

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

MÉCANISMES DE MAINTENANCE NEURONALE À LONG TERME DU
SYSTÈME NERVEUX CHEZ *CAENORHABDITIS ELEGANS* : RÔLES DE LA
MATRICE EXTRACELLULAIRE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

ROBERT IVAN VALETTE REVENO LEATIS

DÉCEMBRE 2023

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire 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.04-2020). 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

Avant tout, je souhaite exprimer ma sincère gratitude envers ma directrice de maîtrise, la Pre Claire Bénard. Claire, je tiens à te remercier chaleureusement pour m'avoir accepté et accueilli au sein de ton équipe exceptionnelle et pour avoir été mon soutien et mon guide tout au long de cette formation. Tu m'as initié à la recherche en partageant généreusement tes connaissances d'apparence inépuisable, le tout agrémenté de ton approche humaine et bienveillante. Recevoir un tel encadrement de la part d'une chercheuse comme toi a été un privilège immense. Je tiens à te remercier infiniment pour toutes les occasions, les enseignements et la confiance que tu m'as accordés. Ma reconnaissance envers toi est éternelle.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude envers notre remarquable responsable de recherche, Lise Rivollet, pour ta patience infinie, tes nombreuses recommandations et tout le temps que tu as bien voulu consacrer à ma formation et à mon épanouissement. Merci d'avoir été là pour m'enseigner, me conseiller et pour toutes les réflexions précieuses qui ont contribué à faire progresser ce projet.

Un remerciement spécial s'adresse à tous les membres du laboratoire Bénard, qui maintiennent un environnement de travail agréable et encourageant. Nous avons passé d'excellents moments ensemble j'ai énormément appris de chacun de vous. Une mention spéciale à Malika Nadour, une encadrante hors pair, tu as su me transmettre tes connaissances et ta hargne sans fin.

Merci à mes amis de maîtrise Marin et Samar, je n'oublierai pas nos fous rires et nos longues soirées à bavarder. Grâce à Yann, j'ai découvert One Piece, ce qui a enrichi considérablement ma connaissance et mon plaisir. Merci à Raphaël pour les soirées jeux et ton humour bien à toi. Enfin merci à Anna, tu as le cœur le sur la main et tu n'hésites jamais à prêter main forte. Une mention pour les excellentes stagiaires que

nous avons eues, Noémie alias *Mimoune*, Méganne et Irene. Nous avons passé de bons moments ensemble et vous avez su apporter de la fraîcheur au laboratoire.

Enfin, je ne pourrais terminer sans remercier ma famille et mes amis. Un énorme merci à chacun de vous...

A Papa Paul Aimé et Maman Justine, pour tout votre soutien, vos encouragements et votre dévotion constante durant mes études malgré les hauts et les bas vous avez toujours été là.

A mes frères et sœurs, Estelle, Céline et Junior, j'ai hâte de rentrer et tous vous revoir...

A mes meilleurs potes depuis le lycée, Aaron, Andy, Meryl, Cédric, vous êtes irremplaçables...

A mes colocataires et amies, Orléane et Ourielle, deux fang au grand cœur. Vous êtes mon meilleur souvenir du Maroc et plus encore...

Ces travaux ont été appuyés par des fonds de recherches des IRSC, du CRSNG et du FRQS pour Claire Bénard, ainsi que par les bourses suivantes pour Robert Ivan Valette Reveno Leatis :

De la Faculté des sciences de l'UQAM :

- *Bourse d'exemption des frais de scolarité supplémentaires pour étudiants internationaux*
- *Bourses d'excellence de soutien à la réussite à la maîtrise en biochimie*

Du Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines Fondation Courtois :

- *Bourse d'excellence de soutien à la recherche*

De la Fondation UQAM :

- *Bourses d'excellence de la Fondation J. -A. DeSève – Maîtrise*
- *Bourse d'excellence Lapointe-Rosendahl en biochimie*
- *Bourse du Syndicat des professeurs et professeures de l'UQAM – Maîtrise*
- *Bourse de soutien à la réussite Martial-Nkamani-Afrique-subaharienne*
- *Bourse de la Banque Royale du Canada - Maîtrise*

DÉDICACE

À ma maman, Justine Tsianga,
la meilleure maman du monde

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
DÉDICACE	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	x
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xii
RÉSUMÉ	xiii
CHAPITRE 1 Introduction	1
1.1 La maintenance à long terme du système nerveux	1
1.2 Objectif de la recherche sur la maintenance neuronale : préserver la santé du cerveau ...	3
1.3 <i>Caenorhabditis elegans</i> comme modèle d'étude pour la recherche scientifique	3
1.4 Avantages techniques de l'utilisation de <i>C. elegans</i>	5
1.5 Le système nerveux chez <i>C. elegans</i>	9
1.6 Maintenance de l'architecture du système nerveux chez <i>C. elegans</i>	11
1.7 Facteurs de maintenance de l'architecture neuronale identifiée à ce jour	12
1.8 La matrice extracellulaire	16
1.9 La voie de TGF- β	24
1.10 Interaction de TGF- β avec la MEC et la maintenance neuronale.....	28
1.11 Axes d'étude de ce mémoire.....	28
CHAPITRE 2 Matériels et méthodes.....	33
2.1 Construction et maintenance des souches.....	33
2.2 Techniques de génotypage utilisées lors de la génération de nouvelles souches.....	35
2.3 Microscopie	37
2.4 L'ARN interférence	37
2.4.1 L'ARNi chez <i>C. elegans</i>	37
2.4.2 Propagation de l'ARNdb de l'intestin au reste du corps	38

2.5	Principes de base de l'ARNi chez <i>C. elegans</i>	39
2.6	Protocole de préparation de l'ARNi	40
2.6.1	Synchronisation des vers	40
2.6.2	Préparation des bactéries	41
2.7	Méthodes d'analyse	42
2.7.1	Critères de quantification du phénotype neuronal	42
2.7.2	Analyse des composants de la MEC.....	43
2.7.3	Quantification des structures fibrotiques.....	43
2.8	Analyses statistiques.....	46
	CHAPITRE 3 Résultats	47
3.1	Identification de gènes modulateurs de l'architecture neuronale	48
3.2	Distribution de composants de la MEC chez le mutant <i>mig-6</i>	53
3.3	Recherche de modulateurs des niveaux ou distribution de la MIG-6S/papiline.....	57
3.4	Analyse des interactions génétiques entre les gènes <i>mig-6</i> et ceux de la voie TGF- β : impact sur le collagène IV et la maintenance neuronale.....	59
3.5	La voie TGF- β semble moduler les niveaux de la protéine MIG-6S/papiline.....	62
	CHAPITRE 4 Discussion	65
4.1	Interactions de MIG-6, un régulateur de la MEC qui impacte la maintenance neuronale, avec d'autres composants de la MEC.....	66
4.1.1	Le NID-1/nidogène.....	67
4.1.2	Le UNC-52/perlécan	68
4.1.3	La FBL-1/fibuline.....	68
4.1.4	Le EMB-9/collagène IV	70
4.1.5	La LAM-1/laminine.....	71
4.2	Interaction de <i>mig-6</i> avec la voie TGF- β	72
4.2.1	Influence de la signalisation par TGF- β sur la maintenance neuronale et le collagène IV.....	72
4.2.2	Influence de TGF- β sur les niveaux de la papiline	73
4.3	Prédiction de la structure de la protéine MIG-6S, des conséquences de la mutation <i>mig-6</i> (<i>qv33</i>) et ouverture sur d'autre possibles interacteurs moléculaires.....	74
4.4	Autres études du rôle de MIG-6S à venir	75
4.4.1	Test de sauvetage de <i>mig-6</i> en niveau endogène.....	75
4.4.2	Est-ce que <i>mig-6</i> participe au maintien neuronal lors du vieillissement ?.....	76
4.4.3	Analyse du matrisome du mutant <i>mig-6</i>	78
	CONCLUSION.....	79
	BIBLIOGRAPHIE.....	82

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Représentation schématique de l'anatomie du nématode adulte.	4
Figure 1.2 Schématisation du cycle de vie du <i>C. elegans</i> à 22°C.	6
Figure 1.3 Représentation de quelques tissus observables par fluorescence chez <i>C. elegans</i> . .	8
Figure 1.4 L'organisation du système nerveux de <i>C. elegans</i>	10
Figure 1.5 <i>C. elegans</i> comme modèle d'étude de la maintenance de l'architecture neuronale.	11
Figure 1.6 Schéma des facteurs de maintenance neuronale identifiés chez <i>C. elegans</i>	13
Figure 1.7 Représentation d'un exemple des défauts de maintenance neuronale : sax-7/L1CAM.	15
Figure 1.8 Schématisation des principaux composants la matrice extracellulaire.	17
Figure 1.9 Structures des gènes de collagènes IV chez <i>C. elegans</i> et l'humain.	18
Figure 1.10 Structures des gènes de laminines chez <i>C. elegans</i> et l'humain.	19
Figure 1.11 Le perlécan : structure de la protéine et localisation à la membrane des cellules musculaires chez <i>C. elegans</i>	21
Figure 1.12 Structure de la papiline chez différentes espèces.	22
Figure 1.13 Le nidogène : homologie, localisation et domaines.	23
Figure 1.14 La fibuline : chez l'humain et <i>C. elegans</i>	24
Figure 1.15 Signalisation de TGF- β : la voie de dauer et de voie Sma/Mab de <i>C. elegans</i>	27
Figure 1.16 Schéma du crible génétique par mutagenèse.	29
Figure 1.17 Présentation sommaire des axes de cette étude.	31
Figure 2.1 Exemple des étapes de construction d'une souche par génétique classique chez <i>C.</i> <i>elegans</i>	35
Figure 2.2 Illustration du phénotype <i>Sma</i>	36
Figure 2.3 Illustration des critères de discrimination pour l'analyse du phénotype de maintenance de l'organisation neuronale.	43

Figure 2.4 Critères de dénombrement des structures fibrotiques.....	44
Figure 2.5 Exemple de délimitation de la région de la tête sur ImageJ.	45
Figure 3.1 Le laboratoire a précédemment découvert <i>mig-6(qv33)</i> comme suppresseur des défauts d'organisation neuronale du mutant <i>sax-7</i>	47
Figure 3.2 Test d'implication du nidogène dans la maintenance neuronale chez le mutant <i>sax-7</i>	49
Figure 3.3 Test d'interaction entre <i>unc-52</i> /perlécan et <i>mig-6</i> /papiline.	51
Figure 3.4 Analyses génétiques de possibles interactions entre les gènes <i>fbl-1</i> /fibuline et <i>mig-6</i> /papiline	52
Figure 3.5 Distribution d'EMB-9/collagène IV chez le type sauvage et le mutant <i>mig-6</i>	54
Figure 3.6 Distribution de la fibuline chez le mutant <i>mig-6</i>	56
Figure 3.7 Distribution de la laminine chez le mutant <i>mig-6</i>	57
Figure 3.8 Recherche de modulateurs des niveaux et/ou distribution de la MIG-6S/papiline.58	
Figure 3.9 La voie TGF- β interagit avec <i>mig-6</i> pour réguler le collagène IV	60
Figure 3.10 La voie TGF- β interagit avec <i>mig-6</i> pour réguler le maintien de l'architecture neuronale.	62
Figure 3.11 La voie TGF- β impacte les niveaux de la protéine MIG-6S/papiline.....	63
Figure 4.1 Modèle : La perte de fonction de <i>mig-6</i> entraîne un remodelage matriciel impactant la maintenance de l'architecture neuronale.....	66

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Liste des allèles utilisés.....	33
Tableau 2.2 Liste des souches utilisées et construites.....	34
Tableau 2.3 Liste des amorces utilisées.....	36
Tableau 2.4 Liste des clones utilisés pour les expériences d'ARNi.....	42

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ARN : acide ribonucléique

ARNdb : acide ribonucléique double brin

ARNi : interférence à l'acide ribonucléique

exo-ARNi : interférence à l'acide ribonucléique exogène

C. elegans : *caenorhabditis elegans*

CRISPR : *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

E. coli : *escherichia coli*

GFP : *green fluorescent protein*

IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

L1CAM : *L1 cell adhesion molecule*

L1 : 1^{er} stade larvaire

L2 : 2^{ème} stade larvaire

L3 : 3^{ème} stade larvaire

L4 : 4^{ème} stade larvaire

M9 : *medium 9*

MEC : matrice extracellulaire

MB : membrane basale

EMS : méthane sulfonate d'éthyle

NGM : *nematode growth media*

RPM : rotation par minute

Sma/Mab : *small/morphologically abnormal*

Smad : *small mother against decapentaplegic*

R-Smad : *receptor-regulated Smad*

Co-Smad : *common partner Smad*

I-Smad : *inhibitory Smad*

SfIg : superfamille des immunoglobulines

TGF- β : *transforming growth factor- β*

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

°C : Degré Celsius

µg : Microgramme

µL : Microlitre

µm : Micromètre

mL : millilitre

mM : milimolaire

ns : non significatif

UA : Unité arbitraire

% : Pourcentage

RÉSUMÉ

Durant la vie d'un organisme, l'architecture de son système nerveux est confrontée à des défis constants, englobant des étapes de maturation, de croissance, ainsi que des stress mécaniques et le vieillissement. Certaines molécules impliquées dans la préservation de la structure des ganglions et des fascicules neuronaux ont été identifiées chez le nématode *C. elegans*. Cependant, les mécanismes assurant une protection à long terme de cette architecture demeurent en grande partie incompris. Chez les mutants de la protéine d'adhésion cellulaire *sax-7/L1CAM*, certaines structures neuronales initialement bien formées se désorganisent au fil du temps. Grâce à un crible génétique menée au sein de notre laboratoire, nous nous sommes intéressés aux rôles du gène *mig-6/papiline* dans la préservation neuronale : la perte de fonction de *mig-6* s'avère efficace pour contrer la désorganisation progressive des structures neuronales des mutants *sax-7*. De plus, les mutants *mig-6* se caractérisent par un remodelage de la matrice extracellulaire, notamment des protéines clés pour le maintien des structures cellulaires. Cela suggère qu'un défaut d'adhésion cellulaire peut être contrebalancée par une modification de l'élasticité de la matrice extracellulaire. Par ailleurs, chez *C. elegans* l'implication de TGF- β sur la matrice extracellulaire périneuronale a été négligée jusqu'à présent et mérite une exploration approfondie dans ce contexte de remodelage et de préservation neuronale. De ce fait, cette étude s'articule autour de la question fondamentale de la contribution de la matrice extracellulaire et du rôle de TGF- β dans la dynamique de préservation de l'architecture du système nerveux chez *C. elegans* via la perte de fonction de *mig-6*. La compréhension des principes généraux au maintien de l'architecture et de la connectivité neuronale pourrait permettre l'identification de facteurs influençant l'apparition et la progression de pathologies neurodégénératives.

Mots clés : maintenance neuronale, système nerveux, matrice extracellulaire, TGF- β , *C. elegans*.

CHAPITRE 1

Introduction

Cette étude a pour objectif de mettre en évidence les rôles et interactions de protéines de la matrice extracellulaire dans la maintenance à long terme de l'architecture du système nerveux. Dans ce chapitre, je fais une revue de la littérature en relation avec le sujet de recherche afin de poser les bases des connaissances actuelles.

1.1 La maintenance à long terme du système nerveux

Depuis plusieurs décennies, de nombreux travaux sont mis en œuvre afin d'élucider et décortiquer les mécanismes du développement du système nerveux. Ainsi, grâce à des technologies et outils innovants, les chercheurs ont réalisé d'importantes avancées dans la compréhension de l'orchestration des étapes d'induction neurale jusqu'à l'élaboration de circuits neuronaux complexes (Sanes *et al.*, 2019). Un axe de neurobiologie actuellement effervescent concerne l'étude des processus que l'organisme emploie pour maintenir l'assemblage initial du système nerveux sur le long terme, et ainsi préserver son intégrité structurelle et fonctionnelle (Bénard et Hobert, 2009). À ce jour, les mécanismes assurant la maintenance de l'architecture du système nerveux demeurent peu étudiés et mal compris. Cependant, l'étude de ces mécanismes est un point clef dans la compréhension de bases de maladies neurodégénératives.

Dès les premiers stades de vie post-natale, notre organisme est mis à l'épreuve par des événements pouvant influencer l'organisation et la maintenance de l'architecture du système nerveux. Par la suite, une période de maturation permet de spécialiser et de consolider les circuits neuronaux immatures, notamment par une formation initiale en excès du nombre de neurones et de synapses, suivie de leur élimination sélective à grande échelle par des processus d'apoptose et d'élagage synaptique (Hua et Smith, 2004; Sanes *et al.*, 2019). Des périodes critiques de plasticité, influencées par

l'expérience sensorielle, interviennent également pour façonner le traitement de l'information dans les aires visuelles, auditives et somatosensorielles (Reh *et al.*, 2020). On observe également chez les rongeurs des remaniements dendritiques et des variations de densité d'épines dendritiques à l'âge adulte, ce qui indique que le système nerveux mature est capable de plasticité (Perez-Cruz *et al.*, 2009; Tailby *et al.*, 2005; Vyas *et al.*, 2002). Malgré ces modifications structurelles importantes, le système nerveux conserve néanmoins son organisation générale prédéterminée pendant l'embryogenèse.

Les stress mécaniques représentent également un défi auquel le système nerveux doit faire face. Par exemple, les mouvements du corps engendrent des tensions sur les axones du système nerveux périphérique, et la pression intraoculaire exerce un stress constant sur les neurones de la rétine (Topp et Boyd, 2006). Les mouvements internes tels que les battements cardiaques, le péristaltisme intestinal et les pulsations du liquide céphalorachidien sont d'autres exemples de stress subis par les neurones environnants. Avec l'âge, le déclin progressif des autres systèmes de l'organisme, tel que les systèmes respiratoire, endocrinien et cardiovasculaire, est un processus qui peut influencer la maintenance des structures neuronales contribuant ainsi à accélérer le processus de vieillissement. Enfin, au fil du temps, des accidents peuvent survenir et affecter l'architecture neuronale. Les commotions cérébrales, les compressions des nerfs périphériques et les accidents vasculaires cérébraux sont quelques exemples. Le système nerveux doit donc être capable de résister à diverses atteintes qui ont le potentiel de perturber son organisation à long terme, et le contraire peut entraîner des déficits fonctionnels importants.

Par rapport aux autres systèmes de l'organisme, le système nerveux se démarque par sa complexité morphologique et le remplacement cellulaire minimal. En effet, à la suite des phénomènes de maturation, bien que certaines cellules souches peuvent générer de nouveaux neurones, la vaste majorité des neurones sont dans un état quiescent, c'est-à-

dire qu'ils ne se divisent pas une fois qu'ils sont différenciés dans le système nerveux adulte. Toutefois, de nouvelles cellules neuronales sont incorporées dans certaines zones du cerveau tout au long de la vie. Par exemple, on observe une prolifération homéostatique des microglies, qui sont les cellules immunitaires résidentes du système nerveux, ainsi que l'angiogenèse et l'incorporation de nouveaux neurones pendant le processus de neurogenèse chez l'adulte (Eriksson *et al.*, 1998; Moreno-Jiménez *et al.*, 2019; Prinz *et al.*, 2019; Thion et Garel, 2017).

1.2 Objectif de la recherche sur la maintenance neuronale : préserver la santé du cerveau

La maintenance insuffisante de l'architecture du système nerveux peut causer des conditions neuropathologiques. Il est donc crucial de comprendre les mécanismes de protection à long terme de l'architecture neuronale, en particulier pour notre population vieillissante. En effet, d'ici 2050, la population mondiale âgée de 60 ans et plus devrait doubler, ce qui entraînera une augmentation des cas d'accidents vasculaires cérébraux et de maladies neurodégénératives telles que la démence. L'âge est un facteur de risque important associé au développement de ces maladies (Béjot et Yaffe, 2019). La recherche fondamentale sur la maintenance à long terme du système nerveux chez les organismes modèles pourrait contribuer à la compréhension des mécanismes sous-jacents et donc au développement de diagnostics et de traitements pour les maladies neurologiques liées à l'âge, ce qui serait bénéfique pour notre société.

1.3 *Caenorhabditis elegans* comme modèle d'étude pour la recherche scientifique

Notre laboratoire utilise le ver rond *Caenorhabditis elegans* (Figure 1.1) comme modèle d'étude. Il est largement reconnu pour sa puissance expérimentale, sa grande reproductibilité, sa facilité d'utilisation et son utilité dans les domaines de la génétique, de la biologie cellulaire et moléculaire notamment pour l'étude du système nerveux.

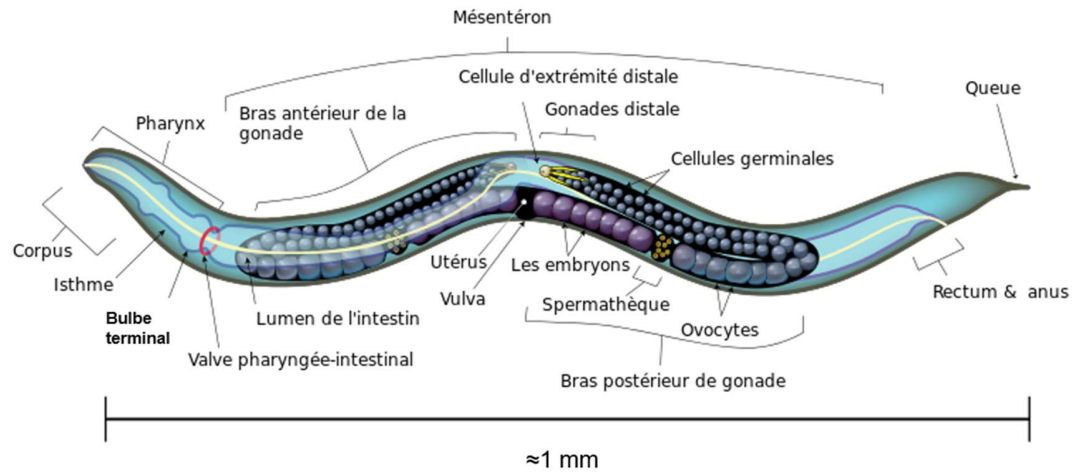


Figure 1.1 Représentation schématique de l'anatomie du nématode adulte. Image adaptée de Van Gerven, 2017.

Bien que plusieurs chercheurs aient déjà étudié les nématodes au début du 20^{ème} siècle, les travaux de Sydney Brenner débutés en 1960 et publiés en 1974, ont établi le nématode *C. elegans* comme organisme modèle (Brenner, 1974; Nigon et Felix, 2017). Depuis les travaux pionniers de Brenner, de nombreuses avancées scientifiques significatives ont été réalisées grâce à l'utilisation de ce nématode en tant qu'organisme modèle. Cela inclut la première caractérisation complète du lignage cellulaire d'un métazoaire en développement (Sulston *et al.*, 1983), l'identification du phénomène de l'apoptose et des mécanismes génétiques la régissant (Hedgecock *et al.*, 1983; NobelPrize.org, 2002), l'utilisation de la protéine fluorescente verte GFP (pour « *Green Fluorescent Protein* ») comme marqueur d'expression génique (Chalfie *et al.*, 1994; NobelPrize.org, 2008), le premier séquençage complet d'un génome métazoaire (Consortium*, 1998) et la découverte de l'ARN interférence (Fire *et al.*, 1998; NobelPrize.org, 2006).

Les neurosciences ont également grandement bénéficié des avancées réalisées avec le nématode, notamment la complétion du connectome entier d'un système nerveux

(White *et al.*, 1986), la découverte de gènes de guidage axonal (Hedgecock *et al.*, 1987), l'identification de gènes de transmission synaptique conservés (Gengyo-Ando *et al.*, 1993) et la première utilisation d'une channelrhodopsine pour induire un comportement (Richmond *et al.*, 1999). Il a permis de mettre en lumière de nouvelles voies de signalisation et est utilisé comme modèle pour étudier des maladies génétiques humaines ainsi que pour accélérer la découverte de traitements pour des maladies rares. L'impact scientifique de la recherche réalisée avec le nématode est indéniable et son utilisation continuera sans aucun doute à permettre de réaliser d'importantes avancées scientifiques dans le futur.

Cette utilisation est rendue possible grâce à une communauté scientifique dynamique, collaborative et interconnectée, ainsi qu'à de nombreux outils bio-informatiques tels que Wormbase, Wormatlas (Altun *et al.*, (ed.s) 2002-2023), Wormbook et Textpresso, qui fournissent facilement un large éventail d'informations. En outre, d'autres outils bio-informatiques spécialisés tels que GExplore (Hutter et Suh, 2016), VisCello (Cao *et al.*, 2017) et CeNGEN (Hammarlund *et al.*, 2018) offrent des données sur l'expression des transcrits et/ou des protéines de *C. elegans* en fonction du type cellulaire et de l'âge de l'animal, ce qui facilite davantage la recherche dans ce domaine. De plus, de nombreuses ressources génétiques reçus des mutations de perte et gain de fonction du Million Mutation Project (Thompson *et al.*, 2013), Oklahoma *C. elegans* Gene Knockout Project, ainsi que le *Caenorhabditis Genetics Center* (Daul *et al.*, 2019) pour le stockage de milliers de souches.

1.4 Avantages techniques de l'utilisation de *C. elegans*

C. elegans présente plusieurs caractéristiques qui en font un modèle génétique puissant. Tout d'abord, sa petite taille d'environ 1 mm à l'âge adulte facilite sa culture en grande quantité dans des boîtes de Pétri contenant des bactéries, ce qui réduit les coûts et espaces liés à son entretien. De plus, son cycle de vie court lui permet

d'atteindre l'âge adulte en seulement trois jours (Figure 1.2), avec une durée de vie totale d'environ trois semaines (Byerly *et al.*, 1976; Cassada et Russell, 1975).

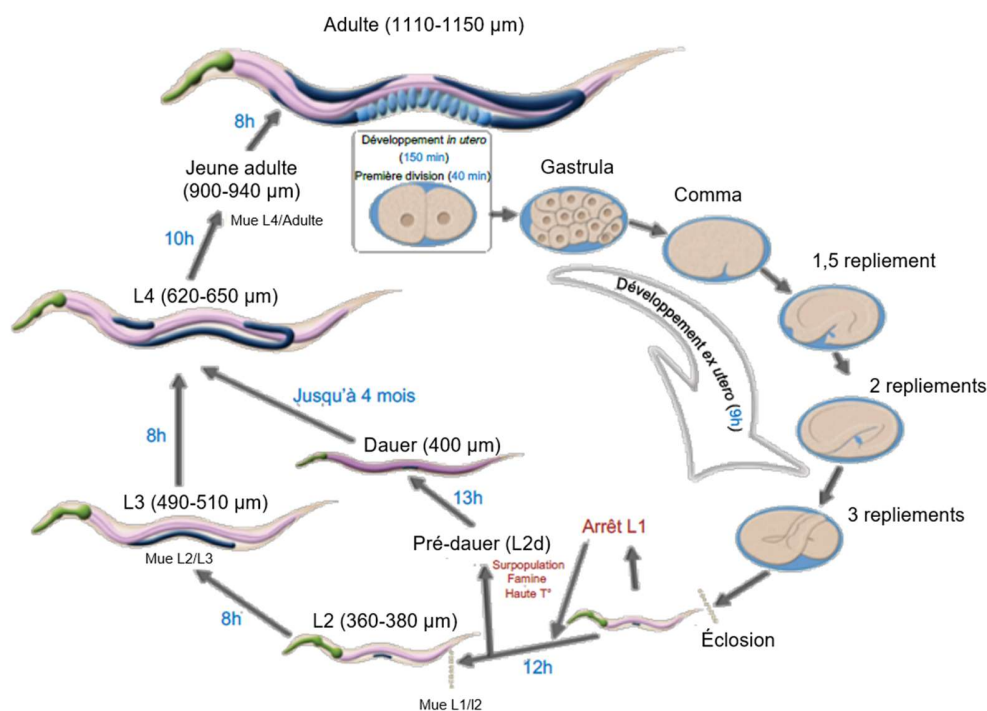


Figure 1.2 Schématisation du cycle de vie du *C. elegans* à 22°C. Ce schéma illustre les quatre stades larvaires (L1 à L4) par lesquels le nématode passe après son éclosion pour atteindre la maturité. Le nématode peut également entrer dans un stade alternatif appelé 'dauer' pour faire face à des stress environnementaux importants avant de reprendre son développement lorsque les conditions deviennent favorables à nouveau. Image adaptée de WormAtlas.

Bien que *C. elegans* soit hermaphrodite et capable d'autofécondation, la non-disjonction méiotique du chromosome X (Hodgkin *et al.*, 1979) entraîne la présence d'une faible proportion de mâles (~0,1%) dans la population de laboratoire, ce qui permet la réalisation de croisements génétiques avec les hermaphrodites pour générer de nouvelles souches. La progéniture abondante produite par l'hermaphrodite autoféconde, soit environ 300 animaux, permet de maintenir les souches sans nécessiter

de croisements supplémentaires et d'obtenir rapidement une taille d'échantillon importante pour les expériences (Hodgkin, 1988). Il est également important de noter que *C. elegans* est très résistant et peut être congelé à -80°C, permettant de stocker à long terme une variété de souches mutantes avec peu d'entretien et en minimisant les effets de dérive génétique (Cassada et Russell, 1975).

Des méthodes de biologie cellulaire et moléculaire peuvent être facilement appliquées à cet organisme, notamment la transgénèse, ce qui facilite l'étude des voies moléculaires et des interactions génétiques. Un aspect bénéfique clef est que le génome de *C. elegans* est entièrement séquencé. En effet, entre 60 et 80 % des gènes humains ont un orthologue chez *C. elegans*, ce qui offre des opportunités de recherche translationnelle (Kaletta et Hengartner, 2006; Shaye et Greenwald, 2011). De plus, environ 40 % des gènes impliqués dans des pathologies humaines ont également un orthologue chez *C. elegans*, ce qui facilite l'étude des mécanismes pathologiques conservés (Culetto et Sattelle, 2000). Cela permet ainsi d'établir des parallèles avec l'humain pour mieux comprendre leur fonctionnement. Le génome entièrement annoté accélère aussi l'identification de nouveaux gènes par le biais de cribles génétiques (Consortium*, 1998) et l'analyse systématique de voies cellulaires. De plus, la technique CRISPR/Cas9 facilite l'analyse fonctionnelle et mécanistique des interactions génétiques.

Pendant les premières décennies de travaux avec le vers, les mutations chez *C. elegans* étaient identifiées sur la base de l'aspect physique lors de cribles génétiques, ce qui a par exemple conduit à un grand nombre de mutants "*unc*" pour "uncoordinated", c'est-à-dire présentant des troubles de la locomotion (Brenner, 1974). Par la suite, la microscopie à fluorescence a permis d'exploiter la transparence de ce nématode avec l'observation *in vivo* des protéines couplées avec des marqueurs fluorescents tels que GFP. Cette méthode permet l'observation en temps réel de plusieurs protéines et tissus, en utilisant des rapporteurs fluorescents exprimés sous le contrôle de promoteurs

spécifiques. Ainsi, la transparence de *C. elegans* constitue un avantage majeur, permettant la visualisation, à une résolution unicellulaire dans le temps et tout au long de la vie, de structures cellulaires, subcellulaires et extracellulaires grâce à des techniques de microscopie ainsi que l'utilisation des rapporteurs fluorescents *in vivo*. Par exemple, l'observation de diverses structures telles que des catégories neuronales, des muscles et la lignée germinale (Figure 1.3) a été possible, ce qui a permis d'étudier leur développement, de cribler et d'identifier des mutants affectant la morphologie, la fonction ou la localisation cellulaire, ainsi que de caractériser des interactions protéiques (Boulin *et al.*, 2006; Chalfie *et al.*, 1994; Feinberg *et al.*, 2008).

Enfin, *C. elegans* possède un nombre constant de 959 cellules somatiques et présente les principaux tissus et systèmes similaires à ceux présents chez l'humain, notamment l'épiderme, les muscles, l'appareil reproducteur, le système digestif et le système nerveux (Kimble et Hirsh, 1979; Sulston et Horvitz, 1977; Sulston *et al.*, 1983). En raison de ces nombreux avantages, *C. elegans* est un modèle expérimental idéal pour étudier les questions neurobiologiques dans notre laboratoire.

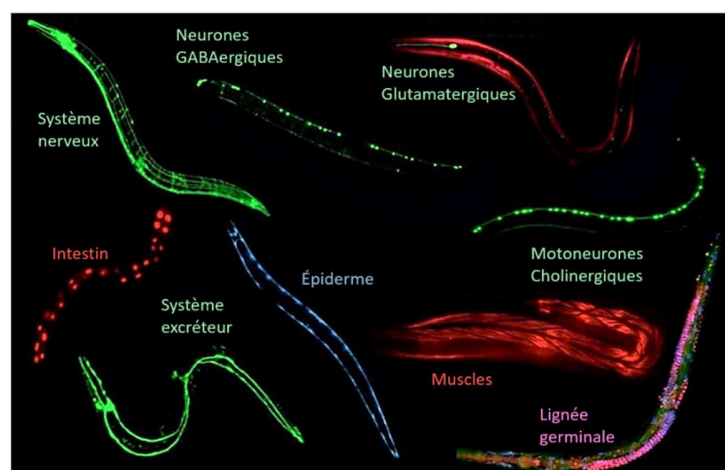


Figure 1.3 Représentation de quelques tissus observables par fluorescence chez *C. elegans*. Pour chacun des vers représentés, un rapporteur fluorescent, sous le contrôle d'un promoteur

tissu-spécifique, a été utilisé. Ces rapporteurs sont intégrés dans le génome du ver et les structures marquées peuvent ainsi être observées *in vivo*. Image adaptée de Katzman, 2017.

1.5 Le système nerveux chez *C. elegans*

Le système nerveux de l'hermaphrodite (Figure 1.4) est composé de manière constante de 302 neurones (Sulston et Horvitz, 1977; White *et al.*, 1986). Parmi ces neurones, 282 appartiennent au système nerveux somatique, tandis que les 20 autres constituent le système nerveux du pharynx (Albertson *et al.*, 1976; White *et al.*, 1986). La morphologie neuronale est généralement simple, avec des neurones souvent unipolaires ou bipolaires, bien que quelques exceptions présentent des ramifications plus élaborées, telles que les neurones sensoriels appelés FLP et PVD (les noms des neurones des vers ne sont pas des acronymes). Les neurones sont organisés en ganglions et en fascicules (White *et al.*, 1986). Les ganglions les plus importants se trouvent dans la région de la tête, où des neurones projettent leurs axones pour former un anneau nerveux, souvent appelé le "cerveau" du ver où la majorité des interactions ont lieu. Deux autres ganglions sont présents dans la région ventrale de la corde et de la queue, et des commissures relient les régions dorsales et ventrales du système nerveux.

La croissance axonale et la connectivité synaptique sont largement établies chez la larve L1 dès l'éclosion (Sulston et Horvitz, 1977; Sulston *et al.*, 1983; White *et al.*, 1986). À la naissance, le cerveau du ver (appelé anneau nerveux) compte 222 neurones qui sont reliés entre elles par environ 1 300 synapses formant environ 800 connexions. Avec la maturation, environ 4 500 nouvelles synapses viennent renforcer la plupart des connexions déjà présentes à la naissance. Le nombre moyen de synapses par connexion passe de 1,7 à la naissance à 6,9 à l'âge adulte. De plus, environ 1 200 nouvelles synapses se forment pour établir de nouvelles connexions entre des neurones qui n'étaient pas connectés auparavant, entraînant ainsi une augmentation de 2,4 fois du nombre total de connexions par rapport à la naissance (Witvliet *et al.*, 2021). La position relative des neurones est conservée entre individus, ce qui a permis de les

classifier en plus de 118 catégories différentes selon les axes antéro-postérieur, dorso-ventral et latéral droite/gauche (White *et al.*, 1986). Par ailleurs, la position neuronale semble jouer un rôle important dans le développement des partenaires synaptiques, avec 45 % des contacts se produisant entre deux neurones adjacents (White *et al.*, 1983).

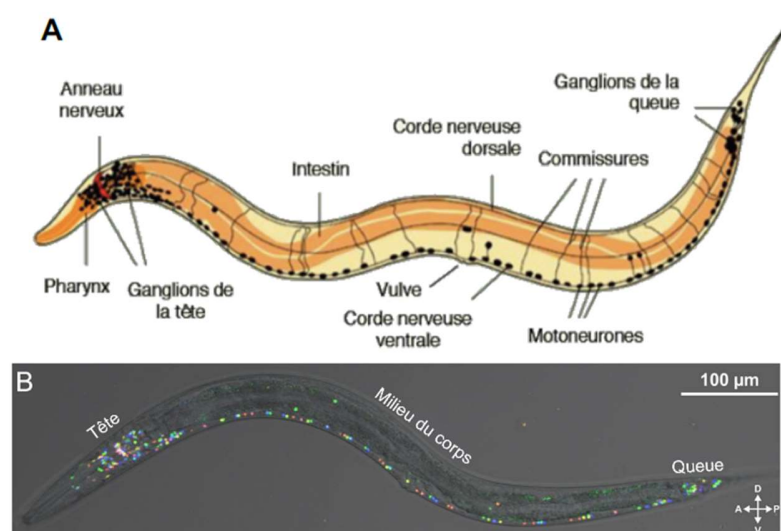


Figure 1.4 L'organisation du système nerveux de *C. elegans*. (A) Représentation simplifiée du système nerveux. (B) Image obtenue par microscopie à fluorescence d'un nématode adulte met en évidence les 302 neurones grâce à l'utilisation du rapporteur fluorescent NeuroPAL (*a neuronal polychromatic atlas of landmarks*), qui se localise spécifiquement dans les noyaux. Échelle = 100 µm. Image 'A' adaptée de Gally et Bessereau, 2003; et 'B' de Yemini *et al.*, 2021.

La connectivité neuronale dans le système nerveux du nématode se fait par le biais de milliers de synapses, dont des synapses chimiques, des jonctions gap et des jonctions neuromusculaires (Varshney *et al.*, 2011; White *et al.*, 1986). La transmission au niveau des synapses chimiques se fait "en passant", et les principaux neurotransmetteurs présents chez les mammifères, tels que le GABA, le glutamate, l'acétylcholine, la dopamine, la sérotonine et autres monoamines et neuropeptides sont également conservés chez le nématode (Chase et Koelle, 2007; McIntire *et al.*, 1993;

Pereira *et al.*, 2015; Serrano-Saiz *et al.*, 2013). Bien que jusqu'à récemment aucun potentiel d'action n'avait été détecté, une étude a révélé que les neurones olfactifs AWA du nématode sont capables d'en générer, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives de recherche dans ce domaine (Liu *et al.*, 2018).

1.6 Maintenance de l'architecture du système nerveux chez *C. elegans*

C. elegans présente des similitudes avec l'humain en termes de défis de maintenance de l'architecture neuronale, ce qui en fait un modèle pour l'étude de ces processus (Figure 1.5). En effet, pendant la phase de croissance importante du ver, les neurones maintiennent une densité synaptique stable malgré une augmentation considérable du volume (White *et al.*, 1986).

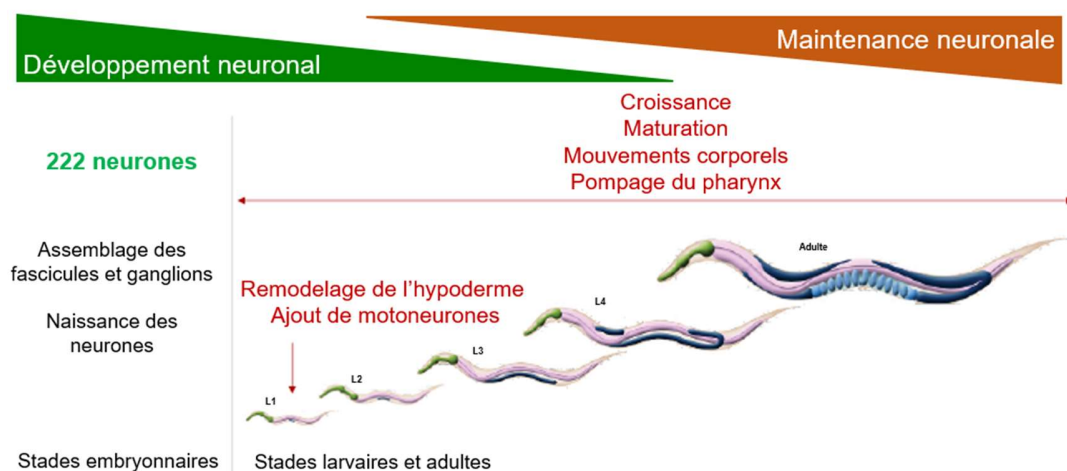


Figure 1.5 *C. elegans* comme modèle d'étude de la maintenance de l'architecture neuronale. La formation du système nerveux a lieu principalement pendant l'embryogenèse et doit être maintenue malgré de nombreux défis tout au long de la vie. L'image a été créée par Virginie Desse, membre du laboratoire Bénard.

Le système nerveux subit des modifications post-développementales telles que l'ajout de nouveaux neurones et des périodes de plasticité, notamment la réorganisation

de certains contacts synaptiques (Witvliet *et al.*, 2021) et le passage au stade *dauer* en réponse à des stress environnementaux (Hu, 2007). Enfin, il est également soumis à des stress mécaniques engendrés par les mouvements du corps tels que la locomotion, le pompage du pharynx lors de l'alimentation, la défécation et la ponte d'œufs.

La plupart des structures du système nerveux se développent pendant la période embryonnaire, et pourtant, des mécanismes intrinsèques et extrinsèques sont nécessaires pour garantir l'intégrité de la formation initiale du système nerveux tout au long de la vie, à la fois au niveau cellulaire et au niveau des ensembles cellulaires. Une brève présentation des différents types de facteurs de maintenance sera abordée dans la section suivante.

1.7 Facteurs de maintenance de l'architecture neuronale identifiée à ce jour

Dans la suite de ce mémoire, les termes « maintenance neuronale » et « maintenance du système nerveux » seront utilisés de manière interchangeable pour décrire l'action de facteurs sur la préservation de l'assemblage structurel de groupes de neurones. Quelques groupes de recherche ont démontré l'effet post-développemental de molécules spécifiques sur la préservation de l'architecture neuronale chez *C. elegans* (Figure 1.6, (Aurelio *et al.*, 2002; Bénard *et al.*, 2006; Bénard et Hobert, 2009; Bénard *et al.*, 2009; Bülow *et al.*, 2004; Desse *et al.*, 2021; Pocock *et al.*, 2008; Sasakura *et al.*, 2005).

Certains de ses facteurs qui agissent de manière sélective pour maintenir la position des axones dans les fascicules sans altérer l'organisation neuronale des ganglions (Aurelio *et al.*, 2002; Bénard *et al.*, 2009; Bülow *et al.*, 2004). Les interneurones PVQ et PVP dans la corde nerveuse ventrale maintiennent leur position axonale grâce à la production de deux petites protéines, ZIG-3 et ZIG-4, qui contiennent deux domaines immunoglobulines et sont sécrétées par l'interneurone PVT (Aurelio *et al.*, 2002; Bénard *et al.*, 2009). De manière similaire, l'isoforme EGL-15(5A) appartenant à la

superfamille des immunoglobulines (SfIg) et ayant une fonction similaire au récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes chez les vertébrés, est également impliquée dans le maintien axonal des interneurons PVQ et PVP. Cependant, contrairement aux protéines ZIG-3 et ZIG-4, elle agit à partir de l'épiderme pour assurer cet effet (Bülow *et al.*, 2004).

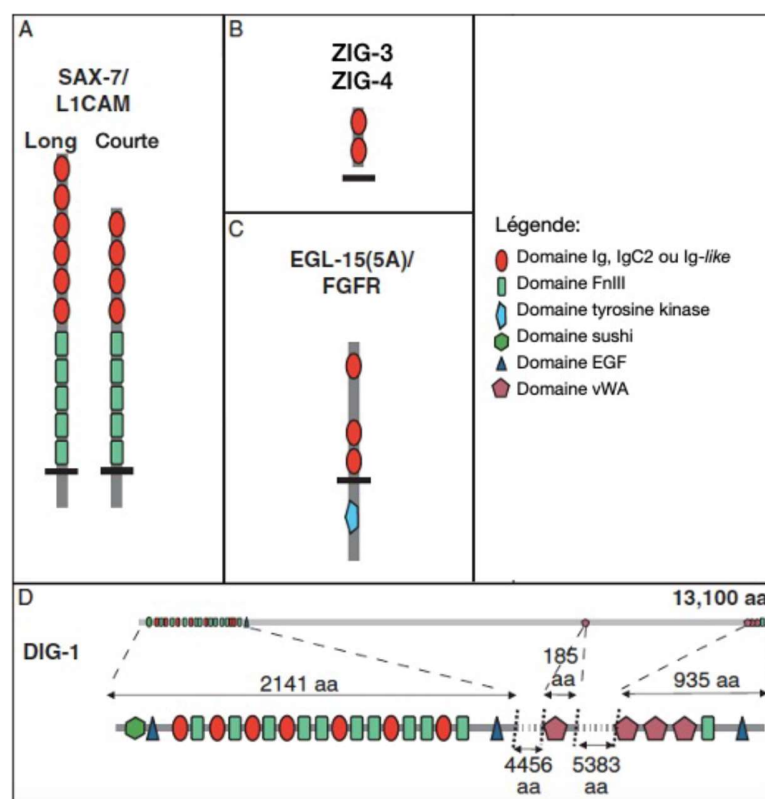


Figure 1.6 Schéma des facteurs de maintenance neuronale identifiés chez *C. elegans*. Les ganglions et les fascicules chez le nématode sont maintenus grâce à une variété de molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Image adaptée de Bénard et Hobert, 2009.

DIG-1, une autre protéine de la SfIg qui est extracellulaire et massive -composée de 13 100 acides aminés- participe activement aussi à la maintenance de l'architecture du système nerveux (Figure 1.6). DIG-1 est impliquée dans le maintien des axones de la

corde nerveuse ventrale et des neurones chimiosensoriels (ASH et ASI) par rapport à l'anneau nerveux (Bénard *et al.*, 2006). Cette protéine de la Sflg est produite par des cellules mésodermales, dont les muscles et contient plusieurs domaines d'interaction qui pourraient coordonner l'adhésion des neurones à leur environnement (Bénard et Hobert, 2009).

SAX-7, une protéine transmembranaire homologue aux protéines de la famille L1CAM (CAM pour « *cell adhesion molecule* ») des vertébrés, est un autre facteur impliqué dans le maintien post-développemental des ganglions et des fascicules des cordes nerveuses chez *C. elegans* (Figure 1.6). Cette protéine d'adhésion appartient également à la Sflg et est présente sous deux formes dérivées d'initiation alternative de la transcription, une forme courte (SAX-7S) et une longue (SAX-7L). Seule SAX-7S est fonctionnelle pour maintenir l'architecture du système nerveux (Desse *et al.*, 2021; Pocock *et al.*, 2008; Sasakura *et al.*, 2005). SAX-7 est exprimé et fonctionne à partir des neurones via des interactions homophiliques pour coordonner l'adhésion cellulaire entre les neurones (Desse *et al.*, 2021). Des produits clivés de SAX-7S sont les plus abondants, et ils fonctionnent à partir des neurones également (Desse *et al.*, 2021). Plusieurs études ont démontré que SAX-7 est essentielle pour le maintien de l'organisation des ganglions de la tête et des fascicules des cordes nerveuses ventrale et latérale chez *C. elegans* (Chen et Zhou, 2010; Desse *et al.*, 2021; Ramirez-Suarez *et al.*, 2019). Notre laboratoire mène actuellement des recherches approfondies sur SAX-7/L1CAM, car cette molécule joue un rôle crucial dans le maintien de l'architecture du système nerveux. En effet, en plus de ses rôles de développement bien connus et conservés du nématode à l'humain, la molécule d'adhésion SAX-7/L1CAM semble également jouer un rôle post-développemental chez la souris adulte. Des études ont montré qu'une déplétion conditionnelle du gène L1 dans le cerveau adulte de la souris entraîne (1) une augmentation de la transmission synaptique excitatrice et cause des déficits comportementaux (Law *et al.*, 2003), (2) une perte de la dépolarisation tonique et avec pour conséquences des troubles d'apprentissage moteur (Hortsch *et al.*,

2014; Weller et Gärtner, 2001). Chez l'humain, des mutations dans le gène L1CAM engendrent un ensemble de maladies neurodéveloppementales appelé « syndrome L1 ».

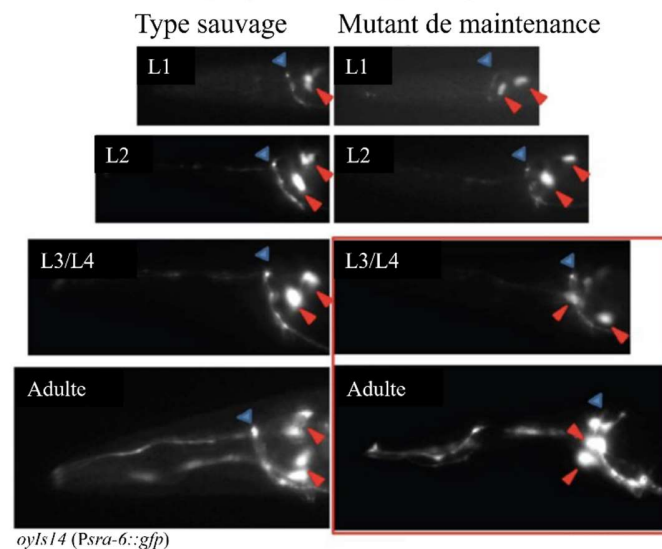


Figure 1.7 Représentation d'un exemple des défauts de maintenance neuronale : *sax-7/L1CAM*. Jusqu'au 2^{ème} stade larvaire (L2), les neurones chimiosensoriels (ASH et ASI) repérables grâce au marqueur *oyIs14 (P_{sra-6}::gfp)*, signalés par des flèches rouges, sont correctement positionnés en arrière de l'anneau nerveux, identifié par une flèche bleue, autant chez les mutants de maintenance neuronale que chez le type sauvage. Cependant, à partir du 3^{ème} stade larvaire (L3), une désorganisation progressive des ganglions neuronaux (délimités par un encadré rouge) survient chez les mutants de maintenance neuronale, jamais observé chez le type sauvage. Image adaptée de Bénard *et al.*, 2012.

Au-delà des facteurs neuronaux de la SfIg, notre laboratoire a mis en évidence le rôle de la matrice extracellulaire (MEC) dans la maintenance à long terme de l'architecture neuronale (Nadour *et al.*, en préparation). En effet, lors d'un crible génétique classique par mutagenèse pour trouver des mutations capables de supprimer les défauts de maintenance de l'architecture neuronale des mutants *sax-7*, une mutation causant une perte de fonction d'une protéine appelée MIG-6 et codant pour la papiline, a été identifiée. La papiline est une protéine de la MEC conservée jusqu'à l'humain qui est

très peu étudiée à ce jour, dont rien n'est encore connu sur son rôle ni ses potentiels interacteurs.

Afin de mieux comprendre le rôle de la papiline au sein de la MEC et dans la maintenance neuronale, nous nous sommes demandé comment une perte de fonction de la papiline pouvait éventuellement affecter l'expression ou la localisation des composants de la MEC. Nous faisons ci-dessous un résumé des rôles des principaux composants de la MEC.

1.8 La matrice extracellulaire

Chez l'humain, environ 20% du volume total du cerveau est occupé par la MEC (Nicholson et Syková, 1998). Les membranes basales (MB) sont de minces feuilles denses de MEC qui entourent la plupart des tissus (Yurchenco, 2011). Cette couche protéique joue un rôle essentiel dans divers processus biologiques tout au long de la vie des organismes. En effet, elle protège les tissus des forces mécaniques, contribue à former la barrière hémato-encéphalique et les jonctions neuromusculaires, et participe à la mise en forme des tissus (Morrissey et Sherwood, 2015; Rogers et Nishimune, 2017).

La matrice extracellulaire chez *C. elegans*

La majeure partie de nos connaissances sur les fonctions de la MEC chez les invertébrés provient des modèles de *C. elegans* et de *Drosophila melanogaster*. Chez *C. elegans*, il existe deux formes principales de MEC : celle de la MB et la cuticulaire. Récemment, une caractérisation *in silico* a révélé que la MEC de *C. elegans* comprend plus de 700 molécules, dont 70 % ont des homologues chez l'humain (Teuscher *et al.*, 2019). Le développement d'un organisme multicellulaire implique une série de processus tels que la division cellulaire, la différenciation et la migration des cellules. Les interactions entre les cellules et la MEC régulent ces différentes étapes du développement.

Toutefois, parmi les multiples rôles que joue la MEC de *C. elegans* dans son développement, la migration cellulaire a été l'un des aspects les plus étudiés, à l'instar des vertébrés. La composition de la MEC varie en fonction du type de tissu, avec certaines protéines présentes en quantité abondante dans un tissu donné tandis qu'elles sont quasi-absentes dans un autre tissu. Chez *C. elegans* les protéines structurales, comme le collagène de type IV, les laminines et le perlécan, permettent de former et de structurer la MEC (Figure 1.8).

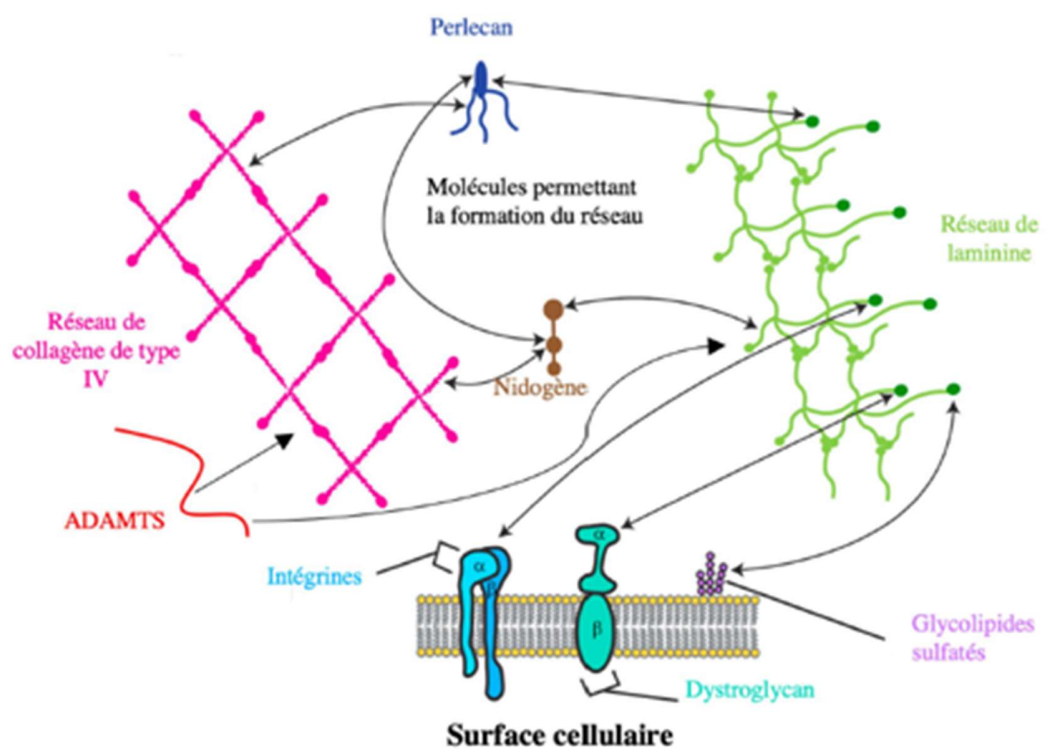


Figure 1.8 Schématisation des principaux composants de la matrice extracellulaire. Schéma représentatif de composants de la MEC à la surface cellulaire. Chacun de ces composants sont interreliés via des connexions (représentées par des flèches) formant ainsi une matrice permettant de maintenir les structures cellulaires et tissulaires en place. Image adaptée de Jayadev et Sherwood, 2017.

Le Collagène IV

Les collagènes représentent les molécules les plus abondantes au sein de la MEC chez *C. elegans*. Les collagènes jouent un rôle prépondérant dans la composition de la MEC cuticulaire spécifique aux nématodes, constituant la majeure partie de ses molécules non conservées. Concernant la MEC de la membrane basale chez *C. elegans*, huit collagènes y sont exprimés. Parmi eux, les plus abondants sont les collagènes IV (EMB-9 et LET-2), orthologues du collagène IV $\alpha 1$ humain (Figure 1.9). Ces collagènes de la MEC jouent un rôle crucial dans le développement embryonnaire et larvaire de *C. elegans*. En effet, la perte de EMB-9/collagène IV $\alpha 1$ ou de LET-2/collagène IV $\alpha 2$ entraîne une létalité embryonnaire et larvaire précoce (Guo *et al.*, 1991). Des études récentes suggèrent que leur recrutement est régulé par des récepteurs de surface cellulaires, notamment les intégrines, ainsi que par d'autres protéines structurales de la MEC, telles que les laminines (Jayadev *et al.*, 2019).

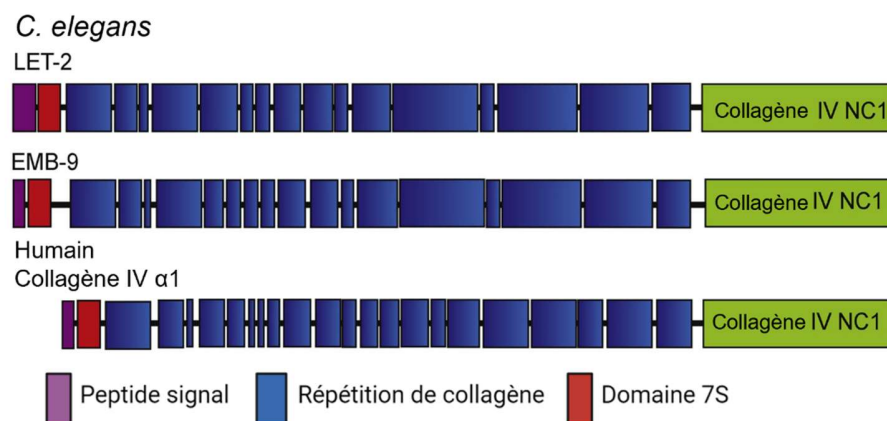


Figure 1.9 Structures des gènes de collagènes IV chez *C. elegans* et l'humain. LET-2 et EMB-9, les deux collagènes IV chez *C. elegans* orthologue du collagène IV $\alpha 1$ chez l'humain. Image adaptée de Amran *et al.*, 2021.

Les laminines

En plus des collagènes IV, les laminines sont des glycoprotéines essentielles qui constituent un réseau filamentaire dans l'assemblage de la MEC (Hohenester et Yurchenco, 2013). *C. elegans* possède quatre gènes de sous-unités de laminine (*lam-1*; *-2*; *-3*; et *epi-1*) (Figure 1.10). Chez *C. elegans*, on trouve deux chaînes α (LAM-3 et EPI-1); une chaîne β (LAM-1) et une chaîne γ (LAM-2) (Figure 1.10; Kao *et al.*, 2006; Whitman et Borkowski, 1989; Zhu *et al.*, 1999). Ces chaînes de laminine s'associent de manière spécifique pour former deux types de trimères de laminine, qui diffèrent uniquement par leurs chaînes α (Figure 1.10). Les interactions principales de la laminine avec d'autres molécules telles que le perlécan et la fibuline se produisent principalement grâce aux domaines G de la laminine. Parallèlement, le nidogène établit une interaction avec la chaîne γ 1 (LAM-2) pour assurer la liaison du réseau de laminine aux fibres de collagène IV ce qui permet l'adhésion des cellules épithéliales avec la lame basale (Holmberg et Durbeej, 2013).

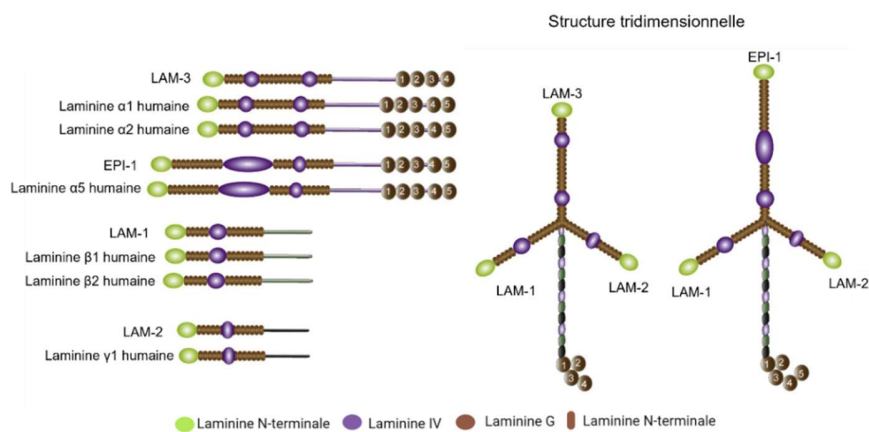


Figure 1.10 Structures des gènes de laminines chez *C. elegans* et l'humain. Les laminines forment des hétéros trimères différencié uniquement par leur chaîne α (LAM-3 et EPI-1). Les deux autres chaînes β (LAM-1) et γ (LAM-2) sont communes. Image adaptée de Amran *et al.*, 2021.

Le perlécan

Le perlécan est l'un des quatre protéoglycans matriciels chez *C. elegans*. La séquence de la protéine centrale d'UNC-52/perlécan présente une similarité globale de 50 % avec le perlécan humain (Figure 1.11A), mais diffère dans les régions portant les chaînes de glycosaminoglycans. UNC-52 est sécrété dans la MEC. Les mutations dans le gène du perlécan provoquent un phénotype musculaire désorganisé ainsi qu'une locomotion non coordonnée (Rogalski *et al.*, 1993). En effet, UNC-52/perlécan est sécrété par les cellules épidermiques (Figure 1.11B) et se localise à l'interface muscle-épiderme (Figure 1.11C), où il est nécessaire à l'initiation du développement des sarcomères, en assurant la polarisation des intégrines vers la membrane basale et à la formation des quatre quadrants musculaires.

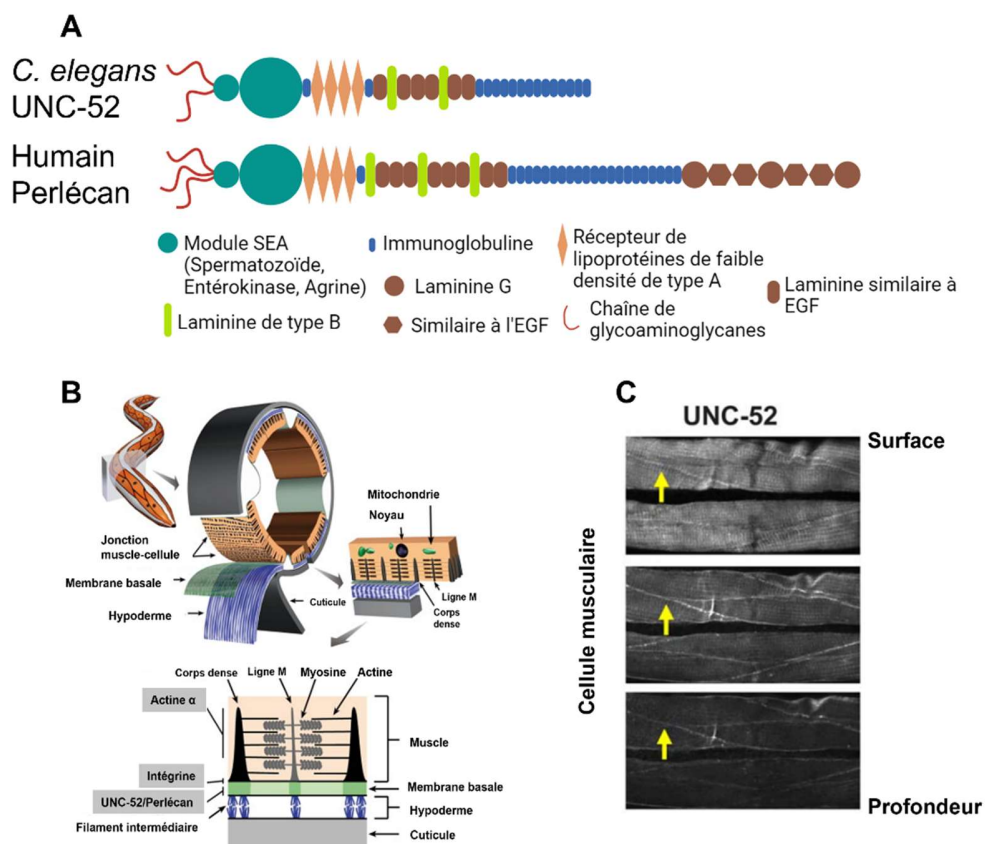


Figure 1.11 Le perlécan : structure de la protéine et localisation à la membrane des cellules musculaires chez *C. elegans*. A) Structure et domaines du perlécan chez *C. elegans* et chez l'humain. (B) Localisation cellulaire du perlécan dans la membrane basale hypodermale à la jonction muscle-hypoderme (C) UNC-52/perlécan se localise aux limites des cellules musculaires à la fois en surface (près de la membrane adjacente à l'hypoderme) et à l'intérieur (loin de cette surface) des plans focaux. Les animaux ont été immunomarqués avec des anticorps dirigés contre UNC-52 et les images ont été obtenues par microscopie confocale, montrant trois coupes optiques consécutives de 1,0 μm . Les flèches jaunes indiquent les limites des cellules musculaires. Image 'A' adaptée de Amran *et al.*, 2021, 'B' adaptée de Mackinnon *et al.*, 2002, 'C' adaptée de Qadota *et al.*, 2017.

La papiline

De nombreuses études suggèrent que des protéines modulatrices, telles que la MIG-6/papiline et certaines métalloprotéinases modifient la composition de la MEC (Hesselson *et al.*, 2004; Kawano *et al.*, 2009; Keeley *et al.*, 2020; Nadour *et al.*, en préparation). Elles interagissent avec les autres composants de la MEC pour en moduler la dégradation et/ou la localisation de certains composants par des interactions moléculaires. *C. elegans* possède deux isoformes de la papiline, une dite S pour « Short » et une L pour « Long » (Figure 1.12). Très peu de travaux ont jusqu'alors été effectués sur la papiline. On sait néanmoins qu'elle participe à l'organogénèse (chez le vers et la Drosophile), l'organisation des dendrites et dans la régulation d'autres métalloprotéinases matricielles (Fessler *et al.*, 2004; Kawano *et al.*, 2009; Kramerova *et al.*, 2000; Ramirez-Suarez *et al.*, 2019; Wong et Schwarzbauer, 2012). De récents travaux de notre laboratoire ont montré que seule l'isoforme S de la papiline est impliquée dans la modulation des défauts de maintenance d'architecture neuronale du mutant *sax-7* (Nadour *et al.*, en préparation).

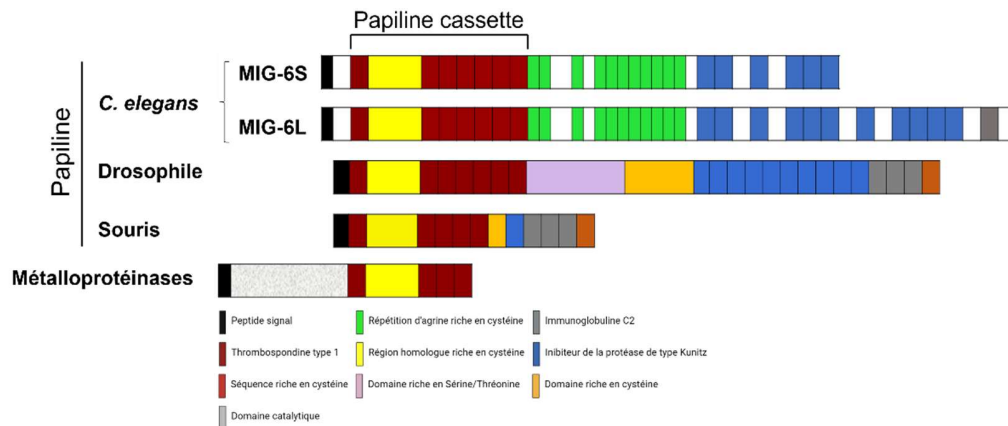


Figure 1.12 Structure de la papiline chez différentes espèces. La papiline possède des domaines conservés caractéristiques de nombreuses métalloprotéinases. Image générée par Malika Nadour du laboratoire Bénard.

Le nidogène

Enfin, des protéines dynamiques de la MEC telles que le nidogène et la fibuline ont des rôles de soutien complémentaire à d'autres protéines matricielles (Das *et al.*, 2022). Le nidogène est une glycoprotéine de la MEC conservée. Elle est composée de trois domaines globulaires séparés par un domaine de type tige (Figure 1.13A et C) permettant des attaches au collagène IV (via les domaines G1 et G2) et aux laminines (domaine G3), ce qui entraîne une accentuation de la stabilité entre ces deux composants structuraux essentiels (Dai *et al.*, 2018).

Chez *C. elegans*, le nidogène est principalement retrouvé dans la MB de l'intestin, mais également, dans une moindre proportion, dans celle d'autres tissus (pharynx, gonade, anneau nerveux, utérus, muscle et hypoderme) (Figure 1.13B; Kanae *et al.*, 2019). Le nidogène, qui joue un rôle important dans la mise en place des neurones HSN et PVQ (Kim et Wadsworth, 2000) et dans la formation synaptique (Ackley *et al.*, 2003) chez *C. elegans*, est également important pour le développement des dendrites de PVD en interaction avec le perlécan (Dai *et al.*, 2018).

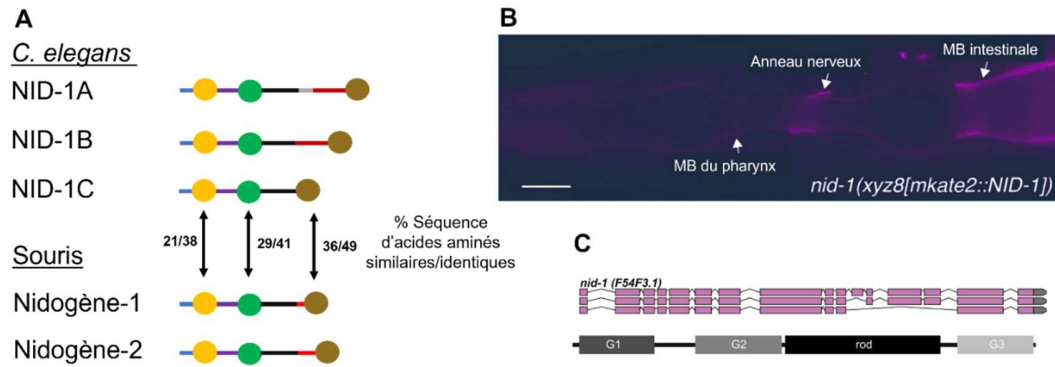


Figure 1.13 Le nidogène : homologie, localisation et domaines. (A) Similitude du nidogène entre *C. elegans* et la souris. (B) Localisation du nidogène dans la tête avec *nid-1(xyz8[mkate2::NID-1])* au stade L2. (C) Domaines du nidogène. Échelle = 10 μ m. MB (Membrane Basale). Image 'B' adaptée de Kanae *et al.*, 2019, 'C' adaptée de WormBase.

La fibuline

L'homologue de la FBL-1/fibuline chez *C. elegans* a été mis en évidence grâce aux études chez le poulet (Barth *et al.*, 1998). Fonctionnellement, il a été démontré que la fibuline interagit avec plusieurs autres protéines de la MEC, dont la fibronectine, les laminines, le nidogène et le fibrinogène (Balbona *et al.*, 1992; Pan *et al.*, 1993; Tran *et al.*, 1995). Ses deux isoformes, C et D, sont des homologues des fibuline-1C et fibuline-1D humaines (Figure 1.14; Barth *et al.*, 1998).

Chez *C. elegans*, l'isoforme C est exprimée dans les parties antérieures et postérieures de l'intestin et se localise aux MB de la gonade et du pharynx, et l'isoforme D dans les parois musculaires de la tête et de la queue (Kubota *et al.*, 2004). De nombreux travaux d'interactions génétiques supposent que la fibuline jouera un rôle de stabilisateur d'EMB-9/Collagène IV au sein de la MEC pour le soutenir dans sa capacité à se réticuler (Kubota *et al.*, 2012; Kurshan *et al.*, 2014).

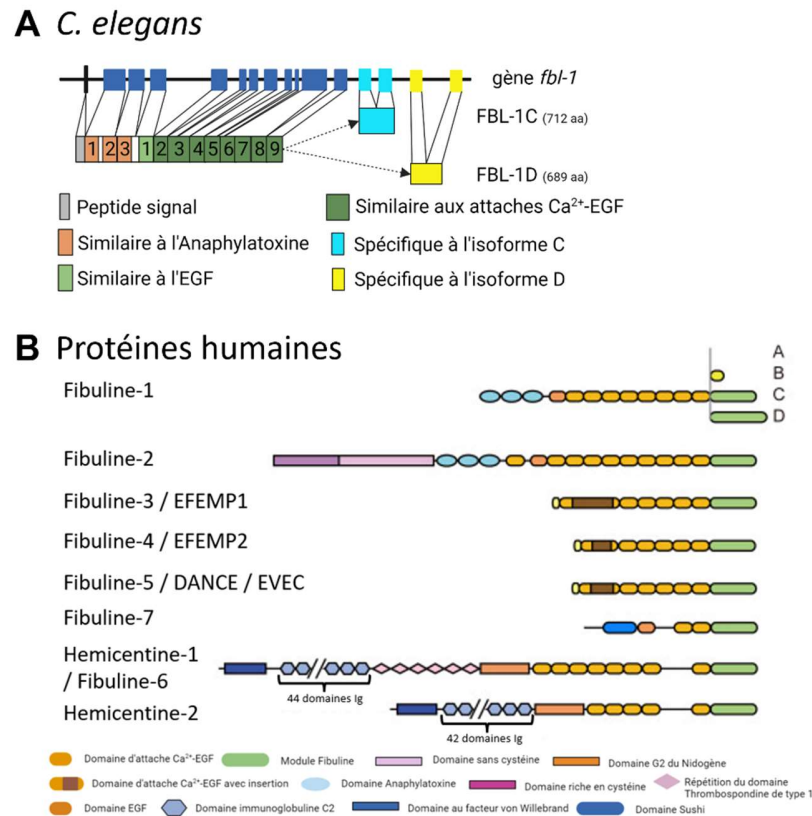


Figure 1.14 La fibuline : chez l'humain et *C. elegans*. (A) Domaines et isoformes de la fibuline chez *C. elegans*. (B) Domaines et isoformes des différentes protéines de fibuline chez l'humain. Image 'A' adapté de Kubota *et al.*, 2004 et 'B' adaptée de Hanada et Sasaki, 2018.

1.9 La voie de TGF- β

De manière similaire aux mammifères, le matrisome de *C. elegans* comprend toutes les protéines sécrétées dans la MEC, ce qui représente environ 4 % de son génome (Teuscher *et al.*, 2019). Le matrisome est affecté par l'activité d'une des principales voies de signalisation morphogénique : la « *Transforming growth factor beta* » ou facteur de croissance transformateur bêta (TGF- β). Étant donné que cette voie est très impliquée dans la régulation de la MEC, une partie de mes travaux de recherche fut d'évaluer si l'effet de la papiline sur la maintenance de l'architecture

neuronale dépend de la voie de TGF- β . Je présente donc ci-dessous un résumé de cette signalisation.

La famille de TGF- β est l'une des principales voies de transduction de signaux utilisées chez les animaux pour le développement et l'homéostasie. La voie de TGF- β semble être un produit de la conservation évolutive animale, étant présente chez les animaux les plus primitifs, tels que les éponges (ou spongiaires) et *Trichoplax* (Huminiacki *et al.*, 2009; Srivastava *et al.*, 2008), mais pas chez les plantes ou les levures.

L'activation classique débute lors de la liaison du ligand aux récepteurs cellulaires (type I et II) (Figure 1.15A). Il s'en suit alors une cascade de signalisation médiée par les Smads (acronyme portemanteau des homologues humains de *Sma* pour « *Small* » (phénotype *C. elegans*) et Mads pour « *Mother Against Decapentaplegic* » des gènes de *Drosophila*) qui sont des médiateurs de signalisation intracellulaires intervenant dans la signalisation de TGF- β (Derynck *et al.*, 1998; Padgett *et al.*, 1998). On distingue trois classes de Smads, avec des différences fonctionnelles et de séquence : les R-Smads (*receptor-regulated* Smads) régulés par le récepteur type I, les Co-Smads communs (*common partner* Smads) et les I-Smads antagonistes (*inhibitory* Smads). Les R-Smads sont directement phosphorylés et activés par l'activité kinase du récepteur de type I (Kretschmar *et al.*, 1997; Macías-Silva *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996). Après leur activation, les R-Smads s'associent aux Co-Smads pour former des complexes hétéro-oligomériques qui se transloquent dans le noyau (Kretschmar *et al.*, 1997; Lagna *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1996). Les complexes de Smad agissent comme des facteurs de transcription sur des gènes cibles en se liant directement à l'ADN et en coopérant avec d'autres facteurs de transcription (Chen *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997).

TGF- β chez *C. elegans*

Chez *C. elegans*, le principal ligand de la voie de TGF- β , appelé DBL-1, est impliqué dans la régulation de la taille du corps, la morphogenèse de la queue des mâles et l'expression de neurotransmetteurs des neurones sensoriels (Lints et Emmons, 1999; Morita *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999). Les mutants présentant des défauts dans cette voie, connue sous le nom de voie Sma/Mab, sont environ 50% plus petits que les individus de type sauvage, ont des spicules copulateurs mâles froissés et présentent des anomalies dans la formation de motifs et l'expression de neurotransmetteurs des raies sensoriels de la queue des mâles.

Deux types de signalisation de TGF- β chez *C. elegans*

Chez *C. elegans*, deux principales voies de signalisation du TGF- β ont été identifiées : la voie *Dauer* et la voie Sma/Mab (Figure 1.15B et C; Patterson et Padgett, 2000). Bien que ces deux voies utilisent un récepteur de type II commun, DAF-4 (Estevez *et al.*, 1993; Savage-Dunn *et al.*, 1996), d'autres composants de signalisation sont spécifiques à chaque voie.

Dans la voie *Dauer* (Figure 15B) qui régule l'entrée dans le stade larvaire de type *dauer* c'est-à-dire un arrêt dans le développement et la ponte des œufs (Ren *et al.*, 1996; Trent *et al.*, 1983), le ligand DAF-7 (Ren *et al.*, 1996) active le récepteur de type I DAF-1 (Georgi *et al.*, 1990), ainsi que les Smads DAF-8 et DAF-14 (Inoue et Thomas, 2000; Riddle et Albert, 1997), qui sont liés aux R-Smads. L'activité de cette voie s'oppose à celle d'un autre Smad, DAF-3 (Patterson *et al.*, 1997), qui est distamment lié aux Co-Smads.

La voie Sma/Mab (Figure 1.15C) utilise le ligand DBL-1 (Morita *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999), qui active le récepteur de type I SMA-6 (Krishna *et al.*, 1999), ainsi que

les Smads SMA-2, SMA-3 et SMA-4 (Savage-Dunn *et al.*, 1996). Les Smads SMA-2 et SMA-3 sont similaires aux R-Smads humaines, tandis que SMA-4 est homologue du Co-Smad Smad-4 des vertébrés. Cette voie régule la taille du corps et le développement de la queue mâle.

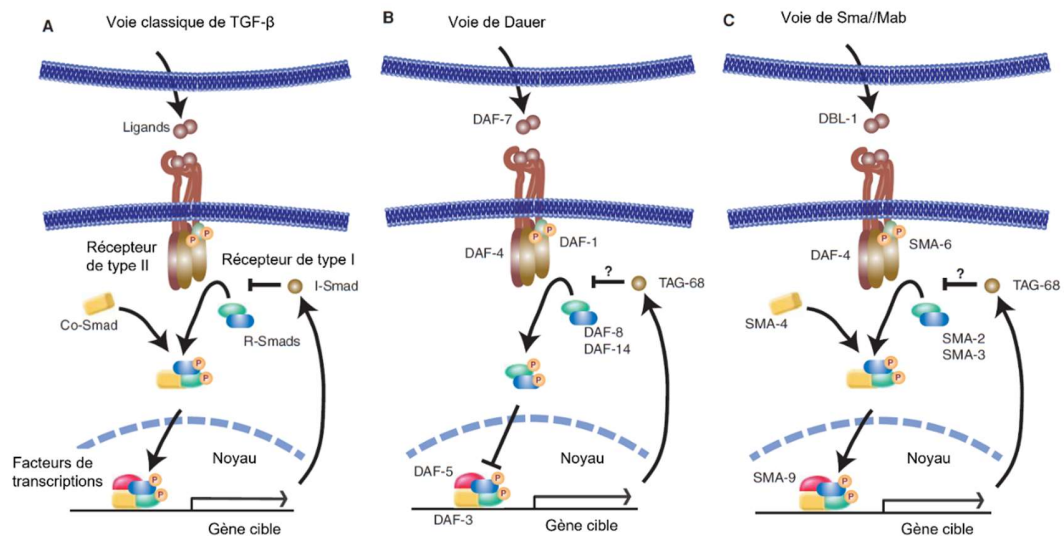


Figure 1.15 Signalisation de TGF- β : la voie de dauer et de voie Sma/Mab de *C. elegans*. (A) La voie classique de signalisation du TGF- β illustrant le ligand TGF- β ; les récepteurs cellulaires, les effecteurs intracellulaires (SMAD) et les effets de la signalisation de cette voie qui est de moduler la transcription de gènes cibles. (B) Chez *C. elegans*, la voie de TGF- β est impliquée dans la régulation de la formation du stade développementale *dauer*. DAF-3, le co-Smad, régule négativement la voie et peut résider dans le noyau plutôt que d'être transporté avec les R-Smads. DAF-5 est l'orthologue de SnoN/c-Ski et ne fonctionne que dans la voie de la dauer et pas dans la voie Sma/Mab. (C) La voie de TGF- β appelé « Sma/Mab » qui régule le développement (taille du corps) et la morphologie de la queue (Sma/Small, Mab/Morphology abnormal). Les deux R-Smads, SMA-2 et SMA-3, s'associent avec SMA-4, le co-Smad, et se transloquent dans le noyau. Le Smad inhibiteur TAG-68 est indiqué par un point d'interrogation car son rôle dans ces voies n'est pas clairement établi. Images adaptées de Savage-Dunn et Padgett, 2017.

Il a depuis longtemps été établi que la voie de TGF- β régule la fibrose dans de nombreux contextes cellulaires. Chez les mammifères, il a été répertorié que le ligand TGF- β 1 aurait une forte affinité avec le collagène IV (Paralkar *et al.*, 1991) et qu'une suractivation de cette signalisation entraînerait une augmentation de la transcription de

sous-unité de laminines et du collagène IV (Chai *et al.*, 2003; Grande *et al.*, 1997). De récents travaux chez *C. elegans* font état de l'implication de la voie de TGF- β dans la régulation de nombreux collagènes cuticulaires (Goodman et Savage-Dunn, 2022; Madaan *et al.*, 2020). Cependant, dans notre modèle d'étude de la maintenance neuronale, rien n'est encore connu de l'implication de la voie de TGF- β dans la régulation du collagène IV et des laminines.

1.10 Interaction de TGF- β avec la MEC et la maintenance neuronale

Les cellules sont très réceptives à leur environnement et ont la capacité d'y répondre et de l'influencer. Par exemple, elles contribuent à créer, maintenir et réguler la MEC et les enzymes la modifiant afin de maintenir une certaine homéostasie. Une perte de cette régulation peut entraîner des conséquences négatives telles que la mort cellulaire ou la fibrose. Les membres de la famille de TGF- β font partie d'un groupe de régulateurs de la MEC. Dans cette étude, nous évaluerons l'implication de l'activité de TGF- β dans la capacité de la papiline à modifier son environnement matriciel et à maintenir l'architecture neuronale à long terme.

1.11 Axes d'étude de ce mémoire

Afin de poursuivre la recherche sur la maintenance de l'architecture du système nerveux, notre laboratoire a effectué un crible génétique visant à identifier des supprimeurs de défauts de maintenance des ganglions neuronaux chez le mutant *sax-7/L1CAM*. En effet, chez le mutant du gène *sax-7*, les somas des neurones ASH et ASI se développent normalement, mais ultérieurement tendent à se déplacer antérieurement vers l'anneau nerveux (tel que décrit en Figure 1.7), à cause de stress mécaniques liés à la locomotion. En comparaison, chez le type sauvage ces neurones demeurent postérieurs à l'anneau nerveux tout au long de la vie du vers. Basé sur ce phénotype, notre laboratoire a effectué un crible pour des mutations modulatrices de ce phénotype de désorganisation neuronale des mutants *sax-7* suite à une mutagenèse (avec l'agent

mutagénique méthane sulfonate d'éthyle ou EMS) (Figure 1.16). Notre laboratoire a découvert un mutant du gène codant pour la MIG-6/papiline (Nadour *et al.*, en préparation) comme supprimeurs des défauts neuronaux des mutants *sax-7*. Par la suite, grâce à une étude quantitative, nous avons découvert que le mutant de la MIG-6/papiline accumule plus d'EMB-9/collagène IV que le type sauvage.

Cette identification du mutant *mig-6* comme modulateur de la MEC et de l'état d'organisation des structures neuronales suggère un lien entre l'organisation neuronale et la composition de la MEC. Nous supposons qu'une densification suffisante de la matrice permet de limiter les mouvements des neurones (dus aux stress mécaniques) et par conséquent promouvoir le maintien de l'organisation neuronale.

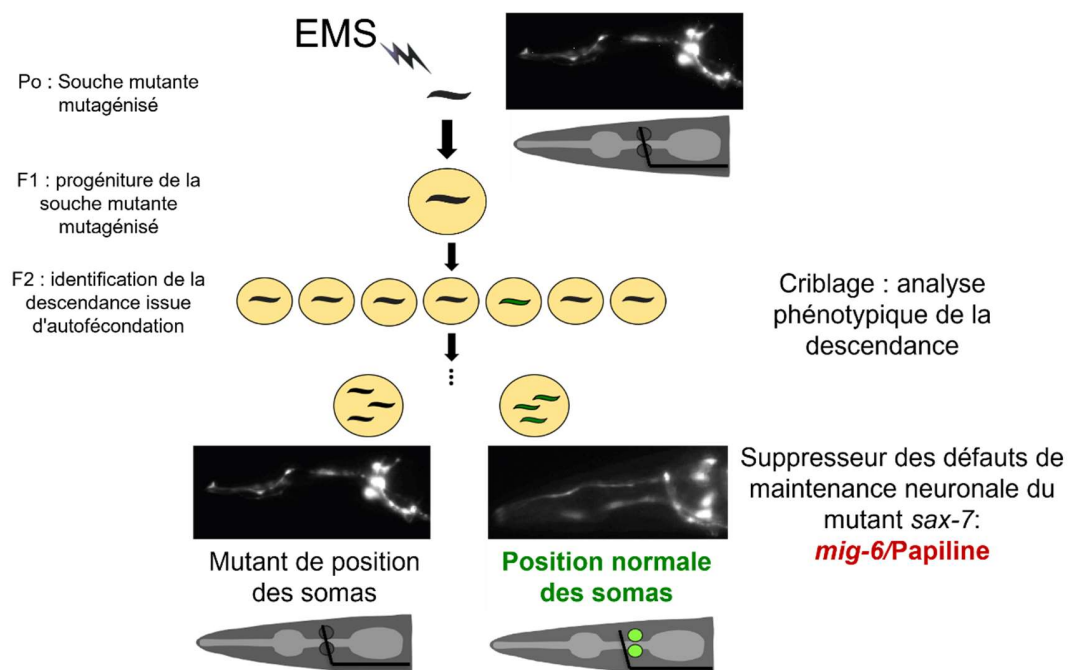


Figure 1.16 Schéma du criblage génétique par mutagenèse. Identification du mutant *mig-6/Papiline* comme suppresseur des défauts d'organisation neuronale du mutant *sax-7*. EMS pour méthane sulfonate d'éthyle est un composé organique mutagène qui engendre diverses mutations dans le génome du sujet exposé. À la suite de l'EMS, de rare mutant ont été identifié

comme suppresseur de l'organisation anormale des somas. Image adaptée d'une illustration générée par Claire Bénard.

Chez les vertébrés, des structures de la MEC appelé « *Perineuronal Net* » ou filet périneuronaux permettent de maintenir l'architecture neuronale en place en coordination avec la MEC environnante. Les filets périneuronaux, qui ont été décrits pour la première fois par Camillo Golgi il y a plus d'un siècle, sont considérés comme une structure de la MEC densément organisée autour des corps cellulaires et des dendrites proximales de nombreux neurones du cerveau et de la moelle épinière (Golgi, 1893). L'importance biologique des filets périneuronaux n'est pas entièrement claire et plusieurs fonctions ont été proposées (basé sur des données obtenues chez la souris), notamment la neuroprotection, la stabilisation synaptique, le développement neuronal et la plasticité (Karetko et Skangiel-Kramska, 2009). Aujourd'hui, plusieurs études montrent qu'il joue un rôle central dans le contrôle de la plasticité du système nerveux central. En effet, au cours du développement on observe une augmentation de l'expression des composants qui constituent les filets périneuronaux, ce qui est coïncide avec la fin de la « période critique » (période de remodelage intense des connexions neuronales) et se manifeste par une diminution de la plasticité neuronale (Kwok *et al.*, 2010; Kwok *et al.*, 2011). Cette observation a conduit à l'hypothèse selon laquelle les filets périneuronaux fonctionnent pour maintenir l'architecture neuronale et stabiliser les contacts synaptiques, réduisant ainsi leur potentiel de neuroplasticité (Rhodes et Fawcett, 2004; Wang et Fawcett, 2012). Dans notre contexte, un épaissement de la MEC via une augmentation de composants structuraux permet-il de compenser l'absence du facteur de maintenance neuronal SAX-7 ?

Par ailleurs, bien que l'étude des rôles de la MEC dans différents modèles de maladie soit en pleine effervescence, peu de choses sont connues des mécanismes de synthèses et des interactions entre la MEC et la voie de TGF- β pour promouvoir la maintenance

neuronale à long terme. Nos résultats préliminaires suggèrent que MIG-6/Papiline modifierait la composition de la MEC, mais de nombreuses questions sont à répondre.

Ces travaux de maîtrise ont visé à caractériser l'importance de facteurs extrinsèques dans la maintenance à long terme du système nerveux. Ils ont été menés selon deux axes, chacun d'entre eux traité séparément dans les prochains chapitres (Figure 1.17):

- 1) Déterminer le rôle de certains composants de la MEC dans la maintenance neuronale (en interaction ou non avec MIG-6/Papiline)
- 2) Déterminer le rôle de TGF- β dans la capacité de MIG-6/Papiline à modifier son environnement matriciel et à maintenir l'architecture neuronale à long terme

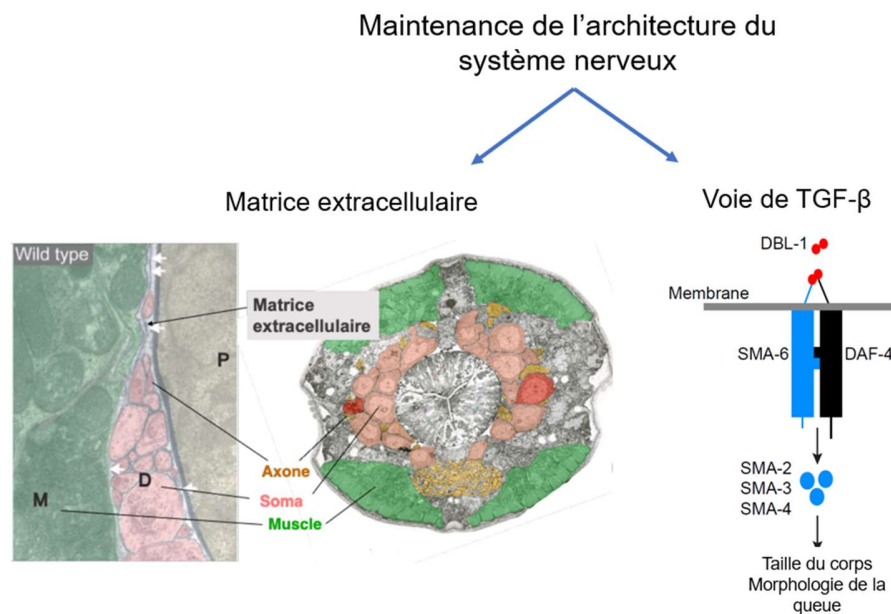


Figure 1.17 Présentation sommaire des axes de cette étude. Deux facteurs extrinsèques seront étudiés en contexte de maintenance neuronale : la MEC et la voie de TGF- β . (Gauche) Des coupes de microscopie électronique au niveau de la tête d'un nématode adulte montrent que la MEC forme des couches denses qui entourent les structures neuronales, les séparant ainsi des

muscles de la paroi corporelle et du pharynx. (Droite) Le rôle de voie de Sma/Mab de TGF- β qui sera testé dans les effets médié par le mutant MIG-6/Papiline. Images adaptées de Bénard *et al.*, 2006 et Baltaci *et al.*, 2022.

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

2.1 Construction et maintenance des souches

Conformément à la procédure standard d'entretien de souches *C. elegans*, les vers ont été conservés dans un incubateur à 20°C sur des boîtes de Pétri préremplies avec du *Nematode Growth Medium* (NGM) et ensemencées (sauf indication contraire) avec *Escherichia coli* OP50 (Brenner, 1974). La souche de *C. elegans* N2 Bristol est utilisée comme type sauvage (Brenner, 1974). Afin de générer les souches nécessaires à la réalisation de cette étude, des croisements par génétique classique (voir exemple en Figure 2.1) à l'aide de mâles de type sauvage ont été réalisés. Les allèles utilisés sont listés dans le Tableau 2.1 et les souches utilisées et construites sont présentées dans le Tableau 2.2.

Tableau 2.1 Liste des allèles utilisés

Gène	Allèle	Nature	Référence
<i>dbl-1</i>	<i>nk3</i>	Délétion de 5 595 paires de bases	(Morita <i>et al.</i> , 1999)
<i>fbl-1</i>	<i>k201</i>	G249E	(Kubota <i>et al.</i> , 2012)
<i>nid-1</i>	<i>cg119</i>	Délétion de 3 129 paires de bases	(Kang et Kramer, 2000)
<i>mig-6</i>	<i>qv33</i>	G664E	(Nadour <i>et al.</i> , en préparation)
<i>sax-7</i>	<i>qv30</i>	Délétion de 19 973 paires de bases	(Desse <i>et al.</i> , 2021)
<i>sma-6</i>	<i>wk7</i>	Y72*	(Krishna <i>et al.</i> , 1999)

Tableau 2.2 Liste des souches utilisées et construites.

Souche	Génotype	Transgène	Référence
Souche de type sauvage servant de référence			
N2			(Brenner, 1974)
NK245	<i>qyIs7</i>	<i>lam-1::gfp</i>	(Ziel <i>et al.</i> , 2009)
NK364	<i>qyIs46</i>	<i>emb-9::mCherry</i>	(Ihara <i>et al.</i> , 2011)
NK2579	<i>qy62</i>	<i>mNG+loxP::fbl-1 Crispr/Cas9</i>	(Keeley <i>et al.</i> , 2020)
VH648	<i>hdlIs26</i>	<i>Podr-2::CFP; Psra-6::DsRed2</i>	(Hutter, 2003)
VQ1742	<i>qyIs9</i>	<i>Pmig-6::mNeonGreen::mig-6s</i>	(Nadour <i>et al.</i> , en préparation)
Observation du collagène IV			
VQ1176	<i>mig-6(qv33) V; qyIs46 X</i>		
VQ1795	<i>sma-6(wk7) II; qyIs46 X</i>		
VQ1839	<i>sma-6(wk7) II; mig-6(qv33) V; qyIs46 X</i>		
Observation de la laminine			
VQ1175	<i>mig-6(qv33) V; qyIs7 X</i>		
Observation de la fibuline			
VQ1837	<i>mig-6(qv33) V; qy62 IV</i>		
Observation de la papiline			
VQ1998	<i>dbl-1(nk3) V; qyIs9</i>		
VQ2013	<i>qyIs9; yxEx615</i>	<i>Psma-6::sma-6; Punc-122::gfp</i>	
Observation des neurones ASH/ASI			
VQ393	<i>nid-1(cg119) V; hdlIs26 III</i>		
VQ1061	<i>sax-7(qv30) IV; hdlIs26 III</i>		
VQ1076	<i>mig-6(qv33) V; hdlIs26 III</i>		
VQ1077	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdlIs26 III</i>		
VQ1295	<i>sax-7(qv30) IV; nid-1(cg119) V; hdlIs26 III</i>		
VQ1828	<i>sma-6(wk7) II; hdlIs26 III</i>		
VQ1852	<i>sma-6(wk7) II; mig-6(qv33) V; hdlIs26 III</i>		
VQ1866	<i>sma-6(wk7) II; sax-7(qv30) IV; hdlIs26 III</i>		
VQ1905	<i>sma-6(wk7) II; sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdlIs26 III</i>		

Références : (Brenner, 1974; Hutter, 2003; Ihara *et al.*, 2011; Keeley *et al.*, 2020; Nadour *et al.*, en préparation; Ziel *et al.*, 2009)

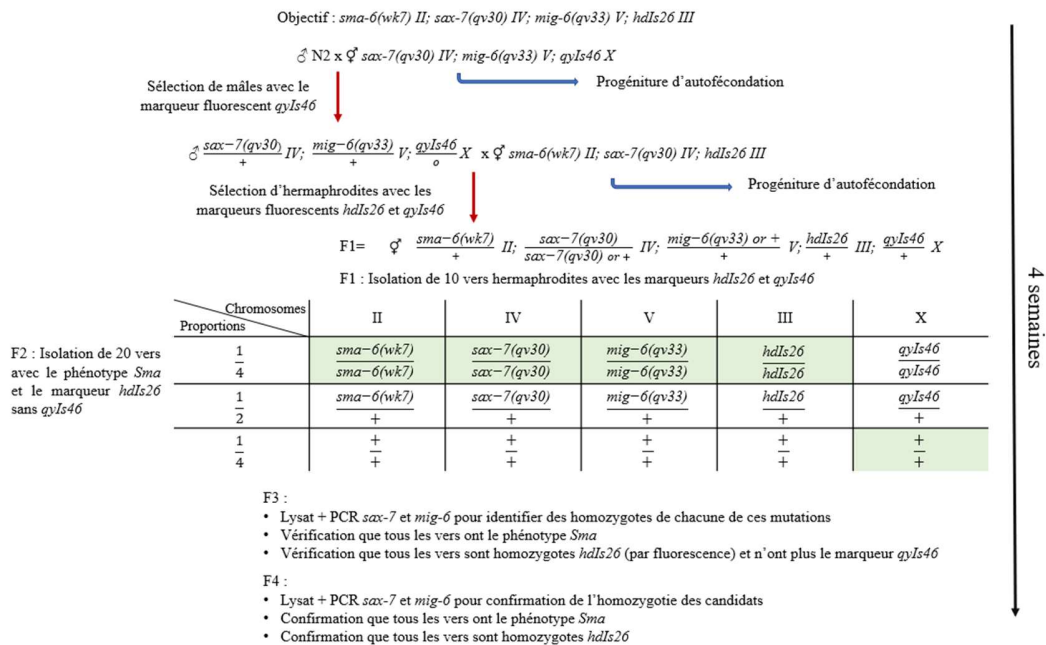


Figure 2.1 Exemple des étapes de construction d'une souche par génétique classique chez *C. elegans*. Le génotype souhaité est indiqué en vert, les flèches rouges indiquent la progression aux phases de croisement et les flèches bleues indiquent la progéniture issue de l'autofécondation qui sera également retrouvée sur la plaque.

2.2 Techniques de génotypage utilisées lors de la génération de nouvelles souches

Afin de détecter la présence et confirmer l'homozygotie de mutations utilisées dans cette étude, deux méthodes de confirmation ont été employées : la sélection sur la base du phénotype et/ou la PCR. Les amorces de génotypage ainsi que la taille des bandes attendues sont détaillées dans le Tableau 2.3.

Les mutations non présentes dans le Tableau 2.3 ont été génotypées sur la base du phénotype visible entraîné par la mutation. Dans cette étude, ce fut le phénotype *Sma* pour « Small » des mutants *sma-6(wk7)* et *dbl-1(nk3)* qui a pour conséquence une limitation de la croissance (en longueur), entraînant donc des vers plus petits que le type sauvage (Figure 2.2). Ces mutations étant récessives, l'identification et la

confirmation du phénotype sur deux générations ont été effectuées pour valider l'homozygotie des mutations.

Tableau 2.3 Liste des amorces utilisées

Allèle	Amorce sens	Amorce antisens	Produit
<i>fbl-1(k201)</i>	CTGCATTGATAGAGTGGTCCTGTCAGT TGAGATC	TAATCGTGGCGATGGTTCC	498 pb
	CTGCATTGATAGAGTGGTCCTGTCAGT TGAGACTC		
<i>nid-1(cg119)</i>	CATGGGATGGCTTTTGC	TGTCACCTATTCCTTCAACG	336 pb
	TTCCTGTCTCACAGATGTGC		522 pb
<i>mig-6(qv33)</i>	CTCCAAGGAAGAGCCTATCC	CGAGCAGTTAGAGCATCCG	Digestion par BamHI 546 pb 362+184 pb
<i>sax-7(qv30)</i>	TCTCTAAAATTCTTCGCAAGC	CGGGAAGAAATGAAACAGGA	592 pb
	TAGTTGATTAATAATGTTTCAAGATTG	GAAATACACACAAAATACGAGTGC	326 pb

En vert, les amorces et produits PCR pour le type sauvage et en rouge, celles correspondant au mutant.

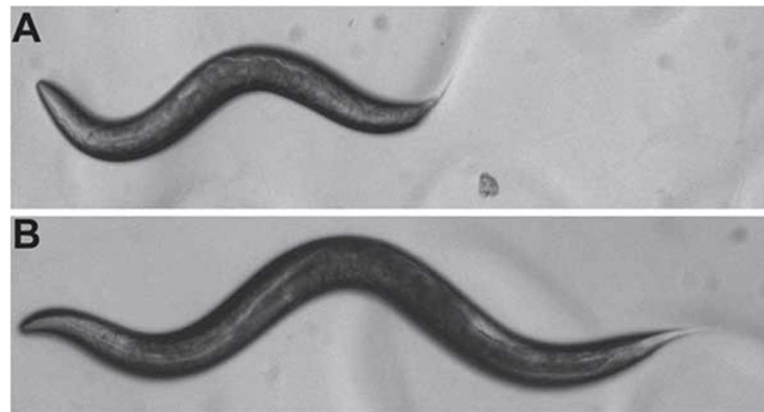


Figure 2.2 Illustration du phénotype *Sma*. Les vers *Sma* sont reconnaissables par leur petite taille (A). En plein mouvement, ils peuvent être différenciés car leur petit corps n'arrive qu'à

former que 2 vagues ou arches du corps, là où des vers de taille normale en forment 3 (B). Images adapté de Gumienny et Savage-Dunn, 2013.

2.3 Microscopie

Avant examen anatomique et cellulaire, chaque souche a été maintenue « nourrie » (transférée régulièrement sur des plaques avec de la bactérie fraîche) à 20 °C, pendant au moins 3 générations après la confirmation de leur génotype, soit une période d'environ 2 semaines. Sauf indication contraire, les souches ont été analysées au stade adulte « jour 2 », soit 48 h après le stade L4. Sur un coussin d'agarose 5%, les vers ont été plongés dans de l'azide de sodium (75 mM) pour induire la paralysie, puis recouverts d'une lamelle. L'observation des vers s'est faite au microscope à fluorescence *Zeiss AxioScope A1* pour l'analyse du phénotype neuronale, et au *Imager M2* muni d'une camera *AxioCam* pour l'observation des protéines de la MEC avec le logiciel *AxioVision*. Le traitement post-expérimental des images a été effectué à l'aide du logiciel *ImageJ*, et la déconvolution d'images avec le logiciel *AutoQuant X3*.

2.4 L'ARN interférence

L'ARN interférence (ARNi) est un mécanisme biologique présent chez la grande majorité des eucaryotes à l'exception de certaines espèces (Shabalina et Koonin, 2008). Cette technique permet, via la liaison d'un brin d'ARN exogène complémentaire à celui synthétisé par l'organisme, la dégradation de l'ARNm endogène d'un gène précis. Cela a pour conséquence l'inhibition contrôlée (dans le temps) de sa traduction d'un gène sans affecter le génome.

2.4.1 L'ARNi chez *C. elegans*

C. elegans a été le premier animal dans lequel l'activation des voies d'ARNi en réponse à des amorces exogènes a été observée, et où ces voies d'ARNi activées ont été caractérisées (Fire *et al.*, 1998; Sarkies et Miska, 2013). Depuis, deux sources d'ARN double brin (ARNdb) exogènes ont été mises en évidence chez plusieurs organismes :

les virus à ARN d'une part et les ARNdb présents dans l'environnement (notamment produits par les bactéries) d'autre part.

L'étude originale de Mello et Fire a démontré que l'injection d'ARNdb dans la gonade du ver entraîne le silençage du gène ciblé chez la génération suivante (Fire *et al.*, 1998). Ces résultats montrent que l'ARNi exogène (exo-ARNi) chez *C. elegans* est systémique, ce qui signifie que le signal de silence peut se propager dans tout le corps de l'animal, y compris la lignée germinale, et peut donc être transmis des parents à la progéniture. D'autres études ont révélé l'existence de plusieurs méthodes pour déclencher l'exo-ARNi chez le ver, notamment en nourrissant les animaux avec des bactéries exprimant de l'ARNdb (Timmons *et al.*, 2001) ou en les trempant (croissance en milieu liquide) dans des solutions contenant de l'ARNdb (Tabara *et al.*, 1998).

2.4.2 Propagation de l'ARNdb de l'intestin au reste du corps

Dans cette étude, nous avons choisi d'induire l'ARNi via l'ingestion de bactéries exprimant de l'ARNdb. La protéine transmembranaire SID-1 (système d'interférence d'ARN systémique déficient-1) joue un rôle essentiel dans l'ARNi systémique en permettant l'importation cellulaire du signal de silençage, mais elle n'est pas nécessaire pour l'ARNi par injection (Winston *et al.*, 2002). SID-1 est exprimée dans presque tous les types de cellules, à l'exception des neurones, ce qui explique la résistance de la plupart de ces derniers à l'exo-ARNi (Timmons *et al.*, 2001; Winston *et al.*, 2002). En revanche, la surexpression de SID-1 dans les neurones les rend sensibles à l'ARNi (Calixto *et al.*, 2010). Une autre protéine transmembranaire et récepteur endocytaire, SID-2, est exprimée dans les cellules intestinales et joue un rôle essentiel dans l'absorption de l'ARNdb provenant de l'environnement (par alimentation ou trempage), mais elle n'est pas indispensable pour l'ARNi déclenché par l'injection (McEwan *et al.*, 2012; Winston *et al.*, 2007).

2.5 Principes de base de l'ARNi chez *C. elegans*

Pour nos expériences d'ARNi, nous utilisons la souche bactérienne *E. coli* HT115(DE3) transformée. Cette souche est un lysogène, c'est-à-dire qu'elle contient un bactériophage (dans notre contexte non virulent) qui se transmet de façon héréditaire ou non (Timmons et Fire, 1998). De plus, elle renferme en elle-même un opéron intégré au chromosome bactérien. Cet opéron abrite le gène codant pour l'ARN polymérase T7 ainsi que le gène de résistance à la tétracycline, les deux sous le contrôle d'un promoteur "Lac" inductible par isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Ainsi, la sélection adéquate de la souche bactérienne se fait grâce à la tétracycline. Un aspect important est que cette souche bactérienne est mutante pour l'enzyme ARNase III, qui aurait normalement pour fonction de dégrader les ARN double brin. Cette caractéristique permet alors l'accumulation d'importantes quantités d'ARNdb au sein des bactéries.

Le contexte génétique de cette bactérie [souche HT115(DE3)] est ensuite modifié en y introduisant le plasmide souhaité, visant à exprimer l'ARNdb ayant pour cible les transcrits d'un gène spécifique. Tous les plasmides conçus pour l'ARNi de *C. elegans* partagent la même structure de base, abritant une séquence spécifique d'un gène de *C. elegans*. Cette séquence est insérée entre deux promoteurs de l'ARN polymérase T7, disposés de part et d'autre du gène ciblé (Ausubel *et al.*, 1990). Ce schéma favorise une transcription bidirectionnelle du gène et génère ainsi l'ARNdb correspondant (Kamath *et al.*, 2001; Timmons *et al.*, 2001). De plus, ce plasmide possède une séquence de résistance à l'ampicilline pour maintenir et favoriser la prolifération des bactéries qui transmettent le plasmide d'intérêt. À titre de contrôle systématique pour les expériences d'ARNi, nous avons employé le plasmide d'ARNi "vide" L4440 (il ne contient pas d'insert de gène spécifique de *C. elegans*) comme contrôle dans cette étude (Andersen *et al.*, 2008; Timmons et Fire, 1998).

2.6 Protocole de préparation de l'ARNi

Les cultures bactériennes d'ARNi sont préparées en parallèle de la synchronisation des vers selon un protocole bien défini (ci-dessous) afin de maximiser l'efficacité de l'expérience.

2.6.1 Synchronisation des vers

Les animaux à traiter par ARNi sont préalablement synchronisés afin d'obtenir une population finale du même stade au début de l'expérience. Pour synchroniser les vers, un minimum de huit plaques de Pétri fortement peuplées d'embryons et d'hermaphrodites gravides ont été lavées deux fois avec 1 mL d'eau milliQ tout en décollant les embryons du NGM à l'aide d'une pipette Pasteur repliée. La suspension recueillie dans un tube *Falcon* de 15 mL sur glace a ensuite été centrifugée à la vitesse 4 (~1300 rpm) d'une centrifugeuse clinique *International Equipment Company*, puis le surnageant a été retiré et le culot (1 mL) a été transféré dans un tube *Eppendorf* de 1,5 mL. Il a ensuite été centrifugé deux minutes à 1500 rpm, puis le surnageant a été retiré. Au culot restant (de 250 µL), ont été ajoutés 200 µL d'hypochlorite de sodium (6 % p/v) et 500 µL d'hydroxyde de sodium (1 M). La suspension a été délicatement mélangée par inversion du tube chaque seconde pendant quatre minutes. Les larves et adultes sont graduellement dégradés, mais les embryons sont protégés par une coquille matricielle (donc résistants au traitement), puis récupérés pour établir une population synchronisée.

Afin de terminer le traitement et retirer les cuticules restantes d'adultes dégradés, trois lavages avec 1 mL d'eau milliQ suivi de deux lavages avec du M9 (Medium 9) (Stiernagle, 2006) sont nécessaires. Chaque lavage étant entrecoupé d'un cycle de centrifugation afin de culotter les embryons au fond du tube. À la fin, le culot d'embryons est transféré dans un tube *Falcon* de 15 mL et suspendu dans 2 mL de M9. Ce dernier est incubé à 20°C sur un *Nutator* (agitateur) durant 15-18 h afin que

l'ensemble des embryons atteignent approximativement le milieu du premier stade larvaire (le stade mi-L1), qu'ils maintiendront jusqu'à leur retrait du M9, car le développement (dans ce milieu) s'arrête en l'absence de nourriture.

2.6.2 Préparation des bactéries

La préparation d'expériences d'ARNi nécessite une grande organisation en amont afin de limiter les facteurs de variations et d'augmenter la reproductibilité des résultats.

À J-3 : Préparation des plaques

Des bactéries *E. coli* HT115(DE3) transformées avec le vecteur L4440 "vide" (contrôle, sans insert) ou avec les plasmides contenant des inserts pour cibler un gène donné sont listées dans le Tableau 2.4. Ces bactéries, entreposées à -80°C , ont été étalées sur une plaque d'agar contenant de l'ampicilline ($75\ \mu\text{g}/\text{mL}$) et de la tétracycline ($12,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$). Les plaques ont été incubées à $37\ ^{\circ}\text{C}$ durant 18 h.

À J-2 : Précultures

Une colonie isolée par clone a été cultivée dans 1 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline ($75\ \mu\text{g}/\text{mL}$) et de la tétracycline ($12,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$) à $37\ ^{\circ}\text{C}$ sous agitation durant 15 h.

À J-1 : Cultures et synchronisation des vers

Lancement du protocole de synchronisation des vers à analyser afin qu'ils soient prêts à la fin de la préparation de la bactérie. Six tubes de cultures contenant 15 mL de milieu LB + ampicilline ($75\ \mu\text{g}/\text{mL}$) ont été inoculés avec 100 μL de préculture puis laissés sous agitation à $37\ ^{\circ}\text{C}$ durant 15 h. Par la suite, 30 μL d'IPTG (à 1 mM) ont été rajoutés aux cultures puis ces cultures sont remises sous agitation à $37\ ^{\circ}\text{C}$ durant 3 h.

Les cultures bactériennes ont ensuite été centrifugées à 3000 rpm pendant dix minutes à 4 °C, puis la majorité du surnageant a été éliminée pour ne garder que, dans l'une d'elles, 2,5 mL de bactéries concentrées. Le surnageant des cinq autres cultures a été complètement retiré, puis par homogénéisation et transfert, l'ensemble des bactéries des six cultures a été regroupé dans un tube puis étalé sur des plaques de NGM supplémenté d'ampicilline et d'IPTG. Les plaques ainsi nourries ont été placées dans un incubateur à 20°C pendant la nuit (à l'abri de la lumière jusqu'à l'analyse des vers). Chaque génotype étudié comportait un groupe témoin (c'est-à-dire nourri avec de la bactérie transformée avec le vecteur vide) et un groupe subissant l'ARNi contre un gène du Tableau 2.4.

À J-0 : Dépôt des vers synchronisés sur plaques

Les vers synchronisés tels que décrits précédemment sont centrifugés 4 min à 1300 rpm, puis après retrait de la majorité du surnageant, déposés sur les plaquesensemencées. L'analyse par microscopie s'effectue 96 h après le dépôt des vers sur les plaques, soit au stade *Jour 2* après le stade mi-L1 de synchronisation.

Tableau 2.4 Liste des clones utilisés pour les expériences d'ARNi

Gène (nom de cosmide)	Gène	Référence
	aucun (L4440)	(Timmons <i>et al.</i> , 2001; Timmons et Fire, 1998)
F56H11.1	<i>fbl-1</i>	(Kamath et Ahringer, 2003)
T25F10.2	<i>dbl-1</i>	
ZK370.2	<i>sma-2</i>	
R13F6.9	<i>sma-3</i>	

2.7 Méthodes d'analyse

2.7.1 Critères de quantification du phénotype neuronal

Les observations ont été effectuées sur des vers en position latérale. Les quatre neurones sensoriels ASH (droit et gauche) et ASI (droit et gauche) ont été visualisés à 400X avec le rapporteur *hdIs26* (*Psra-6::DsRed2*). Les vers ont été observés au stade *Jour 2*. Pour la quantification des défauts de maintenance d'organisation neuronale du

mutant *sax-7*, tout animal comportant au moins un neurone qui touche, chevauche ou dépasse antérieurement l'anneau nerveux est considéré comme ayant une organisation neuronale défectueuse (Figure 2.3). Ainsi, seuls les vers ayant tous leurs neurones (ASH et ASI) postérieurs à l'anneau nerveux sont considérés comme ayant une organisation neuronale semblable au type sauvage (Figure 2.3).

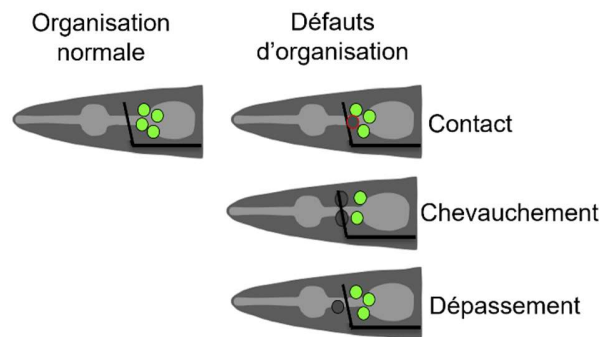


Figure 2.3 Illustration des critères de discrimination pour l'analyse du phénotype de maintenance de l'organisation neuronale. Selon la gravité du déplacement antérieur des somas causé par le mutant *sax-7*, les neurones ASH et ASI (gauche et droite) peuvent (selon un point de vue latéral du vers) être en contact, chevaucher ou être antérieurs à l'anneau nerveux. Adapté d'un schéma généré par C. Bénard.

2.7.2 Analyse des composants de la MEC

Les vers ont été observés en vue latérale. L'âge auquel les vers ont été analysés est indiqué dans les légendes des figures. Afin de limiter les variations de fluorescence liée à l'exposition des vers à la lumière fluorescente, un maximum de 1 à 3 vers par lame (selon la stabilité du rapporteur fluorescent) a été examiné. Aussi, les vers du bon âge sont sélectionnés à l'aveugle, sans biais d'apparence, jusqu'à l'obtention du nombre d'individus désiré. Les images ainsi obtenues ont été analysées sur *ImageJ*.

2.7.3 Quantification des structures fibrotiques

Le nombre de structures fibrotiques de chaque animal a été déterminé sur des *Z-stack* entiers d'images déconvolués en *Max projection* du logiciel *ImageJ*. Une moyenne de

40 tranches a été définie avec une marge de variation de 1 à 5 tranches en plus selon l'épaisseur du vers pour garantir un balayage complet de chaque vers. Afin de différencier une « structure fibrotique » (Figure 2.4B) d'une « ligne » de collagène IV visible dans les parois musculaires (Figure 2.4A) sur des Z-stack entiers (Figure 2.4C), des mesures de sélection ont été définies.

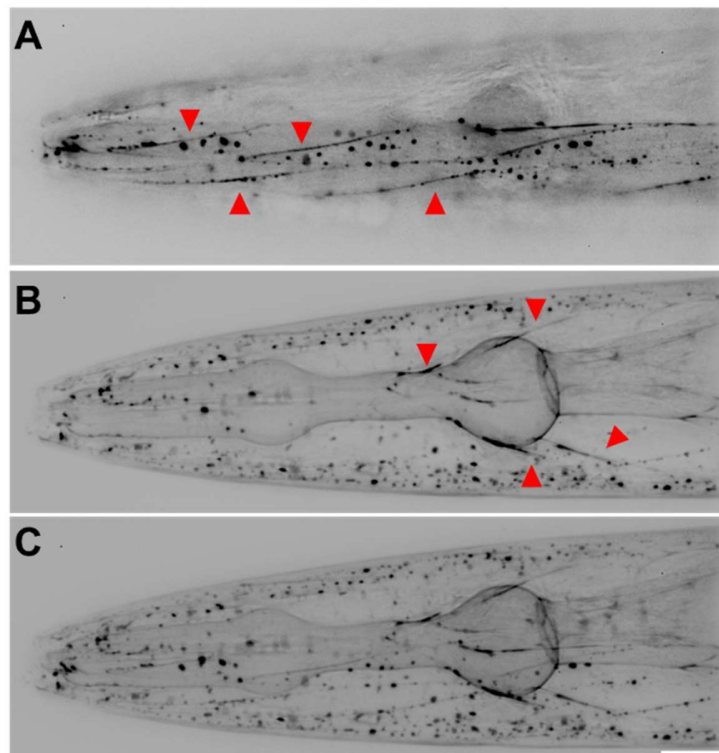


Figure 2.4 Critères de dénombrement des structures fibrotiques. (A) Projection des 10 premières slides d'un Z-stack où seules les « lignes » de collagène IV des muscles sont bien définies. (B) Projection des 20 slides entourant le pharynx, on y voit clairement et de façon définie les structures fibrotique avec un minimum d'interférence du signal provenant des muscles. (C) Projection de l'ensemble des 40 slides d'un vers, le patron d'expression des « lignes » musculaires peut perturber le dénombrement des structures fibrotiques. A, B et C sont différentes projections d'un même vers *mig-6(qv33); qvIs46* à Jour 2 adulte. Echelle 10 µm.

Nous avons suivi systématiquement l'origine, le parcours et l'orientation de chaque « structure » afin de nous assurer de ne compter que les « structures fibrotiques », qui ont généralement pour origine le pharynx et se dirige vers l'extérieur avec de surcroît

une intensité accrue. De plus, on retrouve les structures fibrotiques uniquement dans les tranches entourant du pharynx. En comparaison, les « lignes » des cellules musculaires de la paroi du corps sont parallèles les unes aux autres et suivent un schéma répétitif spiralé. Enfin, on retrouve ces « lignes » des parois musculaires aux extrémités du *Z-stack* lorsque l'on parcourt le vers en largeur.

Quantification de l'intensité de fluorescence

Une région d'intérêt a été tracée autour de la tête des vers à partir de la pointe antérieure du *procorpus* jusqu'à l'extrémité du bulbe terminal (Figure 2.5).

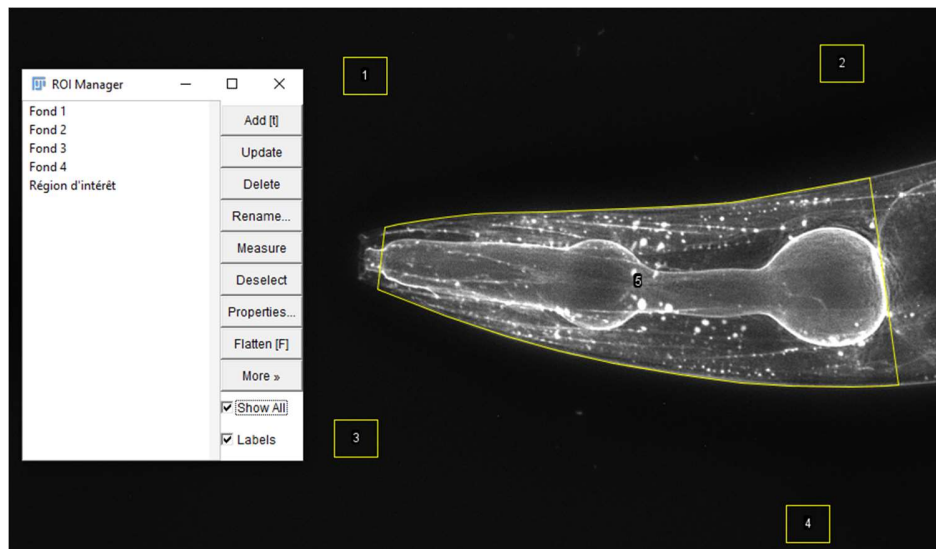


Figure 2.5 Exemple de délimitation de la région de la tête sur ImageJ. Les quatre carrés autour du vers (Fond 1 à 4) servent à définir la fluorescence totale du bruit de fond qui se superpose à la fluorescence réelle de la tête. La région d'intérêt de la tête débute du *procorpus* jusqu'à l'extrémité du bulbe terminal en suivant les bords de la cuticule du vers. Image déconvolué en projections par somme d'un vers de type sauvage avec le rapporteur fluorescent *qyIs46* à Jour 2 adulte.

La densité intégrée a été sélectionnée comme paramètre représentatif de la fluorescence de cette région sur *ImageJ*. L'intensité du bruit de fond a été soustraite de cette mesure à partir du produit de la moyenne de fluorescence de quatre régions carrées identiques

autour de la tête avec l'aire de la région d'intérêt de la tête, donnant ainsi la fluorescence totale corrigée. Soit la formule suivante :

$$\text{Fluorescence totale corrigée} = \frac{\text{densité intégrée de la tête}}{\text{moyenne de fluorescence des bruits de fond} \times \text{aire de la tête}}$$

2.8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R. Les données des figures sont exprimées en proportion \pm erreur standard ou en moyenne \pm erreur standard. Afin d'analyser les proportions, des tests de Fisher ont été effectués et les valeurs-p ont été ajustées pour comparaisons multiples (correction Bonferroni). Les comparaisons entre deux moyennes ont été faites avec des tests de Student, et des analyses par ANOVA à un facteur pour plus de deux moyennes si les conditions (normalité des résidus, l'homogénéité des variances) étaient respectées. Pour les cas où les conditions d'application étaient non remplies, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi de tests post-hoc avec ajustement pour comparaisons multiples ont été effectués (correction Bonferroni). Les valeurs-p ont été considérées significatives lorsque $< 0,05$ (*), 0,01 (**) ou 0,001 (***)

CHAPITRE 3

Résultats

Partie 1

Comme décrit dans l'introduction, les animaux mutants du gène *sax-7* possèdent des défauts d'organisation de l'architecture neuronale. La mutation *sax-7(qv30)* est une délétion entière du locus du gène *sax-7* (Desse *et al.*, 2021), avec laquelle ~90% des animaux ont des défauts d'organisation des ganglions neuronaux ASH et ASI (Figure 3.1B).

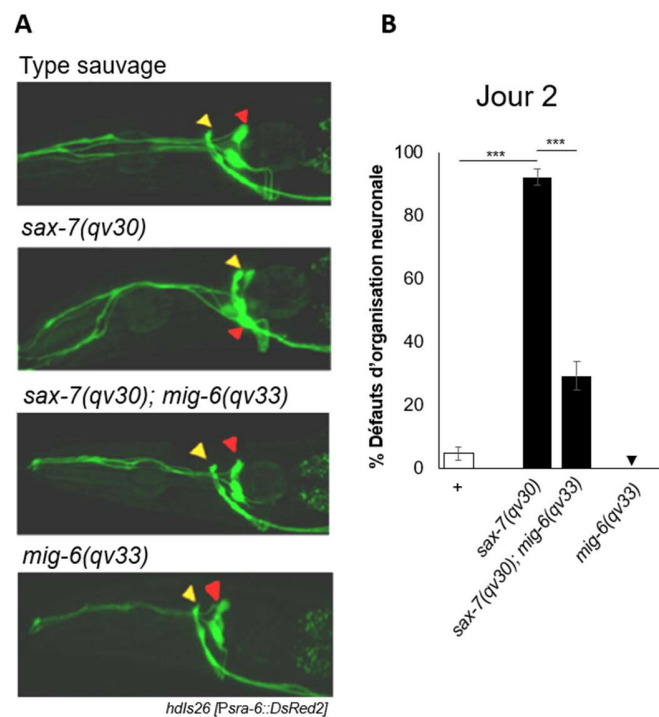


Figure 3.1 Le laboratoire a précédemment découvert *mig-6(qv33)* comme suppresseur des défauts d'organisation neuronale du mutant *sax-7*. (A) Observation du phénotype d'organisation neuronale à l'aide du rapporteur *hdl526 [Psra-6::DsRed2]*. (B) Quantification des défauts d'organisation neuronale à *Jour 2* adulte Nadour et al., en préparation. (Proportion \pm erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour

comparaisons multiples). Pour chacun des génotypes, le n est compris entre 100 et 150 animaux. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$.

La mutation *mig-6(qv33)* dans le gène *mig-6* a été isolée lors d'un crible génétique (mené auparavant par le laboratoire à la recherche de modulateurs de la désorganisation neuronale des animaux mutants *sax-7*). Cette mutation *mig-6(qv33)* engendre un faux sens dans la protéine papiline (G664E), qui résulte en une perte de fonction hypomorphique de *mig-6*. Cette mutation permet que l'organisation neuronale soit préservée : seulement 30% des animaux doubles mutants *sax-7; mig-6* ont des défauts d'organisation neuronale (Figure 3.1B). L'organisation neuronale des animaux simples mutants *mig-6(qv33)* seuls, quant à eux, est semblable au type sauvage (Figure 3.1A). Des expériences complémentaires effectuées par notre laboratoire ont établi que la perte de fonction de *mig-6S* (et non *mig-6L*) est nécessaire pour la suppression des défauts d'organisation neuronale du mutant *sax-7* (Nadour *et al.*, en préparation).

3.1 Identification de gènes modulateurs de l'architecture neuronale

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action du gène *mig-6*/papiline dans la maintenance neuronale, nous avons débuté notre étude par la recherche d'interacteurs génétiques codants pour des composants de la MEC, pouvant soit reproduire ou altérer l'effet de maintien des structures neuronales du mutant *mig-6*. De précédents travaux ont répertorié l'importance du collagène IV dans la régulation de phénotypes causé par la perte de fonction de *mig-6* (Biard, 2021; Keeley *et al.*, 2020; Nadour *et al.*, en préparation). Nous avons donc testé l'implication d'autres composants structuraux de la MEC ayant des liens fonctionnels avec le collagène IV/EMB-9. Ainsi, nous avons évalué l'implication du nidogène/*nid-1*, du perlécan/*unc-52* et de la fibuline/*fbl-1* car il a été démontré qu'ils possèdent des domaines de liaison avec le collagène IV pour maintenir l'intégrité structurale de la MEC (Battaglia *et al.*, 1992; Bonche, 2019; Dai *et al.*, 2018; Hopf *et al.*, 1999; Whitelock *et al.*, 1999) ou qu'ils interagissent ensemble

dans de nombreux contextes (cas de la fibuline) (Kubota *et al.*, 2012; Kurshan *et al.*, 2014).

Test d'implication du nidogène sur la maintenance neuronale chez le mutant *sax-7*

Une délétion du gène *nid-1*, *cg119*, cible la région promotrice du gène ainsi que les premiers exons, ce qui empêche la transcription des trois isoformes du gène nidogène (Figure 3.2A). Avec cette mutation, une analyse qualitative du phénotype de maintenance neuronale (selon le modèle en Figure 3.2B) a été effectuée.

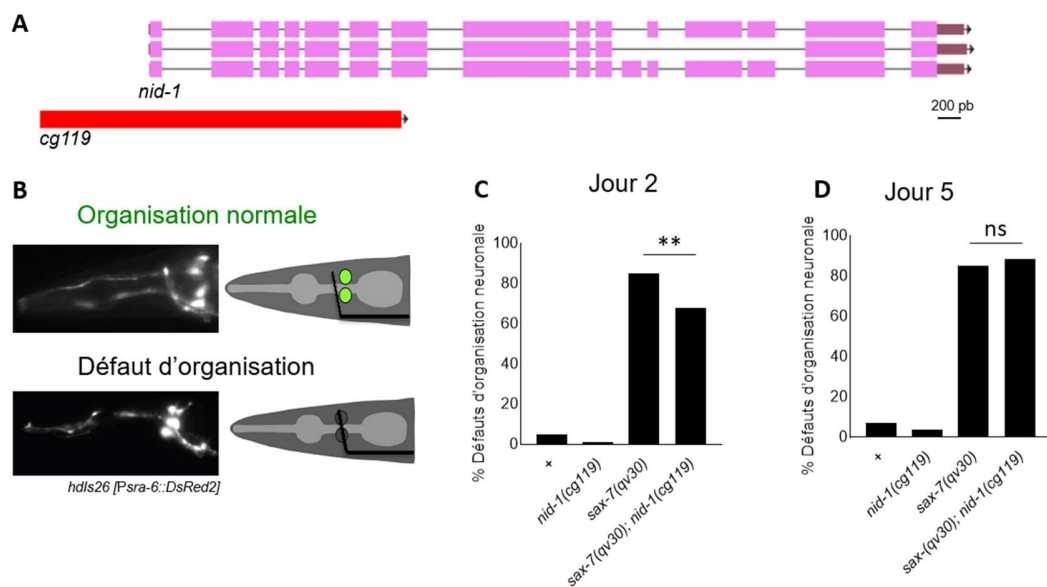


Figure 3.2 Test d'implication du nidogène dans la maintenance neuronale chez le mutant *sax-7*. (A) La mutation *nid-1(cg119)* est une délétion de 3129 paires de base. (B) Schéma du modèle de quantification qualitative des défauts d'organisation des neurones ASH et ASI avec le rapporteur fluorescent *hdl26 [Psra-6::DsRed2]*. (C) Quantification des défauts d'organisation neuronale à *Jour 2* d'âge adulte. (D) Quantification des défauts d'organisation neuronale à *Jour 5* d'âge adulte. (Proportion \pm erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Pour chacun des génotypes, le n est compris entre 100 et 150 animaux. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (** $p \leq 0,01$). ns, non significatif. Image A adaptée de WormBase.

À *Jour 2*, une légère diminution des défauts neuronaux a été observée chez le double mutant *sax-7(qv30); nid-1(cg119)* (Figure 3.2C), soit ~70% de défauts neuronaux chez des animaux *sax-7;nid-1* (au lieu de ~90% de défauts chez les mutants *sax-7*). Ceci est significatif, mais loin d'être comparable à la suppression engendrée par la perte de fonction de *mig-6*. Pour vérifier la robustesse de cet effet dans le temps, nous avons analysé les animaux à *Jour 5* où le double mutant *sax-7(qv30); nid-1(cg119)* s'est révélé semblable au simple mutant *sax-7(qv30)* (Figure 3.2D). Ce résultat suggère une légère interaction du nidogène dans le mécanisme de maintenance neuronale, surtout au début de l'âge adulte, mais que sa présence dans ce contexte n'est probablement requise que dans les premiers stades de vie adulte.

Le perlécan, un interacteur potentiel de l'effet du mutant *mig-6*

Nous avons déterminé si une réduction d'expression du perlécan, en combinaison ou non avec la perte de fonction de *mig-6*, pourrait entraîner un effet sur les défauts neuronaux des mutants *sax-7* (Figure 3.3B). Pour ceci, nous avons effectué une expérience d'ARNi pour cibler les transcrits du gène *unc-52*/perlécan. Au stade *Jour 2* d'âge adulte, une légère réduction des défauts neuronaux (quantifiés tel que référencé en Figure 3.3A) est observée entre le mutant *sax-7* et le double *sax-7; unc-52(ARNi)*, mais cette suppression est probablement due à la paralysie entraînée par l'ARNi du perlécan. En effet, de précédentes expériences au laboratoire ont révélé que la paralysie des animaux mutants *sax-7* est suffisante pour inhiber l'apparition de défauts neuronaux (Bénard *et al.*, 2012; Desse *et al.*, 2021; Pocock *et al.*, 2008). Un effet similaire était attendu en combinaison avec le mutant *mig-6* du fait de la paralysie. Cependant, on observe une réapparition partielle des défauts neuronaux de *sax-7* suite à l'*unc-52(ARNi)* chez les animaux triplement manipulés *sax-7; mig-6; unc-52(ARNi)* (Figure 3.3B). Ensemble, ces résultats suggèrent une possible interaction du perlécan dans le mécanisme neuroprotecteur médié par la perte de fonction de *mig-6*.

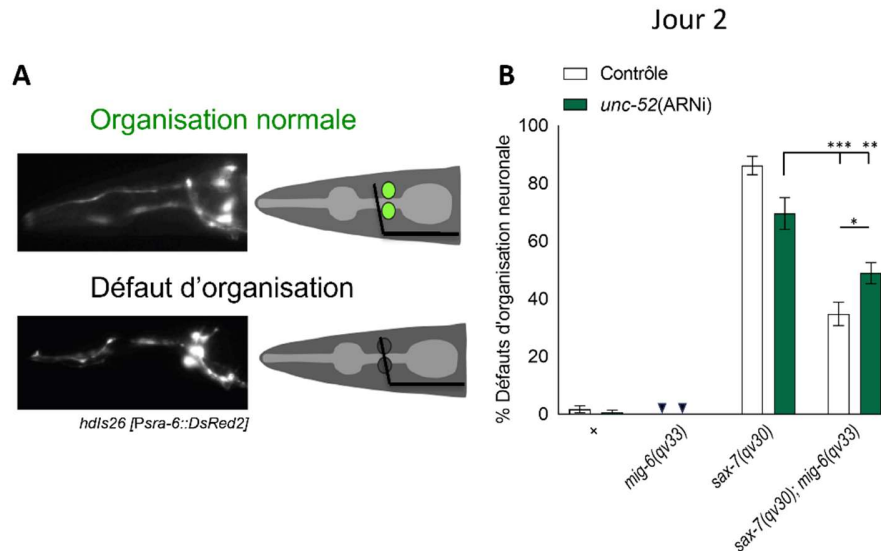


Figure 3.3 Test d'interaction entre *unc-52*/perlécan et *mig-6*/papiline. (A) Schéma du modèle de quantification qualitative des défauts d'organisation des neurones ASH et ASI avec le rapporteur fluorescent *hdl526 [Psr6::DsRed2]*. (B) Quantification des défauts d'organisation neuronale à Jour 2 d'âge adulte des animaux traités par l'*unc-52*(ARNi). (Proportion ± erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Pour chacun des génotypes, le n est compris entre 100 et 150 animaux. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001).

Identification de la fibuline comme interacteur dans la maintenance neuronale médié par *mig-6*

Les mutations de perte de fonction du gène *fbl-1*/fibuline étant peu viables, nous avons opté pour une approche comparative entre une mutation de gain de fonction *fbl-1(k201)* et une approche par ARNi. Ce mutant *k201* (glycine-249 en glutamate) a été identifié lors d'un crible génétique à la recherche de suppresseurs de défauts de développement de la gonade (Kubota *et al.*, 2004). Les analyses ont révélé que le mutant *fbl-1(k201)* est similaire au type sauvage, seul ou en combinaison avec le mutant *mig-6* (Figure 3.4A). De plus, *fbl-1(k201)* n'a pas eu d'impact significatif sur l'organisation neuronale chez le mutant *sax-7* [en examinant les animaux doubles mutants *sax-7(qv30)*

fbl-1(k201)], ni chez le double mutant *sax-7; mig-6* [en examinant les animaux triples mutants *sax-7(qv30) fbl-1(k201); mig-6(qv33)*] (Figure 3.4A).

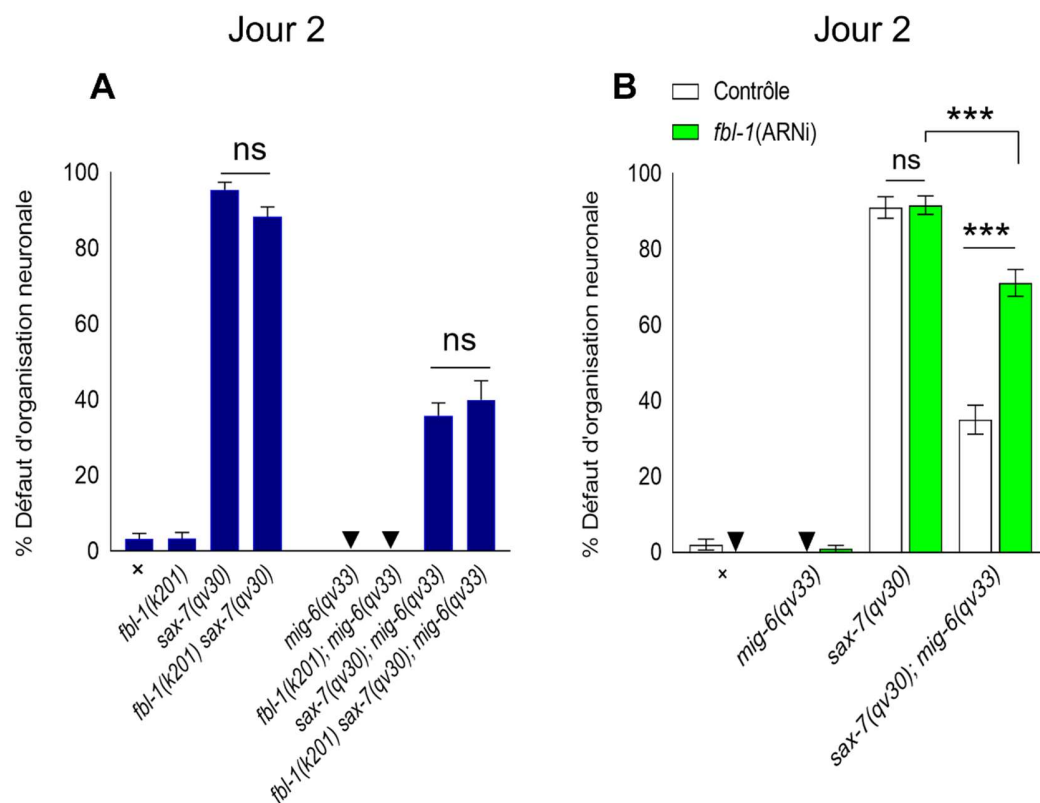


Figure 3.4 Analyses génétiques de possibles interactions entre les gènes *fbl-1*/fibuline et *mig-6*/papiline . (A) Quantification des défauts d'organisation neuronale à *Jour 2* d'âge adulte du mutant *fbl-1(k201)* en combinaison avec les mutations *sax-7* ou/et *mig-6*. (B) Quantification des défauts d'organisation neuronale à *Jour 2* d'âge adulte de la *fbl-1*(ARNi). Proportion \pm erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples. Pour chacun des génotypes le n est compris entre 100 et 150 animaux. L'expérience d'ARNi compte 80 à 100 vers par génotype et par essai, pour un total de deux essais. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$. ns, non significatif.

Nous avons aussi effectué une expérience d'ARNi contre le gène de la fibuline. Contrairement au résultat obtenu avec le mutant de gain de fonction *k201*, la diminution d'expression de la fibuline par ARNi a entraîné un large retour de défauts d'organisation neuronale chez le double mutant *sax-7; mig-6* [en examinant les

animaux *sax-7(qv30); mig-6(qv33); fbl-1(ARNi)*]. A noter que *fbl-1(ARNi)* ne modifie pas à elle seule les défauts neuronaux chez le simple mutant *sax-7* [en examinant les animaux *sax-7(qv30); fbl-1(ARNi)*] (Figure 3.4B). Cette tendance à la réapparition des défauts neuronaux du mutant *sax-7* à la suite de la l'ARNi de la fibuline [en examinant les animaux *sax-7(qv30); mig-6(qv33); fbl-1(ARNi)*] a été observée sur deux expériences indépendantes, renforçant ainsi la robustesse de l'effet. Ensemble, ces résultats suggèrent que la fibuline joue un rôle dans l'effet protecteur de l'architecture neuronale médié par la perte de fonction de *mig-6*.

3.2 Distribution de composants de la MEC chez le mutant *mig-6*

Afin de mieux décrire les conséquences de la perte de fonction de MIG-6/papiline sur l'état de la MEC, nous avons analysé les niveaux et la distribution de certains composants de la MEC. Pour ce faire, nous avons effectué des analyses quantitatives et qualitatives de nombreux rapporteurs fluorescents intégrés de divers composants de la MEC dans les mutants *mig-6(qv33)* comparés au type sauvage. Des croisements génétiques m'ont permis de générer 3 différentes souches portant la mutation *mig-6(qv33)* utilisées pour ces expériences.

Distribution de la protéine EMB-9/Collagène IV chez le mutant *mig-6*

De précédents travaux ont révélé que la perte de fonction du gène *mig-6* engendre une accumulation d'EMB-9/collagène IV dans la MB de la gonade (Keeley *et al.*, 2020), ainsi que l'apparition de structures fibrotiques dans la tête (Figure 3.5B; Nadour *et al.*, en préparation). Dans l'optique de définir cette accumulation d'EMB-9/collagène IV de façon plus détaillée, une quantification de fluorescence avec un marqueur stable d'EMB-9 intégré a été faite dans toute la tête (Figure 3.5C). On observe une accumulation d'EMB-9 dans la tête du vers chez le mutant *mig-6* comparativement au type sauvage. L'apparition de structures fibrotiques d'EMB-9 étant principalement localisée autour du bulbe terminal du pharynx (Figure 3.5A; Nadour *et al.*, en

préparation), nous avons alors effectué une seconde quantification incluant uniquement le bulbe terminal (Figure 3.5D) et avons trouvé la même accumulation, comparativement au contrôle. Afin de mettre ce résultat en perspective, nous avons également quantifié la fluorescence uniquement dans le corpus (partie antérieure) de la tête (Figure 3.5E). Le collagène IV du corpus reste similaire au type sauvage. Par ailleurs, nous avons recensé les structures fibrotiques, et trouvé qu'elles se retrouvent dans un nombre de 3 à 4 structures fibrotiques par animal chez le mutant *mig-6*, un phénotype jamais observé chez le type sauvage (Figure 3.5F). Ensemble, ces résultats indiquent que la perte de fonction de *mig-6* entraîne une accumulation d'EMB-9/collagène IV dans la partie postérieure de la tête avec l'apparition d'un nombre moyen de 3 à 4 structures fibrotiques.

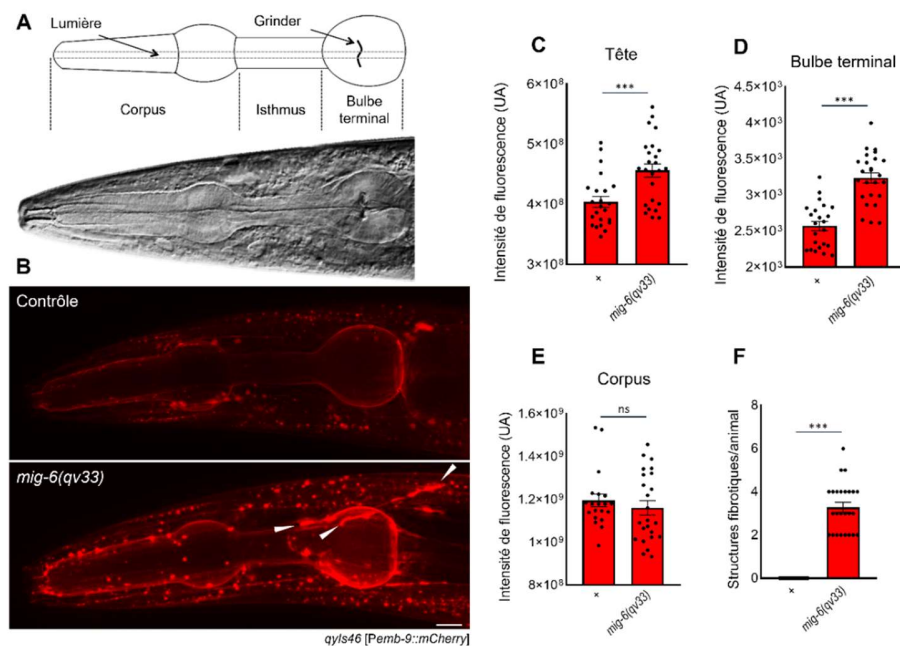


Figure 3.5 Distribution d'EMB-9/collagène IV chez le type sauvage et le mutant *mig-6*. (A) Vue latérale du pharynx. Le corpus attire la nourriture bactérienne dans la lumière, où elle est transportée vers le bulbe terminal par l'isthme. Le grinder écrase les bactéries avant qu'elles ne soient transportées vers l'intestin. (B) Projection en somme de vers à Jour 2 d'âge adulte de type sauvage et le mutant *mig-6(qv33)* avec le marqueur fluorescent *qyls46*

[*Pemb-9::mCherry*]. (C) Quantification de la fluorescence de la tête à *Jour 2* de vers de type sauvage et mutant *mig-6(qv33)*. (D) Quantification de la fluorescence du bulbe terminal à *Jour 2* de vers de type sauvage et mutant *mig-6(qv33)*. (E) Quantification de la fluorescence du corpus à *Jour 2* de vers de type sauvage et mutant *mig-6(qv33)*. (F) Quantification du nombre de structures fibrotiques par animal. (Proportion \pm erreur standard de la moyenne, tests de Student). Pour chacun des génotypes le n est compris entre 19 et 30 animaux. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (ns pour non significatif; *** $p \leq 0,001$). Échelle = 10 μm . UA renvoi à une unité arbitraire de fluorescence. Image A adaptée de Trojanowski, 2015.

Distribution de la protéine FBL-1/fibuline chez le mutant *mig-6*

Étant donné nos résultats montrant l'implication du gène *fbl-1* codant pour la fibuline dans le processus de suppression des défauts du mutant *sax-7* par le mutant *mig-6* (Figure 3.4B), nous avons voulu déterminer si la distribution de la protéine fibuline était affectée chez le mutant *mig-6*. Grâce à un rapporteur traductionnel des niveaux endogènes de la fibuline générée par CRISPR, *fbl-1(qv62[mNG+loxP::fbl-1])* (Keeley *et al.*, 2020), nous avons effectué des comparaisons entre le type sauvage et le mutant *mig-6(qv33)* (Figure 3.6B). Comparativement au type sauvage, chez le mutant *mig-6* nous avons identifié la présence de structures semblables aux structures fibrotiques d'EMB-9/Collagène IV (Figure 3.6A). Nous avons alors effectué une quantification du nombre de ces « structures de fibuline » par animal qui apparaissent, elles aussi, autour du bulbe terminal du pharynx. Nous avons observé que le type sauvage ne présente quasiment pas de « structures » de fibuline, et qu'en comparaison le mutant *mig-6* a une moyenne de 2 à 3 structures de fibuline par animal (Figure 3.6B). Ce résultat suggère que comme pour le EMB-9/collagène IV qui n'est pas correctement remodelé en l'absence de *mig-6*, le remodelage de la fibuline serait également affecté par la perte de fonction du gène *mig-6*.

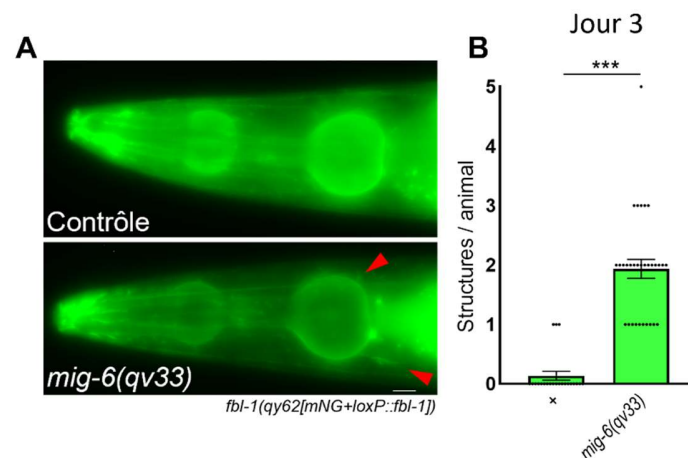


Figure 3.6 Distribution de la fibuline chez le mutant *mig-6*. **(A)** Projection en somme de vers à Jour 3 d'âge adulte de type sauvage et le mutant *mig-6* avec le marqueur fluorescent *fbl-1(qy62[mNG+loxP::fbl-1])*. **(B)** Quantification du nombre de « structures » de fibuline autour du bulbe terminal du pharynx chez le type sauvage et le mutant *mig-6*. (Proportion \pm erreur standard de la moyenne, tests de Student). Pour chacun des génotypes, le n est compris entre 22 et 31 animaux. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$).

Distribution de la protéine LAM-1/laminine chez le mutant *mig-6*

Pour examiner la laminine, nous avons utilisé un rapporteur de la sous-unité LAM-1, marquée par la protéine fluorescente GFP, *qyIs7[Plam-1::lam-1::gfp]* surexprimée à partir d'un transgène stable intégré. *C. elegans* possède quatre gènes de sous-unités de laminine (Figure 1.10 de l'introduction) dont deux chaînes α (LAM-3 et EPI-1); une chaîne β (LAM-1) et une chaîne γ (LAM-2) formant ainsi deux trimères distincts différencier uniquement par leurs chaînes α (LAM-3 ou EPI-1). Le rapporteur *qyIs7* nous permet ainsi de visualiser la distribution des deux trimères de laminines par la visualisation d'une des chaînes communes : chaîne β (LAM-1). Nous avons alors construit la souche avec la mutation *mig-6(qv33)* (Figure 3.7A) et avons effectué une quantification de la fluorescence chez les mutants *mig-6* comparé au type sauvage. Comme on peut l'observer sur la Figure 3.7A, confirmé par la quantification (Figure

3.7B), chez le mutant *mig-6* comparativement au type sauvage, la laminine est plus abondante. Ce résultat suggère qu'une perte de fonction de la papiline entraîne (de façon directe ou indirecte) une accumulation de laminine.

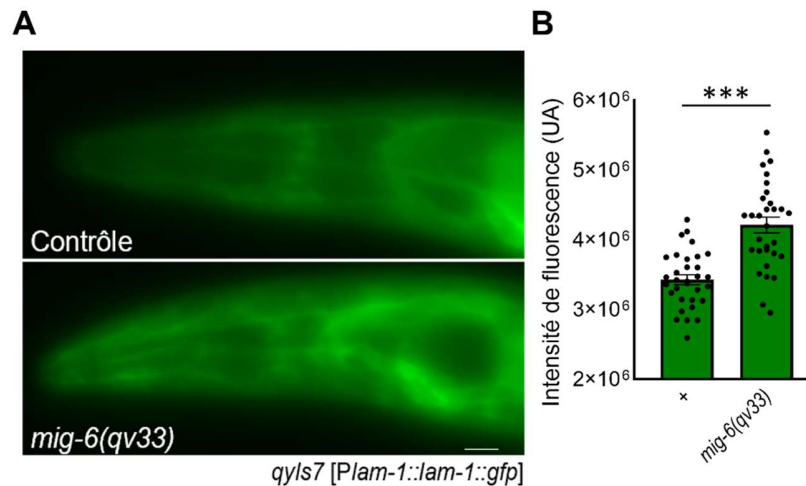


Figure 3.7 Distribution de la laminine chez le mutant *mig-6*. (A) Projection en somme de vers à Jour 2 d'âge adulte de type sauvage et le mutant *mig-6* avec le marqueur fluorescent *qyls7 [Plam-1::lam-1::gfp]*. (B) Quantification de la fluorescence sur des projections en somme de vers à Jour 2 d'âge adulte de type sauvage et le mutant *mig-6*. (Proportion \pm erreur standard de la moyenne, tests de Student). Pour chacun des génotypes, le n est compris entre 31 et 32 animaux. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques (***) $p \leq 0,001$). Échelle = 10 μ m. UA renvoie à une unité arbitraire de fluorescence.

3.3 Recherche de modulateurs des niveaux ou distribution de la MIG-6S/papiline

Dans l'optique de découvrir des modulateurs des niveaux et/ou distributions de la protéine MIG-6S/papiline, nous avons testé l'impact de la réduction de la fonction de composants de la MEC, tels que FBL-1/fibuline et l'EMB-9/collagène IV, sur MIG-6/papiline. Pour ceci nous avons effectué des expériences d'ARNi sur ces deux composants de la MEC. Nous avons ciblé la FBL-1/fibuline et l'EMB-9/collagène IV, car chez le mutant *mig-6*, ces molécules forment des accumulations de type « structures » linéaires.

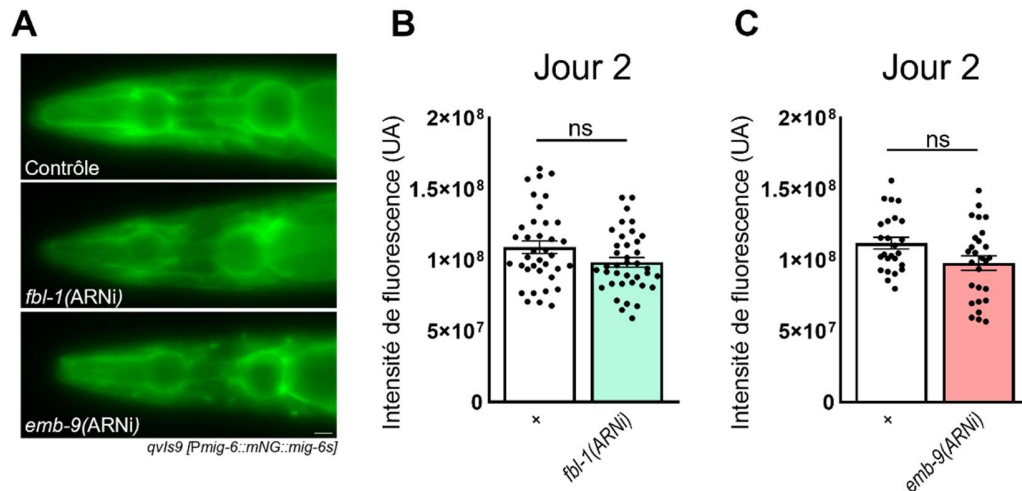


Figure 3.8 Recherche de modulateurs des niveaux et/ou distribution de la MIG-6S/papiline. (A) Projection en somme de vers à *Jour 2* d'âge adulte de type sauvage, les vers sur *fbl-1*(ARNi) et *emb-9*(ARNi) avec le marqueur fluorescent *qvIs9*[*Pmig-6::mNG::mig-6s*]. (B) Quantification de la fluorescence sur des projections en somme de vers à *Jour 2* d'âge adulte de type sauvage et les vers *fbl-1*(ARNi) en vert clair. (C) Quantification de la fluorescence sur des projections en somme de vers à *Jour 2* d'âge adulte de type sauvage et les vers *emb-9*(ARNi) en rose clair. (Proportion \pm erreur standard de la moyenne, tests de Student). Pour chacun des génotypes, le n est compris entre 25 et 38 animaux. Échelle = 10 μ m. UA renvoie à une unité arbitraire de fluorescence.

Pour mesurer les niveaux de la papiline suite à diverses manipulations, nous avons utilisé un rapporteur fluorescent de MIG-6S, *qvIs9*[*Pmig-6::mNG::mig-6s*]. Cette souche générée par le laboratoire est une intégration stable dans le génome du transgène surexprimé. Une quantification de la fluorescence de la tête des vers au stade adulte *Jour 2* a été faite par microscopie et sauvegarde d'images (Figures 3.8B et C). Comme on peut l'observer (Figure 3.8A), aucune modification significative du niveau de MIG-6S n'est détectable.

Partie 2

Jusqu'à présent, nos résultats suggèrent qu'une perte de fonction de *mig-6* est accompagnée ou même pourrait entraîner un remodelage de certains composants de la MEC. De plus, l'effet de protection à long terme de l'architecture du système nerveux médié par la perte de fonction de *mig-6* semble nécessiter l'implication d'autres composants de la MEC, tels que le perlécan et la fibuline comme décrits ci-dessus. Nous nous sommes alors posé la question si cet état de la MEC chez les mutants *mig-6* était dépendant de la signalisation de TGF- β . Une modulation de l'activité de TGF- β pourrait-elle modifier la maintenance neuronale induite par le mutant *mig-6* ? Dans cette deuxième partie, nous tenterons d'apporter des réponses à ces questions par la réalisation d'expériences ciblées.

3.4 Analyse des interactions génétiques entre les gènes *mig-6* et ceux de la voie TGF- β : impact sur le collagène IV et la maintenance neuronale

Basée sur la littérature chez les vertébrés, la voie TGF- β est centrale dans la régulation de l'état de la MEC (Chai *et al.*, 2003; Grande *et al.*, 1997; Paralkar *et al.*, 1991). Nous avons donc testé les interactions génétiques entre la mutation *mig-6(qv33)* et diverses conditions de perte de fonction de la voie TGF- β . Pour ceci, nous avons mesuré la distribution d'EMB-9/collagène IV dans des combinaisons de simples et doubles mutants. Notre choix du composant de la voie de TGF- β à muter a été guidé par la pénétrance des phénotypes engendrée par les mutations, ainsi que par la position chromosomique du gène (ce qui détermine si c'est possible de faire de combinaisons génétiques relativement rapidement lors de croisements génétiques).

Pour la construction des souches, nous avons choisi comme référence d'inactivation de la voie de TGF- β un mutant nul du récepteur SMA-6 de TGF- β nommé *sma-6(wk7)* (Figure 3.9A). Nous avons observé la protéine EMB-9/Collagène IV avec le rapporteur fluorescent *qyIs46 [Pemb-9::mCherry]* dans une combinaison de souches avec

sma-6(wk7) et *mig-6(qv33)* (Figure 3.9B). Comme illustré sur les images de microscopie à fluorescence, la quantité d'EMB-9/Collagène IV est similaire entre le type sauvage et le mutant *sma-6* (quantifications de 22 à 25 vers à *Jour 2*, Figure 3.9B).

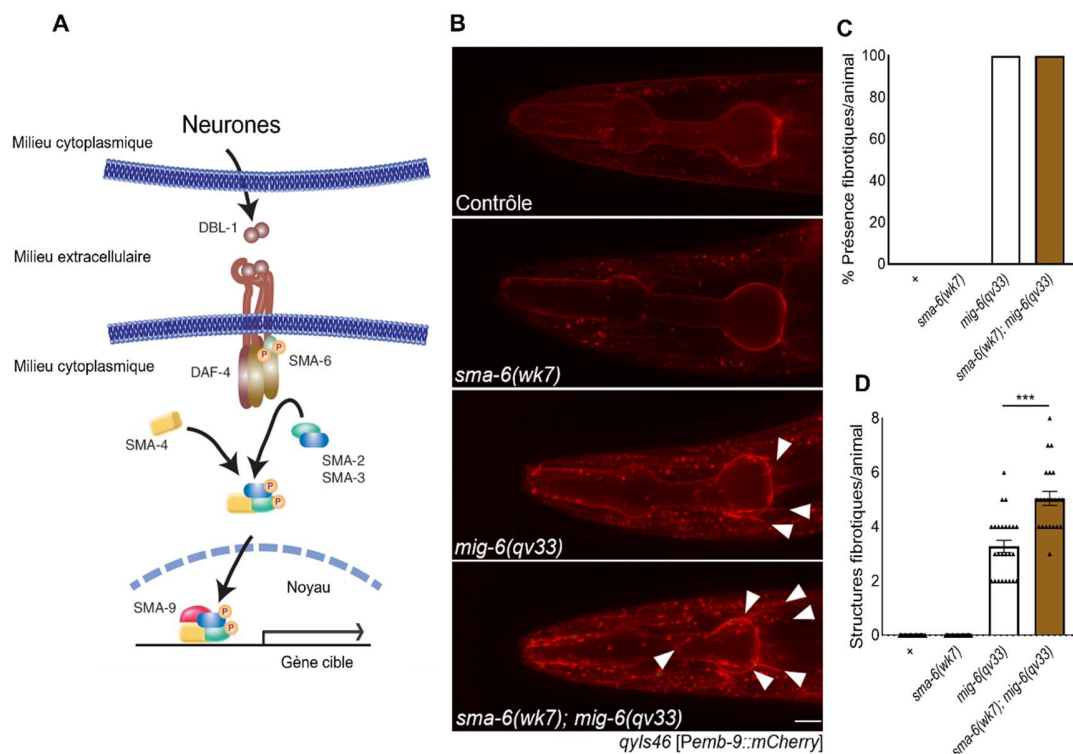


Figure 3.9 La voie TGF- β interagit avec *mig-6* pour réguler le collagène IV. (A) Voie classique de TGF- β (Sma/Mab) chez *C. elegans*. (B) Projection en somme de vers à *Jour 2* d'âge adulte avec le marqueur fluorescent *qyls46 [Pemb-9::mCherry]*, les structures fibrotiques sont pointées par des flèches blanches. (C) Quantification de la présence de structures fibrotiques d'EMB-9/Collagène IV. (D) Quantification du nombre de ses structures fibrotiques par animal. Proportion \pm erreur standard de la moyenne, ANOVA paramétrique avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples (Figure 3.9D). Pour chacun des génotypes, le n est compris entre 20 et 25 animaux. Échelle = 10 μ m. Figure 3.9A adaptée de Savage-Dunn et Padgett, 2017.

Cependant, chez le double mutant *sma-6; mig-6* comparativement au simple mutant *mig-6*, nous avons remarqué plus de collagène IV dans la tête (données non montrées) et de structures fibrotiques de collagène IV autour du bulbe terminal du pharynx

(Figure 3.9B). Nous avons alors quantifié la récurrence de ces structures fibrotiques (Figure 3.9C). Il y a plus de structures fibrotiques de collagène IV chez le double mutant *sma-6; mig-6* comparativement à *mig-6* (Figure 3.9D). Pour rappel, ces structures ne sont jamais observées chez le type sauvage.

Dans l'optique de déchiffrer si cette suraccumulation de collagène IV pouvait entraîner une meilleure suppression des défauts neuronaux du mutant *sax-7*, nous avons généré une souche triple mutante *sma-6; sax-7; mig-6* [en croisant le mutant *sma-6(wk7)* avec le double mutant *sax-7; mig-6* portant le rapporteur neuronal *hdIs26*]. Dans ces animaux triples mutants, l'organisation neuronale a été examinée avec le rapporteur fluorescent *hdIs26* qui permet de visualiser les neurones ASH et ASI (Figure 3.10A). La perte de *sma-6* seule n'impacte pas l'organisation neuronale et ne modifie pas les défauts neuronaux engendrés par la perte de *sax-7*. Néanmoins, en combinaison avec *mig-6(qv33)*, on note une amélioration de la suppression des défauts neuronaux, qui est légère mais significative (Figure 3.10A) [soit l'analyse des animaux triples mutants *sma-6(wk7) ; sax-7(qv30) ; mig-6(qv33)*].

Afin de vérifier la robustesse et la reproductibilité de ce résultat, c'est-à-dire que la réduction de la signalisation de la voie TGF- β permet une suppression accrue des défauts neuronaux de *sax-7* par la mutation *mig-6*, nous avons effectué d'autres manipulations de la voie TGF- β . En effet, nous avons réduit la fonction du ligand TGF- β , codé par le gène *dbl-1*, par une expérience d'ARNi contre le gène *dbl-1* (Figure 3.10B). La perte de fonction du ligand TGF- β /DBL-1 améliore également la suppression des défauts du mutant *sax-7* et ceci uniquement chez les mutants *mig-6(qv33)*, c'est-à-dire chez les animaux *sax-7; mig-6; dbl-1(ARNi)* (Figure 3.10B). Ensemble, ces résultats indiquent qu'une inhibition de la voie de TGF- β améliore l'effet de maintenance neuronale médié par la mutation *mig-6*.

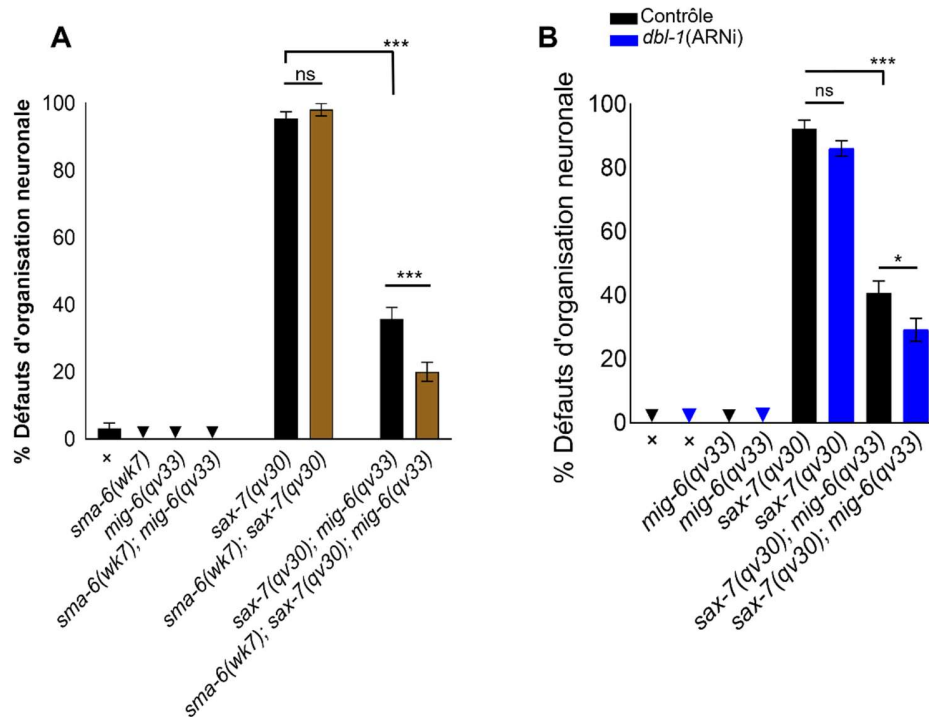


Figure 3.10 La voie TGF- β interagit avec *mig-6* pour réguler le maintien de l'architecture neuronale. (A) Quantification des défauts d'organisation neuronale à *Jour 2*. (B) Quantification des défauts d'organisation neuronale pour vérifier l'implication de la voie de TGF- β par l'intermédiaire de l'ARNi du ligand DBL-1. La perte de fonction du ligand TGF- β /DBL-1 a été réussie, car les vers traités étaient *Sma* (taille courte du corps), indiquant que l'ARNi a bien marché. Proportion \pm erreur standard de proportion, tests exacts de Fisher avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples. Pour chacun des génotypes, le n est compris entre 100 et 150.

3.5 La voie TGF- β semble moduler les niveaux de la protéine MIG-6S/papiline

À la suite des résultats obtenus sur le collagène IV et la maintenance neuronale par l'inhibition de la voie de TGF- β , nous avons testé l'hypothèse que cette voie pourrait impacter les niveaux et/ou distribution de la protéine papiline. MIG-6/papiline étant une protéine de la MEC, il est concevable que la voie TGF- β pourrait potentiellement impacter l'expression du gène *mig-6*, ou bien la distribution de la protéine papiline elle-même. Nous avons donc généré un ensemble de souches où la fonction de la voie de

TGF- β est altérée, que ce soit par des pertes de fonction (en utilisant des mutants ou par ARNi), ou bien par des gains de fonction (en surexprimant des composants de la voie de TGF- β), portant le rapporteur fluorescent *qvIs9* [*Pmig-6S::mNG::mig-6S*], pour évaluer la papiline (Figure 3.11A).

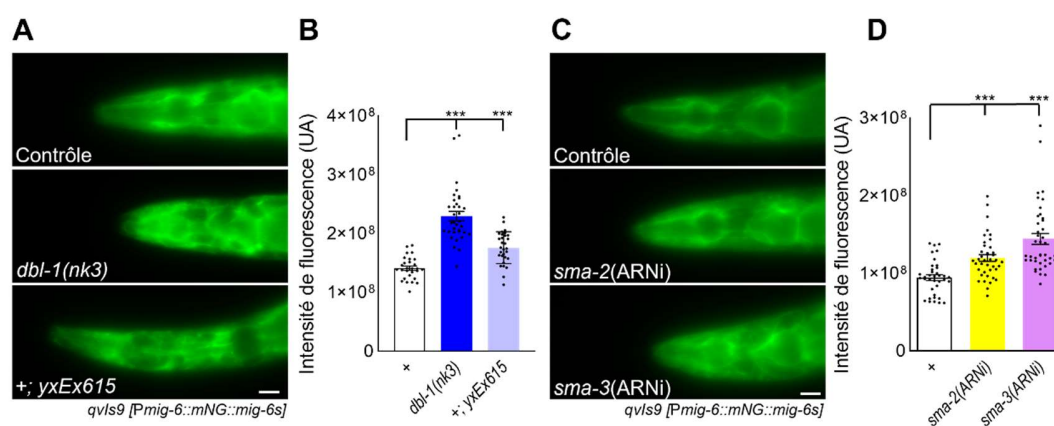


Figure 3.11 La voie TGF- β impacte les niveaux de la protéine MIG-6S/papiline. (A) Projections en somme de vers à *Jour 2* d'âge adulte de type sauvage, du mutant du ligand de la voie de TGF- β [*dbl-1(nk3)*] et de la surexpression du récepteur SMA-6 (*yxEx615* [*Psma-6::sma-6(+)*]) avec le marqueur fluorescent *qvIs9*. (B) Quantification de la fluorescence sur des projections en somme de vers à *Jour 2* d'âge adulte (C) Projections en somme de vers à *Jour 2* d'âge adulte de type sauvage, et des ARNi des effecteurs SMA-2 et SMA-3 avec le rapporteur fluorescent *qvIs9* [*Pmig-6S::mNG::mig-6S*]. (D) Quantification de la fluorescence sur des projections en somme de vers à *Jour 2* d'âge adulte. (Proportion \pm erreur standard de la moyenne, ANOVA paramétrique avec valeurs-p ajustées pour comparaisons multiples). Pour chacun des génotypes, le n est compris entre 28 et 34 animaux pour la Figure 3.11B et entre 37 et 41 pour la Figure 3.11D. Échelle = 10 μ m. UA renvoie à une unité arbitraire de fluorescence.

Comparé au type sauvage, le mutant à perte de fonction du ligand DBL-1 [soit *dbl-1(nk3)*], mais aussi la surexpression du récepteur SMA-6 (*yxEx615* [*Psma-6::sma-6(+)*]), induisent une augmentation des niveaux de MIG-6S (Figure 3.11B). Ceci montre qu'une régulation fine des niveaux d'activité de TGF- β semble essentiel dans le contexte de la maintenance neuronale pour les voies de signalisation

cellulaires. Il y a probablement des *feedbacks* qui entraînent des remodelages pour s'adapter à la réalité du vivant.

Afin de vérifier ce résultat avec d'autres composants de la voie de TGF- β , nous avons effectué des expériences d'ARNi sur deux des effecteurs intracellulaires de la voie, SMA-2 et SMA-3 (Figure 3.11C et D). L'inhibition de l'expression des gènes des effecteurs a elle aussi entraîné une augmentation des niveaux de la protéine MIG-6S au sein de la MEC. Ces résultats suggèrent qu'une perturbation de la voie de TGF- β , que ce soit son inhibition, ou sa suractivation, entraîne une surproduction de MIG-6S/papiline.

CHAPITRE 4

Discussion

Après sa formation initiale lors de l'embryogenèse, le système nerveux est soumis à diverses épreuves. La croissance, la maturation, l'incorporation de nouveaux neurones, les accidents et les stress mécaniques, entre autres, sont des facteurs susceptibles de perturber la conformation structurelle du système nerveux tout au long de la vie. Les mécanismes de protection à long terme de l'architecture neuronale contre ces stress restent largement méconnus. Dans cette étude, nous avons cherché à approfondir notre compréhension de la manière dont la perte de fonction de *mig-6*/papiline contribue à la maintenance de l'architecture neuronale via différents interacteurs de la MEC. L'analyse de différents composants de la MEC et du rôle de la voie de TGF- β a permis de démontrer que *mig-6* exerce sa fonction en régulant l'environnement périneuronal et en interagissant avec cette voie de signalisation (Figure 4.1). Notre hypothèse actuelle est que des modifications de la distribution de composants la MEC, dans les régions à haute densité neuronale, seraient associées à un meilleur maintien de leur organisation spatiale au fil du temps. Les résultats obtenus soutiennent l'idée selon laquelle un équilibre entre les facteurs d'adhésion cellulaire et la flexibilité de la MEC joue un rôle crucial dans la préservation à long terme du système nerveux. Dans cette section, certaines perspectives du projet seront abordées, telles que les possibles interactions moléculaires de MIG-6 pour maintenir l'organisation neuronale, le rôle potentiel des composants affectés par sa perte de fonction, et les composants qui affectent les niveaux de MIG-6.

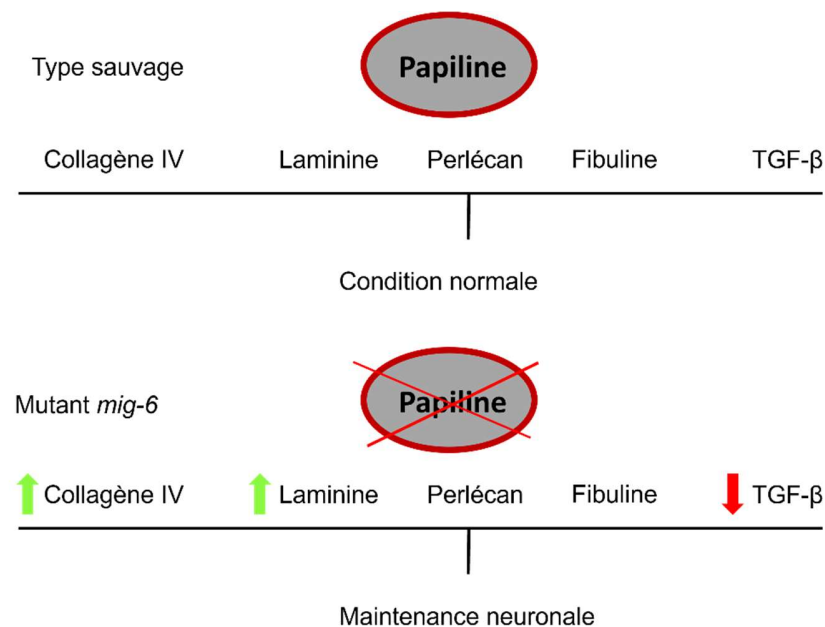


Figure 4.1 Modèle : La perte de fonction de *mig-6* entraîne un remodelage matriciel impactant la maintenance de l'architecture neuronale. Chez le type sauvage, la matrice extracellulaire est finement régulée pour médier diverses fonctions. Chez le mutant *mig-6*/Papiline, de nombreux composants matriciels sont retrouvés à des niveaux supérieurs (dont le collagène IV et la laminine). De plus, en condition d'absence de maintenance neuronale (mutant *sax-7*), la perte de fonction de la Papiline permet de révéler le rôle de maintien d'autres composants tels que le perlécan, la fibuline et ceux de la voie de TGF- β .

4.1 Interactions de MIG-6, un régulateur de la MEC qui impacte la maintenance neuronale, avec d'autres composants de la MEC

La perte de fonction du gène *mig-6* entraîne une accumulation accrue de collagène IV avec l'apparition de structures fibrotiques (Keeley *et al.*, 2020; Nadour *et al.*, en préparation). Selon l'hypothèse que nous favorisons actuellement, les changements de la MEC suite à la perte de fonction de *mig-6* permettent un meilleur maintien des structures neuronales chez le mutant *sax-7*. Il est important de souligner ici que le rôle de *mig-6* dans la maintenance de l'architecture neuronale est apparent également chez les animaux de type sauvage. En effet, en conditions de stress mécanique accrues (nage prolongée forcée en culture liquide), les ganglions antérieurs et le neuropile

situés dans la tête des vers de type sauvage sont déplacés postérieurement. Ce déplacement est contrecarré chez les vers mutants *mig-6*, ce qui révèle que la perte de fonction du gène *mig-6* engendre des conditions qui sont protectrices de l'architecture neuronale (Nadour *et al.*, en préparation). Afin de mieux décrire l'état de la MEC chez les mutants *mig-6*, au-delà du collagène IV, ainsi que de déterminer quels interacteurs génétiques impactent la fonction de *mig-6*, nous avons testé systématiquement l'implication de différents composants dans cet effet médié par *mig-6*.

4.1.1 Le NID-1/nidogène

nid-1 encode le nidogène, une protéine de la MEC permettant des attaches physiques entre le collagène IV et la laminine. Il s'est déjà révélé important dans la migration axonale et la formation synaptique (Ackley *et al.*, 2003; Kim et Wadsworth, 2000). Dans notre contexte, son absence n'impacte pas les défauts neuronaux des mutants *sax-7* (Figure 3.2). Néanmoins, étant donné son rôle matriciel ainsi que l'accumulation de laminine et de collagène IV qui accompagne la perte de fonction de *mig-6*, il est possible que la maintenance de cet état matriciel entraîne une transcription importante du gène *nid-1* pour que des niveaux plus élevés de la protéine nidogène aident à stabiliser les complexes de laminine et collagène IV. Ainsi, il serait intéressant de comparer, en utilisant un rapporteur traductionnel, l'expression de NID-1/nidogène chez le type sauvage et le mutant *mig-6*. De plus, l'absence de NID-1/nidogène au sein de la MEC pourrait fragiliser la force de liaison entre la laminine et le collagène IV, diminuant ainsi le pouvoir de rétention des fluctuations mécaniques de la matrice. Une double perte de fonction *nid-1 mig-6* en contexte de mutant *sax-7* [c'est-à-dire des animaux triples mutants *sax-7; nid-1 mig-6*] permettrait de répondre à cette question. De plus, elle permettrait d'observer également l'impact de cette double perte de fonction (mutant *nid-1 mig-6*) sur la capacité de formation et de maintenance des structures fibrotiques de collagène IV engendrées par la perte de fonction du gène *mig-6*.

4.1.2 Le UNC-52/perlécan

Le perlécan est un protéoglycane sécrété de la MEC. Nos résultats indiquent une possible interaction génétique entre *mig-6* et *unc-52* (Figure 3.3). De plus, des données de littérature font état d'une régulation négative du collagène IV sur l'expression du Perlécan (Lázaro-Peña *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2014). Il serait intéressant d'investiguer davantage le rôle du perlécan et son interaction avec *mig-6*. Cependant, son absence causant une paralysie chez les animaux mutants, cela peut biaiser nos résultats de quantification de défauts neuronaux. Il serait donc judicieux de l'aborder au travers d'une approche de perte de fonction post-développementale, grâce à des expériences d'ARNi sur des vers de stade L4 (plutôt que des larves L1 telles que réalisées dans cette étude). Ainsi, on pourrait outrepasser la paralysie causée par l'absence développementale de perlécan et tester son implication dans la maintenance neuronale chez le mutant *mig-6*. D'autre part, le perlécan est nécessaire à l'interface muscle-épiderme (Rogalski *et al.*, 1993). Le gène *mig-6* s'étant révélé fonctionner à partir des muscles dans le contexte de maintenance neuronale [grâce à des expériences de sauvetage; (Nadour *et al.*, en préparation)]. De plus, nos résultats indiquent que *mig-6* interagit avec la voie de TGF- β (dont la plupart des interactions se font via les cellules épidermales chez *C. elegans*) (Figures 3.9, 3.10, et 3.11). Il est possible que la perte de fonction de *mig-6* affecte la distribution du perlécan ou que le perlécan soit un intermédiaire dans l'interaction MIG-6 - TGF- β . Des expériences complémentaires quant à l'implication du perlécan dans ces différents contextes permettront d'élucider son implication dans la maintenance neuronale du mutant *mig-6*.

4.1.3 La FBL-1/fibuline

Nos résultats sur la fibuline suggèrent qu'elle serait fortement impliquée dans le mécanisme de maintenance neuronale médié par *mig-6*. Le retour de défauts neuronaux chez les animaux *sax-7; mig-6* a été observé lors de la réduction de la fonction du gène *fbl-1* (par ARNi), mais pas par le gain de fonction (avec une mutation) (Figure 3.4).

Ceci laisse supposer que la présence de la fibuline, même non fonctionnelle, suffirait dans notre contexte à soutenir l'effet médié par *mig-6*. D'autre part, la perte de fonction de *mig-6* entraîne un phénotype « fibrillaire » de fibuline similaire au collagène IV autour du bulbe terminal du pharynx. Il est possible que la distribution de la fibuline sous forme fibrillaire se superpose ou colocalise avec le collagène IV. Cette notion est appuyée par ces évidences : (1) la localisation similaire des structures de collagène IV et de fibuline autour du bulbe terminal; (2) nos résultats d'ARNi de fibuline montrent que une réapparition des défauts d'architecture neuronale; et (3) les interactions génétiques décrites dans la littérature suggèrent un rôle stabilisateur de la fibuline sur EMB-9/collagène IV (Kubota *et al.*, 2012; Kurshan *et al.*, 2014). Des études de colocalisation par imagerie confocale plus poussées, grâce à des rapporteurs fluorescents distincts du collagène IV (marqué de fluorescence rouge) et de la fibuline (marqués de fluorescence verte), permettraient de confirmer ou non cette hypothèse. De plus, une étude de l'implication de la fibuline, par ARNi, sur la capacité de formation et de maintenance de ces structures fibrotiques de collagène IV chez le mutant *mig-6* aiderait à orienter son implication. Par la suite, il serait intéressant de tester l'implication de chaque isoforme de fibuline (C ou D) requise dans ce contexte de stabilisation du collagène IV avec d'autres expériences de colocalisation avec des rapporteurs fluorescents spécifiques à chaque isoforme de la fibuline.

Une autre hypothèse serait que ces structures de fibuline et de collagène IV seraient indépendantes l'une de l'autre, localisées autour du bulbe terminal mais pas au même endroit à une échelle moléculaire. Cependant, de par sa structure moléculaire, la fibuline ne possède pas en elle-même une capacité de réticulation ou de fibrillation, et donc cela pourrait être plutôt via des interactions avec d'autres composants matriciels qui pourraient promouvoir, par eux-mêmes ou via des facteurs pro-fibrotiques, une composition matricielle plus dense (Ducros *et al.*, 2007).

4.1.4 Le EMB-9/collagène IV

De précédents travaux du laboratoire ont révélé que la perte de fonction de *mig-6* entraîne une accumulation de collagène IV et que cette accumulation est requise pour la fonction de maintenance neuronale médiée par *mig-6* (Nadour *et al.*, en préparation). Dans cette étude, nous avons décrit de façon plus précise la localisation et le phénotype d'accumulation de structures fibrotiques du mutant *mig-6* (Figure 3.5). Notre laboratoire a découvert l'implication de PXN-2 dans la formation des structures fibrotiques de collagène IV chez le mutant *mig-6* (Nadour *et al.*, en préparation). PXN-2 est une peroxydase impliquée dans la réticulation fibrotique du collagène IV (Gotenstein *et al.*, 2018; Gotenstein *et al.*, 2010). Il est possible qu'un ensemble de facteurs matriciels interagissent pour induire la formation et la maintenance de ces structures en absence de *mig-6*. Une étude sur les facteurs de maintenance de ces structures de collagène IV, via un crible génétique ou par l'induction de mutations basées sur la littérature, permettrait de mettre en lumière la fonction et l'implication d'autres gènes affectés par la perte de fonction de *mig-6*.

De plus, de nombreuses métalloprotéinases matricielles ont été répertoriées comme ayant, parmi leurs fonctions, une activité de clivage du collagène type IV. C'est notamment le cas des métalloprotéinases GON-1 et MIG-17 qui régulent la dynamique des composants de la MEC autour du tube épithélial qui forme la gonade (Hesselson *et al.*, 2004; Imanishi *et al.*, 2021; Kubota *et al.*, 2012). Des mutations des gènes codants pour ces deux protéines ont été répertoriées comme déstabilisant la migration ou la formation en « U » de la gonade via une absence de régulation des composants de la MEC pour promouvoir, de façon appropriée, un équilibre entre élasticité pour la croissance, d'une part, et la rigidité pour la maintenance de la structure d'autre part (Kim et Nishiwaki, 2015). Par ailleurs, MIG-6 et MIG-17 agissent dans la même voie de régulation pour participer dans le guidage de la cellules distales de la gonade (Kawano *et al.*, 2009), ainsi que pour promouvoir la maintenance neuronale (Kawano

et al., 2009; Nadour *et al.*, en préparation). La fonction de maintien de l'architecture neuronale est dépendante de la région de la protéine MIG-6 nommée « papiline cassette » (Nadour *et al.*, en préparation). Une analyse de l'interaction d'autres métalloprotéinases aux motifs similaires que MIG-6 (domaines métalloprotéases) sur le collagène IV et leur capacité à maintenir l'architecture neuronale permettrait de détecter de possibles interacteurs en amont ou en aval de cet effet, la spécificité ou non de la papiline cassette, ainsi que leur importance dans la maintenance neuronale.

4.1.5 La LAM-1/laminine

Les laminines sont parmi les principaux composants de la MEC. Nos résultats indiquent une accumulation de laminines chez le mutant *mig-6* (Figure 3.7). Les laminines possèdent un rôle de soutien structurel des MB via une organisation supramoléculaire (Cognato et Yurchenco, 2000). En effet, leur assemblage sous forme de polymère dans la MEC est nécessaire avant l'ajout ultérieur d'autres composants de la MEC (Aurelio *et al.*, 2002; Smyth *et al.*, 1999). Ainsi, il est possible que l'augmentation des niveaux de laminines, observé chez le mutant *mig-6*, soutienne le recrutement d'autres composants matriciels et permette leur maintenance au sein de la MEC. Pour notre étude, nous avons utilisé un rapporteur fluorescent permettant l'observation du brin β (celui de LAM-1) commun aux deux hétérotrimères des laminines (LAM-1 β /LAM-2 γ /LAM-3 α et LAM-1 β /LAM-2 γ /EPI-1 α) (Amran *et al.*, 2021). Par la suite, il serait intéressant d'approfondir sur la spécificité des hétérotrimères requis dans notre contexte. Pour ce faire, l'utilisation de rapporteurs fluorescents spécifiques à chaque chaîne α (*lam-3* et *epi-1*) permettrait une étude plus spécifique des possibles interacteurs de la papiline. Des essais de déplétions post-développementales par ARNi permettront ensuite de tester leur implication dans l'effet de maintenance neuronale chez le mutant *mig-6*.

D'autre part, les laminines sont connues pour interagir avec de nombreux récepteurs cellulaires tels que les intégrines, dystroglycanes et le protéoglycane à chaîne

d'héparane sulfate tel que Syndécan. Des mutations au sein de chaque gène de sous-unité α de la laminine provoquent des adhésions cellulaires anormales dans des régions associées à la localisation de la sous-unité (Huang *et al.*, 2003). Certaines cellules n'arrivent pas à établir les connexions appropriées avec les tissus adjacents, tandis que d'autres cellules adhèrent de manière inappropriée et envahissent les tissus voisins (Huang *et al.*, 2003), révélant ainsi une MEC manquante ou anormale avec des complexes d'adhésion mal positionnés et des éléments du cytosquelette désorientés. Selon notre hypothèse, la perte de fonction de *mig-6* entraîne un remodelage matriciel à l'origine de l'effet de maintenance neuronale. Il est alors possible que ce remodelage matriciel chez les mutants *mig-6*, via une surexpression de laminines, soutienne indirectement une amélioration de l'adhésion cellulaire et renforce les connexions des cellules aux tissus adjacents. Ainsi, une étude de l'expression/distribution et de l'implication des intégrines aiderait à mieux comprendre ce mécanisme de maintenance neuronale chez le mutant *mig-6*.

4.2 Interaction de *mig-6* avec la voie TGF- β

4.2.1 Influence de la signalisation par TGF- β sur la maintenance neuronale et le collagène IV

Chez les mammifères, il est connu que la voie de TGF- β régule la production et/ou l'accumulation du collagène IV dans de nombreux contextes et que cette régulation fait intervenir diverses métalloprotéinases matricielles (par exemple, MMP-2, MMP-8, MMP-9 et MMP-13). Chez *C. elegans*, des études détaillent l'implication de la signalisation de TGF- β dans la production de plusieurs collagènes de la cuticule recouvrant le corps du ver (qui est produite par l'épiderme). Cependant, rien n'est connu sur les interactions potentielles de la voie TGF- β avec la MEC basale qui entoure les neurones et de son rôle potentiel dans sa régulation. Dans cette étude, nous mettons en évidence le rôle de la papiline comme possible régulateur négatif de la voie TGF- β .

En effet, les effets résultant de la perte de fonction de *mig-6* - tant sur le phénotype collagène IV (niveau d'accumulation, structures fibrotiques) que sur le phénotype neuronal (suppression des défauts de maintenance des mutants *sax-7*) - sont magnifiés par l'inhibition de TGF- β (Figures 3.9 et 3.10). Il s'agit de la première interaction génétique démontrée à ce jour entre *mig-6* et la voie TGF- β . De nombreuses expériences restent à faire pour mieux déchiffrer cette interaction, telles que :

- caractériser le lieu d'action de la voie TGF- β dans ce contexte de maintenance neuronale (en faisant de tests de sauvetage tissu-spécifiques). Par exemple, le ligand provient-il des cellules épidermales ou des neurones?
- analyser le phénotype de maintenance neuronale en condition de suractivation de la voie de TGF- β (grâce à des surexpressions de différents composants de cette voie)
- déterminer l'activité de TGF- β en contexte de mutant *mig-6* (mesure de la longueur des vers, rapporteurs fluorescent réagissant à l'intensité de l'activation de TGF- β).

D'ailleurs, au vu de l'affinité entre le ligand de TGF- β et le collagène IV démontrée chez les mammifères où en condition *in vitro* par immunoprécipitation, le ligand de TGF- β s'est retrouvé fortement lié au collagène IV (Paralkar *et al.*, 1991). Il est concevable qu'en contexte de mutant *mig-6*, où la MEC est enrichie en collagène IV, le ligand DBL-1 soit préférentiellement retenu par des accumulations de collagène IV.

4.2.2 Influence de TGF- β sur les niveaux de la papiline

Les niveaux et/ou la distribution de la protéine MIG-6S/papiline sont modifiés par une signalisation de TGF- β altérée (soit dans des mutants du ligand DBL-1 ou des effecteurs intracellulaires SMA-2/SMA-3, soit par surexpression du récepteur SMA-6) (Figure 3.11). Cette augmentation de l'expression de la papiline en cas de modulation de la signalisation de TGF- β (perte de fonction et surexpression) pose de nombreuses

questions. Selon notre hypothèse, la protéine MIG-6 participe à la flexibilité matricielle. De façon temporelle, chez *C. elegans* la signalisation de TGF- β est majoritairement active durant le développement, pour induire la croissance du corps et la transcription de gènes morphogènes (Savage-Dunn et Padgett, 2017). Par la suite, cette signalisation demeure dans un état latent durant l'âge adulte (Savage-Dunn et Padgett, 2017). Il est possible que l'expression de la papiline soit finement régulée par des facteurs influencés par l'activité de TGF- β . Une surexpression et une absence de signalisation seraient perçues comme un besoin de plasticité matricielle afin de favoriser des changements morphologiques (diffusion de ligands morphogènes, modifications structurelles ou différenciation cellulaire, etc.). À l'inverse, l'état latent dans lequel la signalisation de TGF- β se trouve durant l'âge adulte pourrait être un parallèle à la « période critique » chez les mammifères, signalant ainsi le besoin de maintenance des structures préalablement établies.

De nombreuses expériences restent à faire afin de comprendre cette interaction. Une étude transcriptomique comparant le profil transcriptionnel des vers de type sauvage, des mutants et des surexpressions de la voie de TGF- β aideraient à l'identification de facteurs pouvant influencer l'expression de la papiline. En effet, une régulation à la hausse de gènes en condition de mutant ou de surexpression de TGF- β , comparativement au type sauvage, pourrait aider à identifier des facteurs impliqués dans cette modulation.

4.3 Prédiction de la structure de la protéine MIG-6S, des conséquences de la mutation *mig-6(qv33)* et ouverture sur d'autres possibles interacteurs moléculaires

Afin d'aider à comprendre l'effet de perte de fonction de la mutation *qv33* sur MIG-6S/papiline, on a utilisé Alphafold (<https://alphafold.ebi.ac.uk>), en collaboration avec le Pr Laurent Cappadocia (Dépt. de chimie, UQAM). Ainsi, nous avons visualisé (1) la structure tridimensionnelle de MIG-6S (données non montrées) déterminé les

possibles conséquences de la mutation *qv33* sur la molécule MIG-6S (Annexe : Figure 4.2). En effet, la mutation *qv33* (G664E) est situé dans le domaine « papiline cassette » de MIG-6. Comparativement aux autres mutations de *mig-6* répertoriées, seules les mutations affectant la région « papiline cassette » ont un phénotype de maintenance de l'architecture neuronale (Nadour *et al.*, en préparation). De plus, une surexpression de cette « papiline cassette » dans des animaux double mutant *sax-7 ; mig-6* est suffisante pour contrecarrer l'effet de maintenance neuronale du mutant *mig-6*. Nos prédictions Alphafold révèlent que cette mutation *qv33* (G664E) dans la « papiline cassette » engendre un encombrement stérique après repliement de la protéine. Cela aurait pour conséquence de déstabiliser le domaine et ainsi empêcher les interactions avec de possibles partenaires moléculaires.

Avec de meilleurs outils bio-informatiques, ces travaux préliminaires pourraient être supplémentés par un « blast » de la séquence de MIG-6S sur un ensemble de protéines (matricielles, membranaires, ligands, etc.) basé sur la littérature. Des interacteurs structuraux théoriques devraient être subséquentement testés par différentes approches génétiques et biochimiques (mutations, surexpression, marquage par fluorescence, etc.).

4.4 Autres études du rôle de MIG-6S à venir

4.4.1 Test de sauvetage de *mig-6* en niveau endogène

Des tests de sauvetage tissu-spécifique de *mig-6(qv33)* en multicopie ont montré un retour de défauts d'organisation neuronale à partir des muscles, chez le double mutant *sax-7 ; mig-6* (de 30 à 80% de défauts) (Nadour *et al.*, en préparation). Cependant, l'expression de MIG-6S sauvage sous son propre promoteur en multicopie, chez le double mutant *sax-7 ; mig-6*, n'induit pas un effet aussi prononcé (de 30 à 50% de défaut) (Nadour *et al.*, en préparation). Ainsi, il est possible que le niveau précis d'expression de MIG-6S puisse altérer sa fonction au sein de la MEC. D'autre part, de

précédentes études ont montré que la mutation *mig-6* est haplo-insuffisante tant dans la maintenance neuronale que sur le remodelage du collagène IV (Kawano *et al.*, 2009; Nadour *et al.*, en préparation). Le fait que l'état génotypique hétérozygote des mutations du gène *mig-6* (dont *qv33*) résulte en des défauts phénotypiques indique que la mutation n'est pas récessive. Ainsi, la moitié de la dose normale de la fonction du gène *mig-6* est insuffisante pour répondre à la demande fonctionnelle de MIG-6/papiline, suggérant que ses niveaux doivent être importants et finement régulés. Des essais de sauvetage en copie unique (en insérant une copie simple du gène *mig-6* dans le génome) des mutants *sax-7; mig-6* pourraient donc aider à obtenir des niveaux de sauvetage plus conséquents.

4.4.2 Est-ce que *mig-6* participe au maintien neuronal lors du vieillissement ?

L'effet du mutant *mig-6* sur la maintenance neuronale a pour l'instant été démontré dans des contextes de maintenance (chez le mutant *sax-7*, du 4^{ème} et dernier stade larvaire au Jour 2 d'âge adulte). Afin d'étendre cette étude, l'observation d'âges avancés dans le processus de vieillissement (Jour 5, Jour 8, Jour 10 d'âge adulte) permettrait d'ouvrir des perspectives de recherche quant à la capacité de la MEC à compenser la perte d'une molécule d'adhésion cellulaire sur le long terme en maintenant en place l'architecture neuronale.

De plus, l'effet de maintenance des structures neuronales du mutant *mig-6* simple, comparé au types sauvage, a précédemment été mis à l'épreuve via des expériences de stress mécanique accru révélant sa capacité à maintenir en place la position du neurophile et à conserver des structures fibrotiques (Biard, 2021; Nadour *et al.*, en préparation). L'aspect de la maintenance à long terme de ces structures fibrotiques de collagène IV et de l'architecture neuronale méritent d'être étudiés.

Une autre catégorie d'altération neuronale est celle qui survient avec l'âge chez le type sauvage. En effet, le vieillissement entraîne l'apparition de projections supplémentaires

sur des structures neuronales déjà matures (Bénard et Doitsidou, 2016; Khandekar *et al.* ; Pan *et al.*, 2011; Tank *et al.*, 2011; Toth *et al.*, 2012). Ainsi, grâce aux rapporteurs fluorescents décrits par la littérature, on pourrait se demander si la perte de fonction de *mig-6* permet de diminuer ou encore éviter l'apparition de projections axonales supplémentaires.

Enfin, ici nous avons étudié l'effet de *mig-6* sur la maintenance des ganglions neuronaux antérieurs (observation de neurones ASH et ASI). Afin de généraliser l'implication du gène *mig-6* dans la maintenance de l'architecture neuronale sur l'ensemble du système nerveux, on pourrait étudier l'effet de *sax-7* et de *mig-6* sur d'autres types de neurones (moteurs, interneurones, sensoriels). Par la suite, nous pourrions approfondir l'étude de l'importance de *mig-6* dans le maintien des circuits neuronaux en examinant la structure de synapses. Pour cela, des rapporteurs fluorescents pré- et post-synaptiques exprimés dans différents types de neurones (GABAergique, cholinergique, etc.) seraient analysés. La perte de *sax-7* entraîne-t-elle des défauts d'agencement synaptiques ? La perte de fonction de *mig-6* permet-elle de supprimer ces défauts ?

D'autre part, des essais de fonctionnalité neuronale peuvent être effectués afin de déterminer si la restauration de l'organisation neuronale du mutant *mig-6* chez le mutant *sax-7* permet de conserver les fonctions normales. En effet, des données préliminaires suggèrent que le mutant *sax-7* possède des facultés limitées/moindres à des tests d'attraction/répulsion chimique. Ainsi, il est possible que la restauration de l'architecture neuronale médiée par le mutant *mig-6* restaure également les fonctionnalités neuronales amoindries par le mutant *sax-7* et ainsi revenir à des niveaux normaux.

4.4.3 Analyse du matrisome du mutant *mig-6*

Afin d'obtenir une vue d'ensemble des changements des niveaux protéiques dus à la perte de fonction de *mig-6*, une étude protéomique pourrait être réalisée sur *C. elegans*. L'approche protéomique permettra d'une part de vérifier les résultats d'expression de protéines matricielles obtenus par quantification de fluorescence et d'autre part elle permettra de trouver de nouveaux axes de recherche pour comprendre pourquoi certaines autres protéines seraient affectées par l'activité de MIG-6.

Ces expériences devront être réalisées, idéalement, sur des vers du stade L4 avancé/final afin d'éviter que les profils protéiques des embryons présents dans la gonade chez les adultes, et des larves en développement (L1 à jeune L4) ne masquent des modifications générées par la perte de fonction de *mig-6*. Aussi, la MEC étant un environnement extrêmement riche en protéines (ligands, facteurs de régulations, enzymes matricielles, composants structuraux de la MEC, etc.), nos essais préliminaires (données non montrées) révèlent qu'il est difficile d'extraire les composants de la MEC sans protocole adapté à son extraction. Ainsi, pour enrichir nos analyses protéomiques, une adaptation des protocoles de protéomique grâce à des étapes supplémentaires de décellularisation, utilisation de Triton/sonication, ainsi que d'autres traitements complémentaires permettant la cassure de super structures (telles que les feuillettes de laminines, les grilles de collagènes IV réticuler, etc.) en petits peptides plus solubles et donc analysables par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. Grâce à ces approches, nous devrions pouvoir obtenir un aperçu des modifications protéiques du mutant *mig-6* comparativement au type sauvage nous permettant d'approfondir nos analyses à l'échelle de l'organisme.

CONCLUSION

En somme, ces travaux de maîtrise ont permis d'approfondir la contribution de la MEC et de la voie de TGF- β dans un contexte de maintenance de l'architecture du système nerveux chez *C. elegans*. La MEC est un milieu où de multiples facteurs et interactions ont lieu et s'intègrent. Son étude est ardue et nécessite une approche minutieuse et systématique. Notre modèle *C. elegans* permet, du fait de sa simplicité et de la grande conservation évolutive entre lui et l'humain, de commencer à déchiffrer les mystères de régulation et d'interaction se produisant dans ce milieu.

Ainsi, les résultats de cette étude définissent les conséquences d'une perte de fonction de la MIG-6S/papiline sur l'organisation et sur les niveaux de nombreuses protéines matricielles pour compenser les défauts d'adhésion cellulaire des mutants de maintenance *sax-7/L1CAM*. La découverte de l'implication de la fibuline comme acteur important dans ce mécanisme de maintenance neuronale et le profil « similaire » de localisation de la fibuline et du collagène IV suscitent de nombreuses interrogations quant à son rôle dans ce contexte.

Le nidogène et le perlécan, du fait de leurs interactions matricielles, sont des composants de la MEC dont il faudrait approfondir plus en détail l'implication dans l'effet médié par *mig-6* sur la maintenance neuronale. Néanmoins, les quelques résultats obtenus montrent la spécificité de certains composants et constituent une ébauche de l'élucidation de la modulation des composants de la MEC et de leur hiérarchie fonctionnelle pour maintenir l'architecture neuronale. Nous avons pu définir les modifications de niveaux et de distribution du collagène IV et de la laminine chez le mutant *mig-6*. De précédents travaux démontrent leur importance pour maintenir la conformation de nombreuses structures organiques telles que les jonctions neuromusculaires et la forme de vaisseaux sanguins (Hunter *et al.*, 1990; Samuel *et al.*,

2012; Weber, 1989). Dans notre contexte, on montre qu'une homéostasie matricielle différente peut compenser partiellement le rôle de protéines d'adhésion cellulaire.

Par la suite, l'identification de la voie de TGF- β comme modificateur des niveaux de MIG-6S et comme interacteur (en combinaison avec la mutation *mig-6*) dans le phénotype neuronal et du collagène IV amène des questions quant au rôle de la papiline. De futures expériences permettront de détailler leur interaction avec les neurones et la MEC pour maintenir l'assemblage des structures neuronales face aux défis que représentent la maturation, la croissance, les stress mécaniques et le vieillissement tout au long de la vie. La signalisation de TGF- β étant très étudiée, on pourra définir de façon détaillée et spécifique l'interaction de la papiline au sein de cette régulation. Le fait de tester ces mutants et les réactions résultantes permet de mieux comprendre la fonction de ces gènes, leurs rôles et comment ils sont conservés dans l'évolution.

À ce jour, aucune maladie n'a pour le moment été répertoriée en lien avec la papiline. Bien que de nombreuses expériences sont à venir afin de comprendre le rôle de la papiline et connaître ses interacteurs, les expériences effectuées dans cette étude ont pu mettre en évidence l'interaction de *mig-6* avec une voie de signalisation. Par son interaction avec la voie de TGF- β , qui est impliquée dans de nombreuses pathologies, un lien pourrait être fait avec le syndrome de Loeys-Dietz. Ce syndrome est une maladie génétique touchant le tissu conjonctif, qui entraîne des altérations au niveau du cœur, des vaisseaux sanguins, des os, des articulations, de la peau et des organes internes tels que les intestins, la rate et l'utérus. Parmi les caractéristiques de cette maladie, on trouve notamment l'élargissement de l'aorte, qui correspond à une expansion du vaisseau sanguin principal transportant le sang du cœur vers le reste du corps, pouvant mettre la vie en danger. Cette pathologie est causée par une mutation (héréditaire ou spontanée) quelconque d'un composant de la signalisation de TGF- β entraînant sa perte de fonction. Nous espérons, à terme, que ces travaux sur la papiline

contribueront à faire avancer les connaissances sur ce genre de maladie et que les interactions mises en évidence aideront à l'élaboration de diagnostics et traitements.

BIBLIOGRAPHIE

- Ackley, B. D., Kang, S. H., Crew, J. R., Suh, C., Jin, Y. et Kramer, J. M. (2003, May 1). The basement membrane components nidogen and type XVIII collagen regulate organization of neuromuscular junctions in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 23(9), 3577-3587. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-09-03577.2003>
- Albertson, D. G., Thompson, J. N. et Brenner, S. (1976). The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 275(938), 299-325. <https://doi.org/doi:10.1098/rstb.1976.0085>
- Altun, Z., Herndon, L., Wolkow, C., Crocker, C., Lints, R. et Hall, D. ((ed.s) 2002-2023). *WormAtlas*. <http://wormatlas.org>.
- Amran, A., Pigatto, L., Pocock, R. et Gopal, S. (2021, 2021/08/01/). Functions of the extracellular matrix in development: Lessons from *Caenorhabditis elegans*. *Cellular Signalling*, 84, 110006. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110006>
- Andersen, J., Krichevsky, A., Leheste, J. R. et Moloney, D. J. (2008, Nov). *Caenorhabditis elegans* as an undergraduate educational tool for teaching RNAi. *Biochem Mol Biol Educ*, 36(6), 417-427. <https://doi.org/10.1002/bmb.20233>
- Aurelio, O., Hall, D. H. et Hobert, O. (2002). Immunoglobulin-domain proteins required for maintenance of ventral nerve cord organization. *Science*, 295(5555), 686-690.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., SEIDMAN, J., Smith, J. et KRUHL, K. (1990). *Current protocols in molecular biology. Vol 1. John USA* : Wiley and Sons, Inc.
- Balbona, K., Tran, H., Godyna, S., Ingham, K. C., Strickland, D. K. et Argraves, W. S. (1992, Oct 5). Fibulin binds to itself and to the carboxyl-terminal heparin-binding region of fibronectin. *J Biol Chem*, 267(28), 20120-20125. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)88674-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)88674-X)
- Baltaci, O., Pedersen, M. E., Sherry, T., Handley, A., Snieckute, G., Cao, W., Haas, M., Archer, S. et Pocock, R. (2022, Feb 18). Atypical TGF- β signaling controls neuronal guidance in *Caenorhabditis elegans*. *iScience*, 25(2), 103791. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103791>
- Barth, J. L., Argraves, K. M., Roark, E. F., Little, C. D. et Argraves, W. S. (1998, Dec). Identification of chicken and *C. elegans* fibulin-1 homologs and characterization of the *C. elegans* fibulin-1 gene. *Matrix Biol*, 17(8-9), 635-646. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(98\)90114-7](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(98)90114-7)

- Battaglia, C., Mayer, U., Aumailley, M. et Timpl, R. (1992, Sep 1). Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *Eur J Biochem*, 208(2), 359-366. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17195.x>
- Béjot, Y. et Yaffe, K. (2019). Ageing population: a neurological challenge. *Neuroepidemiology*, 52(1-2), 76-77. <https://doi.org/10.1159/000495813>
- Bénard, C. Y., Blanchette, C., Recio, J. et Hobert, O. (2012). The Secreted Immunoglobulin Domain Proteins ZIG-5 and ZIG-8 Cooperate with L1CAM/SAX-7 to Maintain Nervous System Integrity. *PLOS Genetics*, 8(7), e1002819. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002819>
- Bénard, C. Y., Boyanov, A., Hall, D. H. et Hobert, O. (2006). DIG-1, a novel giant protein, non-autonomously mediates maintenance of nervous system architecture. <https://doi.org/10.1242/dev.02507>
- Bénard, C. Y. et Doitsidou, M. (2016). Ageing: Lessons from *C. elegans*. *Springer*, 163-189.
- Bénard, C. Y. et Hobert, O. (2009). Looking beyond development: maintaining nervous system architecture. *Curr Top Dev Biol*, 87, 175-194. [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(09\)01206-x](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(09)01206-x)
- Bénard, C. Y., Tjoe, N., Boulin, T., Recio, J. et Hobert, O. (2009). The small, secreted immunoglobulin protein ZIG-3 maintains axon position in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 183(3), 917-927. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.107441>
- Biard, M. (2021). Protection à long terme du système nerveux: étude de facteurs extrinsèques chez *C. elegans*. <https://doi.org/https://doi.org/1866/26204>
- Bonche, R. (2019). *Rôles du Perlécane de la membrane basale dans la morphogénèse épithéliale chez Drosophila melanogaster* Université Côte d'Azur]. <https://theses.hal.science/tel-03473745>
- Boulin, T., Etchberger, J. F. et Hobert, O. (2006, Apr 5). Reporter gene fusions. *WormBook*, 1-23. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.106.1>
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- Bülöw, H. E., Boulin, T. et Hobert, O. (2004). Differential functions of the *C. elegans* FGF receptor in axon outgrowth and maintenance of axon position. *Neuron*, 42(3), 367-374. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(04\)00246-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(04)00246-6)

- Byerly, L., Cassada, R. C. et Russell, R. L. (1976, Jul 1). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev Biol*, 51(1), 23-33. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90119-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90119-6)
- Calixto, A., Chelur, D., Topalidou, I., Chen, X. et Chalfie, M. (2010). Enhanced neuronal RNAi in *C. elegans* using SID-1. *Nature methods*, 7(7), 554-559. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1463>
- Cao, J., Packer, J. S., Ramani, V., Cusanovich, D. A., Huynh, C., Daza, R., Qiu, X., Lee, C., Furlan, S. N., Steemers, F. J., Adey, A., Waterston, R. H., Trapnell, C. et Shendure, J. (2017, Aug 18). Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science*, 357(6352), 661-667. <https://doi.org/10.1126/science.aam8940>
- Cassada, R. et Russell, R. (1975, 11/01). Cassada, R. C. & Russell, R. L. The dauer larva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *C. elegans*. *Dev. Biol.* 46, 326-342. *Developmental biology*, 46, 326-342. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90109-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90109-8)
- Chai, Q., Krag, S., Miner, J. H., Nyengaard, J. R., Chai, S. et Wogensen, L. (2003). TGF-beta1 induces aberrant laminin chain and collagen type IV isotype expression in the glomerular basement membrane. *Nephron Exp Nephrol*, 94(4), e123-136. <https://doi.org/10.1159/000072496>
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. et Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805.
- Chase, D. L. et Koelle, M. R. (2007, Feb 20). Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*. *WormBook*, 1-15. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.132.1>
- Chen, L. et Zhou, S. (2010). "CRASH" ing with the worm: insights into L1CAM functions and mechanisms. *Developmental dynamics: An official publication of the American Association of Anatomists*, 239(5), 1490-1501. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22269>
- Chen, X., Rubock, M. J. et Whitman, M. (1996). A transcriptional partner for MAD proteins in TGF- β signalling. *Nature*, 383(6602), 691-696. <https://doi.org/10.1038/383691a0>
- Chen, Y. G., Liu, F. et Massague, J. (1997, Jul 1). Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *Embo j*, 16(13), 3866-3876. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3866>
- Colognato, H. et Yurchenco, P. D. (2000, Jun). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*, 218(2), 213-234. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0177\(200006\)218:2<213::Aid-dvdy1>3.0.Co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0177(200006)218:2<213::Aid-dvdy1>3.0.Co;2-r)
- Consortium*, C. e. S. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 282(5396), 2012-2018.

- Culetto, E. et Sattelle, D. B. (2000, Apr 12). A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum Mol Genet*, 9(6), 869-877. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.6.869>
- Dai, J., Estrada, B., Jacobs, S., Sánchez-Sánchez, B. J., Tang, J., Ma, M., Magadán-Corpas, P., Pastor-Pareja, J. C. et Martín-Bermudo, M. D. (2018). Dissection of Nidogen function in *Drosophila* reveals tissue-specific mechanisms of basement membrane assembly. *PLOS Genetics*, 14(9), e1007483. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007483>
- Das, A., Franco, J. A., Wang, L., Chapman, D., Wang, L. M., Jaisinghani, C., Pruitt, B. L. et Goodman, M. B. (2022). Conserved basal lamina proteins, laminin and nidogen, are repurposed to organize mechanosensory complexes responsible for touch sensation. *bioRxiv*, 2022.2002.2011.479800. <https://doi.org/10.1101/2022.02.11.479800>
- Daul, A., Andersen, E. et Rougvié, A. (2019). The *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) and the *Caenorhabditis elegans* Natural Diversity Resource. Dans (p. 69-94). <https://doi.org/10.1201/9781315100999-5>.
- Derynck, R., Zhang, Y. et Feng, X. H. (1998, Dec 11). Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*, 95(6), 737-740. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81696-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81696-7)
- Desse, V. E., Blanchette, C. R., Nadour, M., Perrat, P., Rivollet, L., Khandekar, A. et Bénard, C. Y. (2021). Neuronal postdevelopmentally acting SAX-7S/L1CAM can function as cleaved fragments to maintain neuronal architecture in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 218(4), iyab086. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab086>
- Ducros, E., Berthaut, A., Mirshahi, P., Lemarchand, S., Soria, J., Legeais, J. M. et Mirshahi, M. (2007, Jun). Expression of extracellular matrix proteins fibulin-1 and fibulin-2 by human corneal fibroblasts. *Curr Eye Res*, 32(6), 481-490. <https://doi.org/10.1080/02713680701411269>
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A. et Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, 4(11), 1313-1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Estevez, M., Attisano, L., Wrana, J. L., Albert, P. S., Massagué, J. et Riddle, D. L. (1993, Oct 14). The *daf-4* gene encodes a bone morphogenetic protein receptor controlling *C. elegans* dauer larva development. *Nature*, 365(6447), 644-649. <https://doi.org/10.1038/365644a0>
- Feinberg, E. H., Vanhoven, M. K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R. D., Shen, K. et Bargmann, C. I. (2008, Feb 7). GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron*, 57(3), 353-363. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.030>

- Fessler, J. H., Kramerova, I., Kramerov, A., Chen, Y. et Fessler, L. I. (2004, Jun). Papilin, a novel component of basement membranes, in relation to ADAMTS metalloproteases and ECM development. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(6), 1079-1084. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.12.010>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. et Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Gally, C. et Bessereau, J.-L. (2003). *C. elegans* : des neurones et des gènes. *M/S : médecine sciences*, 19(6-7), 725-734. <https://id.erudit.org/iderudit/006835ar>
- Gengyo-Ando, K., Kamiya, Y., Yamakawa, A., Kodaira, K., Nishiwaki, K., Miwa, J., Hori, I. et Hosono, R. (1993, Oct). The *C. elegans* unc-18 gene encodes a protein expressed in motor neurons. *Neuron*, 11(4), 703-711. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90080-b](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90080-b)
- Georgi, L. L., Albert, P. S. et Riddle, D. L. (1990, May 18). daf-1, a *C. elegans* gene controlling dauer larva development, encodes a novel receptor protein kinase. *Cell*, 61(4), 635-645. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90475-t](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90475-t)
- Golgi, C. (1893). Intorno all'origine del quarto nervo cerebrale e una questione istofisiologica a questo argomento si collega. . *Rendiconti della Reale Accademia Del Lincei* 2, 433-450.
- Goodman, M. B. et Savage-Dunn, C. (2022). Reciprocal interactions between transforming growth factor beta signaling and collagens: Insights from *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Dynamics*, 251(1), 47-60. <https://doi.org/10.1002/dvdy.423>
- Gotenstein, J. R., Koo, C. C., Ho, T. W. et Chisholm, A. D. (2018, Apr). Genetic Suppression of Basement Membrane Defects in *Caenorhabditis elegans* by Gain of Function in Extracellular Matrix and Cell-Matrix Attachment Genes. *Genetics*, 208(4), 1499-1512. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300731>
- Gotenstein, J. R., Swale, R. E., Fukuda, T., Wu, Z., Giurumescu, C. A., Goncharov, A., Jin, Y. et Chisholm, A. D. (2010, Nov). The *C. elegans* peroxidasin PXN-2 is essential for embryonic morphogenesis and inhibits adult axon regeneration. *Development*, 137(21), 3603-3613. <https://doi.org/10.1242/dev.049189>
- Grande, J. P., Melder, D. C. et Zinsmeister, A. R. (1997, Nov). Modulation of collagen gene expression by cytokines: stimulatory effect of transforming growth factor-beta1, with divergent effects of epidermal growth factor and tumor necrosis factor-alpha on collagen type I and collagen type IV. *J Lab Clin Med*, 130(5), 476-486. [https://doi.org/10.1016/s0022-2143\(97\)90124-4](https://doi.org/10.1016/s0022-2143(97)90124-4)

- Gumienny, T. L. et Savage-Dunn, C. (2013, Jul 10). TGF- β signaling in *C. elegans*. *WormBook*, 1-34. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.22.2>
- Guo, X., Johnson, J. J. et Kramer, J. M. (1991). Embryonic lethality caused by mutations in basement membrane collagen of *C. elegans*. *Nature*, 349(6311), 707-709. <https://doi.org/10.1038/349707a0>
- Hammarlund, M., Hobert, O., Miller, D. M., 3rd et Sestan, N. (2018, Aug 8). The CeNGEN Project: The Complete Gene Expression Map of an Entire Nervous System. *Neuron*, 99(3), 430-433. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.042>
- Hanada, K. et Sasaki, T. (2018). Expression and purification of recombinant fibulins in mammalian cells. *Methods Cell Biol*, 143, 247-259. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.08.014>
- Hedgecock, E. M., Culotti, J. G., Hall, D. H. et Stern, B. D. (1987). Genetics of cell and axon migrations in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 100(3), 365-382. <https://doi.org/10.1242/dev.100.3.365>
- Hedgecock, E. M., Sulston, J. E. et Thomson, J. N. (1983). Mutations Affecting Programmed Cell Deaths in the Nematode *Caenorhabditis elegans* *Science*, 220(4603), 1277-1279. <https://doi.org/10.1126/science.6857247>
- Hesselson, D., Newman, C., Kim, K. W. et Kimble, J. (2004, Nov 23). GON-1 and fibulin have antagonistic roles in control of organ shape. *Curr Biol*, 14(22), 2005-2010. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.11.006>
- Hodgkin, J. (1988). Sexual dimorphism and sex determination. In *The nematode C. elegans Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chap. 9*, 243-279.
- Hodgkin, J., Horvitz, H. R. et Brenner, S. (1979, Jan). Nondisjunction Mutants of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 91(1), 67-94. <https://doi.org/10.1093/genetics/91.1.67>
- Hohenester, E. et Yurchenco, P. D. (2013). Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adhesion & Migration*, 7(1), 56-63. <https://doi.org/10.4161/cam.21831>
- Holmberg, J. et Durbeej, M. (2013). Laminin-211 in skeletal muscle function. *Cell Adhesion & Migration*, 7(1), 111-121. <https://doi.org/10.4161/cam.22618>
- Hopf, M., Göhring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y. et Timpl, R. (1999, Feb). Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur J Biochem*, 259(3), 917-925. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00127.x>

- Hortsch, M., Nagaraj, K. et Mualla, R. (2014). The L1 family of cell adhesion molecules: a sickening number of mutations and protein functions. *Adv Neurobiol*, 8, 195-229. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8090-7_9
- Hu, P. (2007). Dauer, WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology.
- Hua, J. Y. et Smith, S. J. (2004). Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nature neuroscience*, 7(4), 327-332. <https://doi.org/10.1038/nn1218>
- Huang, C.-C., Hall, D. H., Hedgecock, E. M., Kao, G., Karantza, V., Vogel, B. E., Hutter, H., Chisholm, A. D., Yurchenco, P. D. et Wadsworth, W. G. (2003). Laminin α subunits and their role in *C. elegans* development. *Development*, 130(14), 3343-3358. <https://doi.org/10.1242/dev.00481>
- Huminiecki, L., Goldovsky, L., Freilich, S., Moustakas, A., Ouzounis, C. et Heldin, C. H. (2009, Feb 3). Emergence, development and diversification of the TGF-beta signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evol Biol*, 9, 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-28>
- Hunter, I., Schulthess, T., Bruch, M., Beck, K. et Engel, J. (1990). Evidence for a specific mechanism of laminin assembly. *European Journal of Biochemistry*, 188(2), 205-211. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15391.x>
- Hutter, H. (2003). Extracellular cues and pioneers act together to guide axons in the ventral cord of *C. elegans*. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.00727>
- Hutter, H. et Suh, J. (2016). GExplore 1.4: An expanded web interface for queries on *Caenorhabditis elegans* protein and gene function. *Worm*, 5(4), e1234659. <https://doi.org/10.1080/21624054.2016.1234659>
- Ihara, S., Hagedorn, E. J., Morrissey, M. A., Chi, Q., Motegi, F., Kramer, J. M. et Sherwood, D. R. (2011, Jun). Basement membrane sliding and targeted adhesion remodels tissue boundaries during uterine-vulval attachment in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol*, 13(6), 641-651. <https://doi.org/10.1038/ncb2233>
- Imanishi, A., Aoki, Y., Kakehi, M., Mori, S., Takano, T., Kubota, Y., Kim, H.-S., Shibata, Y. et Nishiwaki, K. (2021). Genetic interactions among ADAMTS metalloproteases and basement membrane molecules in cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE*, 16(12), e0261880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261880>
- Inoue, T. et Thomas, J. H. (2000, Jan 1). Targets of TGF-beta signaling in *Caenorhabditis elegans* dauer formation. *Dev Biol*, 217(1), 192-204. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9545>

- Jayadev, R., Chi, Q., Keeley, D. P., Hastie, E. L., Kelley, L. C. et Sherwood, D. R. (2019). α -Integrins dictate distinct modes of type IV collagen recruitment to basement membranes. *Journal of Cell Biology*, 218(9), 3098-3116.
- Jayadev, R. et Sherwood, D. R. (2017). Basement membranes. *Current Biology*, 27(6), R207-R211. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.006>
- Kaletta, T. et Hengartner, M. O. (2006, May). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov*, 5(5), 387-398. <https://doi.org/10.1038/nrd2031>
- Kamath, R. S. et Ahringer, J. (2003, Aug). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*, 30(4), 313-321. [https://doi.org/10.1016/s1046-2023\(03\)00050-1](https://doi.org/10.1016/s1046-2023(03)00050-1)
- Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G. et Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol*, 2(1), Research0002. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-2-1-research0002>
- Kanae, M., Akihiro, K. et Shinji, I. (2019). Visualization of endogenous NID-1 and EMB-9 in *C. elegans*. *microPublication Biology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.17912/micropub.biology.0001104/19/2019> - Open Access
- Kang, S. H. et Kramer, J. M. (2000). Nidogen is nonessential and not required for normal type IV collagen localization in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology of the cell*, 11(11), 3911-3923. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.11.3911>
- Kao, G., Huang, C. C., Hedgecock, E. M., Hall, D. H. et Wadsworth, W. G. (2006, Feb 1). The role of the laminin beta subunit in laminin heterotrimer assembly and basement membrane function and development in *C. elegans*. *Dev Biol*, 290(1), 211-219. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.11.026>
- Karetko, M. et Skangiel-Kramska, J. (2009). Diverse functions of perineuronal nets. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 69(4), 564-577. <https://doi.org/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20048772/>
- Katzman, B. (2017). *Volumetric 3D Reconstruction of Tissues in C. elegans: Part 1*. <https://medium.com/@bradenkatzman/volumetric-3d-reconstruction-of-tissues-in-c-elegans-part-1-443fe3113e15>
- Kawano, T., Zheng, H., Merz, D. C., Kohara, Y., Tamai, K. K., Nishiwaki, K. et Culotti, J. G. (2009, May). *C. elegans* mig-6 encodes papilin isoforms that affect distinct aspects of DTC migration, and interacts genetically with mig-17 and collagen IV. *Development*, 136(9), 1433-1442. <https://doi.org/10.1242/dev.028472>

- Keeley, D. P., Hastie, E., Jayadev, R., Kelley, L. C., Chi, Q., Payne, S. G., Jeger, J. L., Hoffman, B. D. et Sherwood, D. R. (2020, Jul 6). Comprehensive Endogenous Tagging of Basement Membrane Components Reveals Dynamic Movement within the Matrix Scaffolding. *Dev Cell*, 54(1), 60-74.e67. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.05.022>
- Khandekar, A., Chabi, Y., Liu, J.-L., Rivollet, L. et Bénard, C. Y.). Age-related neuronal changes, lifespan pathways and maintenance of neuronal architecture. *en préparation*.
- Kim, H.-S. et Nishiwaki, K. (2015, May-Jul). Control of the basement membrane and cell migration by ADAMTS proteinases: Lessons from *C. elegans* genetics. *Matrix Biol*, 44-46, 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.001>
- Kim, S. et Wadsworth, W. G. (2000, Apr 7). Positioning of longitudinal nerves in *C. elegans* by nidogen. *Science*, 288(5463), 150-154. <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.150>
- Kimble, J. et Hirsh, D. (1979, Jun). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 70(2), 396-417. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(79\)90035-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(79)90035-6)
- Kramerova, I. A., Kawaguchi, N., Fessler, L. I., Nelson, R. E., Chen, Y., Kramerov, A. A., Kusche-Gullberg, M., Kramer, J. M., Ackley, B. D., Sieron, A. L., Prockop, D. J. et Fessler, J. H. (2000, Dec). Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. *Development*, 127(24), 5475-5485. <https://doi.org/10.1242/dev.127.24.5475>
- Kretzschmar, M., Liu, F., Hata, A., Doody, J. et Massague, J. (1997). The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes & development*, 11(8), 984-995. <https://doi.org/10.1101/gad.11.8.984>
- Krishna, S., Maduzia, L. L. et Padgett, R. W. (1999). Specificity of TGFβ signaling is conferred by distinct type I receptors and their associated SMAD proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 126(2), 251-260. <https://doi.org/10.1242/dev.126.2.251>
- Kubota, Y., Kuroki, R. et Nishiwaki, K. (2004). A Fibulin-1 Homolog Interacts with an ADAM Protease that Controls Cell Migration in *C. elegans*. *Current Biology*, 14(22), 2011-2018. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.047>
- Kubota, Y., Nagata, K., Sugimoto, A. et Nishiwaki, K. (2012, Apr). Tissue architecture in the *Caenorhabditis elegans* gonad depends on interactions among fibulin-1, type IV collagen and the ADAMTS extracellular protease. *Genetics*, 190(4), 1379-1388. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133173>

- Kurshan, P. T., Phan, A. Q., Wang, G. J., Crane, M. M., Lu, H. et Shen, K. (2014). Regulation of Synaptic Extracellular Matrix Composition Is Critical for Proper Synapse Morphology. *Journal of Neuroscience*, 34(38), 12678-12689. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1183-14.2014>
- Kwok, J. C., Carulli, D. et Fawcett, J. W. (2010, Sep 1). In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *J Neurochem*, 114(5), 1447-1459. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06878.x>
- Kwok, J. C., Dick, G., Wang, D. et Fawcett, J. W. (2011, Nov). Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol*, 71(11), 1073-1089. <https://doi.org/10.1002/dneu.20974>
- Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A. et Massagué, J. (1996). Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF- β signalling pathways. *Nature*, 383(6603), 832-836. <https://doi.org/10.1038/383832a0>
- Law, J. W., Lee, A. Y., Sun, M., Nikonenko, A. G., Chung, S. K., Dityatev, A., Schachner, M. et Morellini, F. (2003, Nov 12). Decreased anxiety, altered place learning, and increased CA1 basal excitatory synaptic transmission in mice with conditional ablation of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurosci*, 23(32), 10419-10432. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-32-10419.2003>
- Lázaro-Peña, M. I., Díaz-Balzac, C. A., Bülow, H. E. et Emmons, S. W. (2018, May). Synaptogenesis Is Modulated by Heparan Sulfate in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 209(1), 195-208. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300837>
- Lints, R. et Emmons, S. W. (1999, Dec). Patterning of dopaminergic neurotransmitter identity among *Caenorhabditis elegans* ray sensory neurons by a TGFbeta family signaling pathway and a Hox gene. *Development*, 126(24), 5819-5831. <https://doi.org/10.1242/dev.126.24.5819>
- Liu, F., Pouponnot, C. et Massagué, J. (1997, Dec 1). Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev*, 11(23), 3157-3167. <https://doi.org/10.1101/gad.11.23.3157>
- Liu, Q., Kidd, P. B., Dobosiewicz, M. et Bargmann, C. I. (2018, Sep 20). *C. elegans* AWA Olfactory Neurons Fire Calcium-Mediated All-or-None Action Potentials. *Cell*, 175(1), 57-70.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.018>
- Macías-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L. et Wrana, J. L. (1996). MADR2 is a substrate of the TGF β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell*, 87(7), 1215-1224. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81817-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81817-6)

- Mackinnon, A. C., Qadota, H., Norman, K. R., Moerman, D. G. et Williams, B. D. (2002, May 14). *C. elegans* PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr Biol*, 12(10), 787-797. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00810-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00810-2)
- Madaan, U., Faure, L., Chowdhury, A., Ahmed, S., Ciccarelli, E. J., Gumienny, T. L. et Savage-Dunn, C. (2020). Feedback regulation of BMP signaling by *Caenorhabditis elegans* cuticle collagens. *Molecular biology of the cell*, 31(8), 825-832. <https://doi.org/10.1091/mbc.e19-07-0390>
- McEwan, D. L., Weisman, A. S. et Hunter, C. P. (2012). Uptake of extracellular double-stranded RNA by SID-2. *Molecular cell*, 47(5), 746-754. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.014>
- McIntire, S. L., Jorgensen, E., Kaplan, J. et Horvitz, H. R. (1993, Jul 22). The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 364(6435), 337-341. <https://doi.org/10.1038/364337a0>
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J. et Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature medicine*, 25(4), 554-560. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9>
- Morita, K., Chow, K. L. et Ueno, N. (1999). Regulation of body length and male tail ray pattern formation of *Caenorhabditis elegans* by a member of TGF- β family. *Development*, 126(6), 1337-1347. <https://doi.org/10.1242/dev.126.6.1337>
- Morrissey, M. A. et Sherwood, D. R. (2015, May 1). An active role for basement membrane assembly and modification in tissue sculpting. *J Cell Sci*, 128(9), 1661-1668. <https://doi.org/10.1242/jcs.168021>
- Nadour, M., Biard, M., St-Louis, P., Rivollet, L., Thackeray, A. et Bénard, C. Y. (en préparation). MIG-6/Papilin mediates the long-term maintenance of neuronal architecture by regulating the extracellular matrix.
- Nicholson, C. et Syková, E. (1998, May). Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci*, 21(5), 207-215. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01261-2](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01261-2)
- Nigon, V. M. et Felix, M.-A. (2017). History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. *WormBook*, 1-84. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.181.1>

- NobelPrize.org. (2002). *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2002*. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2002/summary/>
- NobelPrize.org. (2006). *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006*. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/summary/>
- NobelPrize.org. (2008). *The Nobel Prize in Chemistry 2008*. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/summary/>
- Padgett, R. W., Das, P. et Krishna, S. (1998). TGF- β signaling, Smads, and tumor suppressors. *Bioessays*, 20(5), 382-390. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199805\)20:5<382::AID-BIES5>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199805)20:5<382::AID-BIES5>3.0.CO;2-Q)
- Pan, C. L., Peng, C. Y., Chen, C. H. et McIntire, S. (2011, May 31). Genetic analysis of age-dependent defects of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(22), 9274-9279. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011711108>
- Pan, T.-C., Kluge, M., Zhang, R.-Z., Mayer, U., Timpl, R. et Chu, M.-L. (1993). Sequence of extracellular mouse protein BM-90/fibulin and its calcium-dependent binding to other basement-membrane ligands. *European Journal of Biochemistry*, 215(3), 733-740. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18086.x>
- Paralkar, V. M., Vukicevic, S. et Reddi, A. H. (1991, 1991/02/01). Transforming growth factor β type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: Implications for development. *Developmental biology*, 143(2), 303-308. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90081-D](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90081-D)
- Patterson, G. I., Koweeck, A., Wong, A., Liu, Y. et Ruvkun, G. (1997, Oct 15). The DAF-3 Smad protein antagonizes TGF-beta-related receptor signaling in the *Caenorhabditis elegans* dauer pathway. *Genes Dev*, 11(20), 2679-2690. <https://doi.org/10.1101/gad.11.20.2679>
- Patterson, G. I. et Padgett, R. W. (2000, Jan). TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends Genet*, 16(1), 27-33. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(99\)01916-2](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(99)01916-2)
- Pereira, L., Kratsios, P., Serrano-Saiz, E., Sheftel, H., Mayo, A. E., Hall, D. H., White, J. G., LeBoeuf, B., Garcia, L. R., Alon, U. et Hobert, O. (2015, Dec 25). A cellular and regulatory map of the cholinergic nervous system of *C. elegans*. *eLife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.12432>
- Perez-Cruz, C., Simon, M., Flügge, G., Fuchs, E. et Czéh, B. (2009). Diurnal rhythm and stress regulate dendritic architecture and spine density of pyramidal neurons in the rat infralimbic cortex. *Behavioural brain research*, 205(2), 406-413. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.07.021>

- Pocock, R., Bénard, C. Y., Shapiro, L. et Hobert, O. (2008). Functional dissection of the *C. elegans* cell adhesion molecule SAX-7, a homologue of human L1. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 37(1), 56-68. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.08.014>
- Prinz, M., Jung, S. et Priller, J. (2019). Microglia biology: one century of evolving concepts. *Cell*, 179(2), 292-311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.053>
- Qadota, H., Matsunaga, Y., Nguyen, K. C. Q., Mattheyses, A., Hall, D. H. et Benian, G. M. (2017, Nov). High-resolution imaging of muscle attachment structures in *Caenorhabditis elegans*. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 74(11), 426-442. <https://doi.org/10.1002/cm.21410>
- Qin, J., Liang, J. et Ding, M. (2014, Jul 30). Perlecan antagonizes collagen IV and ADAMTS9/GON-1 in restricting the growth of presynaptic boutons. *J Neurosci*, 34(31), 10311-10324. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5128-13.2014>
- Ramirez-Suarez, N. J., Belalcazar, H. M., Salazar, C. J., Beyaz, B., Raja, B., Nguyen, K. C. Q., Celestrin, K., Fredens, J., Færgeman, N. J., Hall, D. H. et Bülow, H. E. (2019). Axon-Dependent Patterning and Maintenance of Somatosensory Dendritic Arbors. *Developmental cell*, 48(2), 229-244.e224. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.12.015>
- Reh, R. K., Dias, B. G., Nelson III, C. A., Kaufer, D., Werker, J. F., Kolb, B., Levine, J. D. et Hensch, T. K. (2020). Critical period regulation across multiple timescales. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(38), 23242-23251. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820836117>
- Ren, P., Lim, C. S., Johnsen, R., Albert, P. S., Pilgrim, D. et Riddle, D. L. (1996, Nov 22). Control of *C. elegans* larval development by neuronal expression of a TGF-beta homolog. *Science*, 274(5291), 1389-1391. <https://doi.org/10.1126/science.274.5291.1389>
- Rhodes, K. E. et Fawcett, J. W. (2004). Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *Journal of Anatomy*, 204(1), 33-48. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2004.00261.x>
- Richmond, M. A., Yee, B. K., Pouzet, B., Veenman, L., Rawlins, J. N., Feldon, J. et Bannerman, D. M. (1999, Dec). Dissociating context and space within the hippocampus: effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. *Behav Neurosci*, 113(6), 1189-1203. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.113.6.1189>
- Riddle, D. L. et Albert, P. S. (1997). Genetic and Environmental Regulation of Dauer Larva Development. Dans D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer et J. R. Priess (dir.), *C.*

elegans II. Cold Spring Harbor Laboratory Press Copyright © 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Rogalski, T. M., Williams, B. D., Mullen, G. P. et Moerman, D. G. (1993, Aug). Products of the *unc-52* gene in *Caenorhabditis elegans* are homologous to the core protein of the mammalian basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *Genes Dev*, 7(8), 1471-1484. <https://doi.org/10.1101/gad.7.8.1471>
- Rogers, R. S. et Nishimune, H. (2017, Jan). The role of laminins in the organization and function of neuromuscular junctions. *Matrix Biol*, 57-58, 86-105. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.08.008>
- Samuel, M. A., Valdez, G., Tapia, J. C., Lichtman, J. W. et Sanes, J. R. (2012). Agrin and Synaptic Laminin Are Required to Maintain Adult Neuromuscular Junctions. *PLOS ONE*, 7(10), e46663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046663>
- Sanes, D., Reh, T., Harris, W. et M., L. (2019). Development of the nervous system. *Elsevier*, 390 p. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-01601-2>
- Sarkies, P. et Miska, E. A. (2013, Aug). RNAi pathways in the recognition of foreign RNA: antiviral responses and host-parasite interactions in nematodes. *Biochem Soc Trans*, 41(4), 876-880. <https://doi.org/10.1042/bst20130021>
- Sasakura, H., Inada, H., Kuhara, A., Fusaoka, E., Takemoto, D., Takeuchi, K. et Mori, I. (2005). Maintenance of neuronal positions in organized ganglia by SAX-7, a *Caenorhabditis elegans* homologue of L1. *The EMBO journal*, 24(7), 1477-1488. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600621>
- Savage-Dunn, C., Das, P., Finelli, A. L., Townsend, S. R., Sun, C. Y., Baird, S. E. et Padgett, R. W. (1996). *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(2), 790-794. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.2.790>
- Savage-Dunn, C. et Padgett, R. W. (2017). The TGF- β family in *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(6), a022178.
- Serrano-Saiz, E., Poole, R. J., Felton, T., Zhang, F., De La Cruz, E. D. et Hobert, O. (2013, Oct 24). Modular control of glutamatergic neuronal identity in *C. elegans* by distinct homeodomain proteins. *Cell*, 155(3), 659-673. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.052>
- Shabalina, S. A. et Koonin, E. V. (2008, Oct). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol Evol*, 23(10), 578-587. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.005>

- Shaye, D. D. et Greenwald, I. (2011). OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLOS ONE*, 6(5), e20085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020085>
- Smyth, N., Vatansever, H. S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M. et Edgar, D. (1999, Jan 11). Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol*, 144(1), 151-160. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.1.151>
- Srivastava, M., Begovic, E., Chapman, J., Putnam, N. H., Hellsten, U., Kawashima, T., Kuo, A., Mitros, T., Salamov, A., Carpenter, M. L., Signorovitch, A. Y., Moreno, M. A., Kamm, K., Grimwood, J., Schmutz, J., Shapiro, H., Grigoriev, I. V., Buss, L. W., Schierwater, B., Dellaporta, S. L. et Rokhsar, D. S. (2008, Aug 21). The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature*, 454(7207), 955-960. <https://doi.org/10.1038/nature07191>
- Stiernagle, T. (2006). *Maintenance of C. elegans (February 11, 2006)*, *WormBook*, ed. *The C. elegans Research Community*, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.101.1.
- Sulston, J. E. et Horvitz, H. R. (1977, Mar). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 56(1), 110-156. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90158-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90158-0)
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. et Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, 100(1), 64-119. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90201-4)
- Suzuki, Y., Yandell, M. D., Roy, P. J., Krishna, S., Savage-Dunn, C., Ross, R. M., Padgett, R. W. et Wood, W. B. (1999). A BMP homolog acts as a dose-dependent regulator of body size and male tail patterning in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 126(2), 241-250. <https://doi.org/10.1242/dev.126.2.241>
- Tabara, H., Grishok, A. et Mello, C. C. (1998). RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science*, 282(5388), 430-431. <https://doi.org/10.1126/science.282.5388.430>
- Tailby, C., Wright, L. L., Metha, A. B. et Calford, M. B. (2005). Activity-dependent maintenance and growth of dendrites in adult cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(12), 4631-4636. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402747102>
- Tank, E. M., Rodgers, K. E. et Kenyon, C. (2011, Jun 22). Spontaneous age-related neurite branching in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 31(25), 9279-9288. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.6606-10.2011>
- Teuscher, A. C., Jongsma, E., Davis, M. N., Statzer, C., Gebauer, J. M., Naba, A. et Ewald, C. Y. (2019). The in-silico characterization of the *Caenorhabditis elegans* matrisome and

- proposal of a novel collagen classification. *Matrix Biology Plus*, 1, 100001. <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2018.11.001>
- Thion, M. S. et Garel, S. (2017). On place and time: microglia in embryonic and perinatal brain development. *Current opinion in neurobiology*, 47, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.004>
- Thompson, O., Edgley, M., Strasbourger, P., Flibotte, S., Ewing, B., Adair, R., Au, V., Chaudhry, I., Fernando, L., Hutter, H., Kieffer, A., Lau, J., Lee, N., Miller, A., Raymant, G., Shen, B., Shendure, J., Taylor, J., Turner, E. H., Hillier, L. W., Moerman, D. G. et Waterston, R. H. (2013, Oct). The million mutation project: a new approach to genetics in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res*, 23(10), 1749-1762. <https://doi.org/10.1101/gr.157651.113>
- Timmons, L., Court, D. L. et Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263(1-2), 103-112.
- Timmons, L. et Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395(6705), 854-854. <https://doi.org/10.1038/27579>
- Topp, K. S. et Boyd, B. S. (2006). Structure and biomechanics of peripheral nerves: nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice. *Physical therapy*, 86(1), 92-109. <https://doi.org/10.1093/ptj/86.1.92>
- Toth, M. L., Melentijevic, I., Shah, L., Bhatia, A., Lu, K., Talwar, A., Naji, H., Ibanez-Ventoso, C., Ghose, P., Jevince, A., Xue, J., Herndon, L. A., Bhanot, G., Rongo, C., Hall, D. H. et Driscoll, M. (2012). Neurite Sprouting and Synapse Deterioration in the Aging *Caenorhabditis elegans* Nervous System. *Journal of Neuroscience*, 32(26), 8778-8790. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1494-11.2012>
- Tran, H., Tanaka, A., Litvinovich, S. V., Medved, L. V., Haudenschild, C. C. et Argraves, W. S. (1995). The Interaction of Fibulin-1 with Fibrinogen. *Journal of Biological Chemistry*, 270(33), 19458-19464. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.33.19458>
- Trent, C., Tsuing, N. et Horvitz, H. R. (1983, Aug). Egg-laying defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 104(4), 619-647. <https://doi.org/10.1093/genetics/104.4.619>
- Trojanowski, N. F. (2015). State dependent regulation of the neural circuit for *C. elegans* feeding.
- Van Gerven, M. (2017). Computational Foundations of Natural Intelligence. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncom.2017.00112>

- Varshney, L. R., Chen, B. L., Paniagua, E., Hall, D. H. et Chklovskii, D. B. (2011). Structural Properties of the *Caenorhabditis elegans* Neuronal Network. *PLoS Computational Biology*, 7(2), e1001066. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001066>
- Vyas, A., Mitra, R., Rao, B. S. et Chattarji, S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *Journal of Neuroscience*, 22(15), 6810-6818.
- Wang, D. et Fawcett, J. (2012, Jul). The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res*, 349(1), 147-160. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1375-y>
- Weber, K. T. (1989, Jun). Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol*, 13(7), 1637-1652. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(89\)90360-4](https://doi.org/10.1016/0735-1097(89)90360-4)
- Weller, S. et Gärtner, J. (2001). Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene. *Hum Mutat*, 18(1), 1-12. <https://doi.org/10.1002/humu.1144>
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N. et Brenner, S. (1983). Factors that determine connectivity in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 48 Pt 2, 633-640. <https://doi.org/10.1101/sqb.1983.048.01.067>
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N. et Brenner, S. (1986, Nov 12). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 314(1165), 1-340. <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056>
- Whitelock, J. M., Graham, L. D., Melrose, J., Murdoch, A. D., Iozzo, R. V. et Underwood, P. A. (1999, Apr). Human perlecan immunopurified from different endothelial cell sources has different adhesive properties for vascular cells. *Matrix Biol*, 18(2), 163-178. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(99\)00014-1](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(99)00014-1)
- Whitman, G. et Borkowski, G. (1989). Giant fibrovascular polyp of the esophagus: CT and MR findings. *American Journal of Roentgenology*, 152(3), 518-520. <https://doi.org/10.2214/ajr.152.3.518>
- Winston, W. M., Molodowitch, C. et Hunter, C. P. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295(5564), 2456-2459. <https://doi.org/10.1126/science.1068836>
- Winston, W. M., Sutherlin, M., Wright, A. J., Feinberg, E. H. et Hunter, C. P. (2007). *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10565-10570. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611282104>

- Witvliet, D., Mulcahy, B., Mitchell, J. K., Meirovitch, Y., Berger, D. R., Wu, Y., Liu, Y., Koh, W. X., Parvathala, R., Holmyard, D., Schalek, R. L., Shavit, N., Chisholm, A. D., Lichtman, J. W., Samuel, A. D. T. et Zhen, M. (2021). Connectomes across development reveal principles of brain maturation. *Nature*, 596(7871), 257-261. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03778-8>
- Wong, M. C. et Schwarzbauer, J. E. (2012, Jul-Aug). Gonad morphogenesis and distal tip cell migration in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 1(4), 519-531. <https://doi.org/10.1002/wdev.45>
- Wu, R.-Y., Zhang, Y., Feng, X. et Derynck, R. (1997, 06/01). Wu, R.-Y. , Zhang, Y. , Feng, X.-H. & Derynck, R. Heteromeric and homomeric interactions correlate with signaling activity and functional cooperativity of Smad3 and Smad4/DPC4. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2521-2528. *Molecular and cellular biology*, 17, 2521-2528. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.5.2521>
- Yemini, E., Lin, A., Nejatbakhsh, A., Varol, E., Sun, R., Mena, G. E., Samuel, A. D. T., Paninski, L., Venkatachalam, V. et Hobert, O. (2021, Jan 7). NeuroPAL: A Multicolor Atlas for Whole-Brain Neuronal Identification in *C. elegans*. *Cell*, 184(1), 272-288.e211. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.012>
- Yurchenco, P. D. (2011, Feb 1). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004911>
- Zhang, Y., Feng, X.-H., Wu, R.-Y. et Derynck, R. (1996). Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- β response. *Nature*, 383(6596), 168-172. <https://doi.org/10.1038/383168a0>
- Zhu, X., Joh, K., Hedgecock, E. M. et Hori, K. (1999). Identification of epi-1 locus as a laminin alpha chain gene in the nematode *Caenorhabditis elegans* and characterization of epi-1 mutant alleles. *DNA Seq*, 10(4-5), 207-217. <https://doi.org/10.3109/10425179909033950>
- Ziel, J. W., Hagedorn, E. J., Audhya, A. et Sherwood, D. R. (2009). UNC-6 (netrin) orients the invasive membrane of the anchor cell in *C. elegans*. *Nature cell biology*, 11(2), 183-189. <https://doi.org/10.1038/ncb1825>