRAP avec une définition dans le z permettra d'évaluer la présence d'un flux de HMR-1/E-cadhérine baso-apical contribuant à la maturation de la jonction.

D'autre part, nous avons précédemment montré que, une fois que les protéines jonctionnelles s'accumulaient après le contact entre les cellules meneuses, *rga-7* régulait la vitesse d'extension de la jonction de façon antagoniste avec *wsp-1*, effecteur de CDC-42, et son partenaire fonctionnel *toca-1/2* (Ouellette *et al.*, 2016). De plus chez le *C. elegans*, la voie CDC-42/TOCA-1/2/WSP-1 régule les voies d'endocytose et de recyclage des protéines de jonctions en modulant la dynamique de l'actine (Giuliani *et al.*, 2009). Ceci suggère que RGA-7 pourrait donc, de la même

façon que pour l'inhibition de l'extension de la jonction, agir soit, de façon antagoniste à la voie d'endocytose soit, dans la même voie de régulation de recyclage dans lesquelles sont impliqués CDC-42, TOCA-1/2 et WSP-1.

En outre, suite à leur endocytose, les E-cadhérines sont localisées au niveau des endosomes précoces, *i.e.* RAB-5 positif, puis sont triées pour être recyclées à la membrane ou dégradées par les lysosomes (Brüser et Bogdan, 2017). La régulation qui permet ce triage n'est pas encore comprise. Les cadhérines passent par deux voies de recyclage; une voie rapide associée à la GTPase Rab4 (de Madrid *et al.*, 2015) et une voie plus lente par les endosomes de recyclage Rab11 positif (Scott *et al.*, 2014 ; Stenmark, 2009). Deux sortes de vésicules sont sécrétées à la membrane par l'exocyste : celles contenant des cadhérines issues des endosomes de recyclage Rab11 positif ou des cadhérines néo-synthétisées provenant du réseau transgolgien. L'exocyste est la voie privilégiée de l'exocytose des E-cadhérines. Une étude a mis en lumière une interaction entre l'exocyste et Rab11 permettant le ciblage à la membrane de vésicules contenant des E-cadhérines endocytées ou néosynthétisées (Woichansky *et al.*, 2016). L'exocytose et/ou de recyclage de HMR-1 dans les cellules de l'hypoderme pourrait donc dépendre minimalement de ces trois voies potentielles du trafic membranaire. Discriminer les voies privilégiées dans notre système d'étude et celles qui pourraient être associées à RGA-7 serait un point d'étude important. La formation des vésicules de sécrétions est associée à la tubulation de l'endomembrane de compartiments intracellulaires, qui implique régulièrement une protéine possédant un domaine F-BAR (Ahmed *et al.*, 2010). Sachant que RGA-7 affiche un domaine F-BAR et qu'elle présente une localisation cytoplasmique de type tubulaire, il est possible que RGA-7 soit recrutée au niveau de ces compartiments intracellulaire lorsque la jonction serait soumise à un stress mécanique. Ainsi RGA-7 pourrait réguler la tubulation des endosomes afin de contrôler le nombre de vésicules sécrétées à la membrane afin de répondre à ce stress (Brüser et Bogdan, 2017).

Une étude récente a montré que chez des hermaphrodites adultes, RGA-7 régule le flux de calcium à l'origine de la contraction des spermathèques pour féconder les oocytes avant la ponte (Bouffard *et al.*, 2019). Cette étude met en lumière une régulation directe, ou indirecte *via* CDC-42, de RGA-7. Cependant l'activateur direct permettant l'augmentation de la concentration de calcium n'a pas été identifié. Or, le calcium est le second messenger principal de l'exocytose régulée (Bi *et al.*, 1995 ; Hong-Geller et Cerione, 2000 ; Rodríguez *et al.*, 1997). On pourrait émettre l'hypothèse que l'inhibition de l'exocytose et/ou du recyclage de HMR-1/E-cadhérine par *rga-7* se ferait par la régulation du relargage de calcium dans le cytoplasme en inhibant CDC-42 ou un intermédiaire inconnu. Pour confirmer cette hypothèse, l'expression de la sonde de calcium GCamp (*green fluorescent-calmodulin-M13 fusion protein*), largement utilisée pour le suivi d'activité des neurones chez le *C. elegans* (Tian *et al.*, 2009) pourra être utilisée sous le contrôle du promoteur *lin-26p*.

4.3 *rga-7* régule la localisation de l'accumulation de HMR-1 de manière mécanosensible

Nous avons mis au point un nouveau système permettant de suivre la formation de nouvelle jonction *in vivo* chez des embryons de *C. elegans* dans deux conditions de stress mécaniques : soit faible, soit élevée. Il est important de noter que très peu d'études ont été réalisées dans un système de faible stress mécanique. En effet, la majorité de études utilise la génération d'un stress mécanique élevé afin d'obtenir une réponse renforcée aux jonctions. Notre système permet d'obtenir cette réponse renforcée lorsque les embryons sont soumis à un stress mécanique élevé mais également d'observer dans un système peu stressant mécaniquement la réponse cellulaire.

Ces deux conditions d'étude ont permis de montrer que *rga-7* possède une fonction mécanosensible lors de la morphogénèse épithéliale. En effet, en étudiant la fermeture

ventrale dans un contexte de stress mécanique faible ou élevé, il fut observé que *rga-7* régule l'accumulation de HMR-1 à la jonction sous condition de faible stress mécanique. En présence d'une forte tension mécanique, *rga-7* module la distribution de HMR-1 (anisotropie et densité de clusters) à la jonction. En étudiant plus précisément la jonction, il fut mis en évidence que cette régulation mécanosensible serait associée à une inhibition spécifique de l'exocytose et/ou du recyclage aux clusters et autour des clusters dans un contexte de faible stress mécanique. En revanche, sous un stress mécanique élevé, cette inhibition serait ciblée entre les clusters. Donc, RGA-7 en régulant spatialement l'exocytose et/ou le recyclage de HMR-1, module également l'arrangement de HMR-1/E-cadhérine à la jonction. Or selon l'étude de la régulation de la contraction de la spermathèque par RGA-7, lorsque la spermathèque n'est pas étirée RGA-7 serait active et localisée à la membrane grâce à son domaine de liaison aux membranes courbées. Elle deviendrait inactive et transloquée dans le cytoplasme lorsque la membrane de la spermathèque s'étire (Tan et Zaidel-Bar, 2015). Ceci suggère que l'inhibition de l'exocytose et/ou du recyclage de HMR-1 lorsque la jonction est soumise à un stress mécanique élevé dépend d'une autre voie de régulation impliquant RGA-7 que celle privilégiée pour réguler l'exocytose de HMR-1 à la jonction à faible stress mécanique.

D'autre part, il a été montré que les jonctions cellulaires, lorsque soumises à des contextes mécaniques locaux différents dû aux forces appliquées entre cellules, présentent des temps de demi-récupération très variables (de Beco *et al.*, 2015). Ceci est également observé lors de notre étude. En effet, la distribution de temps de demi-récupération des jonctions est très étalées chez des embryons surexprimant HMR-1::GFP au temps 10 minutes. Il est important de noter que cette distribution disperse du temps de demi-récupération n'est plus visible chez les jonctions *rga-7(ok1498)*. Il serait intéressant d'étudier si l'homogénéité du temps de demi-récupération est conservée dans un contexte plus ou moins élevé de stress global sur les embryons. Ces résultats aideront à définir le rôle de *rga-7* dans la dynamique des cadhérines

dans un contexte mécanique *in vivo*. De plus, en co-exprimant HMR-1::GFP avec des marqueurs du trafic membranaire (Rab5 et Rab35 pour les endosomes précoces, et Rab11 pour les endosomes de recyclage et Rab4 voie rapide de recyclage) sous contrôle d'un promoteur spécifique de l'hypoderme (*lin-26p* ou *elt-3p*), il serait possible de discriminer les voies d'exocytose et/ou de recyclage favorisées selon le stress mécanique appliqué. Le rôle de RGA-7 pourrait également être étudié en générant ces souches dans un fond génétique *rga-7(ok1498)* afin d'évaluer si cette mutation est associée à une altération d'une ou plusieurs de recyclage des E-cadhérines selon l'environnement mécanique.

4.4 La composition des jonctions entre les cellules meneuses en cours de maturation varie selon le contexte mécanique

Pour mieux comprendre la voie de régulation de l'accumulation de HMR-1/E-cadhérine passant par RGA-7 dans un contexte de stress mécanique changeant, l'étude de plusieurs protéines connues dans la régulation de l'accumulation de la E-cadhérine à la membrane a été réalisée (Engl *et al.*, 2014 ; Giuliani *et al.*, 2009). En effet, CDC-42 a été associée à la régulation de l'endocytose des protéines jonctionnelles (Giuliani *et al.*, 2009). Pour sa part, le cytosquelette d'actine-myosine joue un rôle dans la stabilisation des clusters de E-cadhérines lorsque la jonction est soumise à un stress mécanique (Engl *et al.*, 2014). De plus, il a récemment été mis en avant que les E-cadhérines sont impliquées dans un dialogue avec le cytosquelette d'actine-myosine afin de répondre aux stress mécaniques (Yap *et al.*, 2018). Par exemple, chez les embryons de drosophile soumis à une pression mécanique, l'expression des cadhérines est diminuée et l'accumulation de la myosine à la jonction augmente (Sumi *et al.*, 2018).

Nos résultats montrent que l'augmentation du stress mécanique semble modifier l'accumulation le long de la jonction et dans le cytoplasme des régulateurs de

l'arrangement spatiale de HMR-1, soit RGA-7, NMY-2, et la forme active de CDC-42. De plus, l'asymétrie d'accumulation du cytosquelette d'actine-myosine dans le cytoplasme des cellules meneuses semble conserver lorsque le stress mécanique augmente, alors que celle de RGA-7 surexprimée dans l'hypoderme et de la forme active de CDC-42 est maintenue, mais change de cellules. De plus, nous avons observé que la conservation de cette asymétrie de distribution d'accumulation du cytosquelette d'actine-myosine dans le cytoplasme des cellules meneuses serait médiée par la fonction moléculaire de *rga-7*. Nos résultats suggèrent que *rga-7* régule positivement l'accumulation jonctionnelle de NMY-2 et de CDC-42 actif à haut stress mécanique, alors que *rga-7* inhibe leur accumulation à faible stress mécanique. Cette étude suggère donc une fonction mécanosensible de *rga-7* dans la régulation de NMY-2 et CDC-42 sous sa forme active.

Dans notre étude, les protéines (i) NMY-2, (ii) CDC-42 sous sa forme active liée au GTP, (iii) RGA-7 surexprimée dans l'hypoderme, (iv) les filaments d'actine et (v) HMR-1 ont été étudiés et ce, en utilisant 4 souches différentes de vers co-exprimant deux acteurs fusionnés à des protéines fluorescentes. Les embryons soumis aux différents contextes de stress mécanique ont permis de montrer que l'accumulation de ces protéines à la jonction et autour de la jonction est modifiée en augmentant le stress mécanique. Il est à noter que les souches exprimant HMR-1, RGA-7 et CDC-42 actif, expriment également la sonde VAB-10(ABD), permettant de localiser les filaments d'actine, fusionnée à la protéine mCherry ou GFP. Quant à la protéine NMY-2, elle est co-exprimée avec DLG-1, protéine appartenant au DAC et permettant de localiser la jonction. Particulièrement, l'accumulation de la sonde VAB-10(ABD) à la jonction varie en fonction des souches, quand le stress mécanique augmente. Or, lorsque l'on cible la compilation transversale des profils d'intensité de fluorescence parcourant la jonction de plusieurs embryons, les profils d'intensité de la sonde de détection des filaments d'actine, VAB-10(ABD), à faible stress mécanique ne présentent pas la même accumulation à la jonction. En effet, les souches

surexprimant HMR-1 ou RGA-7 dans l'hypoderme présentent une accumulation plus faible des filaments d'actine à la jonction par rapport à la souche exprimant la sonde de CDC-42. Sachant que RGA-7 inhibe l'exocytose et/ou le recyclage de HMR-1 et que la surexpression de HMR-1 et RGA-7 inhibe l'accumulation des filaments d'actine à la jonction, ceci suggère un dialogue entre la voie RGA-7/HMR-1 et le cytosquelette d'actine. En revanche, dans un contexte de stress mécanique élevé, les profils d'intensité chez les trois souches exprimant la sonde VAB-10(ABD) présentent un profil d'expression identique. Ceci suggère que le stress mécanique appliqué sur les embryons lève l'inhibition de l'accumulation des filaments d'actine à la jonction associée à la surexpression de HMR-1 et de RGA-7 à faible stress mécanique.

4.5 *rga-7* contrôle l'accumulation de NMY-2 et CDC-42 actif

Après avoir montré que l'augmentation du stress mécanique modifiait l'accumulation des régulateurs, soit RGA-7, NMY-2, et la forme active de CDC-42, l'étude du rôle de *rga-7* dans l'accumulation de ces deux dernières protéines de signalisation fut réalisée. L'ensemble des souches a été croisé avec des mâles *rga-7(ok1498)*, mais seulement deux souches (NMY-2/DLG-1 et WSP-1(CRIB)/VAB-10(ABD)) ont pu être générées car la sonde VAB-10(ABD)::mCherry est localisée sur le même chromosome que *rga-7(ok1498)*.

Notre laboratoire a montré précédemment que RGA-7 affiche une activité GAP pour CDC-42 et RHO-1 (Ouellette *et al.*, 2016). L'étude de la forme active de CDC-42 et de NMY-2, qui est une cible de la voie de signalisation RHO-1/LET-502 (Gally *et al.*, 2009 ; Piekny *et al.*, 2003 ; Wernike *et al.*, 2016), permet d'apprécier le rôle de RGA-7 dans les voies de signalisation de ces deux GTPases. De plus, il fut récemment montré que RGA-7/SPV-1 contrôle le flux de calcium via l'inhibition de

CDC-42, modulant ainsi la contraction de la spermathèque (Bouffard *et al.*, 2019). Selon ce modèle, la tension de la membrane de la spermathèque inhibe la fonction GAP de SPV-1 sur RHO-1 et CDC-42. En suivant ce modèle, les embryons *rga-7(ok1498)* posés sur des coussins d'agarose à 1%, donc soumis à un faible stress mécanique, ne possèderaient pas de RGA-7 actif sous ces conditions; il n'y aurait donc pas d'inhibition des GTPases RHO-1 et CDC-42 à la jonction. Or, à faible stress mécanique, NMY-2 et CDC-42 sous sa forme active s'accumulent davantage à la jonction, confirmant ainsi l'inhibition de la fonction GAP de RGA-7 par la tension à la membrane.

De plus, nos résultats montrent que sous faible stress mécanique, HMR-1 s'accumule à la jonction en absence de *rga-7*, suggérant que RGA-7 inhibe l'exocytose et/ou le recyclage de HMR-1 lorsque sa fonction GAP est active. Donc, lorsque le stress augmente l'inhibition de l'exocytose serait levée et les vésicules de HMR-1 seraient sécrétés à la membrane à l'aide de flux de calcium. Sachant qu'une augmentation de la concentration de Ca^{2+} promeut l'exocytose de vésicules à la membrane et que RGA-7 et CDC-42 régulent le flux de calcium au niveau de la spermathèque, cela suggère que RGA-7 régulerait le flux de calcium pour moduler l'exocytose des vésicules transportant HMR-1 à la jonction et ce, dans un contexte d'extension des jonctions pendant la fermeture ventrale.

En condition de tension élevée, l'accumulation globale de la forme active de CDC-42 n'est pas modifiée chez des embryons *rga-7(ok1498)*, confirmant l'hypothèse de l'étude de Tan et Zaidel-Bar que SPV-1/RGA-7 régulerait préférentiellement RHO-1 à la suite d'un changement de tension à la membrane de la spermathèque et non CDC-42 (Tan et Zaidel-Bar, 2015). Néanmoins, en étudiant plus précisément l'accumulation jonctionnelle de la forme active de CDC-42, celle-ci s'accumule moins aux zones où elle est déjà concentrée en clusters. Ceci suggère que *rga-7*, dans le système mécanique de l'étude, régule également la distribution de la forme active de CDC-42 confirmant donc les précédents résultats de notre laboratoire (Ouellette et

al 2016). En revanche, en absence de *rga-7* et sous conditions de tension élevée, NMY-2 s'accumule moins dans les zones de la jonction moins dense en NMY-2. Ceci suggère que *rga-7* régule l'accumulation et la distribution de NMY-2 le long de la jonction.

4.6 Les domaines de RGA-7 participent à la distribution spatiale de l'accumulation de HMR-1 et à sa propre distribution spatiale

Notre étude suggère l'importance du domaine F-BAR de RGA-7 dans la localisation de l'inhibition de l'accumulation de HMR-1 le long de la jonction. En outre, les domaines N-terminal et F-BAR participent à un dialogue entre RGA-7 et HMR-1, conduisant à une localisation fonctionnelle de HMR-1 à la jonction en réponse au stress mécanique. Celle-ci semble être corrélée par la distribution asymétrique d'accumulation de RGA-7, qui est elle-même régulée par ses domaines N-terminal et F-BAR lorsque le stress mécanique augmente.

En étudiant le rôle de ces différents domaines dans la régulation de l'accumulation de HMR-1 à la jonction, il en ressort que le domaine F-BAR jouerait un rôle dans la régulation spatiale de l'accumulation de HMR-1 le long de la jonction. Selon la littérature actuellement disponible, la souche exprimant RGA-7 Δ F-BAR::GFP semble exprimer une version constitutivement active de RhoGAP (Tan et Zaidel-Bar, 2015). En effet, un orthologue humain de RGA-7, HMHA1, présente une activité constitutive de sa fonction GAP lorsque son domaine F-BAR est retiré (de Kreuk *et al.*, 2013). De même, chez le *C. elegans*, les auteurs suggèrent que SPV-1/RGA-7 démontre cette même activité GAP constitutive (Tan et Zaidel-Bar, 2015). Nos résultats démontrent que quelque soit le stress mécanique appliqué sur les embryons, l'accumulation à la jonction de HMR-1 est toujours significativement plus élevée chez la souche exprimant RGA-7 Δ F-BAR dans un fond génétique *rga-7(ok1498)* comparée à la souche mutante simple. Ceci suggère que l'activité GAP de RGA-7,

impliquée dans la régulation de l'exocytose et/ou le recyclage de HMR-1, engagerait le domaine F-BAR de RGA-7. En observant son accumulation à la jonction, le transgène RGA-7 Δ F-BAR::GFP est significativement plus accumulé dans les zones jonctionnelles où il est le moins présent (*i.e.* entre les clusters) par rapport à RGA-7m::GFP dans un contexte élevé de stress mécanique. Ceci suggère que le domaine F-BAR de RGA-7 régule son accumulation à la jonction, donc sa localisation membranaire, ce qui va permettre d'inhiber de façon spécifique l'exocytose de HMR-1 le long de la jonction. Cette régulation à la jonction semblerait être inhibée lorsque la tension mécanique augmente.

La distribution symétrique de HMR-1 est modifiée lorsque le domaine C1 de RGA-7 est tronqué, suggérant un rôle pour ce domaine dans la régulation de l'accumulation de HMR-1 dans le cytoplasme des cellules meneuses.

Les domaines C1 et N-terminal semblent jouer un rôle dans la distribution spatiale de RGA-7 le long de la jonction. En effet, nos résultats suggèrent que le domaine C1 inhibe la localisation de RGA-7 entre les clusters, mais pas aux minima d'accumulation et autour des clusters. Le domaine N-terminal, dans un contexte de stress élevé à la jonction, inhibe l'accumulation de RGA-7 tout le long de la jonction, à l'exception des minima d'accumulation. À l'opposé, dans un contexte de faible stress mécanique, le domaine N-terminal promeut la localisation de RGA-7 à la jonction. Ces résultats suggèrent que le recrutement de RGA-7 à la jonction pourrait être régulé par son domaine N-terminal en condition de faible stress mécanique et ce domaine inhiberait son recrutement à la suite d'une augmentation de ce stress. Considérant que ce domaine ne présente aucune homologie significative de séquence avec une protéine connue, une prédiction de structure 3D (RaptorX) a été réalisée dans le laboratoire et a révélé que le domaine N-terminal de RGA-7 avait une homologie de structure avec le domaine mécanosensible de l'alpha-caténine (MII-MIII, (Ishiyama *et al.*, 2013)) (Figure 4.2). Cette fonction mécanosensible potentielle du domaine N-terminal pourrait être à l'origine du recrutement de RGA-7 à la

jonction en absence de stress mécanique. D'autre part, le domaine N-terminal de RGA-7 constitue un domaine riche en sérines, pouvant mettre en lumière un domaine de régulation de son activité. En effet comme décrit dans l'introduction, l'activité des RhoGAPs peut être inhibée par une protéine chaperonne 14-3-3 via la phosphorylation de résidus, tels que les sérines. Dans le *C. elegans* l'homologue le plus proche de 14-3-3 est PAR-5, qui a été démontré dans la régulation de la polarité apico-basale avec RAB-11, marqueur des endosomes de recyclage (Winter *et al.*, 2012). Par conséquent une voie de régulation pourrait avoir lieu entre ces différents acteurs du recyclage membranaire.

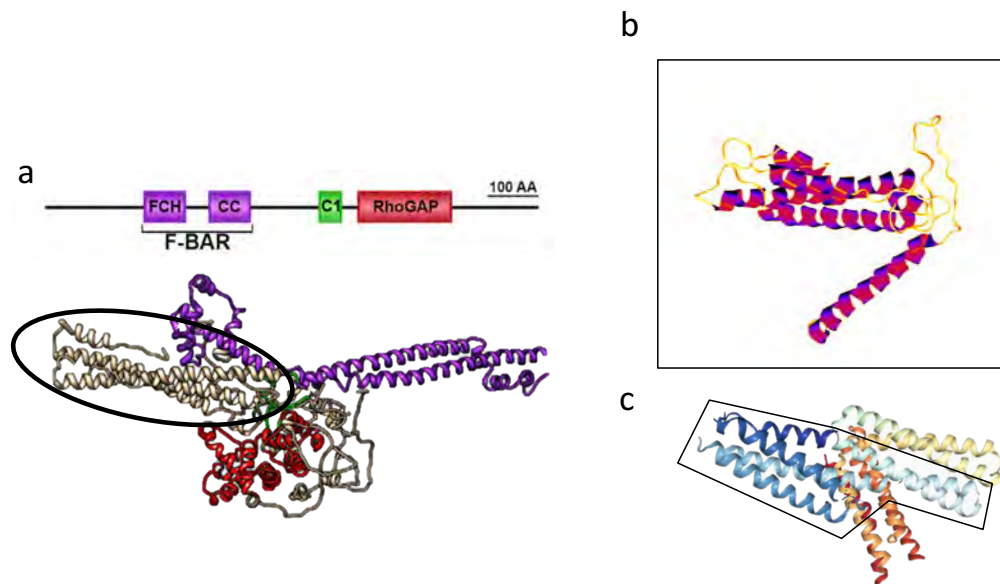


Figure 4.2 Prédiction de la structure du domaine N-terminal de RGA-7 montrant une homologie à une des structures de l'alpha-caténine.

a. Structure de la protéine RGA-7 complète où les différents domaines sont représentés : le N-terminal (beige cerclé noir), le domaine F-BAR (violet), le domaine C1 (vert) et le domaine GAP (rouge). (Tan et Zaidel-Bar, 2015) b. Prédiction de la structure de quadruple hélices s'apparentant à l'alpha-caténine en N-terminal de RGA-7 tel que générée par RaptorX. c. Image de la structure cristalline de HMP-1 (PDB ID : 5H5M) homologue de

l'alpha-caténine du *C. elegans* (Kang *et al.*, 2017) visualisée grâce à NGL Viewer ((Rose *et al.*, 2018) et RCSB PDB (rcsb.org)). Le domaine N-terminal est encadré en noir.

De plus, la délétion des domaines F-BAR et N-terminal de RGA-7 modifie l'accumulation de RGA-7 dans un contexte de stress mécanique élevé, ce qui résulte en une accumulation de HMR-1 dans le cytoplasme, très certainement dans un compartiment membranaire d'endocytose et/ou de recyclage. Ceci suggère que les domaines N-terminal et F-BAR de RGA-7 jouent un rôle dans le recrutement de HMR-1 à la jonction.

Le domaine C1, quant à lui, semble réguler le recrutement de RGA-7 à la jonction différemment que les deux autres domaines. Contrairement aux domaines N-terminal et F-BAR, le domaine C1 n'a jamais été associé à un stress mécanique à ce jour, mais peut interagir avec le DAG, qui est un produit de la phospholipase C responsable de l'hydrolyse du PIP₂ en IP₃ et DAG. L'IP₃ va se lier au récepteur IP₃R au réticulum endoplasmique afin de libérer du calcium qui va permettre, finalement, un remodelage du cytosquelette d'actine-myosine (Tsai *et al.*, 2015). Or, une étude récente lie RGA-7 à la régulation du flux calcique pour contrôler la contraction de la spermathèque (Bouffard *et al.*, 2019). Ce flux de calcium pourrait également réguler l'exocytose de HMR-1. À la lumière de ces observations, le domaine C1 pourrait réguler de façon différente le recrutement de RGA-7 à la membrane. En effet, dans des cardiomyocytes, un signal de tension permettant l'activation de la PLC va augmenter la concentration de DAG à une localisation spécifique de la jonction (Ruwhof *et al.*, 2001). RGA-7 pourrait se fixer au niveau de cette région membranaire riche en DAG et avoir une localisation plus spécifique pour réguler l'exocytose de HMR-1 à la membrane lorsque le stress mécanique augmente. En étudiant cette hypothèse, de nouvelles propriétés de RGA-7 émergeront. D'autre part, il est possible tout comme le domaine F-BAR que le domaine C1 pourrait aussi être utile au recrutement de RGA-7 au niveau des endosomes de recyclage par son

interaction avec le DAG. En effet, le DAG est important pour les fonctions de recyclage des endosomes (Grant et Donaldson, 2009).

4.7 Régulation de la symétrie d'accumulation de protéines de signalisation dans les cellules meneuses par RGA-7

Lors de l'étude de la distribution de l'accumulation des principaux acteurs régulant la dynamique des E-cadhérines, un phénotype de différence d'accumulation dans les cellules meneuses de part et d'autre de la jonction ventrale est apparu. Il fut nommé asymétrie d'accumulation des protéines. L'étude du ratio d'accumulation entre les cellules meneuses a mis en évidence que les régulateurs étudiés, soient (i) le cytosquelette d'actine-myosine, (ii) RGA-7 surexprimée dans l'hypoderme et (iii) la forme active de CDC-42, présentent une asymétrie d'accumulation lorsque le stress mécanique augmente. L'asymétrie est importante pour RGA-7 et légère pour la forme active de CDC-42 (liée au GTP) lorsque le stress augmente. Notamment, le cytosquelette d'actine-myosine présente une asymétrie qui disparaît chez les mutants *rga-7(ok1498)* lorsque le stress mécanique augmente. De plus, l'étude sur les souches exprimant RGA-7 sauvage ou les mutants RGA-7 Δ N, RGA-7 Δ F-BAR et RGA-7 Δ C1, montre que l'asymétrie d'accumulation de RGA-7 sauvage observée sous stress mécanique élevé semble être régulée par ses domaines N-terminal et F-BAR.

Par ailleurs, la fermeture ventrale du *C. elegans* constitue un excellent modèle pour suivre la migration collective des cellules épithéliales *in vivo*. La migration collective est un processus essentiel au développement embryonnaire, à la cicatrisation et à l'invasion des carcinomes (Mayor et Etienne-Manneville, 2016). Elle consiste en la migration d'un groupe de cellules qui utilise un système de traction-propulsion permis par le cytosquelette d'actine-myosine pour avancer tout en maintenant leur jonction intercellulaire (Etienne-Manneville, 2014). Le remodelage du cytosquelette permettant la migration collective des cellules est régulé par les GTPases Rho (Hall,

1998). Nous avons précédemment montré que *rga-7*, RhoGAP pour CDC-42 et RHO-1, régula la migration collective des cellules épithéliales lors de la fermeture ventrale de façon antagoniste avec *wsp-1* et son partenaire fonctionnel *toca-1/2*. *rga-7* contrôle également la formation de protrusions riches en actine au front de migration (Ouellette *et al.*, 2016). Les orthologues de RGA-7 chez l'humain ont également été identifiés en tant que régulateur de la dynamique du cytosquelette d'actine-myosine. RGA-7 possède 3 orthologues humains qui sont ARHGAP29/PARG1, HMHA1/ARHGAP45 et GMIP/ARHGAP46 (Tan et Zaidel-Bar, 2015). De récentes études sur HMHA1 et ARHGAP29 ont mis en évidence un rôle au niveau de la régulation de la migration cellulaire en modulant la dynamique du cytosquelette. Par exemple, la perte de HMHA1 dans des cellules endothéliales HUVECs augmente la vitesse de migration cellulaire et donc de cicatrisation, suggérant une altération du système traction-propulsion régulé par la contraction du cytosquelette d'actine-myosine (Amado-Azevedo *et al.*, 2018). Cette perte amplifie également la réponse cellulaire au stress de frottement et donc, serait aussi à l'origine d'une altération de la réponse mécanosensible (Amado-Azevedo *et al.*, 2018). D'autre part, lors du développement de vaisseaux sanguins chez la souris, ARHGAP29 associée à Rasip1 (*Ras interacting protein 1*), a été montrée comme régulateur de l'activité contractile de la myosine non-musculaire II par l'inhibition du complexe RhoA-ROCK-NMY-2, permettant l'extension de la membrane afin de maintenir le lumen du néovaisseau ouvert (Barry *et al.*, 2016). Cela pourrait suggérer un rôle central de *rga-7* dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine-myosine dans la migration cellulaire. Sachant qu'une fois que les cellules meneuses entrent en contact, les cellules présentent une asymétrie de distribution du cytosquelette d'actine-myosine régulée par *rga-7* et que les embryons mutants *rga-7(ok1498)* présentent des défauts de migration des cellules meneuses, RGA-7 jouerait donc un rôle dans la distribution asymétrique dans les cellules meneuses du cytosquelette d'actine-myosine permettant la formation de protrusion riche en actine afin de permettre le contact cellule-cellule puis l'extension de la jonction. De plus, l'origine de la distribution asymétrique de

RGA-7 serait liée au rôle mécanosensible de ses domaines N-terminal et F-BAR qui permettraient une régulation asymétrique du cytosquelette d'actine-myosine par CDC-42 et RHO-1.

Il serait intéressant d'étudier l'incidence des domaines de RGA-7 sur la distribution asymétrique d'accumulation du cytosquelette d'actine-myosine. Une co-expression des transgènes mutants de RGA-7 avec une sonde d'actine ou NMY-2::GFP permettrait également de confirmer si la distribution asymétrique de RGA-7 joue un rôle sur celle du cytosquelette d'actine-myosine. Moduler le cytosquelette d'actine-myosine par des agents chimiques, tels que la cytochalasine D, sur des embryons co-exprimant HMR-1::GFP avec la sonde actine ou la génération de la souche *nmy-2(ne1490)* mutant thermosensible pour *nmy-2* exprimant HMR-1::GFP, permettrait d'étudier le rôle de cette asymétrie sur la régulation de la dynamique jonctionnelle de HMR-1/E-cadhérine. Elle permettrait également d'identifier un dialogue potentiel entre RGA-7 et le cytosquelette d'actine-myosine afin de maintenir les jonctions cellule-cellule lorsqu'elles sont soumises à une tension mécanique.

D'autre part, comme discuté dans l'introduction, deux réponses sont possibles suite à la détection de stimuli mécaniques, une réponse rapide qui va jouer sur les propriétés mécaniques du cytosquelette d'actine et une réponse plus tardive impliquant la voie de signalisation Hippo. L'activation de la voie Hippo par stimuli mécanique va permettre la phosphorylation de YAP (*yes activating protein*), qui est un co-activateur transcriptionnel, et sa translocation au noyau afin de permettre la transcription de gènes cibles (Varelas, 2014). Dans une récente étude utilisant une lignée cellulaire humaine de cancer gastrique, il fut montré que l'une des cibles transcriptionnelles de YAP est l'orthologue de RGA-7, ARHGAP29. Dans ce modèle, YAP promeut l'expression de ARHGAP29 afin de déstabiliser les filaments d'actine en inhibant RhoA/LIMK (*Lim domain Kinase*)/cofilin, favorisant la formation de métastases (Qiao *et al.*, 2017). Connaissant l'existence de l'orthologue de YAP, YAP-1 chez le *C. elegans* (Yang et Hata, 2013), il serait intéressant d'étudier la contribution de

YAP-1 dans la fermeture ventrale du *C. elegans* et d'évaluer si RGA-7 agit de façon parallèle à YAP-1 ou en aval comme cible transcriptionnelle dans la régulation de la migration des cellules meneuses lors de la fermeture ventrale.

4.8 Le changement de stress mécanique ou de génotype influence la densité de cluster en phase tardive d'extension de la jonction

À la suite de l'étude de la structuration de la jonction HMR-1/E-cadhérine en phase tardive d'extension (4-12 minutes), nos résultats suggèrent que *rga-7* est important pour l'augmentation du nombre de clusters de HMR-1 à la jonction (la densité de clusters). Par conséquent, la densité de clusters, caractéristique de structuration, a été analysée pour l'ensemble des souches étudiées au temps 10 minutes de la phase tardive d'extension de la jonction. Cependant, aucune différence significative n'a été observée quel que soit les protéines, ou les fonds génétiques, étudiés.

Le temps 10 minutes a été utilisé afin de répondre aux objectifs spécifiques 2 et 3. Il s'agit du même temps que celui choisi pour les expériences de FRAP pour caractériser la phase tardive d'extension. La jonction mature présente une fraction immobile de HMR-1/E-cadhérine significativement plus élevée (Figure 3.2). Ceci suggère donc que la jonction est plus stable au temps 10 minutes. Or, la phase tardive d'extension de la jonction étudiée (4-12 minutes) englobe un éventail de temps où la jonction semble être à différents stades de maturation. Par conséquent, le choix du temps 10 minutes pourrait ne pas permettre d'observer des différences significatives de densité de clusters selon le stress mécanique ou le fond génétique. Une analyse de la distance inter-cluster de chaque protéine le long de la jonction a été également réalisée. Cette analyse permet une autre méthode de mesure de la densité de clusters. Seule la distribution de distance inter-clusters de HMR-1::mCherry présente une différence significative à la suite de l'augmentation du stress mécanique que l'on perd, en absence de *rga-7* (Figure 3.14.a). Cette perte de différence de distance inter-

cluster pourrait s'apparenter à la perte de l'augmentation de densité de clusters observée lors de l'étude de la phase tardive d'extension de la jonction lorsque le stress mécanique augmente chez des embryons *rga-7(ok1498)* (Figure 3.3.c, 3.14.a). Une augmentation de l'échantillonnage pourrait aider à réduire la variabilité et permettre de mettre en avant l'effet du stress mécanique et de la mutation *rga-7(ok1498)* sur la structuration de la jonction. De plus, afin d'étudier si *rga-7* et/ou l'augmentation du stress mécanique joue un rôle dans la distribution spatiale des clusters des différents acteurs, la distribution de la distance entre les protéines exprimées dans une même souche et sous les différentes conditions de stress mécanique a été étudiée. Bien que visuellement il est possible d'observer des variations dans la distribution, aucune différence significative n'a été relevée. L'augmentation du nombre de couple de clusters pourrait peut-être permettre de faire ressortir plus de différence. Une autre voie à explorer serait d'augmenter la résolution des acquisitions des embryons au stade de fermeture ventrale. Pour cela, le passage à de la microscopie haute résolution, tel que le système de *Total Internal Reflection Fluorescence* (TIRF). Cette technique permet de visualiser la fluorescence d'un échantillon sur une profondeur de 200 nm *i.e.* la membrane reposant sur la lamelle qui est en contact avec la lentille de l'objectif (Fish, 2009). Cela contribuerait à l'observation d'évènements plus locaux à haute résolution (*e.g.* échange cytoplasme-jonction) et à une discrimination plus précise des clusters de HMR-1/E-cadhérine.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Lors de cette étude, un nouveau système a été mis en place afin de pouvoir affecter l'environnement mécanique dans lequel se développe les embryons de *C. elegans*. Ce système permet le suivi, par microscopie confocale, de processus cellulaires *in vivo*. Cette étude s'est concentrée sur la formation et l'extension d'une jonction lors de la fermeture ventrale du *C. elegans* à faible et haut stress mécanique.

L'ensemble de cette étude suggère que la RhoGAP RGA-7 constitue un nouveau régulateur de la dynamique jonctionnelle de HMR-1/E-cadhérine *in vivo* et ce, de façon mécanosensible. En effet, selon notre modèle RGA-7 régulerait l'exocytose ou le recyclage de HMR-1/E-cadhérine à la jonction que ce soit à faible ou haut stress mécanique (Figure 4.3). À faible stress mécanique, RGA-7 inhiberait de façon globale (aux et entre les clusters) l'exocytose ou le recyclage de HMR-1 à la jonction. Les trois domaines (N-terminal, F-BAR et C1) seraient nécessaires à la fonction de RGA-7 mais seulement son domaine N-terminal serait nécessaire à sa présence à la jonction (Figure 4.3). En revanche, à haut stress mécanique, RGA-7 inhiberait l'exocytose ou le recyclage de HMR-1 exclusivement entre les clusters. Seul le domaine F-BAR serait nécessaire à cette fonction (Figure 4.3). Cependant, les trois domaines de RGA-7 seraient requis pour réguler son adressage vers le cytoplasme plutôt qu'à la jonction (Figure 4.3). L'inhibition de l'exocytose de HMR-1 pourrait passer par la régulation du trafic membranaire soit, dans les voies de recyclage des E-cadhérines passant par la régulation des GTPases Rab11 ou Rab4, ou par l'exocyste permettant également l'exocytose de E-cadhérines néosynthétisées ou endocytées (Brüser et Bogdan, 2017). De plus, les domaines N-terminal, F-BAR et

C1 par leur interaction spécifique pourraient agir de concert pour permettre le recrutement de RGA-7 au niveau des endosomes de recyclage.

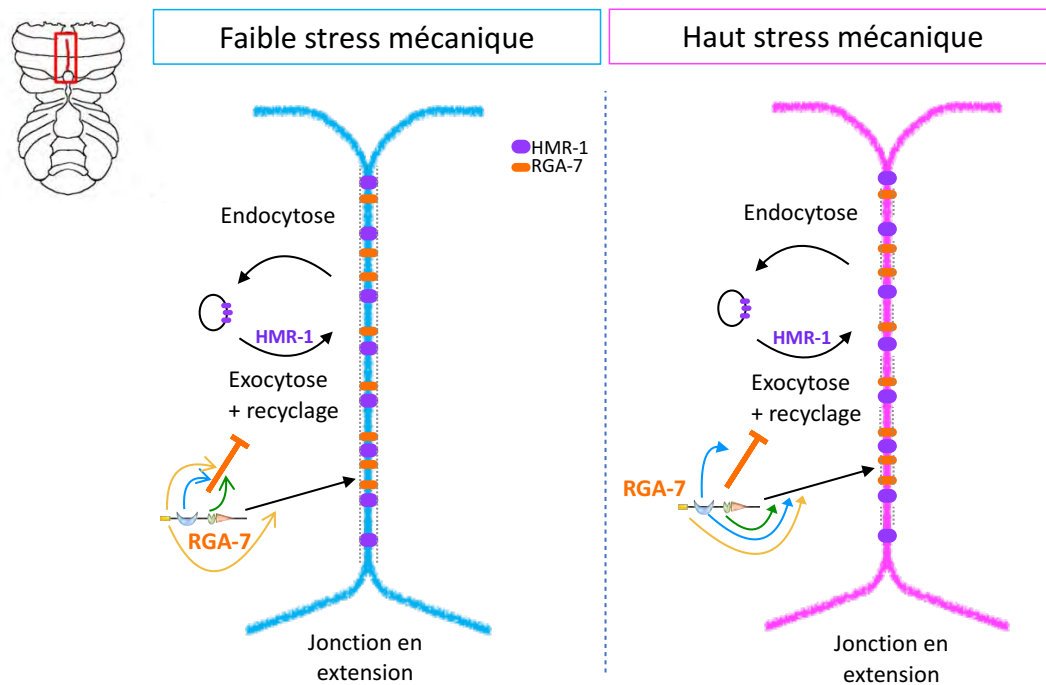


Figure 4.3 Modèle de régulation de l'exocytose ou du recyclage de HMR-1 par RGA-7 selon le stress mécanique lors de la fermeture ventrale du *C. elegans*.

Lors de la maturation de la jonction, RGA-7 inhiberait l'exocytose ou le recyclage de HMR-1 selon le stress mécanique. Les domaines de RGA-7 semblent également nécessaire à cette fonction. Ils seraient également impliqués dans la localisation de RGA-7 dans les cellules meneuses.

Une seconde voie de régulation de l'exocytose ou recyclage de HMR-1 par RGA-7 dépendrait de la dynamique du cytosquelette d'actine-myosine qui a déjà été montrée comme importante dans la régulation du maintien et du recyclage des clusters de E-cadhérines à la membrane lorsqu'elle est soumise à une tension (Engl *et al.*, 2014 ; Levayer *et al.*, 2011). En effet, RGA-7 permettrait de réguler une asymétrie du cytosquelette d'actine essentielle au bon déroulement de la fermeture ventrale et à l'extension de la jonction. Nous émettons également l'hypothèse d'un dialogue entre

le cytosquelette d'actine et les E-cadhérines médié ou non par RGA-7 afin de répondre à un stress mécanique soumis aux jonctions des embryons.

La mécanobiologie est une science émergente que l'on commence à comprendre. Elle s'avère être aussi importante que la signalisation chimique nécessaire à la différenciation des feuillets embryonnaires (Mammoto *et al.*, 2013). Un débalancement de la réponse au stress mécanique à l'échelle cellulaire peut engendrer une conséquence délétère ou létale pour l'embryon. Le maintien de cette réponse est indispensable pour un développement embryonnaire normal. Cette étude montre un nouveau rôle potentiel d'une RhoGAP dans la régulation mécanosensible du recrutement des E-cadhérines à la jonction en régulant finement des voies de signalisation intimement liées dans la mécanobiologie des E-cadhérines.

D'autre part, une mutation au locus codant pour le gène *ARHGAP29*, l'un des orthologues humain de *rga-7*, a été associée à la maladie orpheline non-syndromique de la fente labio-palatine chez l'humain (Leslie *et al.*, 2012 ; Letra *et al.*, 2014). Il s'agit d'une maladie multifactorielle qui était autrefois appelée, bec de lièvre. Elle présente une pléthore de défauts buccaux plus ou moins sévères (Dixon *et al.*, 2011). Les enfants atteints de cette maladie peuvent être affectés au niveau de leur interaction sociale et de leur santé mentale. Afin de mieux comprendre l'importance de la mutation de *ARHGAP29* dans cette maladie, une équipe a généré une lignée murine possédant la mutation de *ARHGAP29* associée à cette maladie humaine (Paul *et al.*, 2017). Cette étude a mis en évidence que *ARHGAP29* est nécessaire à la survie embryonnaire des souris, concordant avec les études de létalité embryonnaire associée à la mutation *rga-7(ok1498)* chez le *C. elegans* (Ouellette *et al.*, 2016 ; Paul *et al.*, 2017 ; Tan et Zaidel-Bar, 2015). Dans ce même système, l'étude expose l'importance de *ARHGAP29* dans le développement crânio-faciale murin. En effet, les souris présentant une hétérozygotie de *ARHGAP29* démontrent des adhésions orales anormales (E-cadhérine) (Paul *et al.*, 2017). Dans ce contexte, ce projet de thèse portant sur le rôle de RGA-7 dans la dynamique d'accumulation de HMR-1/E-

cadhérine à la jonction par l'inhibition de l'exocytose et ou le recyclage des vésicules contenant HMR-1 pourrait conduire à une meilleure compréhension du mécanisme impliqué dans la maladie non-syndromique de la fente labio-palatine.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams CL, Chen YT, Smith SJ et Nelson, WJ (1998). Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *The Journal of Cell Biology*, 142(4), 1105-1119. doi: 10.1083/jcb.142.4.1105
- Adams CL, Nelson WJ et Smith SJ (1996). Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. *The Journal of Cell Biology*, 135(6 Pt 2), 1899-1911. doi: 10.1083/jcb.135.6.1899
- Ahmed S, Bu W, Lee RC, Maurer-Stroh S et Goh WI (2010). F-BAR domain proteins. *Communicative & Integrative Biology*, 3(2), 116-121.
- Altun ZF et Hall DH (2009). Introduction. *Wormatlas*. doi: doi:10.3908/wormatlas.1.1
- Amado-Azevedo J, Reinhard NR, van Bezu J, van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VWM et Hordijk PL (2018). The minor histocompatibility antigen 1 (HMHA1)/ArhGAP45 is a RacGAP and a novel regulator of endothelial integrity. *Vascular Pharmacology*, 101, 38-47. doi: 10.1016/j.vph.2017.11.007
- Barry AK, Wang N et Leckband DE (2015). Local VE-cadherin mechanotransduction triggers long-ranged remodeling of endothelial monolayers. *Journal of Cell Science*, 128(7), 1341-1351. doi: 10.1242/jcs.159954
- Barry DM, Koo Y, Norden PR, Wylie LA, Xu K, Wichaidit C, Azigoglu DB, Zheng Y, Cobb MH, Davis GE et al. (2016). Rasip1-Mediated Rho GTPase Signaling Regulates Blood Vessel Tubulogenesis via Nonmuscle Myosin II. *Circulation Research*, 119(7), 810-826. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309094

- Barstead RJ et Waterston R H (1991). Vinculin is essential for muscle function in the nematode. *The Journal of Cell Biology*, 114(4), 715-724. doi: 10.1083/jcb.114.4.715
- Baum B et Georgiou M (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *The Journal of Cell Biology*, 192(6), 907-917. doi: 10.1083/jcb.201009141
- Baumgartner W, Hinterdorfer P, Ness W, Raab A, Vestweber D, Schindler H et Drenckhahn D (2000). Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 4005-4010. doi: 10.1073/pnas.070052697
- Berezikov E, Bargmann CI et Plasterk RHA (2004). Homologous gene targeting in *Caenorhabditis elegans* by biolistic transformation. *Nucleic Acids Research*, 32(4), e40. doi: 10.1093/nar/gnh033
- Bernards A et Settleman J (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends in Cell Biology*, 14(7), 377-385. doi: 10.1016/j.tcb.2004.05.003
- Bi GQ, Alderton JM et Steinhardt RA (1995). Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. *The Journal of Cell Biology*, 131(6 Pt 2), 1747-1758. doi: 10.1083/jcb.131.6.1747
- Bouffard J, Cecchetelli AD, Clifford C, Sethi K, Zaidel-Bar R et Cram EJ (2019). The RhoGAP SPV-1 regulates calcium signaling to control the contractility of the *Caenorhabditis elegans* spermatheca during embryo transits. *Molecular Biology of the Cell*, 30(7), 907-922. doi: 10.1091/mbc.E18-10-0633
- Boulin T, Etchberger JF et Hobert O (2006). Reporter gene fusions. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, 1-23. doi: 10.1895/wormbook.1.106.1
- Braga VMM (2002). Cell-cell adhesion and signalling. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(5), 546-556.
- Brenner S (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94.
- Brüser L et Bogdan S (2017). Adherens Junctions on the Move-Membrane Trafficking of E-Cadherin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(3). doi: 10.1101/cshperspect.a029140

- C. elegans Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5396), 2012-2018. doi: 10.1126/science.282.5396.2012
- Carman PJ et Dominguez R (2018). BAR domain proteins-a linkage between cellular membranes, signaling pathways, and the actin cytoskeleton. *Biophysical Reviews*, 10(6), 1587-1604. doi: 10.1007/s12551-018-0467-7
- Cavey M et Lecuit T (2009). Molecular bases of cell-cell junctions stability and dynamics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(5), a002998. doi: 10.1101/cshperspect.a002998
- Cavey M, Rauzi M, Lenne P-F et Lecuit T (2008). A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin. *Nature*, 453(7196), 751-756. doi: 10.1038/nature06953
- Chanet S, Miller CJ, Vaishnav ED, Ermentrout B, Davidson LA et Martin AC (2017). Actomyosin meshwork mechanosensing enables tissue shape to orient cell force. *Nature Communications*, 8, 15014. doi: 10.1038/ncomms15014
- Chen H, Choudhury DM et Craig SW (2006). Coincidence of actin filaments and talin is required to activate vinculin. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 40389-40398. doi: 10.1074/jbc.M607324200
- Chen L, Ong B et Bennett V (2001). LAD-1, the *Caenorhabditis elegans* L1CAM homologue, participates in embryonic and gonadal morphogenesis and is a substrate for fibroblast growth factor receptor pathway-dependent phosphotyrosine-based signaling. *The Journal of Cell Biology*, 154(4), 841-855. doi: 10.1083/jcb.200009004
- Chen X et Macara IG (2005). Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nature Cell Biology*, 7(3), 262-269. doi: 10.1038/ncb1226
- Chen YT, Stewart DB et Nelson WJ (1999). Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *The Journal of Cell Biology*, 144(4), 687-699. doi: 10.1083/jcb.144.4.687
- Chisholm AD et Hardin J (2005). Epidermal morphogenesis. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, 1-22. doi: 10.1895/wormbook.1.35.1

- Collinet C et Lecuit T (2013). Stability and dynamics of cell-cell junctions. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 116, 25-47. doi: 10.1016/B978-0-12-394311-8.00002-9
- Conway DE, Breckenridge MT, Hinde E, Gratton E, Chen CS et Schwartz MA (2013). Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1. *Current Biology: CB*, 23(11), 1024-1030. doi: 10.1016/j.cub.2013.04.049
- Costa M, Raich W, Agbunag C, Leung B, Hardin J et Priess JR (1998). A Putative Catenin–Cadherin System Mediates Morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* Embryo. *The Journal of Cell Biology*, 141(1), 297-308. doi: 10.1083/jcb.141.1.297
- de Beco S, Gueudry C, Amblard F et Coscoy S (2009). Endocytosis is required for E-cadherin redistribution at mature adherens junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(17), 7010-7015. doi: 10.1073/pnas.0811253106
- de Beco S., Perney J-B, Coscoy S et Amblard F (2015). Mechanosensitive Adaptation of E-Cadherin Turnover across adherens Junctions. *PLoS ONE*, 10(6). doi: 10.1371/journal.pone.0128281
- de Kreuk B-J, Schaefer A, Anthony EC, Tol S, Fernandez-Borja M, Geerts D, Pool J, Hambach L, Goulmy E et Hordijk PL (2013). The human minor histocompatibility antigen 1 is a RhoGAP. *PloS ONE*, 8(9), e73962. doi: 10.1371/journal.pone.0073962
- de Madrid BH, Greenberg L et Hatini V (2015). RhoGAP68F controls transport of adhesion proteins in Rab4 endosomes to modulate epithelial morphogenesis of *Drosophila* leg discs. *Developmental Biology*, 399(2), 283-295. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.01.004
- Delva E et Kowalczyk AP (2009). Regulation of Cadherin Trafficking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(3), 259-267. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00862.x
- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH et Murray JC (2011). Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nature Reviews. Genetics*, 12(3), 167-178. doi: 10.1038/nrg2933

- Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ et Weis WI (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*, 123(5), 903-915. doi: 10.1016/j.cell.2005.09.021
- Dubé N, Kooistra MRH, Pannekoek W-J, Vliem MJ, Oorschot V, Klumperman J, Rehmann H et Bos JL (2008). The RapGEF PDZ-GEF2 is required for maturation of cell-cell junctions. *Cellular Signalling*, 20(9), 1608-1615. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.05.006
- Duncan MC et Peifer M (2008). Regulating polarity by directing traffic: Cdc42 prevents adherens junctions from Crumblin' aPart. *The Journal of Cell Biology*, 183(6), 971-974. doi: 10.1083/jcb.200811057
- Engl W, Arasi B, Yap LL, Thiery JP et Viasnoff V (2014). Actin dynamics modulate mechanosensitive immobilization of E-cadherin at adherens junctions. *Nature Cell Biology*, 16(6), 587-594. doi: 10.1038/ncb2973
- Etienne-Manneville S (2004). Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 5(7), 470-477. doi: 10.1111/j.1600-0854.2004.00196.x
- Etienne-Manneville S (2014). Neighborly relations during collective migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 30, 51-59. doi: 10.1016/j.ceb.2014.06.004
- Etienne-Manneville S et Hall A (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420(6916), 629-635. doi: 10.1038/nature01148
- Fish KN (2009). Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. *Current Protocols in Cytometry*, 0-12, Unit12.18. doi: 10.1002/0471142956.cy1218s50
- Gally C, Wissler F, Zahreddine H, Quintin S, Landmann F et Labouesse M (2009). Myosin II regulation during *C. elegans* embryonic elongation: LET-502/ROCK, MRCK-1 and PAK-1, three kinases with different roles. *Development (Cambridge, England)*, 136(18), 3109-3119. doi: 10.1242/dev.039412
- Garcia MA, Nelson WJ et Chavez N (2018). Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks To Regulate Epithelial Tissue Homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(4). doi: 10.1101/cshperspect.a029181

- Garrod D et Chidgey M (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1778(3), 572-587. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.07.014
- Gavard J et Gutkind JS (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature Cell Biology*, 8(11), 1223-1234. doi: 10.1038/ncb1486
- Georgiou M, Marinari E, Burden J et Baum B (2008). Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Current Biology: CB*, 18(21), 1631-1638. doi: 10.1016/j.cub.2008.09.029
- Giepmans BNG et van Ijzendoorn SCD (2009). Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1788(4), 820-831. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.07.015
- Giuliani C, Troglio F, Bai Z, Patel FB, Zuconni A, Malabarba MG, Disanza A, Stradal TB, Cassata G, Confalonieri S et al. (2009). Requirements for F-BAR proteins TOCA-1 and TOCA-2 in actin dynamics and membrane trafficking during *Caenorhabditis elegans* oocyte growth and embryonic epidermal morphogenesis. *PLoS Genetics*, 5(10), e1000675. doi: 10.1371/journal.pgen.1000675
- Goodenough DA, Goliger JA et Paul DL (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 475-502. doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002355
- Grant BD et Donaldson JG (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(9), 597-608. doi: 10.1038/nrm2755
- Gumbiner BM (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(8), 622-634. doi: 10.1038/nrm1699
- Hall A (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5350), 509-514. doi: 10.1126/science.279.5350.509
- Harris TJC (2012). Adherens junction assembly and function in the *Drosophila* embryo. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 293, 45-83. doi: 10.1016/B978-0-12-394304-0.00007-5

- Harris TJC et Tepass U (2010). Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(7), 502-514. doi: 10.1038/nrm2927
- Harrison OJ, Jin X, Hong S, Bahna F, Ahlsen G, Brasch J, Wu Y, Vendome J, Falsovalyi K, Hampton CM et al. (2011). The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins. *Structure (London, England: 1993)*, 19(2), 244-256. doi: 10.1016/j.str.2010.11.016
- Hayakawa K, Tatsumi H et Sokabe M (2011). Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament. *The Journal of Cell Biology*, 195(5), 721-727. doi: 10.1083/jcb.201102039
- Herszterg S, Pinheiro D et Bellaïche Y (2014). A multicellular view of cytokinesis in epithelial tissue. *Trends in Cell Biology*, 24(5), 285-293. doi: 10.1016/j.tcb.2013.11.009
- Hinck L, Näthke IS, Papkoff J et Nelson WJ (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *The Journal of Cell Biology*, 125(6), 1327-1340. doi: 10.1083/jcb.125.6.1327
- Hodge RG et Ridley AJ (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(8), 496-510. doi: 10.1038/nrm.2016.67
- Hong S, Troyanovsky RB et Troyanovsky SM (2010). Spontaneous assembly and active disassembly balance adherens junction homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3528-3533. doi: 10.1073/pnas.0911027107
- Hong-Geller E et Cerione RA (2000). Cdc42 and Rac stimulate exocytosis of secretory granules by activating the IP(3)/calcium pathway in RBL-2H3 mast cells. *The Journal of Cell Biology*, 148(3), 481-494. doi: 10.1083/jcb.148.3.481
- Ishiyama N, Tanaka N, Abe K, Yang YJ, Abbas YM, Umitsu M, Nagar B, Bueler SA, Rubinstein JL, Takeichi M et al. (2013). An autoinhibited structure of α -catenin and its implications for vinculin recruitment to adherens junctions. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(22), 15913-15925. doi: 10.1074/jbc.M113.453928

- Izumi G, Sakisaka T, Baba T, Tanaka S, Morimoto K et Takai Y (2004). Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. *The Journal of Cell Biology*, 166(2), 237-248. doi: 10.1083/jcb.200401078
- Jacinto A, Wood W, Woolner S, Hiley C, Turner L, Wilson C, Martinez-Arias A et Martin P (2002a). Dynamic analysis of actin cable function during *Drosophila* dorsal closure. *Current biology: CB*, 12(14), 1245-1250. doi: 10.1016/s0960-9822(02)00955-7
- Jacinto A, Woolner S et Martin P (2002b). Dynamic analysis of dorsal closure in *Drosophila*: from genetics to cell biology. *Developmental Cell*, 3(1), 9-19.
- Justilien V, Jameison L, Der CJ, Rossman KL et Fields AP (2011). Oncogenic activity of Ect2 is regulated through protein kinase C iota-mediated phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 8149-8157. doi: 10.1074/jbc.M110.196113
- Kametani Y et Takeichi M (2007). Basal-to-apical cadherin flow at cell junctions. *Nature Cell Biology*, 9(1), 92-98. doi: 10.1038/ncb1520
- Kang H, Bang I, Jin KS, Lee B, Lee J, Shao X, Heier JA, Kwiatkowski AV, Nelson WJ, Hardin J et al. (2017). Structural and functional characterization of *Caenorhabditis elegans* α -catenin reveals constitutive binding to β -catenin and F-actin. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(17), 7077-7086. doi: 10.1074/jbc.M116.769778
- Kimble J et Hirsh D (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 70(2), 396-417. doi: 10.1016/0012-1606(79)90035-6
- Knust E et Bossinger O (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5600), 1955-1959. doi: 10.1126/science.1072161
- Kobielak A, Pasolli HA et Fuchs E (2004). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nature Cell Biology*, 6(1), 21-30. doi: 10.1038/ncb1075
- Köppen M, Simske JS, Sims PA, Firestein BL, Hall DH., Radice AD, Rongo C et Hardin JD (2001). Cooperative regulation of AJM-1 controls junctional integrity in *Caenorhabditis elegans* epithelia. *Nature Cell Biology*, 3(11), 983-991. doi: 10.1038/ncb1101-983

- Kovacs EM, Goodwin M, Ali RG, Paterson AD et Yap AS (2002). Cadherin-directed actin assembly: E-cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts. *Current Biology: CB*, 12(5), 379-382. doi: 10.1016/s0960-9822(02)00661-9
- Kozlov MM et Bershadsky AD (2004). Processive capping by formin suggests a force-driven mechanism of actin polymerization. *The Journal of Cell Biology*, 167(6), 1011-1017. doi: 10.1083/jcb.200410017
- Krendel MF et Bonder EM (1999). Analysis of actin filament bundle dynamics during contact formation in live epithelial cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 43(4), 296-309. doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(1999)43:4<296::AID-CM3>3.0.CO;2-U
- Lampugnani MG, Zanetti A, Breviario F, Balconi G, Orsenigo F, Corada M, Spagnuolo R, Beston M, Braga V et Dejana E (2002). VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam. *Molecular Biology of the Cell*, 13(4), 1175-1189. doi: 10.1091/mbc.01-07-0368
- Lawson CD et Ridley AJ (2018). Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *The Journal of Cell Biology*, 217(2), 447-457. doi: 10.1083/jcb.201612069
- le Duc Q, Shi Q, Blonk I, Sonnenberg A, Wang N, Leckband D et de Rooij J (2010). Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *The Journal of Cell Biology*, 189(7), 1107-1115. doi: 10.1083/jcb.201001149
- Leerberg JM, Gomez GA, Verma S, Moussa EJ, Wu SK, Priya R, Hoffman BD, Grashoff C, Schwartz MA et Yap AS (2014). Tension-sensitive actin assembly supports contractility at the epithelial zonula adherens. *Current Biology: CB*, 24(15), 1689-1699. doi: 10.1016/j.cub.2014.06.028
- Leibfried A, Fricke R, Morgan MJ, Bogdan S et Bellaiche Y (2008). Drosophila Cip4 and WASp define a branch of the Cdc42-Par6-aPKC pathway regulating E-cadherin endocytosis. *Current Biology: CB*, 18(21), 1639-1648. doi: 10.1016/j.cub.2008.09.063

- Lemmers C, Michel D, Lane-Guermonprez L, Delgrossi M-H, Médina E, Arsanto J-P et Le Bivic A (2004). CRB3 Binds Directly to Par6 and Regulates the Morphogenesis of the Tight Junctions in Mammalian Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3), 1324-1333. doi: 10.1091/mbc.E03-04-0235
- Leslie EJ, Mansilla MA, Biggs LC, Schuette K, Bullard S, Cooper M, Dunnwald M, Lidral AC, Marazita ML, Beaty TH et al. (2012). Expression and mutation analyses implicate ARHGAP29 as the etiologic gene for the cleft lip with or without cleft palate locus identified by genome wide association on chromosome 1p22. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 94(11), 934-942. doi: 10.1002/bdra.23076
- Lessey EC, Guilluy C et Burridge K (2012). From mechanical force to RhoA activation. *Biochemistry*, 51(38), 7420-7432. doi: 10.1021/bi300758e
- Letra A, Maili L, Mulliken JB, Buchanan E, Blanton SH et Hecht JT (2014). Further Evidence Suggesting a Role for Variation in ARHGAP29 in Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 100(9), 679-685. doi: 10.1002/bdra.23286
- Levayer R, Pelissier-Monier A et Lecuit T (2011). Spatial regulation of Dia and Myosin-II by RhoGEF2 controls initiation of E-cadherin endocytosis during epithelial morphogenesis. *Nature Cell Biology*, 13(5), 529-540. doi: 10.1038/ncb2224
- Lynch AM, Grana T, Cox-Paulson E, Couthier A, Cameron M, Chin-Sang I, Pettitt J et Hardin J (2012). A genome-wide functional screen shows MAGI-1 is an L1CAM-dependent stabilizer of apical junctions in *C. elegans*. *Current Biology: CB*, 22(20), 1891-1899. doi: 10.1016/j.cub.2012.08.024
- Mammoto T, Mammoto A et Ingber DE (2013). Mechanobiology and developmental control. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29, 27-61. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122340
- Margolis SS, Salogiannis J, Lipton DM, Mandel-Brehm C, Wills ZP, Mardinly AR, Hu L, Greer PL, Bikoff JB, Ho H-YH et al. (2010). EphB-mediated degradation of the RhoA GEF Ephexin5 relieves a developmental brake on excitatory synapse formation. *Cell*, 143(3), 442-455. doi: 10.1016/j.cell.2010.09.038

- Marjoram RJ, Lessey EC et Burridge K (2014). Regulation of RhoA Activity by Adhesion Molecules and Mechanotransduction. *Current Molecular Medicine*, 14(2), 199-208. doi: 10.2174/1566524014666140128104541
- Martin E, Ouellette M-H et Jenna S (2016a). Rac1/RhoA antagonism defines cell-to-cell heterogeneity during epidermal morphogenesis in nematodes. *The Journal of Cell Biology*, 215(4), 483-498. doi: 10.1083/jcb.201604015
- Martin E, Rocheleau-Leclair O et Jenna S (2016b). Novel Metrics to Characterize Embryonic Elongation of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (109), e53712. doi: 10.3791/53712
- Martín-Blanco E et Knust E (2001). Epithelial morphogenesis: filopodia at work. *Current Biology: CB*, 11(1), R28-31. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00039-7
- Martinez-Quiles N, Rohatgi R, Antón IM, Medina M, Saville SP, Miki H, Yamaguchi H, Takenawa T, Hartwig J-H, Geha RS et al. (2001). WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nature Cell Biology*, 3(5), 484-491. doi: 10.1038/35074551
- Mayor R et Etienne-Manneville S (2016). The front and rear of collective cell migration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(2), 97-109. doi: 10.1038/nrm.2015.14
- McCarter J, Bartlett B, Dang T et Schedl T (1999). On the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 205(1), 111-128. doi: 10.1006/dbio.1998.9109
- McMahon L, Legouis R, Vonesch JL et Labouesse M (2001). Assembly of *C. elegans* apical junctions involves positioning and compaction by LET-413 and protein aggregation by the MAGUK protein DLG-1. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 12), 2265-2277.
- Mège RM et Ishiyama N (2017). Integration of Cadherin Adhesion and Cytoskeleton at Adherens Junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(5). doi: 10.1101/cshperspect.a028738
- Meng W, Mushika Y, Ichii T et Takeichi M (2008). Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell*, 135(5), 948-959. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.040

- Miyashita Y et Ozawa M (2007). Increased internalization of p120-uncoupled E-cadherin and a requirement for a dileucine motif in the cytoplasmic domain for endocytosis of the protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11540-11548. doi: 10.1074/jbc.M608351200
- Myster SH, Cavallo R, Anderson CT, Fox DT et Peifer M (2003). Drosophila p120catenin plays a supporting role in cell adhesion but is not an essential adherens junction component. *The Journal of Cell Biology*, 160(3), 433-449. doi: 10.1083/jcb.200211083
- Ngok SP, Geyer R, Kourtidis A, Storz P et Anastasiadis PZ (2013). Phosphorylation-mediated 14-3-3 protein binding regulates the function of the rho-specific guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF) Syx. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(9), 6640-6650. doi: 10.1074/jbc.M112.432682
- Nobes CD et Hall A (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1), 53-62. doi: 10.1016/0092-8674(95)90370-4
- Oda H et Takeichi M (2011). Evolution: structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *The Journal of Cell Biology*, 193(7), 1137-1146. doi: 10.1083/jcb.201008173
- Orr SE, Gokulan K, Boudreau M, Cerniglia CE et Khare S (2019). Alteration in the mRNA expression of genes associated with gastrointestinal permeability and ileal TNF- α secretion due to the exposure of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Journal of Nanobiotechnology*, 17(1), 63. doi: 10.1186/s12951-019-0499-6
- Ouellette M-H, Martin E, Lacoste-Caron G, Hamiche K et Jenna S (2016). Spatial control of active CDC-42 during collective migration of hypodermal cells in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Cell Biology*, 8(4), 313-327. doi: 10.1093/jmcb/mjv062
- Pannekoek W-J, Kooistra MRH, Zwartkruis FJT et Bos JL (2009). Cell-cell junction formation: the role of Rap1 and Rap1 guanine nucleotide exchange factors. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1788(4), 790-796. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.12.010
- Pásti G et Labouesse M (2014). Epithelial junctions, cytoskeleton, and polarity. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, 1-35. doi: 10.1895/wormbook.1.56.2

- Paul BJ, Palmer K, Sharp JC, Pratt CH, Murray SA et Dunnwald M (2017). ARHGAP29 Mutation Is Associated with Abnormal Oral Epithelial Adhesions. *Journal of Dental Research*, 96(11), 1298-1305. doi: 10.1177/0022034517726079
- Peglion F, Llense F et Etienne-Manneville S (2014). Adherens junction treadmill during collective migration. *Nature Cell Biology*, 16(7), 639-651. doi: 10.1038/ncb2985
- Pettitt J, Cox EA, Broadbent ID, Flett A et Hardin J (2003). The *Caenorhabditis elegans* p120 catenin homologue, JAC-1, modulates cadherin-catenin function during epidermal morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 162(1), 15-22. doi: 10.1083/jcb.200212136
- Piekny AJ, Johnson J-LF, Cham GD et Mains PE (2003). The *Caenorhabditis elegans* nonmuscle myosin genes *nmy-1* and *nmy-2* function as redundant components of the *let-502*/Rho-binding kinase and *mel-11*/myosin phosphatase pathway during embryonic morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 130(23), 5695-5704. doi: 10.1242/dev.00807
- Pinheiro D et Bellaïche Y (2018). Mechanical Force-Driven Adherens Junction Remodeling and Epithelial Dynamics. *Developmental Cell*, 47(1), 3-19. doi: 10.1016/j.devcel.2018.09.014
- Pinheiro D, Hannezo E, Herszterg S, Bosveld F, Gaugue I, Balakireva M, Wang Z, Cristo I, Rigaud SU, Markova O et al. (2017). Transmission of cytokinesis forces via E-cadherin dilution and actomyosin flows. *Nature*, 545(7652), 103-107. doi: 10.1038/nature22041
- Primeau M et Lamarche-Vane N (2008). [A brief overview of the small Rho GTPases]. *Medecine Sciences: M/S*, 24(2), 157-162. doi: 10.1051/medsci/2008242157
- Priya R, Gomez GA, Budnar S, Verma S, Cox HL, Hamilton NA et Yap AS (2015). Feedback regulation through myosin II confers robustness on RhoA signalling at E-cadherin junctions. *Nature Cell Biology*, 17(10), 1282-1293. doi: 10.1038/ncb3239
- Qiao Y, Chen J, Lim YB, Finch-Edmondson ML, Seshachalam VP, Qin L, Jiang T, Low BC, Siongh H, Lim CT et al. (2017). YAP Regulates Actin Dynamics through ARHGAP29 and Promotes Metastasis. *Cell Reports*, 19(8), 1495-1502. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.075

- Raich WB, Agbunag C et Hardin J (1999). Rapid epithelial-sheet sealing in the *Caenorhabditis elegans* embryo requires cadherin-dependent filopodial priming. *Current Biology: CB*, 9(20), 1139-1146. doi: 10.1016/S0960-9822(00)80015-9
- Ratheesh A, Gomez GA, Priya R, Verma S, Kovacs EM, Jiang K, Brown NH, Akhmanova A, Stehbens SJ et Yap AS (2012). Centralspindlin and α -catenin regulate Rho signalling at the epithelial zonula adherens. *Nature Cell Biology*, 14(8), 818-828. doi: 10.1038/ncb2532
- Ratheesh A et Yap AS (2012). A bigger picture: classical cadherins and the dynamic actin cytoskeleton. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(10), 673-679. doi: 10.1038/nrm3431
- Rauzi M, Verant P, Lecuit T et Lenne P-F (2008). Nature and anisotropy of cortical forces orienting *Drosophila* tissue morphogenesis. *Nature Cell Biology*, 10(12), 1401-1410. doi: 10.1038/ncb1798
- Reiner DJ et Lundquist EA (2018). Small GTPases. *Wormbook*, 2018, 1-65. doi: 10.1895/wormbook.1.67.2
- Ridley AJ et Hall A (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70(3), 389-399. doi: 10.1016/0092-8674(92)90163-7
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D et Hall A (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70(3), 401-410. doi: 10.1016/0092-8674(92)90164-8
- Rodríguez A, Webster P, Ortego J et Andrews NW (1997). Lysosomes behave as Ca^{2+} -regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 137(1), 93-104. doi: 10.1083/jcb.137.1.93
- Rose AS, Bradley AR, Valasatava Y, Duarte JM, Prlic A et Rose PW (2018). NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 34(21), 3755-3758. doi: 10.1093/bioinformatics/bty419
- Ruwhof C, van Wamel JT, Noordzij LA, Aydin S, Harper JC et van der Laarse A (2001). Mechanical stress stimulates phospholipase C activity and intracellular calcium ion levels in neonatal rat cardiomyocytes. *Cell Calcium*, 29(2), 73-83. doi: 10.1054/ceca.2000.0158

- Sahai E et Marshall CJ (2002). ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nature Cell Biology*, 4(6), 408-415. doi: 10.1038/ncb796
- Sawa M, Suetsugu S, Sugimoto A, Miki H, Yamamoto M et Takenawa T (2003). Essential role of the C. elegans Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 8), 1505-1518. doi: 10.1242/jcs.00362
- Scott CC, Vacca F et Gruenberg J (2014). Endosome maturation, transport and functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 31, 2-10. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.03.034
- Sheffield M, Loveless T, Hardin J et Pettitt J (2007). C. elegans Enabled exhibits novel interactions with N-WASP, Abl, and cell-cell junctions. *Current Biology: CB*, 17(20), 1791-1796. doi: 10.1016/j.cub.2007.09.033
- Shen Y, Hirsch DS, Sasiela CA et Wu WJ (2008). Cdc42 regulates E-cadherin ubiquitination and degradation through an epidermal growth factor receptor to Src-mediated pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 5127-5137. doi: 10.1074/jbc.M703300200
- Song EH, Oh W, Ulu A, Carr HS, Zuo Y et Frost JA (2015). Acetylation of the RhoA GEF Net1A controls its subcellular localization and activity. *Journal of Cell Science*, 128(5), 913-922. doi: 10.1242/jcs.158121
- Stenmark H (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(8), 513-525. doi: 10.1038/nrm2728
- Stetak A et Hajnal A (2011). The C. elegans MAGI-1 protein is a novel component of cell junctions that is required for junctional compartmentalization. *Developmental Biology*, 350(1), 24-31. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.10.026
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG et Thomson JN (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100(1), 64-119. doi: 10.1016/0012-1606(83)90201-4
- Sumi A, Hayes P, D'Angelo A, Colombelli J, Salbreux G, Dierkes K et Solon J (2018). Adherens Junction Length during Tissue Contraction Is Controlled by the Mechanosensitive Activity of Actomyosin and Junctional Recycling. *Developmental Cell*, 47(4), 453-463.e3. doi: 10.1016/j.devcel.2018.10.025

- Takeichi M (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science (New York, N.Y.)*, 251(5000), 1451-1455. doi: 10.1126/science.2006419
- Takeichi M, Atsumi T, Yoshida C, Uno K et Okada TS (1981). Selective adhesion of embryonal carcinoma cells and differentiated cells by Ca^{2+} -dependent sites. *Developmental Biology*, 87(2), 340-350. doi: 10.1016/0012-1606(81)90157-3
- Tan PY et Zaidel-Bar R (2015). Transient membrane localization of SPV-1 drives cyclical actomyosin contractions in the *C. elegans* spermatheca. *Current Biology: CB*, 25(2), 141-151. doi: 10.1016/j.cub.2014.11.033
- Tapon N et Harvey KF (2012). The Hippo pathway--from top to bottom and everything in between. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(7), 768-769. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.08.007
- Terry SJ, Zihni C, Elbediwy A, Vitiello E, Leefa Chong San IV, Balda MS et Matter K (2011). Spatially restricted activation of RhoA signalling at epithelial junctions by p114RhoGEF drives junction formation and morphogenesis. *Nature Cell Biology*, 13(2), 159-166. doi: 10.1038/ncb2156
- Thomas-Virnig CL, Sims PA, Simske JS et Hardin J (2004). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates epidermal cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology: CB*, 14(20), 1882-1887. doi: 10.1016/j.cub.2004.10.001
- Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, Petreanu L, Akerboom J, McKinney SA, Schreiter ER et al. (2009). Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature Methods*, 6(12), 875-881. doi: 10.1038/nmeth.1398
- Trojanovsky SM (2009). Regulation of cadherin-based epithelial cell adhesion by endocytosis. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 1, 61-67.
- Tsai F-C, Kuo G-H, Chang S-W et Tsai P-J (2015). Ca^{2+} signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis. *BioMed Research International*, 2015, 409245. doi: 10.1155/2015/409245
- Varelas X (2014). The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development*, 141(8), 1614-1626. doi: 10.1242/dev.102376

- Vasioukhin V, Bauer C, Yin M et Fuchs E (2000). Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell*, 100(2), 209-219. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81559-7
- Vasioukhin V et Fuchs E (2001). Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(1), 76-84.
- Vigil D, Cherfils J, Rossman KL et Der CJ (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nature Reviews. Cancer*, 10(12), 842-857. doi: 10.1038/nrc2960
- Vuong-Brender TTK, Ben Amar M, Pontabry J et Labouesse M (2017). The interplay of stiffness and force anisotropies drives embryo elongation. *eLife*, 6. doi: 10.7554/eLife.23866
- Walston T et Hardin J (2010). An Agar Mount for Observation of *Caenorhabditis elegans* Embryos. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(12), pdb.prot5540.
- Warner SJ et Longmore GD (2009). Cdc42 antagonizes Rho1 activity at adherens junctions to limit epithelial cell apical tension. *The Journal of Cell Biology*, 187(1), 119-133. doi: 10.1083/jcb.200906047
- Watanabe T, Hosoya H et Yonemura S (2007). Regulation of Myosin II Dynamics by Phosphorylation and Dephosphorylation of Its Light Chain in Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 18(2), 605-616. doi: 10.1091/mbc.E06-07-0590
- Wernike D, Chen Y, Mastronardi K, Makil N et Piekny A (2016). Mechanical forces drive neuroblast morphogenesis and are required for epidermal closure. *Developmental Biology*, 412(2), 261-277. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.02.023
- Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman J et Reynolds AB (2006). p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell*, 127(5), 1027-1039. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.046
- Williams-Masson EM, Heid PJ, Lavin CA et Hardin J (1998). The cellular mechanism of epithelial rearrangement during morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* dorsal hypodermis. *Developmental Biology*, 204(1), 263-276. doi: 10.1006/dbio.1998.9048

- Williams-Masson EM, Malik AN et Hardin J (1997). An actin-mediated two-step mechanism is required for ventral enclosure of the *C. elegans* hypodermis. *Development (Cambridge, England)*, 124(15), 2889-2901.
- Winter JF, Höpfner S, Korn K, Farnung BO, Bradshaw CR, Marsico G, Volkmer M, Habermann B et Zerial M (2012). *Caenorhabditis elegans* screen reveals role of PAR-5 in RAB-11-recycling endosome positioning and apicobasal cell polarity. *Nature Cell Biology*, 14(7), 666-676. doi: 10.1038/ncb2508
- Withee J, Galligan B, Hawkins N et Garriga G (2004). *Caenorhabditis elegans* WASP and Ena/VASP proteins play compensatory roles in morphogenesis and neuronal cell migration. *Genetics*, 167(3), 1165-1176. doi: 10.1534/genetics.103.025676
- Woichansky I, Beretta CA, Berns N et Riechmann V (2016). Three mechanisms control E-cadherin localization to the zonula adherens. *Nature Communications*, 7, 10834. doi: 10.1038/ncomms10834
- Wu Y, Kanchanawong P et Zaidel-Bar R (2015). Actin-delimited adhesion-independent clustering of E-cadherin forms the nanoscale building blocks of adherens junctions. *Developmental Cell*, 32(2), 139-154. doi: 10.1016/j.devcel.2014.12.003
- Xiao K, Allison DF, Buckley KM, Kottke MD, Vincent PA, Faundez V et Kowalczyk AP (2003). Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 163(3), 535-545. doi: 10.1083/jcb.200306001
- Yamazaki D, Oikawa T et Takenawa T (2007). Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 1), 86-100. doi: 10.1242/jcs.03311
- Yang Z et Hata Y (2013). What is the Hippo pathway? Is the Hippo pathway conserved in *Caenorhabditis elegans*? *The Journal of Biochemistry*, 154(3), 207-209. doi: 10.1093/jb/mvt060
- Yap AS, Duszyc K et Viasnoff V (2018). Mechanosensing and Mechanotransduction at Cell-Cell Junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(8). doi: 10.1101/cshperspect.a028761
- Zahraoui A (2004). [Tight junctions, a platform regulating cell proliferation and polarity]. *Medicine Sciences: M/S*, 20(5), 580-585. doi: 10.1051/medsci/2004205580

- Zaidel-Bar R, Joyce MJ, Lynch AM, Witte K, Audhya A et Hardin J (2010). The F-BAR domain of SRGP-1 facilitates cell-cell adhesion during *C. elegans* morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 191(4), 761-769. doi: 10.1083/jcb.201005082
- Zhang H, Landmann F, Zahreddine H, Rodriguez D, Koch M et Labouesse M (2011). A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis. *Nature*, 471(7336), 99-103. doi: 10.1038/nature09765
- Zhao Z et Manser E (2005). PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *The Biochemical Journal*, 386(Pt 2), 201-214. doi: 10.1042/BJ20041638