

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

SYNDÉCAN RÉGULE LA MORPHOGENÈSE DE LA CELLULE EXCRÉTRICE DE
CAENORHABDITIS ELEGANS

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
AU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR
RAPHAËL DIMA

MAI 2025

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). 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

Je voudrais premièrement remercier ma directrice de thèse, la professeure Claire Bénard, de m'avoir offert cette opportunité hors du commun de venir travailler dans son équipe. Je me souviens encore de la joie d'avoir reçu un courriel de ta part pour venir travailler sur ce magnifique modèle qu'est *C. elegans*, dans un domaine qui m'attirait depuis tant d'années, la neurobiologie, à la croisée de deux mondes qui me fascinent toujours autant. J'ai appris beaucoup grâce à toi et je suis très reconnaissant pour nos nombreuses discussions éclairées qui m'ont permis d'ouvrir mes horizons et mon esprit scientifique, de réfléchir parfois différemment et de pousser ce projet aussi loin que possible. Je te remercie pour ta passion des sciences, ton authenticité, ta confiance, ton encadrement bienveillant, ton envie de voir en chacun.e sa spécificité et de l'encourager à s'épanouir. Pour tout ça et bien plus encore, je te remercie.

Je tiens aussi à remercier tou.te.s les professeur.e.s et employé.e.s de l'UQAM et du CERMO-FC qui ont contribué de près ou de loin à mon parcours académique, tou.te.s les collaborateur.rice.s qui ont apporté leur aide à ce travail, mon jury pour leur évaluation, ainsi qu'à toutes les personnes qui liront cette thèse.

Je remercie très chaleureusement notre assistante de recherche au laboratoire, Lise Rivollet. Tu as su répondre à tellement de mes questions, conforter tant d'hypothèses et rassurer tant de doutes, qu'une bonne partie de ce projet n'aurait pu être réalisée sans ton soutien. Tu as participé à l'élaboration de nombreux projets, et celui-ci est loin d'en être l'exception. Merci pour cette aide incomparable, pour nos discussions autour d'un café et pour tout ce que j'ai dû oublier de citer.

Je voudrais particulièrement remercier tou.te.s les étudiant.e.s qui ont partagé ce projet de plus de six ans avec moi. Tout d'abord, Marianne Bah Tahé, qui a été là pour mes premiers pas sur ce projet magnifique. Merci pour ta passion et ton enthousiasme envers les sciences, que tu transmets maintenant en tant qu'enseignante en CEGEP, et qui m'inspirent toujours autant. Je suis aussi impressionné par ta résilience et ta persévérance pour arriver à tes fins, même dans des moments difficiles. Je remercie ensuite Yann Aghiles Chabi, le premier étudiant en maîtrise que j'ai formé sur ce projet, mais qui a su très vite prendre ses marques et être autonome. Merci pour ton aisance sociale, d'avoir partagé tes passions, de montrer combien on peut faire soi-même, même démonter et remonter complètement sa voiture, et merci de m'avoir montré tes capacités à enseigner. Je remercie ensuite la relève de ce projet, Anna Caridys Ramírez Suárez. Merci de ta curiosité et de tes nombreuses questions qui m'ont motivé à repousser les limites de ma compréhension de ce projet. Merci d'ajouter tes années d'expérience et ta rigueur scientifique sur un projet tel que celui-ci, de ta gentillesse, de ton envie d'aider et de bien faire les choses. Gracias Anna. Je remercie ensuite les

étudiant.e.s stagiaires qui ont contribué à l'avancée de ce projet. Je remercie Philippe St-Louis, notre roi de l'injection dont le taux d'obtention de lignées transgéniques est resté longtemps imbattu, et Cynthia Lanteigne, qui a aussi participé à l'obtention de nombreuses lignées.

Je remercie tou.te.s les étudiant.e.s du laboratoire qui sont devenu.e.s bien plus que de simples collègues. Malika, pour nous avoir montré qu'être parent et faire une très belle thèse était conciliable. Virginie, pour l'exemple de ténacité, les nombreuses soirées en ta présence et l'énergie que tu apportais au laboratoire. Vicky, pour ton souhait de faire du milieu académique un endroit où il fait bon vivre. Ivan, pour avoir été un exemple de discipline, de démontrer que l'excellence amène de nombreuses bourses, et qu'il n'y a pas de limites à ta générosité, surtout en termes de pâtisserie. Marin, pour ta positivité, ta curiosité naturelle, ta bienveillance et ta franche camaraderie. Merci Samar, pour avoir partagé des discussions et de nombreux rires. Merci Noémie, pour tes histoires sur les castors scouts et ta passion des jeux. Merci à tous les esprits brillants cités ici, d'avoir partagé une passion commune pour le sucre et le café et d'en avoir fait de beaux moments de rassemblement. Je remercie aussi les étudiant.e.s du 3^e étage de l'UQAM et du centre du CERMO-FC avec qui j'ai partagé de nombreux repas et qui m'ont permis de décompresser dans ces moments de pauses.

Je tiens ensuite à remercier tout particulièrement les ami.e.s et ma famille qui m'ont accompagné dans cette longue aventure. Merci à mes anciens colocataires et amis Elsa et William, pour ces fous rires et bons moments, d'avoir traversé la pandémie ensemble et d'avoir accompagné mon doctorat de musique classique. Oui, même pour le contemporain, merci William. Merci aussi à Juan et Myriam, qui sont restés nos voisins de cœur malgré trois déménagements. Merci à Laurianne et Élio pour les soirées oniriques autour d'une (ou plusieurs) paire de dés. Merci à Francis et Manon pour les soirées passées à discuter, nos parties de Catan endiablées, et tous les moments partagés ensemble. Merci aux personnes qui ont entouré les passions qui m'ont permis de traverser cette période. Merci à la gang du Kung Fu, spécialement à notre enseignant Charles, à Alex, FX, Michaël et tous les autres. Mais surtout, merci à tous pour votre amitié et votre soutien.

Merci à mes ami.e.s en France. Merci à Damien et Suzanne, Agathe et Manon, Robin et Pauline, Louise, aux deux Julien, Vincent, Margot, Aurélien, Charline, Alexandre et Alice, et Florentin. Merci à cette deuxième famille que je ne vois qu'une fois par an, mais qui garde une place d'exception dans mon cœur. Merci à celles et ceux qui sont venus me voir pendant ces six années, qui auraient voulu le faire, mais dont la vie en a fait autrement, et merci (et désolé) à celle que j'ai raté de peu.

Mille mercis à Bruno et Suzanne, ma famille montréalaise. Merci de m’ avoir accueilli dès mon arrivée, par votre chaleur humaine, votre générosité, votre passion pour l’ enseignement, vos leçons de culture québécoise, vos anecdotes racontées lors de ces nombreux repas bien arrosés, de m’ avoir prêté votre petit coin de paradis le temps de quelques fins de semaine, et j’ en oublie certainement beaucoup.

Un énorme merci à ma famille de m’ avoir soutenu dans ce projet d’ aller faire une thèse de l’ autre côté de l’ océan Atlantique. Merci à mes parents, Pierrick et Josiane, d’ avoir été disponibles, même à distance, pour vos encouragements et vos conseils, merci de la confiance que vous portez en moi et de votre amour inconditionnel. Merci de nous avoir accueillis à chacune de nos escapades en France, de vous être adaptés à notre emploi du temps souvent très chargé et d’ avoir veillé à nous combler. Merci à mes frères Quentin et Aurélien pour leur curiosité, pour avoir cultivé ma passion des jeux, de m’ avoir fait découvrir DnD, mais aussi pour s’ être rendus disponibles à chacun de mes courts séjours en France.

Je remercie aussi Peter, Natalja, Celia et Mateo pour votre accueil pendant mes visites à Berlin et d’ avoir parlé anglais quand je ne comprenais plus l’ allemand.

Enfin et surtout, je veux remercier ma conjointe, mais avant tout amie, Alissa Birle, sans qui ce projet ne serait pas ce qu’ il est aujourd’ hui. Je suis éternellement reconnaissant de t’ avoir rencontré au début de cette aventure et de la finir à tes côtés. Merci d’ avoir supporté une thèse de six ans. Merci pour ton soutien pendant toutes ces années, à distance comme en présence. Merci pour ton écoute, ta patience et ta complicité. Merci de m’ avoir inspiré à rêver, à chercher à m’ épanouir, à développer la compassion dans les hauts comme dans les bas, et d’ avoir toujours cherché la communication. Merci aussi d’ avoir essayé d’ apprendre mon sujet et de l’ expliquer aux personnes qui t’ entourent. Il n’ y a pas la place ici pour décrire la gratitude que j’ ai envers toi. Alissa, merci de tout cœur.

En tout dernier lieu, je remercie les quelques 34 452 vers qui ont servi de modèle pour mes dessins d’ anatomie, et à tous les autres qui n’ ont pas été analysés, mais qui ont servi dans ces travaux à faire avancer la science.

Les travaux de recherche du laboratoire de la Pre Claire Bénard ont été appuyés par des fonds de recherche du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, du Fonds de recherche du Québec-Santé (FQRS) et de la Fondation canadienne pour l’ innovation. J’ ai été appuyé par une bourse de formation doctorale du FQRS, une bourse au doctorat de la fondation J.-A. Desève, des bourses d’ excellence pour les études doctorales du CERMO-FC et la bourse de soutien universel au doctorat de L’ UQAM.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xii
RÉSUMÉ.....	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
1.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> comme modèle d'étude pour la morphogenèse.....	3
1.1.1 Un peu d'histoire.....	3
1.1.2 <i>C. elegans</i> , un modèle d'étude génétique	4
1.1.3 Approches en génétique moléculaire et outils d'études du nématode	6
1.1.4 Le système nerveux de <i>C. elegans</i> a été très étudié.....	7
1.2 Polarisation et développement des extensions neuronales	8
1.2.1 Les voies de guidage.....	12
1.2.1.1 Voie de UNC-6/Nétrine	12
1.2.1.2 La voie de guidage de SLT-1/Slit	15
1.2.1.3 Interaction des voies SLT-1/Slit et UNC-6/Nétrine.....	17
1.2.2 La famille des Rho GTPases.....	18
1.2.2.1 Généralités	18
1.2.2.2 Rôles généraux.....	20
1.2.2.3 En aval des voies de guidage	21
1.2.2.4 Redondance.....	23
1.2.2.5 En amont des voies de guidage.....	23
1.3 Les protéoglycanes à chaînes de glycosaminoglycanes	24
1.3.1 Synthèse protéique	24
1.3.2 Rôles des HSPG.....	25
1.3.3 Synthèse des chaînes.....	26
1.3.4 Modification des chaînes	29
1.3.5 Chaînes chondroïtine sulfate.....	30
1.4 Syndécan	31
1.4.1 Rapport structure-fonction des syndécans	32
1.4.1.1 La région extracellulaire	32
1.4.1.2 Le domaine transmembranaire.....	34
1.4.1.3 Le domaine intracellulaire	34
1.4.1.3.1 Région C1	34
1.4.1.3.2 Région variable.....	35
1.4.1.3.3 Région C2.....	35

1.4.2	Rôle des syndécans	36
1.4.2.1	Rôles généraux.....	36
1.4.2.2	Les syndécans dans le neurodéveloppement.....	36
1.4.2.3	Syndécan et les voies de guidage.....	37
1.4.2.4	Syndécan et les Rho GTPases.....	38
1.5	La cellule excrétrice	38
1.5.1	Le système excréteur.....	38
1.5.2	Fonction du système excréteur.....	38
1.5.3	Formation et croissance des canaux.....	40
1.5.4	Similarités de la croissance de la cellule excrétrice avec la croissance neuronale.....	41
1.6	Défauts du nombre d'extensions cellulaires.....	42
1.6.1	Dans les neurones	42
1.6.2	Dans la cellule excrétrice	47
1.7	Problématique et hypothèse	48
CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES		49
2.1	Souches de nématodes et génétique	49
2.2	Microscopie et observation de la cellule excrétrice	49
2.3	Microinjection et animaux transgéniques	51
2.4	Transgènes de sauvetage et d'expression.....	51
2.5	ARN interférence	54
2.6	Statistiques	54
CHAPITRE 3 RÉSULTATS		55
3.1	Des HSPG limitent le nombre d'extensions dans des cellules polarisées.....	55
3.2	L'HSPG syndécan limite le nombre d'extensions dans la cellule excrétrice.....	58
3.3	Syndécan contrôle le nombre de canaux lors du développement de la cellule excrétrice.....	61
3.4	Syndécan agit de manière cellule autonome dans le contrôle du nombre de canaux.....	64
3.5	L'HSPG LON-2/glypican peut partiellement compenser SDN-1/syndécan.....	67
3.6	Besoins fonctionnels des domaines protéiques de SDN-1/syndécan dans la régulation du nombre de canaux de la cellule excrétrice.....	68
3.7	Les récepteurs UNC-40/DCC, UNC-5/Unc5 et possiblement SAX-3/Robo agissent avec SDN-1/syndécan pour réguler le nombre de canaux dans la cellule excrétrice.....	72
3.8	L'activation constitutive des récepteurs UNC-40 et UNC-5 atténue le défaut de canaux surnuméraires des mutants de syndécan	75
3.9	La Rho GTPase MIG-2/RhoG agit de manière cellule autonome dans la voie de SDN-1/syndécan pour réguler le nombre de canaux	78
3.10	La Rho GTPase CED-10/Rac1 fonctionne depuis la cellule excrétrice pour réguler la formation des canaux surnuméraires dans la voie de SDN-1/syndécan.....	80
3.11	MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 agissent indépendamment pour contrôler le nombre d'extensions surnuméraires	84

3.12 La Rho GEF UNC-73/Trio régule le nombre de canaux surnuméraires avec de SDN-1/syndécan.....	85
3.13 La Rho GTPase CDC-42/Cdc42 promeut le développement de canaux surnuméraires dans la voie de SDN-1/syndécan.....	87
CHAPITRE 4 DISCUSSION.....	89
4.1 Extensions surnuméraires, un défaut rarement observé et encore plus rarement caractérisé.....	89
4.2 L'HSPG SDN-1/syndécan inhibe la formation d'extensions surnuméraires de manière cellule autonome.....	91
4.3 Le rôle des chaînes HS dans l'inhibition de la formation de canaux surnuméraires.....	93
4.4 Différents domaines de SDN-1/syndécan participent à sa fonction dans le mécanisme d'inhibition des extensions surnuméraires.....	96
4.5 LON-2/glypican compense partiellement SDN-1/syndécan.....	98
4.6 Les récepteurs de guidage UNC-5/Unc5 et UNC-40/DCC inhibent aussi la formation de canaux surnuméraires.....	99
4.6.1 Interaction entre UNC-5/Unc5 et SDN-1/syndécan.....	99
4.6.2 Interaction entre UNC-40/DCC et SDN-1/syndécan.....	100
4.6.3 Interaction entre UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5.....	100
4.6.4 Questions et perspectives sur le rôle des molécules de guidage dans la régulation de la formation de canaux de la cellule excrétrice.....	101
4.7 Le récepteur SAX-3/Robo semble agir avec SDN-1/syndécan pour réguler le nombre de canaux dans la cellule excrétrice.....	105
4.8 Rôle des Rho GTPases dans la régulation des canaux surnuméraires.....	107
4.8.1 MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 : Un rôle cellule autonome qui intervient dans la formation des extensions surnuméraires.....	107
4.8.2 MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 : Une nécessité d'alterner entre l'état actif et inactif pour fonctionner correctement.....	107
4.8.3 L'allèle <i>ced-10(n3246)</i> entraîne un gain de fonction de CED-10/Rac1 dans le contrôle du nombre de canaux.....	108
4.8.4 MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 agissent indépendamment pour permettre la formation de canaux surnuméraires.....	109
4.8.5 Les potentielles Rho GEF régulant l'activité de MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1.....	110
4.8.6 CDC-42 inhibe la formation d'extensions surnuméraires avec SDN-1/syndécan.....	111
4.8.7 Perspectives sur les Rho GTPases.....	111
4.9 Un mécanisme garantissant la formation des quatre canaux canoniques de la cellule excrétrice.....	113
4.9.1 SDN-1/syndécan régule spécifiquement les canaux manquants.....	113
4.9.2 Les récepteurs de guidage régulent aussi la formation des canaux canoniques.....	114
4.9.3 Les Rho GTPases interviennent aussi dans la régulation des canaux canoniques.....	115
4.9.3.1 MIG-2/RhoG est potentiellement redondante à SDN-1/syndécan.....	115
4.9.3.2 CED-10/Rac1 est potentiellement redondante à SDN-1/syndécan.....	115
4.9.3.3 MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 nécessitent une fine régulation depuis la cellule excrétrice..	116
4.9.3.4 MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 sont redondantes dans la formation des canaux canoniques..	117
4.9.4 Rôles des GEF UNC-73/Trio et TIAM-1/Tiam1 dans la régulation des canaux principaux.....	118
4.9.5 CDC-42/Cdc42 régule la formation des quatre canaux canoniques.....	118
4.9.6 Théories sur la régulation de la mise en place des canaux canoniques de la cellule excrétrice..	119
CONCLUSION.....	121

ANNEXE A FIGURES SUPPLÉMENTAIRES	123
ANNEXE B TABLES D'INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES	129
BIBLIOGRAPHIE	148

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Développement et outils d'étude de <i>C. elegans</i>	6
Figure 1.2. Mise en place de la polarité et structures de croissance.....	10
Figure 1.3. Domaines protéiques des molécules de guidage de la voie UNC-6/Nétrine.....	13
Figure 1.4. Domaines protéiques des molécules de guidage de la voie SLT-1/Slit	16
Figure 1.5. Les Rho GTPases	20
Figure 1.6. Les Protéoglycans à chaînes d'Héparane Sulfate (HSPG).....	27
Figure 1.7. Syndécan	33
Figure 1.8. Le système excréteur de <i>C. elegans</i>	39
Figure 1.9. Les défauts neuronaux et de la cellule excrétrice.....	45
Figure 3.1. La perturbation des HSPG mène à des neurites et des extensions cellulaires surnuméraires ...	56
Figure 3.2. Les canaux surnuméraires dans la cellule excrétrice des mutants pour <i>sdn-1/syndécan</i> se développent pendant l'embryogenèse.....	63
Figure 3.3. <i>sdn-1/syndécan</i> contrôle de manière cellule autonome le nombre de canaux dans la cellule excrétrice	66
Figure 3.4. Dépendance des domaines protéiques de SDN-1/syndécan pour sa fonction de contrôle du nombre de canaux.....	69
Figure 3.5. La perturbation des voies de guidage spécifiques affecte le nombre de canaux dans la cellule excrétrice	73
Figure 3.6. L'activation constitutive des récepteurs <i>unc-40/Dcc</i> et <i>unc-5/Unc5</i> supprime partiellement les défauts de canaux surnuméraires dans les mutants <i>sdn-1/syndécan</i>	77
Figure 3.7. La Rho GTPases MIG-2/RhoG est nécessaire au développement des extensions surnuméraires	79
Figure 3.8. La Rho GTPases CED-10/Rac1 est nécessaire au développement des extensions surnuméraires	83
Figure 3.9. Les Rho GTPases MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 agissent indépendamment dans le développement des extensions surnuméraires.....	84
Figure 3.10. CDC-42/Cdc42 et UNC-73/Trio participent à la régulation du nombre de canaux dans la cellule excrétrice	86
Figure 4.1. Résumé graphique et hypothèses	120

Figure A.1. Informations relatives à la figure 3.1 123

Figure A.2. Informations relatives aux figures 3.2 et 3.3 125

Figure A.3. Informations relatives à la figure 3.5 125

Figure A.4. Informations relatives à la figure 3.6 126

Figure A.5. Informations relatives aux figures 3.7 à 3.9 128

Figure A.6. Informations relatives à la figure 3.10 128

LISTE DES TABLEAUX

Tableau B.1. Liste des allèles mutants utilisés	129
Tableau B.2. Liste des souches utilisées	133
Tableau B.3. Liste des amorces utilisées pour le génotypage et le séquençage	136
Tableau B.4. Liste des souches transgéniques utilisées	140
Tableau B.5. Liste des contributions détaillées	146

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARMS PCR	« Amplification Refractory Mutation System PCR » (PCR par système d'amplification réfractaires aux mutations)
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	Acide ribonucléique double brin
ARNi	Interférence par acide ribonucléique
CFP	« Cyan Fluorescent Protein » (protéine fluorescente cyan)
CS	Chondroïtine sulfate
CSPG	« Chondroitin Sulfate Proteoglycans » (protéoglycanes à chaînes de chondroïtine sulfate)
DCC	« Deleted in Colorectal Cancer » (gène supprimé dans le cancer du côlon)
DD	« Dorsal D-type motoneuron » (motoneurone dorsal de type D)
DTC	« Distal Tip Cell » (cellule distale de la gonade)
ECD	« Extracellular Domain » (domaine extracellulaire)
EGF	« Epidermal Growth Factor » (facteur de croissance épidermique)
FGF	« Fibroblast Growth Factor » (facteur de croissance des fibroblastes)
Fn	Domaine fibronectine
GAG	Glycosaminoglycanes
GAP	« GTPase Activating Protein » (protéine activatrice de la fonction GTPase)
GDI	« Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors » (inhibiteurs de la dissociation du GDP)

GDP	Guanosine diphosphate
GEF	« Guanine nucleotide Exchange Factor » (facteur d'échange du GDP)
GFP	« Green Fluorescent Protein » (protéine fluorescence verte)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosine triphosphate
HS	Héparane sulfate
HSPG	« Heparan Sulfate Proteoglycans » (protéoglycans à chaînes d'héparane sulfate)
ICD	« Intracellular Domain » (domaine intracellulaire)
Ig	Domaine semblable aux immunoglobulines
L1	Premier stade larvaire
L2	Second stade larvaire
L4	Quatrième stade larvaire
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	« Matrix Metalloproteinase » (métalloprotéinase matricielle)
MT	Microtubules
MYR	Myristoylation
PCR	« Polymerase Chain Reaction » (réaction en chaîne par polymérase)
PKC	Protéine kinase C
RFP	« Red Fluorescent Protein » (protéine fluorescente rouge)
Robo	« Roundabout » (phénotype chez la drosophile)
Sqv	« Squashed vulva » (défaut de développement de la vulve des hermaphrodites)

SS-PCR	« Super Selective PCR » (PCR super selective)
TM	Domaine transmembranaire
Unc	« Uncoordinated » (défaut de coordination dans les mouvements du ver)
Neurones de <i>C. elegans</i> :	
AIY	« Anterior Interneuron Y » (interneurone antérieur Y)
ALM	« Anterior Lateral Microtubule neuron » (neurone latéral antérieur à microtubules)
ASE	« Amphid Single cilium E neuron » (neurone amphide à simple cilium E)
ASJ	« Amphid Single cilium J neuron » (neurone amphide à simple cilium J)
AVM	« Anterior Ventral Microtubule neuron » (neurone latéral ventral à microtubules)
AWC	« Amphid Wing neuron C » (neurone de l'aile amphide C)
CAN	« Excretory Canal-Associated Neuron » (neurone associé aux canaux excréteurs)
HSN	« Hermaphrodite-Specific Neuron » (neurone spécifique aux hermaphrodites)
PDE	« Posterior Deirid neuron » (neurone postérieur « déiride »)
PLM	« Posterior Lateral Microtubule neuron » (neurone latéral postérieur à microtubules)
PQR	« Posterior Q-cell derived Receptor » (neurone postérieur dérivé du neuroblaste Q)
PVD	« Posterior Ventral process D neuron » (neurone postérieur ventral à processus D)
PVM	« Posterior Ventral Microtubule neuron » (neurone ventral postérieur à microtubules)
PVQ	« Posterior Ventral process Q neuron » (neurone postérieur ventral à processus Q)
VD	« Ventral D-type motoneuron » (motoneurone ventral de type D)

RÉSUMÉ

La rupture de la symétrie ou polarisation cellulaire, ainsi que la mise en place de structures morphologiques complexes et stéréotypiques, permettent aux cellules polarisées d'avoir des fonctions cellulaires spécifiques dans les organismes à travers le règne animal. Chez l'organisme modèle *C. elegans* par exemple, la formation d'extensions cellulaires comme les axones et dendrites dans les neurones ou les canaux dans la cellule excrétrice permet respectivement les fonctions de transmission de l'influx nerveux et l'osmorégulation. Bien que les mécanismes à la base de la croissance et du guidage de ces extensions aient déjà été étudiés, de nombreuses questions quant aux étapes précoces de leur mise en place restent non résolues. Ainsi, comment une cellule polarisée assure la formation d'un nombre précis d'extensions lors de son développement n'a pas encore été élucidé. Les travaux menés dans cette thèse proposent des réponses à cette importante question de la biologie développementale. Notre analyse de mutants affectant la formation des chaînes des protéoglycanes à chaînes d'héparane sulfate (HSPG) chez *C. elegans* a révélé un défaut rarement observé et encore plus rarement étudié : la formation d'extensions surnuméraires. Chez ces mutants, les neurones unipolaires AVM et HSN peuvent développer deux neurites à partir du soma, et la cellule excrétrice peut développer jusqu'à huit canaux au lieu des quatre retrouvés invariablement chez le type sauvage. Étant donné que les axones et les canaux excréteurs reposent sur des mécanismes moléculaires communs pour leur croissance et leur guidage, et que le défaut des canaux surnuméraires est plus pénétrant dans la cellule excrétrice, nous avons étudié plus en profondeur le mécanisme permettant de contrôler le nombre d'extensions dans cette cellule. Nous avons déterminé que l'HSPG conservé SDN-1/syndécan joue un rôle clé dans ce mécanisme, contrôlant de manière cellule autonome le nombre d'extensions pendant le développement de la cellule excrétrice. Nous avons précisé que les canaux surnuméraires dans les mutants pour *sdn-1* se forment en même temps et ont la même organisation du cytosquelette d'actine et de microtubules que les autres canaux. Notre analyse génétique révèle que le signal UNC-6/Nétrine et les récepteurs de guidage UNC-40/DCC, UNC-5/Unc5 et SAX-3/Robo semblent restreindre le nombre de canaux excréteurs dans la même voie que SDN-1. De plus, nous montrons que SDN-1/syndécan coopère avec les modulateurs du cytosquelette de la famille des Rho GTPases MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1, qui sont nécessaires à la formation des extensions surnuméraires, et avec CDC-42/Cdc42, qui inhibe la formation d'extensions surnuméraires. Les résultats présentés ici dévoilent donc l'existence d'un mécanisme mettant en jeu un HSPG qui coordonne des voies de guidage et des régulateurs du cytosquelette afin d'assurer l'établissement du nombre approprié d'extensions cellulaires lors du développement d'une cellule polarisée. Étant donné la forte conservation évolutive des modulateurs de polarité et de morphogénèse cellulaire, aussi bien entre les types cellulaires qu'entre les espèces, et le fait que nous observons le phénotype d'extensions surnuméraires dans diverses cellules, nous pensons que ces travaux aideront à

élargir les connaissances sur la régulation de la morphogenèse dans divers types cellulaires, y compris les neurones.

Mots clés : morphogenèse cellulaire, cellule polarisées, protéoglycanes à chaînes d'héparane sulfate, voies de guidage, Rho GTPases, cellule excrétrice, *C. elegans*

ABSTRACT

Cell symmetry breakage or cellular polarization, along with the establishment of complex and stereotypical morphological structures, enables polarized cells to have specific cellular functions in organisms across the animal kingdom. In the model organism *C. elegans*, for example, the formation of cellular extensions such as axons and dendrites in neurons, or canals in the excretory cell, enables the functions of nerve impulse transmission and osmoregulation respectively. Although the mechanisms underlying the growth and guidance of these extensions have been studied, many questions regarding the early stages of their establishment remain unresolved. Thus, how a polarized cell ensures the formation of a precise number of extensions during its development has yet to be elucidated. The work conducted in this thesis provides answers to this important question of developmental biology. Our analysis of mutants affecting the formation of Heparan Sulfate Proteoglycan (HSPG) chains in *C. elegans* revealed a rarely observed and virtually unexplored defect: the formation of supernumerary extensions. In these mutants, the unipolar neurons AVM and HSN can develop two neurites from the soma, and the excretory cell can develop up to eight canals instead of the four invariably found in wild-type worms. Given that axons and excretory canals rely on common molecular mechanisms for their growth and guidance, and that the defect of supernumerary canals is more penetrant in the excretory cell, we unravelled the mechanism controlling the number of extensions in this cell. We determined that the conserved HSPG SDN-1/syndecan plays a key role in this mechanism, cell-autonomously controlling the number of extensions during the development of the excretory cell. We specified that supernumerary canals in *sdn-1* mutants form simultaneously and have the same cytoskeletal organization regarding actin and microtubules as the other canals. Our genetic analysis revealed that the guidance signal UNC-6/netrin and the guidance receptors UNC-40/DCC, UNC-5/Unc5, and SAX-3/Robo also restrict the number of excretory canals, possibly in the same pathway as SDN-1 in this mechanism. Additionally, we show that SDN-1/syndecan cooperates with the cytoskeleton modulators from the Rho GTPase family MIG-2/RhoG and CED-10/Rac1, which are necessary for the formation of these supernumerary extensions, and with CDC-42/Cdc42, which inhibits the formation of supernumerary extensions. The results presented here thus reveal the existence of a mechanism involving an HSPG that coordinates guidance pathways and cytoskeleton regulators to ensure the establishment of the appropriate number of cellular extensions during the development of a polarized cell. Given the strong evolutionary conservation of polarity and cellular morphogenesis modulators, between both cell types and species, and the fact that we observed the supernumerary cellular extension phenotype in various cell types, we believe this work will help broaden the understanding of morphogenesis regulation in various cell types, including neurons.

Keywords : Cellular Morphogenesis, Polarised Cells, Heparan Sulfate Proteoglycans, Guidance Pathways, Rho GTPases, Excretory Cell, *C. elegans*

INTRODUCTION

On appelle polarisation le processus développemental par lequel une cellule va rompre sa symétrie en formant une ou plusieurs structures morphologiques spécialisées. La mise en place de ces caractéristiques morphologiques précises est une condition préalable à l'établissement d'une fonction très spécifique. Ainsi, on retrouve certaines structures stéréotypiques, comme les microvillosités des bordures en brosse dans les entérocytes intestinaux, des extensions cytoplasmiques, comme les neurites dans les neurones, ou encore des canaux dans certaines cellules, comme les cellules endothéliales vasculaires ou la cellule excrétrice chez *C. elegans*. Celles-ci permettent respectivement l'absorption intestinale, la transmission de l'influx nerveux ou encore la régulation de l'osmolarité dans l'organisme en question. Ces structures sont établies au bord prédéfini d'une cellule que l'on appelle un pôle. On peut alors parler de polarité morphologique ou de polarité fonctionnelle, mais les deux sont étroitement reliées. Il existe des cellules unipolaires (avec un seul pôle), bipolaires (deux pôles) ou multipolaires (au-delà de trois pôles).

Les cellules utilisent des molécules communes pour leur polarisation, avec des chaînes d'évènements qui sont spécifiques au tissu (Naturale *et al.*, 2023). Ces molécules sont conservées entre les types cellulaires, par exemple entre l'embryon unicellulaire (Pellettieri et Seydoux, 2002), des cellules épithéliales telles que les cellules intestinales ou du pharynx (Naturale *et al.*, 2023) ou dans les cellules non épithéliales, comme les neurones (Wilson *et al.*, 2022). Mais elles sont aussi conservées entre les espèces, puisqu'on les retrouve dans des organismes invertébrés comme *C. elegans* ou *Drosophila melanogaster* et dans des organismes plus complexes, comme les mammifères (Goldstein et Macara, 2007; Naturale *et al.*, 2023; Pellettieri et Seydoux, 2002), ce qui marque leur caractère primordial et fondamental pour le bon développement des organismes.

Bien que la polarisation cellulaire et la morphogenèse soient deux processus étudiés en profondeur au cours des dernières décennies, certaines lacunes demeurent dans la compréhension de la relation entre ces deux phénomènes (Naturale *et al.*, 2023). Par exemple, la manière dont les cellules polarisées régulent le nombre exact de projections qu'elles forment pendant leur développement reste encore un mystère. L'observation d'un phénotype rarement rapporté, le développement d'extensions surnuméraires dans des cellules polarisées de l'organisme modèle *C. elegans*, nous a permis d'aborder cette question de biologie développementale. En effet, chez des mutants où la synthèse des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) sur les protéoglycanes à chaînes d'héparane sulfate (HSPG) est altérée, nous observons des extensions surnuméraires dans des neurones et surtout dans la cellule excrétrice. Dans ces travaux, nous avons alors étudié un mécanisme permettant de réguler le nombre d'extensions déployées pendant le développement de

la cellule excrétrice. Dans le chapitre « revue de la littérature », j'introduis d'abord l'organisme modèle utilisé dans ce cadre : *C. elegans*. Ensuite, bien que le modèle cellulaire étudié dans ces travaux soit la cellule excrétrice, je passe en revue les connaissances actuelles sur la polarisation neuronale ainsi que les mécanismes sous-jacents à la formation et à la croissance des extensions neuronales. En effet, les connaissances sur la polarisation cellulaire et les mécanismes régulant les étapes précoces de la morphogenèse proviennent en grande majorité de l'étude des neurones. Je détaille donc l'implication de voies de guidage et de régulateurs du cytosquelette dans ces processus. Par la suite, je décris le système excréteur de *C. elegans*, et plus en détail la cellule excrétrice, une cellule épithéliale avec une structure complexe et polarisée qui partage de nombreux mécanismes développementaux avec les neurones. Je présente ensuite les HSPG qui jouent un rôle clé dans la coordination des morphogènes et constituent des cibles intéressantes pour l'étude de l'organisation de la morphogenèse cellulaire en général. Enfin, je détaille les cas de défauts de polarisation observés, où des cellules développent un nombre excessif d'extensions, le phénotype au cœur de cette étude.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 *Caenorhabditis elegans* comme modèle d'étude pour la morphogenèse

C. elegans est un petit nématode transparent pouvant atteindre une taille de 1 mm de long à l'âge adulte. Dans la nature, il est retrouvé dans les végétaux et insectes en décomposition, se nourrissant principalement de bactéries. Depuis la fin des années 70, ce ver est utilisé comme organisme modèle en laboratoire pour plusieurs raisons (Corsi, 2015). Tout d'abord, deux sexes existent chez *C. elegans* : les hermaphrodites et les mâles. Les hermaphrodites sont capables d'autofécondation, produisant leurs propres gamètes des deux sexes pendant leur développement, et pouvant ainsi produire 300 embryons. Leur petite taille rend leur utilisation très facile et peu dispendieuse. Ces nématodes possèdent un cycle de vie très rapide (**Fig. 1.1A**) : l'embryogenèse se déroule dans un œuf et dure environ 16 heures à 20°C. Après l'éclosion, le ver passe par quatre stades larvaires (appelés L1 à L4) avec un remplacement de la cuticule qui l'enveloppe entre chaque stade. Finalement, trois jours après la fécondation, le ver atteint l'âge adulte et devient fertile, capable alors à son tour de produire environ 300 embryons. Après cela, *C. elegans* peut vivre quelques semaines avant de mourir en sénescence. En absence de nourriture, les jeunes larves sont en mesure d'interrompre leur croissance et de rentrer dans un stade alternatif appelé « dauer », où elles peuvent survivre jusqu'à plusieurs mois, où jusqu'à l'arrivée d'une nouvelle source de nourriture qui leur permet de reprendre leur croissance, une condition qui rend leur utilisation arrangeante. De plus, on peut congeler ce ver et le garder plusieurs décennies avant de le dégeler pour s'en servir à nouveau. Enfin, la transparence de *C. elegans* permet, avec l'aide de rapporteurs fluorescents, d'étudier *in vivo* les systèmes avec une échelle unicellulaire (**Fig. 1.1B**). Mais si *C. elegans* est autant utilisé en laboratoire, c'est surtout pour ses attraits en génétique et en neurobiologie, tel que résumé ci-dessous.

1.1.1 Un peu d'histoire

L'utilisation de *C. elegans* comme modèle d'étude génétique a débuté avec le chercheur Sidney Brenner à la fin des années 60 et 70 (Brenner, 1974). Le programme de développement de *C. elegans* est invariant, c'est-à-dire que tous les individus du même sexe ont le même nombre de cellules somatiques : 959 chez l'hermaphrodite, dont 302 sont des neurones. La transparence de *C. elegans* a permis la caractérisation de son lignage complet, c'est-à-dire le devenir de chaque cellule, de la fertilisation jusqu'à l'âge adulte, donnant ainsi le premier lignage cellulaire chez un métazoaire à avoir été élucidé (Kimble et Hirsh, 1979; Sulston et Horvitz, 1977; Sulston *et al.*, 1983). Ces études ont permis la découverte de l'apoptose, ainsi que des gènes

hautement conservés qui y sont associés (Ellis et Horvitz, 1986; Hedgecock *et al.*, 1983). Un prix Nobel en physiologie et médecine pour cette découverte fut attribué à S. Brenner, R. Horvitz et J. Sulston. Grâce à la microscopie électronique, des chercheurs ont pu cartographier complètement chaque cellule, notamment les 302 neurones retrouvés chez les vers hermaphrodites. D'autres ont pu élucider pour la première fois le connectome complet d'un organisme, c'est-à-dire l'ensemble des connexions chimiques et des jonctions lacunaires entre les neurones (White *et al.*, 1986). En 1998, le génome de *C. elegans* a été le premier génome d'un animal à être entièrement séquencé et annoté par le « *C. elegans* Sequencing Consortium » (Consortium, 1998). Par la suite, la découverte de l'ARN interférence (Fire *et al.*, 1998) et le développement de la GFP (pour green fluorescent protein) comme marqueur biologique (Chalfie *et al.*, 1994) chez *C. elegans* furent les avancées majeures qui valurent à leurs chercheurs des prix Nobel en physiologie et médecine, et en chimie respectivement. L'invariabilité et la caractérisation précise du développement de *C. elegans* en ont fait un outil inégalé pour étudier la mise en place du système nerveux et des gènes qui y sont associés, comme avec la découverte des premiers gènes affectant le guidage axonal (Hedgecock *et al.*, 1987). Plus récemment, la découverte des microARN et leur rôle dans la régulation génique post-transcriptionnelle chez *C. elegans* par V. Ambros et G. Ruvkun a été récompensée par le prix Nobel de physiologie et de médecine 2024.

1.1.2 *C. elegans*, un modèle d'étude génétique

Un des atouts majeurs de *C. elegans* est sa conservation évolutive. Environ 600 millions d'années d'évolution séparent *C. elegans* de l'humain (Chisholm *et al.*, 2016), et pourtant de nombreuses molécules et mécanismes sont conservés entre les deux espèces. 60 à 80% de gènes humains codant pour des protéines trouvent un orthologue dans le génome de *C. elegans* (Kaletta et Hengartner, 2006) et il en est de même pour 40% des gènes impliqués dans des maladies humaines (Culetto et Sattelle, 2000). La totalité des protéines étudiées dans cette thèse, dont certaines ont été caractérisées pour la première fois chez *C. elegans* (Hedgecock *et al.*, 1990; Hedgecock *et al.*, 1987), trouve au moins un homologue chez l'humain. La plupart d'entre elles possèdent aussi moins de paralogues chez le nématode, permettant ainsi de minimiser les problèmes liés à la redondance et au chevauchement de fonction entre les différents gènes codant pour la protéine d'intérêt.

La capacité à s'autoféconder des hermaphrodites, tout en pouvant aussi effectuer des croisements avec des mâles, le fait que la progéniture de chaque ver suive les lois mendéliennes, et que ce nématode tende vers l'homozygotie, font du ver un modèle génétique simple et facile à utiliser. De nombreux cribles génétiques ont été réalisés, dont la plupart sont basés sur le phénotype (crible « forward » ou génétique directe). Dans ces cribles, on utilise des agents mutagènes, comme le méthanesulfonate d'éthyle, puis on isole des

phénotypes comportementaux ou morphologiques dans la descendance de ces vers mutés. On séquence ensuite le génome au complet afin de trouver la mutation induisant le phénotype, avant de confirmer ce gène par expérience de sauvetage, c'est-à-dire en réexprimant de manière transgénique un transcrite sauvage de la protéine soupçonnée d'être impliquée et en évaluant la disparition du phénotype. Des cribles basés sur un gène d'intérêt (dit « reverse ») sont également possibles. Ces cribles ont permis la formation de banques de mutants comme dans le projet du million de mutations (Thompson *et al.*, 2013) où plus de 800 000 mutations uniques ont été créées, avec une moyenne de 8 mutations par gène. L'entièreté de ces mutations est disponible au centre génétique de *C. elegans* (CGC).

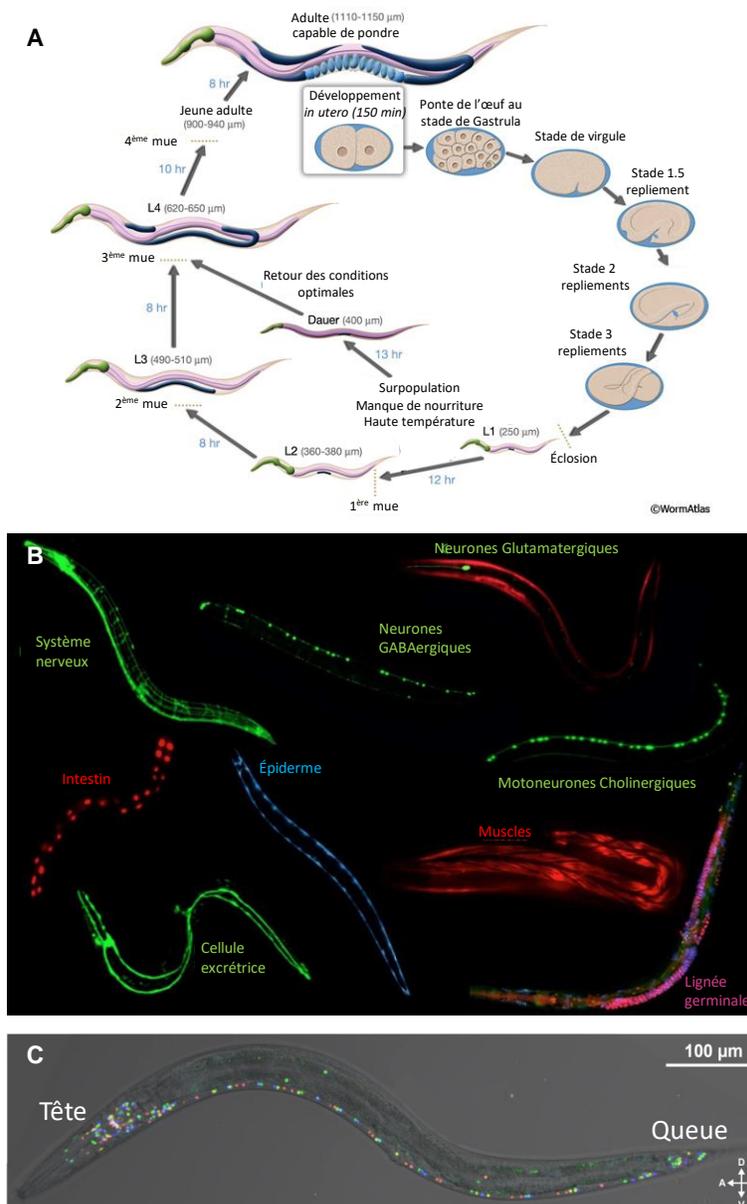


Figure 1.1. Développement et outils d'étude de *C. elegans*

(A) Cycle de développement de *C. elegans*. Le ver se développe dans un œuf pendant un peu plus de 11 heures à 22°C. Des stades sont différenciés en fonction du nombre de repliements qu'il prend dans sa coquille. Après son éclosion, il continue de se développer à travers quatre stades larvaires (L1 à L4) avec une mue entre chaque stade. Dans certaines conditions, comme un manque de nourriture, *C. elegans* peut mettre fin à son développement au stade L1 et rentrer dans le stade dauer. Il peut alors survivre jusqu'à plusieurs mois dans ces conditions extrêmes et, avec le retour des conditions de développement optimales, reprendre son développement au stade L4. En trois jours, le ver est complètement développé et apte à pondre. Schéma adapté de (Altun et Hall, 2009b). (B) L'utilisation de marqueurs fluorescents et de promoteurs d'expression génique tissu-spécifique permet d'étudier des systèmes individuels tels que les neurones GABAergiques, les muscles ou la cellule excrétrice. Adapté de (Ofenbauer, 2018). (C) Le construit NeuroPAL permet l'expression d'une multitude de marqueurs fluorescents dans le noyau de tous les neurones de *C. elegans* et donc l'identification de chacun de ces neurones. Tiré de (Yemini *et al.*, 2021).

1.1.3 Approches en génétique moléculaire et outils d'études du nématode

De nombreuses approches en génétique moléculaire ont été mises au point chez *C. elegans*. La transgénèse chez ce nématode est plutôt simple. On peut injecter de l'ADN dans le syncytium de la gonade des hermaphrodites afin qu'il soit incorporé par les noyaux des futurs embryons. Dans le noyau, de multiples copies de l'ADN injectées forment des structures dites extrachromosomiques, qui pourront être transmises à leur descendance (Mello et Fire, 1995). Grâce à cette méthode, de nouvelles approches d'éditions du génome sont continuellement développées ou adaptées à *C. elegans*, tel que le système CRISPR/Cas (Kim *et al.*, 2022), la recombinaison Cre/Lox (Kage-Nakadai *et al.*, 2014), l'intégration des transgènes multicopies (Frokjaer-Jensen *et al.*, 2014; Noma et Jin, 2018) ou de copie unique d'un gène d'intérêt (El Mouridi *et al.*, 2022; Frokjaer-Jensen *et al.*, 2008; Nonet, 2023) dans le génome de *C. elegans*.

Par ailleurs, l'activité de gènes peut être déplétée par l'ARN interférence, une approche facile et rapide puisqu'elle peut se faire par l'expression d'ARN double brin dans les bactéries dont le ver se nourrit (Timmons et Fire, 1998). L'ARN est alors absorbé par les entérocytes intestinaux puis disséminé dans le reste de l'organisme. D'autres méthodes de déplétion d'activité génique comme le système de dégradation de protéines ciblées induit par l'auxine (Zhang *et al.*, 2015) ou des approches utilisant des ribozymes (Fang *et al.*, 2023) ont plus tard été adaptées à *C. elegans* afin de contrôler l'expression génique dans le temps et dans l'espace. En plus des cribles génétiques largement utilisés chez *C. elegans*, de nouvelles méthodes de criblage d'interacteurs pour des protéines ont été perfectionnées. C'est le cas de l'approche appelée TurboID (Branon *et al.*, 2018).

De nombreux outils ont été développés dans le but de faciliter l'étude des cellules du ver avec une grande résolution. Après l'utilisation de la GFP, d'autres molécules fluorescentes telles que wrmScarlet (El Mouridi *et al.*, 2017) ont été optimisées pour leur utilisation dans le ver. Le développement de marqueurs fluorescents s'est étendu avec l'utilisation de molécules scindées en deux, comme c'est le cas de la "split-GFP" ou de "split-mScarlet", qui permettent de suivre des protéines marquées à un niveau endogène et de manière tissu-

spécifique (**Fig. 1.1B**) (He *et al.*, 2019; Witten *et al.*, 2023). L'augmentation de l'éventail de marqueurs fluorescents a permis le développement d'un ensemble de transgènes chez *C. elegans*, appelé NeuroPAL, avec lequel on peut faire exprimer dans chacun des neurones une combinaison de signaux fluorescents quasi unique pour identifier chaque neurone en temps réel (**Fig. 1.1C**, (Yemini *et al.*, 2021)). On a aussi vu apparaître des rapporteurs fluorescents de flux de calcium, capables de mesurer l'activité calcique dans différentes cellules (Kerr, 2006; Liu *et al.*, 2024), ainsi que l'optogénétique, pour manipuler l'activité de cellules (Husson *et al.*, 2013). Ces outils ont permis la construction de bases de données chez *C. elegans* qu'aucun autre organisme n'a encore vus, rapportant notamment des données de transcriptomique à l'échelle unicellulaire lors du développement embryonnaire du ver (Packer *et al.*, 2019), un atlas des facteurs de transcription exprimés dans toutes les cellules (Li *et al.*, 2024) ainsi qu'un atlas fonctionnel de la propagation des signaux neuronaux dans cet organisme (Randi *et al.*, 2023). Il est également intéressant de noter que l'on peut faire une ablation d'une cellule ou d'un neurone spécifiquement à l'aide d'un laser afin d'étudier l'impact sur l'organisme (Kimble, 1981; Wang *et al.*, 2022). Avec tous ces outils et bases de données, ce nématode a déjà permis d'identifier des gènes importants pour le développement et la spécification cellulaire, la migration, le guidage, la synaptogenèse, la senescence, la régénération axonale ou encore la tubulogenèse pour ensuite faciliter la compréhension de processus biologiques conservés chez les mammifères (Corsi, 2015; Shaye et Soto, 2021), prouvant alors son efficacité comme modèle génétique dans l'étude du système nerveux.

1.1.4 Le système nerveux de *C. elegans* a été très étudié

La plupart des connaissances sur le développement d'extensions cellulaires et son lien avec la polarisation ont été acquise dans des contextes neuronaux. Chez *C. elegans*, le système nerveux est formé d'exactly 302 neurones chez les individus hermaphrodites, dont certains sont spécifiques au sexe, comme les neurones HSN qui contrôlent les muscles de la vulve, et de 385 neurones chez les mâles. Dans leurs travaux, l'équipe du Dr S. Brenner (White *et al.*, 1986) a cartographié et décrit la morphologie de tous ces neurones. La nomenclature utilisée réfère à la position et au type de neurone en utilisant deux à trois lettres pour les classer, par exemple AVM pour « Anterior Ventral Microtubule », et parfois une lettre supplémentaire indiquant de quel côté se situe le neurone, s'il s'agit d'une paire de neurones, par exemple ALMR pour « Anterior Lateral Microtubule Right ». Ces travaux ont aussi mis en évidence le connectome du ver, qui regroupe 7000 synapses chimiques et jonctions lacunaires. Les neurones ont une localisation relativement invariante d'un individu à l'autre et sont soit répartis individuellement dans le ver, soit regroupés dans des ganglions. Les extensions cytoplasmiques développées par les neurones responsables de la transmission de l'influx nerveux, nommés neurites, sont principalement regroupées dans des régions appelées neuropile ou faisceau. Le neuropile principal de *C. elegans* est l'anneau nerveux, une structure circulaire qui s'organise

autour de l'isthme du pharynx. On fait souvent référence à cet anneau nerveux comme étant le cerveau du ver, étant donné que c'est à cet endroit qu'on retrouve le plus de neurites, environ 180, de synapses, et qu'il constitue donc le site majeur d'intégration de l'information nerveuse chez le ver. Les autres neurites se retrouvent dans des faisceaux longitudinaux qui traversent le ver dans sa longueur au niveau de la corde nerveuse ventrale ou de la corde nerveuse dorsale, ainsi que dans des faisceaux moins importants aux niveaux subventral et subdorsal. On trouve également des cellules gliales chez *C. elegans* qui s'organisent principalement dans la tête du ver, entourant l'anneau nerveux et les neurones sensoriels de la bouche.

En neurobiologie, les neurites sont habituellement regroupés en deux catégories: les dendrites, qui reçoivent l'information, et les axones, qui transmettent l'information nerveuse. Cependant, la plupart des extensions neuronales chez *C. elegans* sont capables de jouer les deux rôles, c'est-à-dire de recevoir et de transmettre des informations au long de la même neurite (ces neurites sont tout de même couramment appelés axones) (Hall *et al.*, 2006). Ainsi, la plupart des neurones chez *C. elegans* sont unipolaires ou bipolaires, à l'exception des neurones sensoriels PVD et FLP qui sont multipolaires et dont les dendrites possèdent une arborisation complexe. Contrairement aux vertébrés, la plupart des neurones de *C. elegans* ne semblent pas former de boutons synaptiques au bout de leurs dendrites (à l'exception de neurones moteurs DD et VD), mais plutôt des synapses « en passant » (White *et al.*, 1986). Toutefois, les synapses « en passant » ne sont pas une spécificité du ver, étant donné qu'on en trouve aussi chez les souris (Kasthuri *et al.*, 2015).

1.2 Polarisation et développement des extensions neuronales

Bien que la croissance des extensions de la cellule excrétrice, la cellule au centre de ces travaux de recherche, aient été étudié (Shaye et Soto, 2021), très peu de choses sont connues sur la phase précoce de leur mise en place. Je détaille alors dans cette partie les mécanismes impliqués dans la polarisation, la mise en place et le développement dans le contexte où il a été le plus exploré : les neurones. Puis, je décris dans une autre partie (section 1.5.4) comment la majorité de ces mécanismes semble conservée dans la cellule excrétrice. Les neurones de l'hippocampe dissociés représentent le modèle cellulaire le plus utilisé chez les mammifères pour étudier la mise en place de la polarité neuronale (Schelski et Bradke, 2017). Leur développement se déroule en cinq étapes (**Fig. 1.2A**) : d'abord, les neurones récupérés *in vivo* ont des processus rétractés en forme de sphère ronde autour de la cellule (1). Des neurites dits immatures commencent à apparaître (2), dont une va commencer une croissance plus rapide que les autres pour devenir le futur axone – il s'agit de la spécification axonale (3). Les autres neurites immatures vont s'arboriser pour former les dendrites (4), puis finalement, la polarisation fonctionnelle va commencer avec la synaptogenèse, la formation des épines dendritiques, etc. (Takano *et al.*, 2015). On considère alors la troisième étape, celle

de la spécification axonale, comme étant la polarisation neuronale, puisque c'est à cet instant que la symétrie cellulaire est brisée et que l'on voit apparaître une spécialisation orientée.

On pense que cette spécification se fait grâce à des facteurs de polarisation initiaux qui s'accumulent dans un neurite spécifiquement, pour ensuite induire des boucles de rétrocontrôle positif. Ces boucles peuvent alors amplifier les différences aussi bien au niveau moléculaire que structurel dans les neurites, résultant dans l'induction de la spécification axonale (Schelski et Bradke, 2017). À l'inverse, on pense aussi qu'il existe des boucles de rétrocontrôle négatif ou d'inhibition de croissance dans les autres neurites (Schelski et Bradke, 2017; Takano *et al.*, 2015). Pour que cette hypothèse soit probable, il faut alors un transport adéquat des facteurs pro-croissance, possible grâce à la mise en place d'un réseau de microtubules (MT) stable et à extrémité positive uniquement dans cet axone en devenir. De plus, il y a un transport vers l'axone en croissance ainsi qu'une traduction locale d'ARNm de facteurs pro-croissance ou des sous-unités de microtubules, et qui est induite par le signal de guidage Nétrine-1 (Hengst *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter que la polarité moléculaire axone/dendrite est ensuite maintenue, entre autres, par un mécanisme d'élimination par endocytose des récepteurs polarisés diffusant vers le pôle opposé. Ce mécanisme est très conservé entre les neurones de souris, de rats, d'humain, mais aussi de nématodes, marquant une fois de plus la haute conservation dans la polarisation cellulaire (Eichel *et al.*, 2022).

La spécification axonale lancée, un cône de croissance se forme au bout de l'axone en devenir. Le cône de croissance est une structure constituée de trois compartiments distincts (**Fig. 1.2B**) : le domaine central (domaine C) contenant surtout des MT provenant de la gaine axonale qui se trouve en amont de celui-ci, la zone de transition (zone T) qui semble surtout contenir des arcs d'actine, dont le but est de limiter la pénétration des microtubules du domaine C vers le troisième compartiment, qui est le domaine périphérique (domaine P). Le domaine P contient le bord de croissance du cône et un réseau très dynamique de F-actine capable de former différentes structures protrusives. Dans ces structures, on retrouve les lamellipodes, constitués d'un maillage d'actine branché, et les filipodes, composés de faisceaux parallèles de filaments d'actine (Norris et Lundquist, 2011). La croissance axonale pourrait se faire selon l'hypothèse répandue de l'embrayage (« clutch » en anglais) qui se déroule en trois phases (Schelski et Bradke, 2017). On pense tout d'abord que les filaments d'actine du domaine P se fixent à des zones d'adhésion qui sont connectées à des molécules de la matrice extracellulaire (MEC). Grâce à cela, le cytosquelette d'actine peut alors former des protrusions qui vont entraîner une force de tension au sein du cône de croissance et rapprocher la zone T de ces points d'adhésion. C'est la phase de protrusion (1). On voit ensuite une réorientation des arcs d'actine de la zone T, qui permet aux microtubules de pénétrer dans le domaine P durant la phase d'engorgement (2). Finalement, la gaine axonale est allongée par accumulation de MT dans l'ancienne zone T du cône de

croissance, qui devient alors le nouveau domaine C dans la phase de consolidation (3). On comprend alors que les régulations du cytosquelette à la base de la réorganisation du cône de croissance et de la formation des protrusions au bord de croissance sont une étape limitante pour la formation et la croissance des extensions neuronales (Schelski et Bradke, 2017).

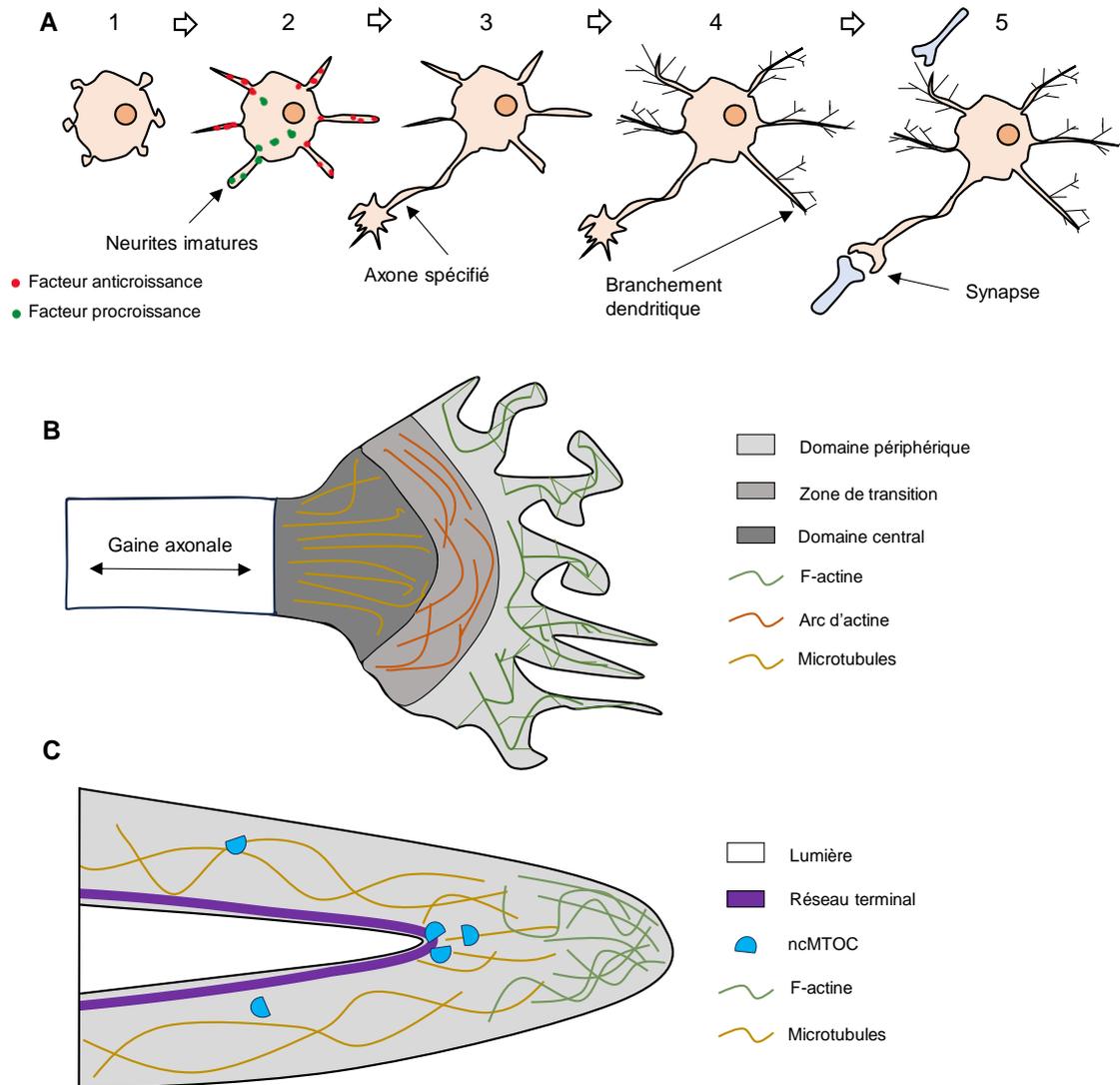


Figure 1.2. Mise en place de la polarité et structures de croissance

(A) Les cinq étapes de la mise en place de la polarité neuronale dans des neurones de l'hippocampe de rongeurs en culture *in vitro*. Des bourgeonnements apparaissent rapidement après la mise en culture des neurones (1), qui se développent ensuite en neurites immatures (2). Des mécanismes d'induction et d'inhibition de la croissance favorisent le développement d'un neurite en particulier qui développe alors un cône de croissance; il s'agit de la spécification axonale (3). Les autres neurites s'arborescent en dendrites (4), et plus tard encore, les spécifications fonctionnelles telles que la formation de synapses ou d'épines dendritiques se mettent en place (5). Schéma adapté de (Takano *et al.*, 2015).

(B) Structure du cône de croissance axonal. La gaine axonale est en lien direct avec le domaine central du cône de croissance où se concentrent les microtubules. La zone de transition est composée d'arcs d'actines formés à l'aide de la myosine II, qui inhibent le mouvement des microtubules vers le bord de croissance. Le domaine périphérique

contient un réseau riche et dynamique de F-actine qui peut former des structures protrusives comme les lamellipodes et les filipodes. Celles-ci se forment au niveau du bord de croissance du cône et sont nécessaires à la croissance axonale. Schéma adapté de (Schelski et Bradke, 2017). (C) Structure du bout du canal de la cellule excrétrice en croissance. On retrouve un réseau riche en F-actine au bord de croissance précédé d'une zone plus riche en microtubules. Des centres d'organisation des microtubules non centrosomaux (ncMTOC) sont présents et organisent les dynamiques de microtubules le long des canaux en croissance. Le réseau membranaire composé de F-actine, de filaments intermédiaires et de microtubules soutient la membrane apicale qui borde la lumière au sein du canal. Schéma adapté de (Shaye et Soto, 2021).

Chez *C. elegans*, la mise en place de la polarité neuronale a surtout été étudiée dans les neurones HSN, où l'on voit une polarisation moléculaire de récepteurs de guidage (discuté plus loin) au niveau ventral du soma. On voit ensuite la formation d'un bord de croissance ventral qui présente plusieurs neurites à activité protrusive. Ces neurites vont s'étendre vers la ligne médiane ventrale du ver, puis un d'eux (le futur axone) va augmenter en taille, tandis que les autres vont régresser (Adler *et al.*, 2006). À plusieurs niveaux, le développement des neurones HSN est proche du modèle des neurones de l'hippocampe. Dans des conditions *in vivo*, la polarisation neuronale pourrait cependant se dérouler différemment ou être plus complexe. Certains neurones peuvent hériter de la polarité de leur progéniteur, et d'autres suivre la polarisation d'un neurone déjà mis en place, appelé l'axone pionnier, selon le modèle de contact et départ (« touch and go » en anglais) qui met en jeu des molécules d'adhésion et de contact entre ces deux neurones (Namba *et al.*, 2014).

Il existe un manque dans les connaissances concernant la mise en place de la polarité dans des neurones en conditions *in vivo* et l'étude des mécanismes à la base de ce processus mériterait d'être approfondie. De plus, à l'heure actuelle, le régulateur du cytosquelette RhoA est le seul facteur clairement identifié comme étant impliqué dans une boucle d'inhibition de la croissance axonale (Takano *et al.*, 2015). RhoA est en effet capable d'induire la formation d'arcs d'actine via la myosine II dans le cône de croissance afin de limiter la pénétration des MT dans le domaine P et donc la croissance axonale. RhoA est même dégradé dans le neurite en cours de spécification lors de la polarisation neuronale (Cheng *et al.*, 2011; Dupraz *et al.*, 2019). Il manque alors beaucoup de connaissances pour mieux comprendre comment est régulé cet équilibre entre boucles de rétrocontrôle positif et négatif. Finalement, bien que certaines études explorent l'implication des signaux extrinsèques au neurone sur la polarisation neuronale (Adler *et al.*, 2006; Limerick *et al.*, 2018; Tang et Wadsworth, 2014; Yang *et al.*, 2014), la coordination entre ces signaux et les modifications du cytosquelette nécessaires à la polarisation, reste incomprise. Quels sont les mécanismes d'inhibition de la croissance axonale permettant la spécification d'un seul neurite ? Comment se fait la coordination entre l'activation de la croissance dans l'axone en devenir et l'inhibition dans les autres ? Comment la signalisation extracellulaire impacte-t-elle la polarisation neuronale ? Telles sont alors des

questions sans réponse qui nécessitent une étude plus approfondie. Ci-dessous, je décris le rôle de certains signaux de guidage extrinsèques et de modulateurs du cytosquelette qui participent à la croissance et au bon guidage des neurites, mais qui semblent aussi intervenir plus tôt lors de la morphogenèse neuronale comme dans la polarisation.

1.2.1 Les voies de guidage

1.2.1.1 Voie de UNC-6/Nétrine

Le signal de guidage UNC-6/Nétrine a été premièrement découvert chez l'organisme *C. elegans* (Hedgecock *et al.*, 1990) puis purifié par la suite sur la base de son affinité à l'héparine (Serafini *et al.*, 1994). Il possède quatre isoformes secrétées et deux attachées par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) chez les mammifères (Nakashiba *et al.*, 2002), tandis qu'une seule isoforme chez *C. elegans*, qui est sécrétée. La Nétrine partage une forte homologie avec des sous-unités de la laminine, et possède trois domaines identiquement nommés entre les orthologues mammifères et chez *C. elegans* : les domaines IV, V et un domaine C-terminal. Le domaine IV est un domaine semblable aux immunoglobuline (Ig) globulaire, le domaine V contient trois répétitions de domaine EGF (facteur de croissance épidermique) (**Fig. 1.3A**, (Finci *et al.*, 2014; Ogura *et al.*, 2012)). UNC-6/Nétrine a été établie comme un signal disséminé dans la matrice extracellulaire (Wadsworth, 2002), ou qui peut agir à courte distance sur des récepteurs spécifiques situés à la surface de certains cônes de croissance. Chez le ver, UNC-6 est exprimée au moins par les cellules ventrales, les progéniteurs de la vulve ainsi que les cellules gliales et certains neurones de l'anneau nerveux (Asakura *et al.*, 2007; Wadsworth *et al.*, 1996).

Bien que la Nétrine puisse se lier à des récepteurs comme DSCAM (Ly *et al.*, 2008) ou la Néogénine (Wilson et Key, 2006) chez les mammifères, UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 sont ses principaux récepteurs connus chez *C. elegans*. Le récepteur DCC a premièrement été découvert comme un marqueur pronostique de tumeur du colon (Fearon *et al.*, 1990). DCC appartient à la superfamille des immunoglobulines et contient quatre domaines Ig suivis par six répétitions de domaine fibronectine (Fn) de type III, un domaine transmembranaire (TM) et finalement trois domaines intracellulaires nommés P1, P2 et P3, qui sont conservés (**Fig. 1.3B**, (Finci *et al.*, 2014)). D'autre part, UNC-5/Unc5 possède deux domaines Ig, deux domaines thombospondine (TSP) de type I, un domaine TM, et dans sa partie intracellulaire : un domaine ZU5 (pour Zona Occludens), un domaine UPA (qui peut interagir avec le domaine P1 de UNC-40/DCC (Finci *et al.*, 2014)) et finalement un domaine DEATH, impliqué dans l'apoptose et la signalisation pro-inflammatoire (**Fig. 1.3C**). Contrairement à *unc-6* (deux isoformes sensiblement similaires) et *unc-40* (1 isoforme), *unc-5* possède sept isoformes dont l'isoforme court appelé UNC-5b semble avoir des fonctions

distinctes des autres isoformes, notamment dans le contexte de protrusivité du cône de croissance des neurones VD/DD (Mahadik et Lundquist, 2023a).

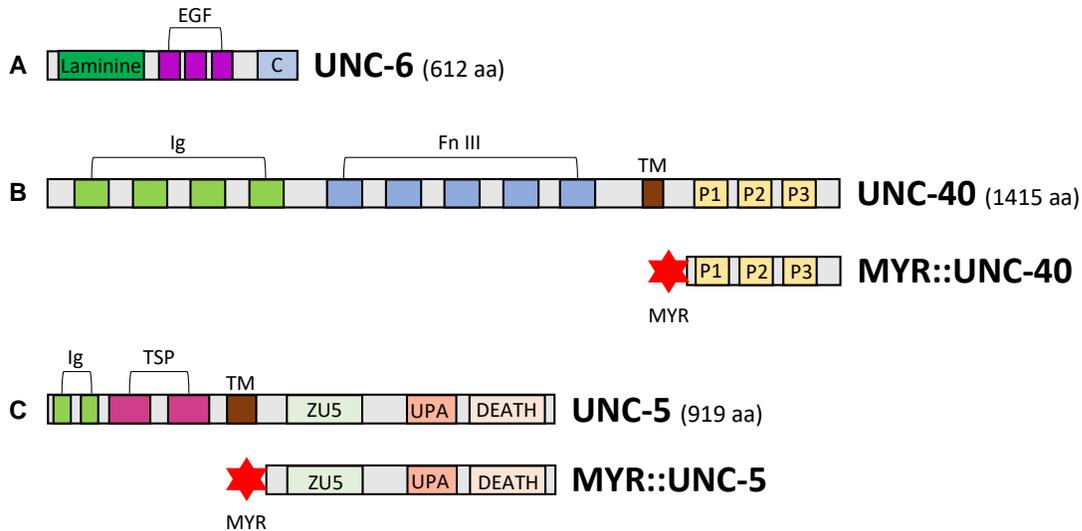


Figure 1.3. Domaines protéiques des molécules de guidage de la voie UNC-6/Nétrine
Structures de UNC-6/Nétrine (A), UNC-40/DCC et MYR::UNC-40 (B), UNC-5/Unc5 (isoforme A, la plus longue) et MYR::UNC-5 (C). Si l'isoforme n'est pas mentionnée, c'est qu'une seule est connue. C = domaine C-terminal. EGF = domaine du facteur de croissance épidermique. P1 à P3 = site d'interaction intracellulaire. TM = région transmembranaire. Fn III = domaine de fibronectine de type III. Ig = domaine de type immunoglobuline. Étoile rouge = myristoylation. TSP = domaine thrombospondine de type I.

Dans son fonctionnement, la Nétrine peut interagir avec ses récepteurs UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 afin d'induire le guidage de l'axone en développement, et ce soit vers la source de UNC-6/Nétrine (attractif), soit contre cette source de signal (répulsif). Lors de l'attraction, la Nétrine induit la dimérisation ou l'oligomérisation de plusieurs récepteurs UNC-40/DCC via différents sites d'interaction (Finci *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014). En effet, la Nétrine-1 possède trois sites d'interaction avec les récepteurs DCC qui sont très conservés chez les isoformes de la Nétrine impliquées dans le guidage neuronal, mais aussi entre les espèces, comme c'est le cas pour *C. elegans* (Finci *et al.*, 2014). La liaison de DCC pour ces sites se fera selon l'ordre d'affinité de sites 1>3>2. Il est intéressant de noter que DCC a aussi deux sites de liaison pour la Nétrine-1 dans son domaine V, pouvant alors lier deux molécules de Nétrine (Finci *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014), induisant potentiellement une multimérisation, et non une dimérisation du récepteur comme on a longtemps pensé. La dimérisation, ou multimérisation, de récepteurs UNC-40/DCC a été reliée à un développement axonal de plusieurs neurones vers des sources de UNC-6/Nétrine proche (Chan *et al.*, 1996; Gitai *et al.*, 2003; Hedgecock *et al.*, 1990). UNC-40 et UNC-6 sont conjointement responsables de la formation et de la stabilité des protrusions dans le cône de croissance de certains neurones, comme HSN ou VD (Norris et Lundquist, 2011).

Mais UNC-6/Nétrine peut également interagir avec UNC-5/Unc5 à travers son deuxième site d'interaction, site où il y aurait compétition pour la liaison avec UNC-40/DCC (Finci *et al.*, 2014; Priest *et al.*, 2024). UNC-5/Unc5 peut induire une répulsion du cône de croissance envers la source de UNC-6/Nétrine (Leonardo *et al.*, 1997; Leung-Hagesteijn *et al.*, 1992), principalement en altérant son cytosquelette (Norris et Lundquist, 2011; Norris *et al.*, 2014). En effet, il peut restreindre la présence de microtubules à extrémité positive, qui ont une activité pro-protrusive, dans le cône de croissance (Gujar *et al.*, 2018) et induire la localisation de la F-actine au bord opposé de la source de Nétrine (Norris et Lundquist, 2011). La signalisation médiée via UNC-5/Unc5 et UNC-6/Nétrine paraît inhiber la stabilité des protrusions du cône de croissance dans une direction donnée, et ce mécanisme est dépendant de UNC-40/DCC (Norris et Lundquist, 2011). Bien que dans la majorité des cas, la répulsion induite par UNC-5/Unc5 nécessite la présence de UNC-40/DCC (Finci *et al.*, 2014; Hedgecock *et al.*, 1990; Keleman et Dickson, 2001; Leung-Hagesteijn *et al.*, 1992; Macneil *et al.*, 2009; Norris et Lundquist, 2011; Norris *et al.*, 2014), il existe des mécanismes où UNC-5/Unc5 induit la répulsion envers une source de UNC-6/Nétrine de manière indépendante de UNC-40/DCC (Hedgecock *et al.*, 1990; Keleman et Dickson, 2001; Macneil *et al.*, 2009). Après l'utilisation très répandue d'une vision selon laquelle un récepteur peut induire une signalisation attractive ou répulsive envers une source de signal donné, il a été soulevé qu'un tel modèle était limitant et trop simpliste pour représenter le rôle réel de chaque acteur du guidage axonal et de la polarisation neuronale. Afin de trouver un modèle plus proche de la réalité, l'équipe du Dr Wadsworth (Limerick *et al.*, 2018) a proposé un modèle probabilistique selon lequel UNC-5 n'est plus répulsif à la source de Nétrine, mais semble plutôt contrôler le mouvement de la membrane du cône de croissance vers, contre ou perpendiculairement à la source de la Nétrine, dépendamment du contexte dans lequel il se trouve.

Afin d'étudier le rôle de ces récepteurs dans différents contextes ainsi que leur dépendance au signal UNC-6/Nétrine, la construction de récepteurs dits constitutivement actifs a été proposée. Par analogie avec certains récepteurs tyrosine kinase, la perte de la partie extracellulaire du récepteur mène à une activation constitutive. Dans ce cas, la partie intracellulaire peut induire une signalisation sans la nécessité d'interaction du récepteur avec le signal qui vient l'activer, ici UNC-6. En ciblant le récepteur à la membrane au moyen d'un signal de modification lipidique, la myristoylation, on obtient un récepteur capable d'induire des voies de signalisation intracellulaire en absence de son signal qui, de plus, est localisé à la membrane comme le sont les récepteurs endogènes : le récepteur MYR::UNC-40 (**Fig. 1.3B**, (Gitai *et al.*, 2003)). Exprimé de manière transgénique, MYR::UNC-40 inhibe la protrusivité dans le cône de croissance des neurones VD (Norris et Lundquist, 2011) et induit un excès de croissance dans les neurones AVM et HSN (Gitai *et al.*, 2003) d'une manière indépendante de UNC-6 et de UNC-40 endogènes, confirmant ainsi l'activation constitutive du récepteur. L'effet de MYR::UNC-40 peut cependant varier selon la présence de

UNC-5 et des contextes cellulaires (Gitai *et al.*, 2003; Norris et Lundquist, 2011), ce qui signifie que MYR::UNC-40 peut toujours interagir directement avec UNC-5 ou qu'il peut nécessiter la signalisation qui découle de ce récepteur. Similairement, un récepteur UNC-5 constitutivement actif a été construit : MYR::UNC-5, capable d'inhiber la protrusivité du cône de croissance des neurones VD et ce d'une manière indépendante de UNC-6 mais dépendante de UNC-40, du moins dans le contexte où il a été étudié (**Fig. 1.3C**, (Norris *et al.*, 2014)).

Bien que la distribution du signal de guidage dans la matrice ou le gradient de signal puisse jouer un rôle important sur le cône de croissance, la disponibilité sélective et la distribution des récepteurs à sa surface doivent également exercer une fonction primordiale. Effectivement, la localisation des récepteurs à la surface du cône de croissance dans l'espace (Nguyen *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2015; Niftullayev et Lamarche-Vane, 2019) mais aussi dans le temps (Norris et Lundquist, 2011) impacte la migration neuronale et le guidage axonal. Dans le contexte de la voie de guidage de la Nétrine, la localisation de UNC-40 varie durant le développement de la cellule d'ancrage de la vulve (Wang *et al.*, 2014) et le développement de l'axone des neurones HSN (Adler *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2009). Dans ce deuxième exemple, UNC-40 semble d'abord polarisé à la surface ventrale pour ensuite former des zones concentrées au bord de croissance (Kulkarni *et al.*, 2013), un processus qui initie la rupture de la symétrie de ce neurone. Cette polarisation dite asymétrique a l'air de dépendre de UNC-6 directement, mais aussi d'autres partenaires (Limerick *et al.*, 2018; Tang et Wadsworth, 2014; Yang *et al.*, 2014) et permet de définir le site de développement du futur axone (Adler *et al.*, 2006). Cela démontre que la voie de guidage UNC-6/Nétrine est impliquée dans de nombreux processus cellulaires se déroulant parfois avant le guidage axonal, et dont certains sont nécessaires au bon développement de cellules polarisées, comme la cellule excrétrice (Hedgecock *et al.*, 1990).

1.2.1.2 La voie de guidage de SLT-1/Slit

Les premières découvertes concernant le signal de guidage Slit ont été faites chez la drosophile lors du guidage d'axones aux abords de la ligne médiane lors de l'embryogenèse (Rothberg *et al.*, 1988; Seeger *et al.*, 1993). Slit agit comme un signal répulsif bloquant le passage de la ligne médiane aux neurones possédant les récepteurs de ce ligand (Kidd *et al.*, 1999). Ce signal de guidage est très conservé entre les espèces : trois gènes codent pour des Slit, Slit-1 à 3, chez les vertébrés, tandis qu'un seul chez les invertébrés, *slt-1* chez *C. elegans*. Ils sont composés de quatre domaines riches en leucines, six domaines de type EGF où se trouve un site de clivage chez les vertébrés, un domaine appelé ALPS puisqu'il partage chez la drosophile une haute conservation dans les protéines Agrine, Laminine, Perlécan et Slit (Rothberg et Artavanis-Tsakonas, 1992), suivi à nouveau par des domaines de type EGF (un chez les invertébrés et trois chez les vertébrés)

(**Fig. 1.4A**, (Tong *et al.*, 2019)). Bien que Slit ait d'abord été décrit comme un signal de guidage neuronal, il joue aussi un rôle dans le développement des reins et du cœur, dans la régulation de l'angiogenèse, la migration cellulaire, l'ostéogenèse ainsi que la progression tumorale chez les mammifères (Niimi, 2021).

Le principal récepteur de Slit s'appelle Robo (pour Roundabout, faisant allusion au phénotype de la ligne médiane des embryons mutants de la drosophile). Chez la plupart des espèces, trois gènes codent pour ce récepteur, Robo-1 à 3, excepté chez le nématode où on ne trouve qu'un seul gène capable de cette fonction : *sax-3* (pour "sensory axon guidance defective"). Le récepteur SAX-3/Robo est transmembranaire et possède 5 domaines immunoglobuline, trois domaines Fn III ainsi qu'une région intracellulaire. SAX-3/Robo peut interagir avec des modulateurs du cytosquelette tel que UNC-34/Enabled par l'intermédiaire de cette région intracellulaire (**Fig. 1.4B**, (Yu *et al.*, 2002)), et peut spécifier la réponse cellulaire à un signal de guidage donné (Bashaw et Goodman, 1999).

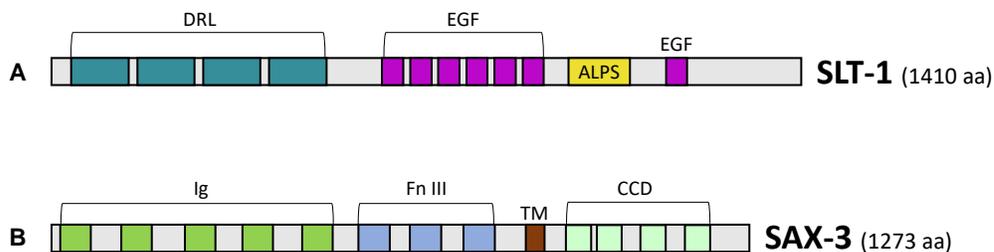


Figure 1.4. Domaines protéiques des molécules de guidage de la voie SLT-1/Slit Structures de SLT-1/Slit (A) et de SAX-3/Robo (isoforme B, la plus longue) (B). Si l'isoforme n'est pas mentionnée, c'est qu'une seule est connue. EGF = domaine du facteur de croissance épidermique. TM = région transmembranaire. Fn III = domaine de fibronectine de type III. Ig = domaine de type immunoglobuline. CCD = domaine cytoplasmique conservé avec la drosophile. ALPS = domaine Agrine, Laminine, Perlécan, Slit. DRL= domaine riche en leucines.

Chez *C. elegans*, SLT-1/Slit est une molécule sécrétée dans la matrice extracellulaire dans la région dorsale du ver et agit comme un signal chimiorépulsif des cônes de croissance qui expriment le récepteur SAX-3 à leur surface. À travers l'interaction avec ses récepteurs cibles, SLT-1/Slit régule le guidage axonal au niveau de la ligne médiane du ver, comme chez la drosophile. De plus, SAX-3 peut partiellement remplacer Robo1 chez la drosophile lors de la répulsion des axones au niveau de la ligne médiane montrant la forte conservation évolutive de ce récepteur (Daiber *et al.*, 2021). SLT-1/Slit participe aussi à la migration de certains neurones et au guidage ventral de leur cône de croissance en parallèle de la voie de UNC-6/Nétrine (Hao *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002; Zallen *et al.*, 1998).

Grâce à des cribles génétiques, d'autres facteurs interagissant avec SAX-3 ont été identifiés, dont le récepteur EVA-1/EVA1C (pour « Enhancer of Ventral-Axon guidance defects in *unc-40* mutants », (Fujisawa *et al.*, 2007)), qui agit comme corécepteur de SAX-3/Robo pour le signal SLT-1/Slit chez *C. elegans*. EVA-1/EVA1C pourrait permettre de spécifier le rôle de SAX-3/Robo comme récepteur de SLT-1/Slit dans certains contextes cellulaires (Fujisawa *et al.*, 2007). En effet, des mutants *sax-3* peuvent induire des défauts que les mutants *slt-1* n'induisent pas, suggérant alors des rôles pour SAX-3/Robo qui sont indépendants du signal de guidage SLT-1/Slit (Fujisawa *et al.*, 2007; Hao *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2015; Zallen *et al.*, 1999). On pense alors que ces rôles pourraient être dépendants d'un autre signal de guidage ou bien alors complètement indépendants de ligands extracellulaires. On remarque néanmoins que l'expression ectopique du récepteur EVA-1/EVA1C dans des contextes cellulaires où il n'est pas présent normalement, et où SAX-3 est exprimé seul, induit une apparition de nouveaux défauts de guidage dépendants de la présence de SLT-1 (Fujisawa *et al.*, 2007). On pense alors que EVA-1/EVA1C induit un rôle de SAX-3/Robo spécifiquement en réponse au signal de guidage SLT-1/Slit.

1.2.1.3 Interaction des voies SLT-1/Slit et UNC-6/Nétrine

Dans plusieurs contextes et différents modèles animaux, on observe une interaction hiérarchique entre les voies de Slit/Slt-1 ou son récepteur Robo/SAX-3, et la voie de Nétrine/UNC-6 ou ses récepteurs DCC/UNC-40 et Unc5/UNC-5 (Bai *et al.*, 2011; Fothergill *et al.*, 2014; Fujisawa *et al.*, 2007; Leyva-Díaz *et al.*, 2014). Par exemple, le guidage axonal chez les neurones HSN de *C. elegans* est assuré par une synergie entre les signaux UNC-6/Nétrine et SLT-1/Slit (Xu *et al.*, 2015). Mais dans ce contexte, UNC-40/DCC pourrait agir en partie indépendamment de son ligand UNC-6/Nétrine, similairement à d'autres contextes (Alexander *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2002), et conjointement au récepteur SAX-3/Robo. Cette action conjointe de UNC-40/DCC et SAX-3/Robo semble passer par la protéine SYD-1/SYDE2 qui interagit physiquement avec la partie intracellulaire de ces deux récepteurs, et qui peut induire l'activation de régulateurs du cytosquelette (Xu *et al.*, 2015). Les récepteurs UNC-40/DCC et SAX-3/Robo sont aussi capables d'interaction physique directement entre eux via leur partie intracellulaire (Su *et al.*, 2024; Yu *et al.*, 2002). Cette interaction pourrait permettre à UNC-40/DCC de potentialiser le rôle de SAX-3/Robo dans sa réponse au signal SLT-1/Slit lors du guidage du neurone AVM (Yu *et al.*, 2002). Inversement, en absence de SLT-1/Slit et/ou de EVA-1/EVA1C dans le cône de croissance de AVM, SAX-3 peut inhiber la signalisation en aval de UNC-40/DCC et son signal de guidage UNC-6/Nétrine (Fujisawa *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Enfin, lors de la formation du cône de croissance dans les neurones HSN, le récepteur SAX-3/Robo a un impact sur la localisation asymétrique du récepteur UNC-40/DCC, et pourrait être requis pour les fonctions de UNC-5/Unc5 dans le guidage ventral de cet axone,

ajoutant des degrés d'interaction supplémentaires entre les deux voies (Limerick *et al.*, 2018; Tang et Wadsworth, 2014).

1.2.2 La famille des Rho GTPases

Le guidage et la morphogenèse neuronaux sont donc influencés par de nombreux facteurs extrinsèques, mais tous ces signaux doivent être interprétés et intégrés par la cellule. Cette étape peut passer par différents aspects, notamment par la modification du taux local de calcium intracellulaire ou encore par les nucléotides cycliques (cAMP/gAMP), mais les acteurs principaux de cette réponse cellulaire sont des modulateurs du cytosquelette universels : les Rho GTPases (Niftullayev et Lamarche-Vane, 2019).

1.2.2.1 Généralités

La superfamille des petites Ras GTPases comprend cinq classes : les Ras, les Rho, les Arf, les Rab (pour Ras-Like Brain) et les Ran (pour Ras-like Nuclear) GTPases, les Rho étant celles qui contrôlent principalement le cytosquelette. Les GTPases agissent comme interrupteur moléculaire affectant de nombreux processus biologiques. Elles peuvent être dans deux états : lié à du GTP, une forme dite active, ou lié à du GDP, leur forme inactive (**Fig. 1.5A**, (Reiner et Lundquist, 2018)).

Les principales effectrices qui agissent sur ces GTPases sont classées en trois groupes. Les GEF (pour Guanine nucleotide Exchange Factor) sont capables d'éjecter le GDP d'une GTPase de la famille Ras et, le GTP étant plus présent dans la cellule que le GDP, une nouvelle molécule de GTP peut prendre sa place, activant ainsi la protéine. À l'inverse, les GAP (pour GTPase Activating Protein) activent spécifiquement l'activité GTPase, induisant ainsi l'hydrolyse du GTP attaché en GDP, inactivant donc la protéine. Finalement, on trouve les GDI (pour Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor), des protéines chaperonnes capables de lier des GTPases inactives (et donc liées à un GDP) afin de les séquestrer dans le cytoplasme et empêcher l'accès à des GEF pour une future activation (**Fig. 1.5A**, (Niftullayev et Lamarche-Vane, 2019)).

Les GTPases ont des structures sensiblement similaires entre elles et se composent de la manière suivante (**Fig. 1.5B**) : le domaine principal est le domaine G, qui permet la liaison au GDP/GTP, l'interaction avec les effecteurs de la GTPase quand la conformation le permet, et finalement la partie catalytique de l'hydrolyse. Plus précisément, on retrouve les boîtes G (« G-boxes » en anglais) qui sont les domaines GTPases et les régions switch 1 et 2 qui changent de conformation en fonction de la liaison à un GDP ou un GTP, et permettent ainsi l'interaction, ou non, avec les effecteurs (Reiner et Lundquist, 2018). La fonction de la Rho GTPase est plus finement régulée par ses régions N- et C-terminale qui peuvent impacter

la localisation cellulaire. La séquence CAAX permet l'ajout de modifications lipidiques, telles qu'un groupement farnésyl, géranyle géranyle ou palmitoyl en C-terminal (pour les Ras, Rho et Rab), ou bien encore myristoyl en N-terminal (pour la Rho GTPase MIG-2). Cette modification lipidique rend possible l'ancrage de la GTPase à la membrane plasmique ou à des membranes de sous-compartiments cellulaires pour moduler la fonction de la GTPase. Enfin, entre le domaine G et la séquence CAAX, se trouve la région hypervariable. Cette région possède une charge électrostatique qui ajoute un niveau de contrôle dans la régulation du ciblage cellulaire, d'autant plus que cette région est sujette aux phosphorylations qui peuvent alors modifier la charge électrostatique. Vient s'ajouter à tout cela le rôle des protéines chaperonnes, comme les GDI qui affectent aussi la localisation des petites GTPases (Reiner et Lundquist, 2018). Il est intéressant de noter que des modifications d'acides aminés à des positions très précises induisent des effets identiques chez tous les membres de la superfamille des Ras GTPases. Notamment, une substitution aux positions 12, 13 et 61 résulte en une activation dite constitutive des protéines : les GTPases sont alors constamment liées à du GTP et donc actives (Reiner et Lundquist, 2018). Une substitution aux alentours de l'acide aminé 28 (généralement F28L) insensibilise les GTPases au GEF, induisant ainsi des cycles GDP(inactif) \leftrightarrow GTP(Actif) beaucoup plus rapides, et permettant des niveaux d'activation intermédiaires (Reinstein *et al.*, 1991). Pour la GTPase Rac1/CED-10 par exemple, la mutation P29S impacte la région switch 1, ce qui lui confère la capacité d'activation spontanée (Davis *et al.*, 2013; Norgaard *et al.*, 2018).

Chez *C. elegans*, il existe sept gènes codants pour des petites Rho GTPases, qui partagent 90 à 97% de similarité protéique avec leurs orthologues humains (Quinn *et al.*, 2008). Les trois principaux et mieux décrits sont *ced-10/Rac1*, *cdc-42/Cdc42* et *rho-1/RhoA*. On trouve ensuite *mig-2*, dont la séquence partage une homologie avec *Rac1* et *Cdc42* mais dont la fonction est plus proche de celle de *RhoG*. *rac-2* est une copie quasi conforme du gène *ced-10*, qui semble cependant pouvoir agir indépendamment de ce dernier, comme dans le guidage axonal par exemple (Struckhoff et Lundquist, 2003). Les GTPases CED-10/Rac1, MIG-2/RhoG et RAC-2 forment une sous-catégorie appelée « les GTPases Rac ». Et finalement, il existe deux Rho GTPases dites atypiques : *chw-1* et *crp-1*. Bien qu'en petit nombre, ces Rho GTPases sont impliquées dans de très nombreux processus biologiques et contextes cellulaires différents (Reiner et Lundquist, 2018). On pense que c'est majoritairement la multitude de Rho GEF et GAP qui permet une telle variété de fonctions ainsi que le contrôle spatiotemporel des Rho GTPases. Les GEF et GAP peuvent être spécifiques d'une Rho GTPase, comme par exemple la GAP SRGP-1 pour CED-10/Rac1 (Neukomm *et al.*, 2011) et la GEF *sax-1* pour RHO-1/RhoA (Zallen *et al.*, 2000). Mais ces enzymes peuvent aussi réguler la fonction de plusieurs GTPases, comme UNC-73/Trio KALRN qui possède deux régions GEF, une spécifique des GTPases Rac comme CED-10/Rac1 ou MIG-2/RhoG, puis une autre spécifique de RHO-1/RhoA (Marcus-Gueret *et al.*, 2012). Bien que la plupart des Rho GAP/GEF soient exprimées de manière

ubiquitaire, certaines pourraient être limitées à un tissu, et leur rôle dans la cellule peut varier au cours du temps (Niftullayev et Lamarche-Vane, 2019; Reiner et Lundquist, 2018). Les Rho GTPases constituent donc un pivot central pour réguler le cytosquelette avec les GEF et GAP en amont, et en aval, différents effecteurs qui peuvent agir indirectement (par l'intermédiaire de kinases par exemple) ou directement sur les dynamiques du cytosquelette principalement d'actine, mais aussi des microtubules (Reiner et Lundquist, 2018) et de la myosine (Dupraz *et al.*, 2019; Kimura *et al.*, 1996; Wissmann *et al.*, 1997).

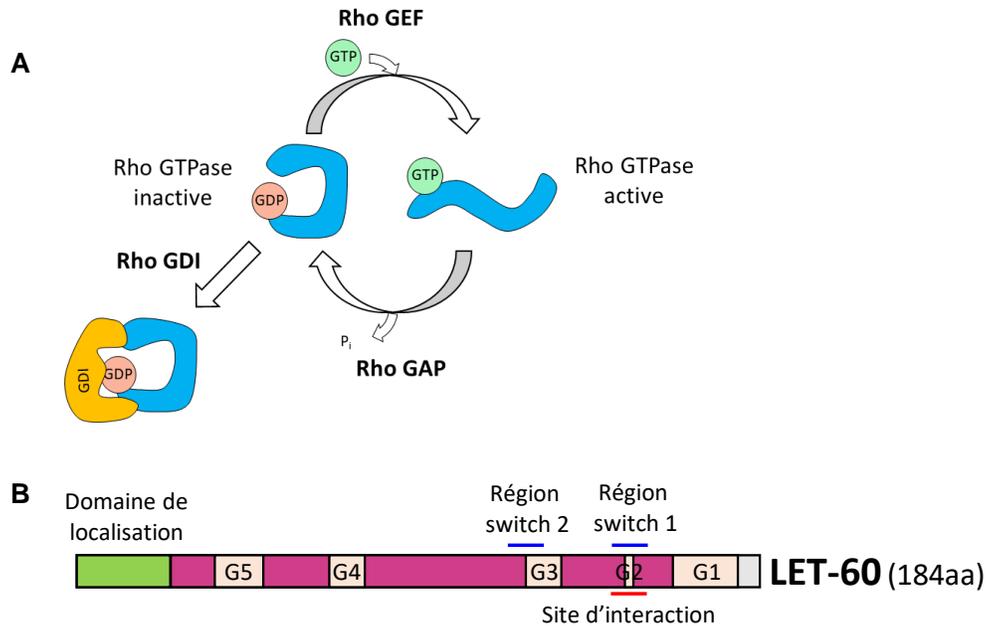


Figure 1.5. Les Rho GTPases

(A) : Cycle des Rho GTPases. Les Rho GEF peuvent remplacer le GDP des Rho GTPases par du GTP, ce qui va induire un changement conformationnel de la protéine et lui permettre d'interagir avec des effecteurs; on la dit activée. Les Rho GAP peuvent activer la fonction GTPase des Rho GTPases, induisant l'hydrolyse du GTP en GDP, qui repassent donc dans leur conformation inactive. Les Rho GDI sont des protéines chaperonnes capables de séquestrer des Rho GTPases dans leur conformation inactive. (B) La structure de la protéine LET-60/Ras est très représentative des GTPases. Son domaine principal est le domaine effecteur (rose). Il comprend les boîtes G (1 à 5, en beige) qui permettent la liaison avec du GDP ou GTP, le site d'interaction (trait rouge) au moyen duquel la protéine peut se lier à des effecteurs quand sa conformation le permet. Les régions switch 1 et 2 (traits bleus) impactent la conformation de la GTPase en fonction de la liaison à du GDP ou GTP. Finalement, on trouve aussi le domaine de localisation (vert) qui contient la région CAAX pour attacher une modification lipidique ainsi que la région hypervariable. Adapté de (Reiner et Lundquist, 2018).

1.2.2.2 Rôles généraux

Les Rho GTPases ont des rôles primordiaux lors du développement embryonnaire de nombreuses espèces, étant donné que la perte de fonction de certaines d'entre elles provoque de la létalité embryonnaire. Chez *C. elegans*, c'est le cas pour la mutation des gènes *ced-10*, *rho-1* et *cdc-42*. En effet, leurs rôles se manifestent très tôt dans le développement d'organismes. Par exemple, CDC-42 et RHO-1 régulent la

polarisation des premières divisions cellulaires en contrôlant la localisation du complexe de polarité apicale PAR (constitué de *par-3/par-6/pkc-3*) soit par une interaction physique pour CDC-42 (Nishimura *et al.*, 2005), soit par la contractilité de l'actomyosine pour RHO-1 (Schonegg et Hyman, 2006). Plus tard, RHO-1, CED-10 et MIG-2 ainsi que la Rho GEF UNC-73/Trio agissent dans l'élongation embryonnaire en régulant les dynamiques des cytosquelettes d'actine et de myosine (Reiner et Lundquist, 2018). Un autre rôle important des Rho GTPases est dans le processus apoptotique découvert chez *C. elegans*. On a révélé l'implication de CED-10 (pour *cell death abnormal*, (Reddien et Horvitz, 2000)), puis MIG-2 (Debakker *et al.*, 2004) et CDC-42 (Hsieh *et al.*, 2012), dans la régulation du cytosquelette nécessaire à la formation des protrusions responsables du nettoyage des corps apoptotiques par les cellules environnantes.

1.2.2.3 En aval des voies de guidage

La fine régulation des Rho GTPases les implique dans de nombreux processus neurodéveloppementaux. Par exemple, CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG agissent dans les mécanismes de migration des neuroblastes Q et de la DTC (« Distal Tip cell ») (Shakir *et al.*, 2006), une cellule migratrice de la gonade, donc non neuronale, mais qui nécessite aussi la voie de guidage UNC-6/Nétrine pour son développement (Su *et al.*, 2000). On a ensuite découvert que les Rho GTPases peuvent agir en aval de ces voies de guidage, surtout lors du guidage axonal (Reiner et Lundquist, 2018). Comme expliqué précédemment, le guidage axonal correspond à la formation de structures protrusives au bord de croissance du cône axonal. Ces dernières servent à l'exploration de la matrice extracellulaire et l'extension de l'axone en développement. Dans les neurones PDE, UNC-40 active CDC-42 qui contrôle les GTPases CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG en passant par la GEF TIAM-1 pour réguler les protrusions dans le cône de croissance et ainsi le guidage de l'axone (Demarco *et al.*, 2012). Similairement, CED-10 module le guidage des neurones AVM et HSN en aval de la signalisation UNC-6/Nétrine - UNC-40/DCC (Gitai *et al.*, 2003), ce qui indique que les GTPases Rac participent au guidage axonal orienté vers le pôle ventral du ver. Dans ce contexte, les GTPases Rac agissent majoritairement sur deux cibles qui sont le complexe de nucléation pour la polymérisation de l'actine Arp2/3 (Demarco *et al.*, 2012; Norris *et al.*, 2009) et la protéine de liaison avec l'actine UNC-115/abLIM (Demarco *et al.*, 2012; Gitai *et al.*, 2003; Norris *et al.*, 2009; Struckhoff et Lundquist, 2003), modulant ainsi le cytosquelette et la protrusivité dans le cône de croissance.

Mais les GTPases Rac ne sont pas uniquement impliquées dans la signalisation dite « attractive » de la voie de la Nétrine. En aval de la signalisation de UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5, la GEF UNC-73/Trio peut activer CED-10 et MIG-2 pour induire l'inhibition de la formation de protrusions au bord, faisant face à la source de Nétrine par le biais de UNC-44/Ankyrine et UNC-33/CRMP, et donc induire une migration répulsive de l'axone (Norris *et al.*, 2014). Ces GTPases peuvent aussi agir en aval du récepteur SAX-3/Robo.

Une voie impliquant le rôle conjoint de SAX-3 et UNC-40 sur la régulation de la GTPase MIG-2 lors du guidage axonal des neurones HSN (Xu *et al.*, 2015) a été mise en évidence. La protéine SYD-1 qui contient un domaine GAP peut interagir physiquement avec la partie intracellulaire de SAX-3/Robo et de UNC-40/DCC dans un mécanisme qui est indépendant du signal de guidage UNC-6/Nétrine. Cette interaction pourrait alors permettre au domaine GAP de SYD-1/SYDE2 d'induire l'inactivation de MIG-2/RhoG et ainsi réguler le guidage de l'axone des neurones HSN. Il a été soulevé qu'un équilibre entre activation et inactivation des Rho GTPases est nécessaire à l'intégration des voies de signalisation. En effet, chez plusieurs espèces, la fonction de Rho GAP (Hu *et al.*, 2005; Yamazaki *et al.*, 2013) et GEF (Fan *et al.*, 2003) doit être assurée afin de permettre la signalisation via le récepteur Robo/SAX-3, mais aussi pour la signalisation médiée par UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 (Reiner et Lundquist, 2018). Le fait que des mutations créant des pertes de fonction ou une activation constitutive des Rho GTPases mènent toutes deux à des défauts de guidage et de développement (Alan *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2012; Struckhoff et Lundquist, 2003; Xu *et al.*, 2015) est en accord avec cette hypothèse.

Cependant, les Rho GTPases, comme CED-10/Rac1, pourraient également réguler des étapes plus précoces dans la morphogenèse et la polarisation cellulaires. Lors du développement de l'initiation axonale du neurone HSN, le signal UNC-6/Nétrine localise asymétriquement la GTPase CED-10/Rac1 qui, lorsqu'activée, peut séquestrer la protéine MIG-10 (Quinn *et al.*, 2008). MIG-10 régule la polymérisation d'actine et assure un assemblage asymétrique d'actine et de MT pour ainsi orienter la formation du cône de croissance et le guidage axonal qui s'en suivra, lors de la polarisation du neurone HSN. Mais CED-10 pourrait aussi polariser MIG-10 en réponse au signal SLT-1/Slit (Quinn *et al.*, 2008). Comme expliqué précédemment, il a été supposé que la polarisation neuronale chez les mammifères se faisait par le mélange d'une inactivation générale dans les neurites immatures et d'une activation locale dans l'axone (Takano *et al.*, 2015). Dans ce modèle, des Rho GTPases, des GEF spécifiques et d'autres acteurs de polarité sont impliqués dans le mécanisme d'activation locale. Comme pour CED-10 chez *C. elegans*, Rac1 semble jouer un rôle majeur dans le mécanisme d'activation de la polarisation neuronale chez les mammifères. L'expression de GEF spécifique de Rac1, ou l'activation constitutive de cette dernière mènent toutes deux à l'inhibition de la spécification axonale, ce qui montre à nouveau la nécessité d'un équilibre dans l'état d'activation de Rac1/CED-10 pour assurer le bon développement de l'axone (Kawauchi, 2003; Takano *et al.*, 2015). Le mécanisme d'inhibition générale dans les neurites immatures, quant à lui, reste à être élucidé. Il met fort probablement en jeu RhoA/RHO-1 et ROCK/Let-502, une kinase qui agit sous RhoA/RHO-1 dans de nombreux contextes (Zallen *et al.*, 2000). Premièrement, l'activation constitutive de RhoA/RHO-1 abolit la croissance de tout neurite dans des neurones de l'hippocampe (Conde *et al.*, 2010). D'autre part, l'inactivation de RhoA/RHO-1, ou celle de ses effecteurs mènent à un excès de croissance axonale (Da Silva

et al., 2003). De plus, RhoA/RHO-1 peut réguler la formation d'arcs d'actine capables de limiter la pénétration des microtubules dans le cône de croissance en développement pour moduler la croissance axonale (Dupraz *et al.*, 2019). Cependant, le mécanisme d'activation et de régulation de RhoA/RHO-1 pour le contrôle de la polarisation reste à être exploré.

1.2.2.4 Redondance

Comme on peut l'observer, les Rho GTPases agissent rarement seules dans un contexte donné. Elles ont parfois des effets divergents les unes des autres, mais plus souvent des effets similaires, voire compensatoires : on parle alors de redondance. CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG agissent de manière redondante dans de nombreux contextes, entre autres dans la migration des neuroblastes (Dyer *et al.*, 2010) et des neurones CAN (Lundquist *et al.*, 2001), le développement de la vulve (Kishore et Sundaram, 2002), ou le guidage axonal de nombreux neurones (Lundquist *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002). Cette redondance est conservée chez la drosophile dans ce dernier exemple (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2002). On comprend donc la nécessité de Rho GEF capables de réguler conjointement CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG. UNC-73/Trio par exemple est une Rho GEF capable de contrôler ces deux GTPases dans la majorité des contextes cités précédemment (Kishore et Sundaram, 2002; Lundquist *et al.*, 2001; Struckhoff et Lundquist, 2003). UNC-73/Trio a la particularité de posséder deux domaines GEF, un spécifique des GTPases Rac (RAC-2, CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG, domaine GEF 1) et un spécifique de RHO-1/RhoA (domaine GEF 2) (Marcus-Gueret *et al.*, 2012). TIAM-1/Tiam1 est une autre GEF spécifique de CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG qui peut agir en aval de UNC-40 et CDC-42 pour réguler le guidage axonal des neurones PDE (Demarco *et al.*, 2012). À noter que CED-10 et MIG-2 peuvent également avoir des effets indépendants, comme cela s'avère être le cas pour CED-10 dans la croissance du neurone AVM (Gitai *et al.*, 2003) ou dans des contextes de migration cellulaire et de phagocytose de corps apoptotiques (Reiner et Lundquist, 2018). En fonction du contexte cellulaire, les Rho GEF citées précédemment semblent pouvoir activer un seul de leurs partenaires, comme c'est le cas de TIAM-1/Tiam1 dans la croissance du neurite postérieur du neurone ALM (Zheng *et al.*, 2016), ou de UNC-73 dans l'inhibition des protrusions du cône de croissance des neurones VD (Norris *et al.*, 2014). On peut aussi se demander si les Rho GTPases sont activées similairement et si la spécificité contextuelle est apportée par différentes régions des Rho GTPases elles-mêmes (Norgaard *et al.*, 2018).

1.2.2.5 En amont des voies de guidage

En plus d'être des acteurs récurrents en aval des voies de guidage, les Rho GTPases peuvent agir en amont des récepteurs de guidage. En 2007, deux équipes publient des résultats identifiant un processus similaire et

font état de tels mécanismes en amont des récepteurs de guidage. Pour la première équipe (Watari-Goshima *et al.*, 2007), l'isoforme du gène *vab-8* relatif aux kinésines (VAB-8L), en coopération avec la Rho GEF UNC-73/Trio, peut réguler le développement des neurones mécanosensoriels ALM. Ensemble, VAB-8L et UNC-73 agissent en amont des voies de guidage de SLT-1/Slit et SAX-3/Robo d'un côté, et de UNC-6/Nétrine, UNC-5/Unc5 et UNC-40/DCC d'un autre, lors de la migration et de la polarisation du neurone ALM. Des perturbations de ce mécanisme mènent à des défauts tels qu'une mauvaise orientation de l'axone ou encore des neurones multipolaires développant plus qu'un axone. Dans ce contexte, UNC-73 semble interagir physiquement avec VAB-8L et avec la partie intracellulaire des récepteurs de guidage SAX-3, UNC-5 et UNC-40. De cette manière, VAB-8L et UNC-73 contrôlent la présence du récepteur SAX-3 à la membrane plasmique des neurones ALM, possiblement via la modulation du trafic membranaire en général. La deuxième équipe (Levy-Strumpf et Culotti, 2007) découvre que UNC-73 et MIG-2 agissent cette fois en amont du récepteur de guidage UNC-40 pour réguler les mêmes processus que le mécanisme décrit précédemment dans les neurones ALM. Bien que la perte de fonction des GTPases MIG-2 et CED-10 n'ait aucun effet sur la localisation membranaire de UNC-40 dans ces neurones, l'activation constitutive de *mig-2(gm103)* induit l'accumulation de UNC-40 sous forme de structures fibrillaires à la membrane. Par ailleurs, MIG-2 et CED-10 agissent aussi en amont du récepteur UNC-5/Unc5 en inhibant sa fonction, nécessaire lors de la dernière phase de la migration de la DTC (Levy-Strumpf *et al.*, 2015). Parallèlement, et de manière plus générale, les GTPases CED-10 et RHO-1 régulent la localisation des endosomes de recyclage (Sun *et al.*, 2012; Winter *et al.*, 2012), ce qui provoque des interrogations sur leur implication dans la localisation de nombreux composants membranaires et, par ce biais, dans la régulation de nombreuses voies de guidage.

1.3 Les protéoglycanes à chaînes de glycosaminoglycanes

D'un côté, nous avons donc des signaux extrinsèques, comme les voies de guidage, qui influent sur la mise en place, le guidage et la croissance d'extensions cellulaires. D'un autre, un nombre restreint de Rho GTPases qui sont responsables de l'intégration des signaux extrinsèques par la cellule, et qui peuvent agir en amont et en aval des récepteurs clés. Mais comment les voies de guidage et les Rho GTPases sont-elles coordonnées les unes avec les autres en fonction des contextes cellulaires ? Les HSPG interviennent dans le développement de nombreuses cellules (Blanchette *et al.*, 2017; Bulow, 2021; Bulow et Hobert, 2006) et sont des candidats très intéressants pour ce rôle de coordination.

1.3.1 Synthèse protéique

Les protéoglycanes bordent la surface de nombreuses cellules et sont constitués d'un corps protéique sur lequel sont attachées une à plusieurs chaînes de GAG. La nature des résidus saccharidiques composant les

chaînes permet de classer les protéoglycanes en quatre catégories : ceux à chaînes d'héparane sulfate (HS), de chondroïtine sulfate (CS), de dermatane sulfate (DS) et de kératane sulfate (KS). La présence de protéoglycanes à chaînes DS ou KS n'ayant pas été montrée chez *C. elegans*, je me concentre ici principalement sur les protéoglycanes à chaînes HS, et j'évoque brièvement ceux à chaînes CS.

Les HSPG sont très conservés au cours de l'évolution et ils sont présents à la surface de toutes les cellules adhérentes métazoaires (Medeiros *et al.*, 2000). Ce sont les mieux conservés entre *C. elegans* et l'humain et les mieux décrits. Ils peuvent être eux-mêmes classés en trois catégories (**Fig. 1.6A**): transmembranaires (les syndécans), attachés à la membrane plasmique par une ancre GPI (les glypicans) ou encore sécrétés dans la MEC. Parmi les HSPG sécrétés chez *C. elegans*, on trouve UNC-52/Perlécane, CLE-1/Collagène XVIII et AGR-1/Agrine. De plus, on sait que les HSPG des deux premières catégories peuvent aussi être clivés et se retrouver libres dans le milieu extracellulaire (Li *et al.*, 2024; Manon-Jensen *et al.*, 2010). Quatre gènes codent pour des HSPG de type syndécan (*sdc-1* à *4*) chez l'humain, contrairement à un seul chez *C. elegans* (*sdn-1*). Pour les glypicans, on retrouve huit gènes chez l'humain et seulement deux chez *C. elegans* (*lon-2* et *gpn-1*). Le faible nombre de gènes codant pour des HSPG chez *C. elegans* permet alors de contourner les problèmes liés à la redondance retrouvés dans d'autres modèles.

1.3.2 Rôles des HSPG

Les HSPG interviennent dans de nombreux processus biologiques. On sait qu'ils sont des composants de membranes basales, qu'ils régulent le trafic des vésicules de sécrétion ainsi que les gradients de cytokines et chimiokines, et qu'ils peuvent contrôler l'adhésion et la migration cellulaires (Sarrazin *et al.*, 2011). Il y a aussi maintes preuves qu'ils régulent la morphogenèse neuronale. Par exemple, le glypican LON-2 régule la migration des neurones HSN (Pedersen *et al.*, 2013) ainsi que le guidage des axones du neurone AVM (Blanchette *et al.*, 2015). Le perlécane/UNC-52 contrôle la mise en place des dendrites du neurone PVD (Liang *et al.*, 2015) et du guidage axonal des neurones AVM et HSN (Tang et Wadsworth, 2014). CLE-1/collagène XVIII modère la migration neuronale ainsi que le guidage axonal de nombreux neurones (Ackley *et al.*, 2001). Ce ne sont que quelques exemples parmi tant d'autres du rôle que jouent des HSPG dans le développement neuronal chez *C. elegans* (Bulow, 2021; Bulow et Hobert, 2006). Il est intéressant de noter que chaque contexte développemental pourrait nécessiter un cocktail d'HSPG spécifique (Saied-Santiago *et al.*, 2017) et qu'il existe une redondance dans la fonction des HSPG dans certains cas (Díaz-Balzac *et al.*, 2014; Hudson *et al.*, 2006; Kinnunen, 2014; Saied-Santiago *et al.*, 2017).

Afin de contrôler le développement neuronal, les HSPG peuvent moduler des voies de guidage décrites précédemment (section 1.2.1). Pour moduler le branchement des neurites de PVD, UNC-52/perlécane agit

dans une voie avec le signal UNC-6/Nétrine et son récepteur UNC-40/DCC (Celestrin *et al.*, 2018). LON-2/glypican module la voie de UNC-6/Nétrine et son récepteur UNC-40/DCC dans le guidage de l'axone d'AVM (Blanchette *et al.*, 2015). SDN-1 a été lié à la cassette de guidage Slit/Robo dans de nombreux contextes chez la drosophile (Johnson *et al.*, 2004; Steigemann *et al.*, 2004) et *C. elegans* (Blanchette *et al.*, 2015; Rhiner *et al.*, 2005). Mais les HSPG régulent aussi les voies de guidage dans des contextes non neuronaux comme c'est le cas de UNC-52/perlécan avec le récepteur UNC-5 dans la migration de la DTC (Merz *et al.*, 2003).

1.3.3 Synthèse des chaînes

L'étude des HSPG a permis de mieux comprendre comment les chaînes HS sont synthétisées, et quel est leur rôle comparé à celui de leur corps protéique. La synthèse des chaînes commence par l'ajout d'un lien tétrasaccharidique sur un site de la protéine bien défini : c'est la phase d'initiation. Ensuite, les chaînes HS sont polymérisées à partir de ce lien par des HS polymérasés : c'est la phase de polymérisation (**Fig. 1.6B**). Le site d'attachement des chaînes a surtout été étudié à partir de la protéine SDN-1/syndécan. Il se compose d'une sérine, à laquelle sera attaché le lien tétrasaccharidique, elle-même entourée de deux glycines, puis d'un contexte d'acides aminés situés en aval. Il semble par ailleurs que les prérequis de l'enzyme responsable de la synthèse de ce lien chez la drosophile soient conservés (Wang *et al.*, 2007). Tous les sites d'attachement des chaînes pourraient ne pas avoir la même importance dépendamment du contexte (Saied-Santiago *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2021). Les enzymes responsables de la synthèse du lien tétrasaccharide ont été découvertes chez *C. elegans* lors d'un crible de mutants affectant le développement de la gonade (Herman *et al.*, 1999; Herman et Horvitz, 1999; Hwang *et al.*, 2003). Elles sont conservées chez l'humain, où la mutation du gène codant pour l'une de ces protéines entraîne le syndrome Ehlers-Danlos (défauts de tissus connectifs et retards mentaux). La synthèse du lien tétrasaccharide (**Fig. 1.6B**) est commune aux chaînes HS et CS. Elle commence par l'ajout d'un résidu xylose par une enzyme possédant une activité xylosyl-transférase (XyIT exercée par *sqv-6* chez *C. elegans*), puis de deux résidus galactose par d'abord une enzyme à activité galactose-transférase I (GalT-I exercée par *sqv-3* chez *C. elegans*), puis galactose-transférase II (GalT-II assurée par *sqv-2* chez *C. elegans*), et finalement un acide glucuronique en passant par l'activité d'une GlucuronicAcide-transférase I (GlcAT-I, *sqv-8* chez *C. elegans*).

Après la synthèse du lien tétrasaccharide, la phase de polymérisation débute par l'ajout d'un résidu N-Acetylglucosamine (GlcNAc) à l'acide glucuronique distal du lien tétrasaccharidique. Ensuite, les chaînes sont prolongées par l'ajout alternatif d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine. Dans les contextes où cela a été étudié, les chaînes ainsi synthétisées semblent avoir une taille d'environ 100 à 150 résidus disaccharidiques (Bulow et Hobert, 2006).

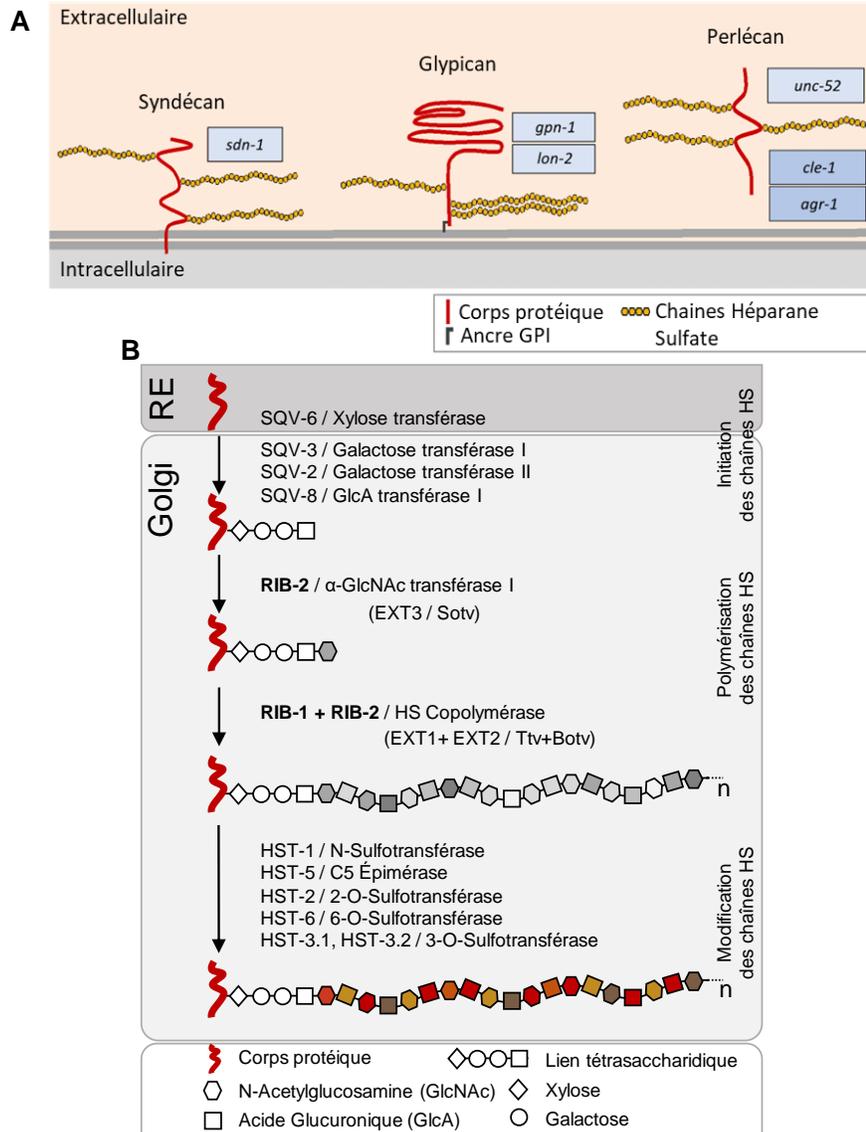


Figure 1.6. Les Protéoglycans à chaînes d'Héparane Sulfate (HSPG)

(A) Schéma des trois classes principales des HSPG. Les HSPG peuvent être transmembranaires, tels que les syndécans, attachés à la membrane par une ancre GPI, les glypicans, ou finalement sécrétés dans la matrice extracellulaire, comme le perlécan. Adapté de (Blanchette *et al.*, 2017). (B) Schéma récapitulant la synthèse et les modifications des chaînes d'héparane sulfate. Un lien tétrasaccharidique est d'abord ajouté sur le corps protéique dans le réticulum endoplasmique (RE) et dans l'appareil de Golgi. La polymérisation commence par l'action de RIB-2, puis l'action combinée de RIB-1 et RIB-2 qui forment la copolymérase spécifique des chaînes HS. Les chaînes subissent ensuite des modifications biochimiques telles que des réactions d'épimérisation ou de sulfatation sur des résidus spécifiques. Adapté de (Blanchette *et al.*, 2017).

Chez *C. elegans*, l'enzyme responsable de la polymérisation est composée de deux sous-unités appelées RIB-1 et RIB-2, et est douée d'activités GlcNAcT-II et GlcAT-II transférase (Fig. 1.6B). Une mutation nulle pour ces protéines entraîne chez le ver une létalité embryonnaire, ce qui est en accord avec un rôle

ubiquitaire et primordial des chaînes HS (ou des HSPG qui les portent) dans le développement. Les homologues que l'on retrouve chez l'humain pour *rib-1/EXT1* et *rib-2/EXTL3* appartiennent à la famille de protéines des exostoses (EXT). Celles-ci sont classées comme étant des suppresseurs de tumeurs et plus précisément d'ostéochondromes (Ahn *et al.*, 1995).

Sachant comment les chaînes HS sont synthétisées, leur rôle spécifique à pu être plus amplement investigué, soit en étudiant des mutants pour les enzymes de polymérisation des chaînes HS, soit en mutant les sites d'attachement des chaînes sur les HSPG. Chez la souris et les poissons-zèbres, une déplétion conditionnelle dans le système nerveux (Inatani *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2007) ou des mutations (Lee *et al.*, 2004) dans des gènes de la famille EXT entraînent des défauts du développement neuronal, confirmant l'importance de l'expression et la maturation des HSPG pour assurer la bonne mise en place du système nerveux. Pour la première fois, notre laboratoire a caractérisé chez *C. elegans* les effets de mutations hypomorphes pour les gènes *rib-1* et *rib-2* (Blanchette *et al.*, 2017). Les animaux mutants pour ces gènes montrent des défauts de développement du système nerveux et de la migration d'autres cellules hautement polarisées comme la DTC ou encore de la cellule excrétrice. Il a par ailleurs été rapporté que les sites d'attachement des chaînes de LON-2/glypican étaient nécessaires pour son rôle dans le guidage axonal du neurone HSN (Pedersen *et al.*, 2013). Plus précisément, la perte des chaînes sur les HSPG entraîne des défauts dans la signalisation de voies de guidage telles que la voie Slit/SLT-1 – Robo/SAX-3 chez les rongeurs (Hu, 2001; Inatani *et al.*, 2003), le poisson-zèbre (Lee *et al.*, 2004), ou encore *C. elegans* (Blanchette *et al.*, 2017).

Le rôle des chaînes HS dans la voie de UNC-6/Nétrine est encore mieux documenté. UNC-6/Nétrine, UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 sont tous les trois capables d'interagir physiquement avec l'héparine (Bennett *et al.*, 1997; Geisbrecht *et al.*, 2003; Priest *et al.*, 2024), un composé similaire à des chaînes HS libres retrouvé naturellement dans les poumons ou l'intestin des mammifères. La présence d'héparine peut accroître la capacité de liaison entre les protéines UNC-5/Unc5 et UNC-6/Nétrine de *C. elegans* (Priest *et al.*, 2024). Il semblerait que l'héparine induise une libération du récepteur UNC-40/DCC des sites de UNC-6/Nétrine pour favoriser son remplacement par UNC-5/Unc5. En plus, l'héparine induit une oligomérisation de UNC-6/Nétrine et donc potentiellement un regroupement de plusieurs récepteurs au même site. L'association entre UNC-6/Nétrine et UNC-5/Unc5 grâce à l'héparine paraît dépendre de la taille du polymère d'héparine ainsi que de son niveau de sulfatation. De plus, la capacité de ces protéines de guidage à interagir avec des composés comme l'héparine pourrait être nécessaire dans certains contextes, comme la migration de la DTC, mais pas tous (Priest *et al.*, 2024). On pense donc que les chaînes HS peuvent impacter la sélection des récepteurs avec lesquels UNC-6 peut interagir (Meijers *et al.*, 2020; Priest *et al.*, 2024) ou même que

différents HSPG favoriseraient spécifiquement la liaison d'un récepteur ou d'un autre à UNC-6 (Finci *et al.*, 2014). Ainsi on rapporte le rôle des chaînes HS en rapport avec la voie de la Nétrine dans le développement neuronal chez la souris (Matsumoto *et al.*, 2007) ou même chez *C. elegans* (Blanchette *et al.*, 2015). Tout cela est finalement en accord avec un rôle primaire et conservé des HSPG dans le développement neuronal, et la vision que les chaînes HS peuvent jouer un rôle central dans la modulation des voies de guidage. On note toutefois que dans certains contextes, l'absence des chaînes HS sur le corps protéique d'HSPG n'affecte pas leur fonction dans la régulation de voies de guidage chez *C. elegans* (Blanchette *et al.*, 2015; Edwards et Hammarlund, 2014; Hacker *et al.*, 2005; Lin, 2004) mais aussi chez la souris (Capurro *et al.*, 2008).

1.3.4 Modification des chaînes

Une fois synthétisées dans l'appareil de Golgi, les chaînes HS peuvent subir des modifications biochimiques importantes à la spécification fonctionnelle des HSPG (Fig. 1.6B). L'action d'une N-désacétylase-N-sulfotransférase (NDST1 à 4 chez les vertébrés et *hst-1* chez *C. elegans*) désacétyle et sulfate le résidu azote de certains N-acetylglucosamines de manière non uniforme le long de la chaîne. Cette activité disparate crée des zones à haute, intermédiaire et faible densité de sulfate qui semblent affecter la susceptibilité à subir d'autres modifications par la suite (Bulow et Hobert, 2006; Esko et Selleck, 2002). Chez la drosophile ou la souris, la perte de cette enzyme est associée à la perturbation de signalisations de morphogènes tels que Wingless/Wnt, FGF (pour « Fibroblast Growth Factor ») ou encore de Hedgehog (Kinnunen *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 1999), menant à des défauts développementaux. Chez *C. elegans*, la perturbation de *hst-1/NDST* induit de la létalité et des défauts de mise en place de structures dendritiques (Celestrin *et al.*, 2018; Kinnunen, 2014). On observe ensuite d'autres types de modifications biochimiques le long des chaînes HS, comme l'isomérisation du carbone C5 de l'acide glucuronique en acide iduronique (assurée par *hse-5* chez *C. elegans*), la sulfatation du groupement hydroxyle C2 des acides hexuroniques (par *hst-2* chez *C. elegans*) ou encore la sulfatation des hydroxyles C6 et C3 des résidus glucosamines (par *hst-6* en C6 et *hst-3.1* et *hst-3.2* en C3 chez *C. elegans*). Ces modifications se produisent plus souvent dans des régions à haute densité de sulfate (Kinnunen *et al.*, 2005). Ces enzymes modifient les chaînes HS de manière non uniforme et on pense que cela pourrait créer des plateformes d'interaction ou de régulation des partenaires avec lesquels les HSPG peuvent interagir dans différents processus (Lindahl et Li, 2009; Xu et Esko, 2014). Il a par ailleurs été rapporté que l'état de modification des chaînes pouvait varier une fois la protéine sécrétée à la surface de la cellule ou dans la matrice extracellulaire (Dhoot *et al.*, 2001).

Tandis que HST-3.1 et HST-3.2 semblent avoir peu d'impact dans le développement du système nerveux (Teclé *et al.*, 2013), HSE-5, HST-2 et HST-6 sont toutes les trois impliquées dans ce processus biologique. Par exemple, HST-2 et HSE-5 sont nécessaires pour le bon guidage des motoneurones (Gysi *et al.*, 2013).

HST-2 à elle seule paraît réguler la migration de la DTC et des neurones HSN (Kinnunen *et al.*, 2005). Dans le neurone PVQ, HST-2, HST-6 et HSE-5 sont toutes les trois requises pour le guidage de l'axone le long de la ligne médiane (Bulow et Hobert, 2004). Il existe encore de nombreux exemples chez *C. elegans* qui montrent l'implication des enzymes responsables de la modification des chaînes HS dans le développement du système nerveux (Bulow, 2021; Saied-Santiago et Bulow, 2018). De ces études, plusieurs constats ont été dégagés : (1) les modifications des chaînes HS sur les HSPG sont dépendantes du contexte et (2) chaque neurone nécessiterait un mélange précis de modifications sur les chaînes HS des HSPG impliqués dans leur développement. Il se pourrait même que les enzymes de modifications soient finement localisées dans la cellule et qu'on ait une spécificité subcellulaire des modifications, étant donné la large distribution des motifs de modifications des chaînes HS dans le système nerveux de *C. elegans* (Attreed *et al.*, 2016). (3) Similairement aux HSPG, on remarque une certaine redondance dans les voies où sont impliquées les enzymes de modifications des chaînes (Bulow *et al.*, 2008; Díaz-Balzac *et al.*, 2014). Et finalement, (4) les enzymes modificatrices sont régulées dans le temps et dans l'espace (Bulow, 2021; Wishart et Lovicu, 2023) et l'expression ectopique de certaines de ces enzymes peut reprogrammer le guidage de certains neurones (Bulow *et al.*, 2008). Ces éléments pointent vers un rôle instructif des modifications des chaînes HS, plutôt que permissif, dans les processus développementaux.

L'état de modification des chaînes HS intervient aussi dans le contrôle des voies de guidage et des morphogènes. Par exemple, la sulfatation de l'héparine semble impacter l'interaction entre UNC-6/Nétrine et UNC-5/Unc5 (Priest *et al.*, 2024) ainsi qu'entre le FGF et son récepteur FGFR, qui nécessite aussi de la présence de résidus disaccharidiques (Pellegrini, 2001). Les chaînes HS jouent alors un rôle étendu dans la modulation des voies de guidage et de morphogènes. Les modifications des chaînes HS impactent aussi la voie de SLT-1/Slit - SAX-3/Robo, ce qui dépend du contexte (Bulow *et al.*, 2008; Conway *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2001; Zallen *et al.*, 1998). De tout ceci ressort alors une hypothèse selon laquelle il existerait un code de modifications sur les chaînes HS qui serait régulé dans le temps et dans l'espace. Ce code serait capable de contrôler l'interaction des HSPG avec des ligands ou récepteurs spécifiques, et, par ce biais, de moduler la signalisation induite par ces voies qui sont nécessaires au bon développement des cellules polarisées.

1.3.5 Chaînes chondroïtine sulfate

Contrairement aux HSPG, les CSPG ont l'air d'être moins bien conservés entre les vertébrés et invertébrés, sauf pour quelques molécules comme MIG-6/Papiline qui partage des fonctions dans le développement du système nerveux (Ramirez-Suarez *et al.*, 2019). Néanmoins, les CSPG chez *C. elegans* ne semblent pas avoir tous été caractérisés puisqu'on continue encore d'en découvrir (Noborn et Larson, 2021). De plus, bien que la plupart des HSPG portent uniquement des chaînes HS, il a été démontré ou suggéré (selon le

contexte) que chez les mammifères, les syndécans SDC-1, SDC-3 et SDC-4 (Deepa *et al.*, 2004; Gould *et al.*, 1992; Kokenyesi et Bernfield, 1994; Ueno *et al.*, 2001), l'agrine (Winzen *et al.*, 2003), ainsi que le collagène XVIII (Dong *et al.*, 2003) puissent également porter des chaînes CS. La synthèse des chaînes CS est un peu différente des chaînes HS. Elle débute de la même manière, par l'ajout d'un lien tétrasaccharide qui nécessite les mêmes enzymes que les chaînes HS. En revanche, la phase de polymérisation des chaînes CS commence par l'attachement d'un résidu N-acétylgalactosamine sur l'acide glucuronique du lien tétrasaccharide par une chondroïtine N-acétylgalactosaminyltransférase (GalNAcT-I ou encore ChGn). La chaîne CS est ensuite polymérisée par ajout alternatif d'acide glucuronique et d'un résidu N-acétylgalactosamine via une chondroïtine synthase (ChSy) possédant des activités GalNAcT-II et GlcAT-II (Bulow et Hobert, 2006). Chez *C. elegans*, une seule enzyme est responsable de ces activités ChGn et ChSy, SQV-5, et donc responsable à elle seule de la polymérisation des chaînes de chondroïtine sulfate. Finalement, les chaînes CS peuvent aussi être modifiées par 4-O-Sulfation et 6-O-Sulfatation (Dierker *et al.*, 2016; Izumikawa *et al.*, 2016). La perte de SQV-5/ChSy entraîne des défauts de migration des neurones HSN chez *C. elegans* (Pedersen *et al.*, 2013) et l'on estime les chaînes CS de manière générale comme importantes pour la morphologie neuronale chez plusieurs espèces (Silver *et al.*, 2014; Sugahara *et al.*, 2003).

1.4 Syndécan

L'HSPG au cœur de cette recherche, syndécan, possède de nombreux atouts pour assumer le rôle de coordinateur lors d'étapes précoces de la mise en place d'une morphologie dans les cellules polarisées. Voici une description de la structure protéique de cette classe d'HSPG, puis de leur rôle dans des contextes proches de celui étudié ici.

Les syndécans sont les seuls HSPG connus à l'heure actuelle pour posséder un domaine transmembranaire. Syndécan a été cloné pour la première fois à la fin des années 80 (Saunders *et al.*, 1989). Chez les mammifères, quatre gènes codent pour des syndécans, ayant en commun leur capacité d'interagir avec le cytosquelette. Chez la souris, quasiment toutes les cellules de l'organisme présentent au moins un des syndécans à la surface de leur membrane (Kim *et al.*, 1994), avec une distribution tissu-spécifique. SDC-2 et SDC-3 sont les deux syndécans exprimés dans le système nerveux, où ils participeraient à la migration neuronale et joueraient même un rôle synaptique (Hienola *et al.*, 2006; Hsueh et Sheng, 1999; Hu *et al.*, 2016; Leadbeater *et al.*, 2006). Chez *C. elegans*, l'unique version de syndécan, SDN-1, se retrouve également exprimée et fonctionne dans le système nerveux pour y réguler la migration de nombreux neurones, le guidage d'axones et aussi la formation synaptique (Blanchette *et al.*, 2015; Minniti *et al.*, 2004; Rhiner *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2021).

1.4.1 Rapport structure-fonction des syndécans

Les syndécans sont composés d'un ectodomaine (ECD) ou région extracellulaire, d'un domaine transmembranaire (TM) et d'un domaine intracellulaire (ICD) (Fig. 1.7A). La plupart des domaines des syndécans a été étudiée chez les mammifères, mais on note une forte conservation évolutive pour certains d'entre eux, que je décris ici.

1.4.1.1 La région extracellulaire

La région extracellulaire, pour commencer, est peu conservée entre les différents syndécans chez l'humain et au cours de l'évolution, à l'exception des sites d'attachement des chaînes HS. Comme décrit précédemment (section 1.3.3), l'attachement des chaînes se fait sur une sérine dans un contexte spécifique. Chez *C. elegans*, il existe trois sites d'attachement potentiels au niveau des sérines S71, S86 et S214 (Fig. 1.7A, (Hudson *et al.*, 2006; Minniti *et al.*, 2004; Rhiner *et al.*, 2005)) même s'il y a un doute sur la présence d'une chaîne sur le troisième site S214 (Zhou *et al.*, 2021). Les chaînes HS des syndécans peuvent jouer plusieurs rôles. Elles sont nécessaires à la translocation de SDC-1 dans le noyau (Stewart *et al.*, 2015) et permettent l'interaction avec des partenaires comme KAL-1 (pour syndrome de Kallmann, (Hudson *et al.*, 2006)), le collagène (Rapraeger et Ott, 1998), la fibronectine (Tumova *et al.*, 2000), la laminine α (Xian *et al.*, 2010) et possiblement des signaux de guidage comme Slit/SLT-1 (Farrugia et Melrose, 2023; Johnson *et al.*, 2004) ou la Nétrine/UNC-6 et ses récepteurs (Finci *et al.*, 2014; Priest *et al.*, 2024). Chez *C. elegans*, elles induiraient aussi la stabilisation de SDN-1/syndécan à certains endroits comme au niveau des synapses de jonctions neuromusculaires, bien que cette localisation ne semble pas dépendre de la présence des chaînes (Zhou *et al.*, 2021). De plus, les modifications des chaînes HS de SDN-1/syndécan ont une importance qui dépend du contexte lors du développement du système nerveux chez *C. elegans* ainsi que de la régénération axonale (Edwards et Hammarlund, 2014; Gysi *et al.*, 2013; Kinnunen, 2014; Rhiner *et al.*, 2005; Sundararajan *et al.*, 2015). La présence des chaînes n'est néanmoins pas nécessaire à toutes les fonctions des syndécans, comme SDC-1 chez les mammifères, qui pourrait se passer de ses chaînes HS pour réguler l'activation des intégrines (Beauvais *et al.*, 2009), ou SDN-1 chez *C. elegans* qui ne semble pas nécessiter ses chaînes HS pour contrôler la stabilité du cône de croissance lors de la régénération axonale des motoneurones GABAergiques (Edwards et Hammarlund, 2014).

Les SDC-1, 2 et 4 sont tous capables d'interagir avec des voies d'intégrines au moyen d'une région située dans leur partie extracellulaire. L'interaction a la sous-unité d'intégrine $\beta 1$ pour SDC-2 et SDC-4, et aux sous-unités $\beta 3$ et $\beta 5$ pour SDC-1 (Multhaupt *et al.*, 2009), pourrait être indirecte et passer par des régulateurs d'intégrines tels que la PKC α (Bass *et al.*, 2011). La capacité des syndécans à interagir avec les intégrines

est importante pour médier l'adhésion cellulaire (Morgan *et al.*, 2007; Whiteford *et al.*, 2007; Woods *et al.*, 1986), la mécanotransduction entre la MEC et le cytosquelette (Morgan *et al.*, 2007), la migration de certaines cellules (Beauvais et Rapraeger, 2003), la modulation de l'endocytose et du recyclage d'intégrines, ainsi que plus généralement dans le processus de cicatrisation (Bass *et al.*, 2011). NxIP est le motif principal par lequel SDC-4 peut induire l'adhésion cellulaire dépendante de la sous-unité d'intégrine $\beta 1$ et il est très conservé chez les vertébrés (Whiteford et Couchman, 2006)

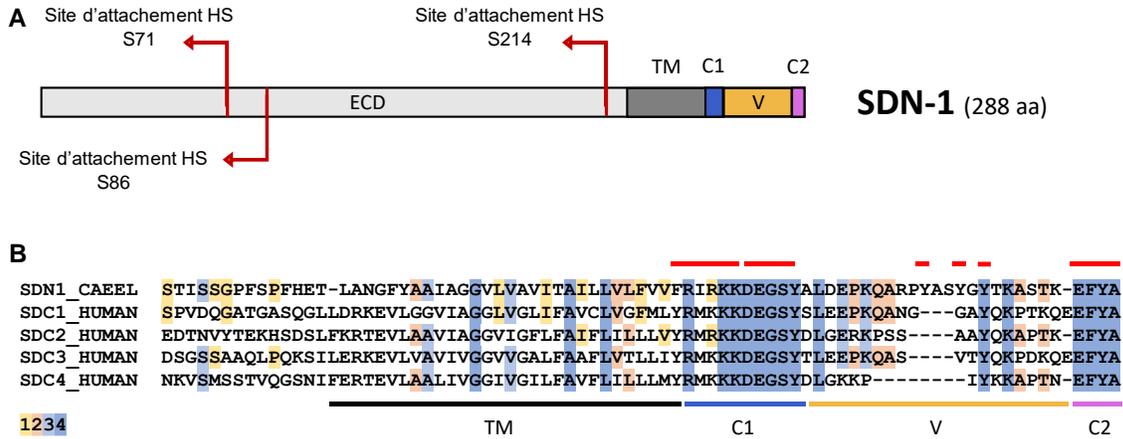


Figure 1.7. Syndécan

(A) : Structure de SDN-1/syndécan. Les trois sites d'attachement des chaînes HS (flèches rouges) se trouvent dans la partie extracellulaire de la protéine. Le domaine transmembranaire (TM) sépare les régions extracellulaire (ECD) et intracellulaire. Cette dernière comprend les régions conservées 1 et 2 (C1 et C2), séparées par la région variable (V). (B) Alignement du domaine transmembranaire et de la région intracellulaire des séquences de SDN-1 chez *C. elegans* et des quatre syndécans chez l'humain (Sdc-1 à 4). Les régions C1, V et C2 sont marquées par les couleurs correspondant à (A). Les traits rouges réfèrent aux régions d'intérêt dans la partie intracellulaire des syndécans, c'est-à-dire le domaine RMKKK, le domaine DEGSY, les tyrosines du domaine V et le domaine EFYA. Les acides aminés sont colorés en fonction de l'homologie de la séquence de SDN-1 chez *C. elegans* avec une (jaune), deux (orange), trois (bleu clair) ou les quatre séquences (bleu foncé) des syndécans chez les humains.

Finalement la région extracellulaire contient des sites de clivage. Chez les mammifères, tous les syndécans peuvent être clivés dans une région proche du domaine transmembranaire (Manon-Jensen *et al.*, 2010) par des enzymes de la matrice extracellulaire, les MMP (pour Matrix MetalloProteinase). Ce clivage est déclenché par divers stimuli tels que des facteurs de croissance ou un stress cellulaire et est impliqué dans des processus biologiques comme le renouvellement naturel des syndécans, y compris lors de la cicatrisation, ou alors pathogéniques comme la progression tumorale (Manon-Jensen *et al.*, 2010). Bien que chez *C. elegans*, aucune preuve du clivage de SDN-1 n'ait encore été apportée, syndécan peut être clivé chez son homologue invertébré de la drosophile (Spring *et al.*, 1994).

1.4.1.2 Le domaine transmembranaire

La région transmembranaire semble très bien conservée entre les différentes versions de syndécan chez les mammifères, mais aussi plus largement au cours de l'évolution. Dans cette région, on trouve les motifs GXXXG et GXXXA qui sont très importants pour la dimérisation des syndécans (Chen *et al.*, 2021; Dews et Mackenzie, 2007). En 1994, on rapporte en effet que SDC-1 peut se dimériser (Sanderson *et al.*, 1994), puis on découvre que tous les syndécans chez les mammifères peuvent se dimériser, ou s'oligomériser, en créant des homodimères ou des hétérodimères de syndécans (Jang *et al.*, 2018). Cette dimérisation pourrait être nécessaire pour la plupart des fonctions des syndécans et permettre la phosphorylation de certaines tyrosines dans sa partie intracellulaire, pour activer des voies de signalisation en aval ou induire des réorganisations du cytosquelette (Jang *et al.*, 2018). Chez *C. elegans*, la nécessité de la dimérisation de SDN-1 pour sa fonction n'a pas été montrée, mais le domaine GXXXA est conservé (Fig. 1.7B).

1.4.1.3 Le domaine intracellulaire

Le domaine intracellulaire des syndécans ne semble pas avoir d'activité enzymatique intrinsèque (Couchman *et al.*, 2015), mais il contient de nombreux motifs qui pourraient servir de plateforme pour des interacteurs agissant en aval. Ce domaine est composé de trois régions dont deux sont hautement conservées entre les différents syndécans au cours de l'évolution (régions C1 et C2), séparées par une région dite variable (région V) (Fig. 1.7A).

1.4.1.3.1 Région C1

La région C1 participe à la communication avec le cytosquelette d'actine en passant par des interacteurs tels que ERM (pour ézrine/radixine/moésine), la tubuline ou encore la Src (Kinnunen *et al.*, 1998). Dans cette région, le motif RMKKK juxtaposé au domaine transmembranaire semble avoir plusieurs fonctions (Fig. 1.7B). Il pourrait premièrement être nécessaire au regroupement des syndécans et à l'endocytose de SDC-1 à partir des radeaux lipidiques (Chen et Williams, 2013). Mais ce motif pourrait également servir de signal de localisation nucléaire (Zong *et al.*, 2009). Effectivement, les syndécans sont majoritairement présents à la membrane, mais ils peuvent aussi se trouver dans la cellule et même dans le noyau (Brockstedt *et al.*, 2002; Wishart et Lovicu, 2023). Cette localisation nucléaire pourrait permettre aux HSPG de contrôler le cycle cellulaire et la prolifération, d'induire des modifications de chromatine ou encore de réguler la machinerie transcriptionnelle. De plus, les HSPG sont capables de médier le transport au noyau de cargo contenant des facteurs de croissance et/ou leurs récepteurs (Stewart *et al.*, 2015; Wishart et Lovicu, 2021), comme c'est le cas pour le transport nucléaire du signal FGF-2 (Hsia *et al.*, 2003; Zong *et al.*, 2009). Cette

fonction est aussi impliquée dans des processus de progression tumorale (Stewart *et al.*, 2015; Zong *et al.*, 2009).

On trouve un deuxième motif dans cette région C1 : DEGSY (Fig. 1.7B). La protéine ézrine du complexe ERM chez les mammifères se lie à SDC-2 à travers ce motif. Il est intéressant de noter que le complexe ERM fait un lien entre le cytosquelette d'actine et la membrane basale, régule les dynamiques du cytosquelette et assure la transduction de signaux de croissance (Granés *et al.*, 2003). De plus, la tyrosine du motif DEGSY est une cible de phosphorylation de kinases de la famille Src. La phosphorylation de ce motif chez SDC-4 est impliquée dans l'activation de la GTPase Arf6 pour réguler le recyclage des intégrines $\alpha 5\beta 1$ ou $\alpha V\beta 3$ lors de la migration cellulaire de fibroblastes embryonnaires de souris (Morgan *et al.*, 2013). La phosphorylation de cette tyrosine semble d'ailleurs impliquée dans l'internalisation des syndécans 1 et 4, au moyen de partenaires similaires (Imjeti *et al.*, 2017).

1.4.1.3.2 Région variable

Différente entre chaque syndécan chez les mammifères et peu conservée chez *C. elegans*, la région variable permettrait la spécificité de fonctions et d'interactions pour chaque syndécan. Par exemple, cette région peut promouvoir la formation de lamellipodes et la polymérisation d'actine pour SDC-1 (Chakravarti *et al.*, 2005) ou alors la formation d'adhésions focales, de fibres de stress ou encore la cicatrisation pour SDC-4 (Bass *et al.*, 2007; Dovas *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2003). Chez SDC-4, on retrouve le motif LGKKPIYKK, qui est nécessaire à l'interaction de la PKC α activée pour induire sa « superactivation » (Lim *et al.*, 2003; Rapraeger et Ott, 1998). La tyrosine de ce motif semble nécessaire à l'interaction de la région V de SDC-4 avec la PKC α , et cette tyrosine est un des seuls acides aminés très conservés de cette région. La liaison de la PKC α à SDC-4 peut conduire à l'activation de RhoA, permettant ainsi la formation d'adhésion focale et de fibres de stress (Dovas *et al.*, 2006), ou de réguler la localisation de Rac pour moduler la migration des fibroblastes lors de la cicatrisation (Bass *et al.*, 2007).

1.4.1.3.3 Région C2

La région C2 n'est composée que du motif EFYA, mais c'est le motif le mieux conservé au cours de l'évolution parmi tous les syndécans (Fig. 1.7B). Le motif EFYA est un site de liaison pour les protéines à domaine PDZ. Par exemple, la protéine CASK peut interagir avec le motif EFYA de SDC-2 afin de réguler la maturation d'épines dendritiques des neurones de l'hippocampe de rat (Ethell et Yamaguchi, 1999). De même, son homologue chez *C. elegans*, LIN-2/CASK, peut interagir avec le motif EFYA de SDN-1/syndécan pour médier le recrutement de récepteurs à l'acétylcholine et au GABA_A aux synapses de

motoneurons (Zhou *et al.*, 2021). Par ailleurs, la protéine Synténine-1, qui permet de faire un lien avec le cytosquelette, est capable de se lier avec le motif EFYA de SDC-1, et cette interaction dépend de l'état de phosphorylation de la tyrosine de ce motif (Sulka *et al.*, 2009). Des analyses bio-informatiques ont révélé qu'environ 40% des Rho GEF et de nombreuses Rho GAP humaines ont un domaine de liaison PDZ (Garcia-Mata et Burridge, 2007).

1.4.2 Rôle des syndécans

1.4.2.1 Rôles généraux

Le premier rôle décrit des syndécans a été le support d'adhésion cellulaire (Rapraeger et Ott, 1998), d'où leur nom provenant du grec ancien « syndein », signifiant « lier ensemble » (Teng *et al.*, 2012). Ils font ceci de plusieurs façons : à travers le contrôle du taux cytoplasmique de calcium (Couchman *et al.*, 2015), l'interaction avec des voies d'intégrines (Mulhaupt *et al.*, 2009; Whiteford *et al.*, 2007) et via le cytosquelette (Chen et Williams, 2013; Kinnunen *et al.*, 1998). Les syndécans font partie de la MEC et sont capables d'interagir avec des composants de cette matrice tels que des collagènes, des laminines, la fibronectine, la fibrilline et bien d'autres. De plus, les syndécans peuvent interagir avec les intégrines, qui sont des récepteurs principaux de la MEC (Farrugia et Melrose, 2023). De plus, SDC-1 est lui-même un senseur mécanique de la matrice puisque des variations de tension dans le milieu semblent affecter sa capacité à interagir avec des composants du cytosquelette ou avec d'autres régulateurs en aval (Le *et al.*, 2021). De par leur localisation quasi ubiquitaire et leurs rôles très variés, les syndécans sont impliqués dans beaucoup de processus pathologiques. Parmi ceux-ci, on retrouve des maladies inflammatoires et vasculaires, l'arthrite, le diabète, de nombreux cancers, des maladies infectieuses ou virales telles que la COVID-19, et même dans la progression de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Balistreri et Monastero, 2025; Letoha *et al.*, 2023; Rajabloo *et al.*, 2024; Teng *et al.*, 2012). Une meilleure compréhension des mécanismes d'action des syndécans est alors crucial pour aider la lutte contre ces troubles pathologiques.

1.4.2.2 Les syndécans dans le neurodéveloppement

Comme dit précédemment (section 1.4), SDC-2 et SDC-3 sont plus présents dans le contexte neuronal que les autres chez les mammifères. SDC-2 et SDC-3 sont exprimés dans le cerveau de rats adultes, plutôt au niveau des synapses pour SDC-2 et des axones pour SDC-3 (Hsueh et Sheng, 1999). SDC-2 joue un rôle dans la formation d'épines dendritiques dans des neurones d'hippocampe de rats en culture (Ethell et Yamaguchi, 1999). SDC-3 est responsable de la migration neuronale (Hienola *et al.*, 2006), du guidage

axonal de certains interneurons (Bespalov *et al.*, 2011) ainsi que de la croissance des neurites dans des cellules issues de neuroblastomes (Kinnunen *et al.*, 1998).

Ces rôles sont conservés au cours de l'évolution puisque chez *C. elegans*, SDN-1 est non seulement responsable de la migration de précurseurs neuronaux, des neurones HSN, CAN, ALM et AVM, mais aussi de cellules non neuronales telles que les coelomocytes (Kinnunen, 2014; Rhiner *et al.*, 2005; Saied-Santiago *et al.*, 2017; Sundararajan *et al.*, 2015). La perte de SDN-1 chez *C. elegans* mène à de nombreux défauts de guidage axonal (Blanchette *et al.*, 2015; Gysi *et al.*, 2013; Kinnunen, 2014; Rhiner *et al.*, 2005). La perte de SDN-1 induit plus généralement des défauts de développement de la morphologie neuronale qui se répercutent sur le comportement du ver (Minniti *et al.*, 2004; Rhiner *et al.*, 2005). De plus, SDN-1 joue des rôles plus complexes dans le développement des neurites puisqu'il régule le branchement des interneurons AIY dans une voie parallèle à celle de la protéine KAL-1 (Díaz-Balzac *et al.*, 2014; Schwieterman *et al.*, 2016). Dans la plupart de ces contextes, SDN-1 agit de manière cellule autonome, c'est-à-dire depuis la cellule où il est exprimé (Blanchette *et al.*, 2015; Rhiner *et al.*, 2005; Saied-Santiago *et al.*, 2017; Sundararajan *et al.*, 2015), mais il pourrait aussi partiellement agir de manière non-autonome (Díaz-Balzac *et al.*, 2014).

1.4.2.3 Syndécan et les voies de guidage

Comme pour les autres HSPG, syndécan est un modulateur de voies de guidage et de morphogène. L'interaction avec la voie de Slit/SLT-1 – Robo/SAX-3 est la mieux décrite. Chez la drosophile, Sdc/syndécan est capable de moduler la distribution du signal Slit/SLT-1 afin de réguler le guidage axonal au niveau de la ligne médiane des embryons de drosophiles (Johnson *et al.*, 2004). De plus, syndécan peut se lier directement au récepteur Robo/SAX-3 pour médier l'interaction avec son signal Slit/SLT-1, avec lequel il semble aussi se lier (Johnson *et al.*, 2004; Steigemann *et al.*, 2004). Chez *C. elegans*, SDN-1/syndécan a également été relié à la voie de SLT-1/Slit-SAX-3/Robo dans le guidage des interneurons PVQ le long de la ligne médiane (Rhiner *et al.*, 2005) ainsi que dans le guidage de l'axone du neurone mécanosensoriel AVM (Blanchette *et al.*, 2015).

En revanche, plusieurs lignes d'évidence pointent vers SDN-1/syndécan affectant aussi la voie de guidage de UNC-6/Nétrine. Premièrement, plusieurs candidats membres de la voie UNC-6/Nétrine ont été retrouvés dans un crible de mutants capables d'augmenter les défauts de guidage des motoneurons dans un fond génétique mutant nul pour *sdn-1* chez *C. elegans*. Parmi les mutations candidates, on en retrouve directement dans le gène codant pour le récepteur de guidage UNC-5/Unc5 lui-même (Gysi *et al.*, 2013). Inversement, dans un crible d'amplificateur de défauts de la migration de la DTC dans un fond génétique

mutant nul pour *unc-5*, on retrouve une mutation dans le gène de *sdn-1*. Dans ce contexte, SDN-1/syndécan semble agir à partir des neurones ou de l'hypoderme, signifiant que syndécan n'agit pas toujours de manière cellule autonome (Schwabiuk *et al.*, 2009). Finalement, il a récemment été démontré que SDN-1/syndécan et UNC-40/DCC impactent réciproquement leur présence aux synapses des jonctions neuromusculaires (Zhou *et al.*, 2021), ce qui laisse penser une possible interaction entre syndécan et la voie de UNC-6/Nétrine.

1.4.2.4 Syndécan et les Rho GTPases

Chez les mammifères, plusieurs preuves d'un contrôle des Rho GTPases par SDC-4 ont été révélées. SDC-4 peut spatialement réguler l'activation de Rac1/CED-10 pour diriger la migration cellulaire (Bass *et al.*, 2007), l'activation de RhoA/RHO-1 pour provoquer la formation de complexes d'adhésion (Bass *et al.*, 2008; Dovas *et al.*, 2006) et réguler RhoG/MIG-2 via des Rho GDI pour amener au recyclage des intégrines (Bass *et al.*, 2011; Elfenbein *et al.*, 2009). Les syndécans seraient capables de réguler Rac1/CED-10 et RhoA/RHO-1 directement par leur domaine intracellulaire afin de réorganiser le cytosquelette (Bass *et al.*, 2007; Okina *et al.*, 2009). Finalement, SDC-4 régule la Rho GTPase Rac1/CED-10 dans des cellules d'adénocarcinomes à au moins deux niveaux : SDC-4 est capable d'interaction avec la Rho GEF Tiam1 à travers son domaine PDZ pour réguler l'état d'activation de Rac1, et peut aussi lier la RhoGDI1 pour la restreindre à la membrane et recruter à son tour Rac1 (Keller-Pinter *et al.*, 2017).

On pense alors que syndécan est un HSPG capable d'orchestrer la coordination entre des voies de guidage et les Rho GTPases. Ceci lui permettrait de transduire les signaux de guidage lors du développement de cellules polarisées telles que les neurones. On peut néanmoins se demander si cette supervision par syndécan intervient dans des étapes développementales plus précoces telles que la spécification axonale ou les premières étapes du développement des neurites, et aussi s'il peut jouer ce rôle dans d'autres contextes cellulaires comme par exemple celui de la cellule excrétrice.

1.5 La cellule excrétrice

1.5.1 Le système excréteur

1.5.2 Fonction du système excréteur

Le système excréteur est souvent comparé au système rénal chez les mammifères puisqu'il est responsable de l'osmorégulation (Shaye et Soto, 2021; Sundaram et Buechner, 2016). Bien que la circulation de fluides dans la lumière du système excréteur n'ait pas été démontrée, de nombreux indices pointent vers ce rôle.

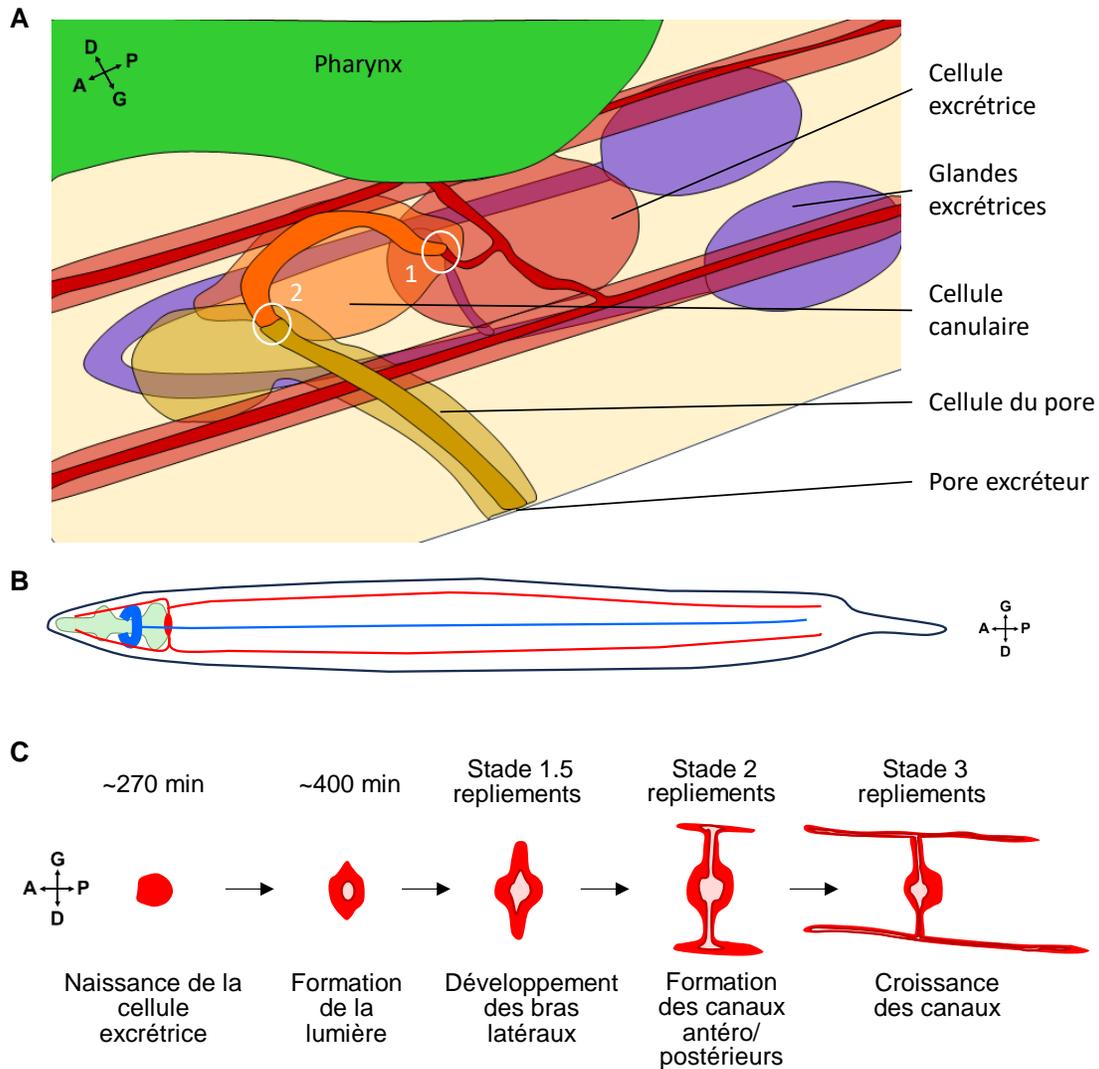


Figure 1.8. Le système excréteur de *C. elegans*

(A) Schéma représentatif des structures du système excréteur, ventrales au pharynx. La cellule excrétrice (rouge) possède une lumière commune (rouge foncé) qui parcourt tous ses canaux et se connecte au niveau du soma à la lumière de la cellule canalaire (en orange foncé) au niveau d'une première jonction (cercle blanc n°1). Les glandes excrétrices (violet) sont interconnectées et débouchent également sur la lumière du système excréteur, proche de cette première jonction. La lumière de la cellule canalaire se connecte à celle de la cellule du pore (jaune foncé) au niveau d'une deuxième jonction (cercle blanc n°2) pour finalement mener vers l'environnement extérieur, en passant par le pore excréteur situé dans l'épiderme. Schéma adapté de (Altun et Hall, 2009a). D/G = droite/gauche, A/P = antérieur/postérieur. (B) Représentation graphique d'un *C. elegans* adulte avec le pharynx (vert), l'anneau nerveux (structure arrondie autour du pharynx) et la corde nerveuse ventrale (bleu) ainsi que la cellule excrétrice (rouge), dont le soma est ventral au bulbe terminal du pharynx. Les quatre canaux latéraux parcourent les parois du ver. (C) Développement de la cellule excrétrice. La cellule excrétrice se différencie vers 270 minutes d'embryogenèse et commence à former une lumière par fusion vésiculaire vers 400 minutes de développement. Les bras latéraux commencent à se développer au stade 1.5 repliements lors de l'embryogenèse, puis se divisent en quatre canaux aux alentours du stade 2 repliements. Les canaux antérieurs vont ensuite croître jusqu'à la fin du développement embryonnaire, les canaux postérieurs jusqu'au stade L2. Par la suite, leur croissance suit proportionnellement celle du ver jusqu'à l'âge adulte.

Premièrement, les mutants qui affectent le développement du système excréteur ou bien l'ablation par laser de la cellule excrétrice, de la cellule canulaire ou de la cellule du pore induisent une létalité survenant au stade L1 appelée « rod-like ». Celle-ci est accompagnée d'une accumulation de fluides dans le pseudocoelome (Forrester et Garriga, 1995; Nelson et Riddle, 1984). Deuxièmement, il semble que la cellule canulaire soit capable de pulsation selon les conditions osmotiques de l'environnement (Nelson et Riddle, 1984). On pense donc que la cellule excrétrice est capable de collecter les fluides excédentaires dans l'organisme et de les éliminer via la pulsation de la cellule canulaire puis le pore excréteur, ou, inversement, de collecter des fluides de l'extérieur pour les redistribuer dans l'organisme. On pense également que cette fonction est mise en place assez tôt dans le développement, étant donné que des mutants affectant le système excréteur montrent des œdèmes au stade embryonnaire (Mattingly et Buechner, 2011; Stone *et al.*, 2009). Les neurones CAN régulent la fonction des canaux excréteurs, leur ablation menant également à de la létalité dite « rod-like » (Nelson et Riddle, 1984). La fonction de la glande excrétrice reste encore inconnue, mais on sait que certains neurones de l'anneau nerveux sont connectés à cette cellule et que celle-ci est capable de synthétiser des hormones stéroïdiennes (Merris *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 1983). On la soupçonne de pouvoir sécréter des substances vers la cellule tubulaire pour élimination, ou vers la cellule excrétrice pour sécrétion dans l'organisme (Sundaram et Buechner, 2016).

1.5.3 Formation et croissance des canaux

La cellule excrétrice est une cellule tubulaire puisqu'elle contient une lumière en son sein. Les canaux de la cellule excrétrice sont constitués d'une membrane apicale tapissant cette lumière et une membrane basolatérale en contact avec l'épiderme ou la membrane basale. On retrouve sous la membrane apicale un réseau terminal de cytosquelette composé de F-actine, de filaments intermédiaires et de MT dont la perturbation mène à la formation de larges kystes le long de la lumière, un phénotype couramment rencontré dans cette cellule (Buechner *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2013; Kolotuev *et al.*, 2013). À l'intérieur de cette lumière, on retrouve une matrice extracellulaire dite apicale (Buechner *et al.*, 1999; Mancuso *et al.*, 2012). Contrairement à la cellule du pore et à la cellule canulaire, la formation de la lumière dans la cellule excrétrice, également appelée tubulogenèse, se fait par un mécanisme dit de creusage qui est similaire à l'angiogenèse de certains capillaires (Shaye et Soto, 2021). Elle commence par l'invagination de la membrane apicale au niveau de la jonction avec la cellule canulaire (Stone *et al.*, 2009) tôt lors de l'embryogenèse. Ensuite, la lumière croît par fusion de vésicules d'endocytose ou d'exocytose (Sundaram et Buechner, 2016) ainsi que de larges vésicules recouvertes d'une couche plus dense en microscopie électronique, les canalicules (Khan *et al.*, 2013).

Lors de l'élongation des canaux, on voit apparaître une structure représentative de cette fusion vésiculaire dite en collier de perles, où les perles sont des varicosités. Ces varicosités sont des zones où les canalicules sont présents en plus grand nombre et fusionnent avec la lumière (Kolotuev *et al.*, 2013) et où il y a un enrichissement en réticulum endoplasmique ainsi qu'en Golgi (Hahn-Windgassen et Van Gilst, 2009). Ces structures sont naturellement observables au stade L1 de croissance et lors d'une adaptation aux conditions osmotiques du milieu (Khan *et al.*, 2013; Kolotuev *et al.*, 2013). La croissance générale des canaux se fait par la coordination de la croissance des membranes apicale et basale, qui peuvent tout de même être partiellement indépendantes (Shaye et Soto, 2021), au moyen de certains régulateurs (Shaye et Greenwald, 2015). Elle nécessite de nombreux acteurs moléculaires dont certains ont déjà été étudiés (Shaye et Soto, 2021; Sundaram et Buechner, 2016). On sait par exemple que cette croissance fait intervenir la voie d'endocytose, le transport vésiculaire, le complexe de fusion membranaire exocyste et le complexe de polarité apicale PAR, tous deux régulés par la GTPase CDC-42 (Abrams et Nance, 2021), ainsi que de nombreux régulateurs du cytosquelette (Shaye et Soto, 2021). Il semble que le flux d'osmolarité puisse apporter des contraintes mécaniques indispensables à la croissance des canaux (Khan *et al.*, 2013; Kolotuev *et al.*, 2013) et que la composition en matrice extracellulaire, et ses récepteurs interviennent aussi dans ce développement (Hedgecock *et al.*, 1987; Huang *et al.*, 2003).

1.5.4 Similarités de la croissance de la cellule excrétrice avec la croissance neuronale

Lors de son développement, la cellule excrétrice est comparée au développement neuronal pour de nombreuses raisons. Tout d'abord, la cellule est sensible aux voies de guidage telles que UNC-6/Nétrine et ses récepteurs UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 (Hedgecock *et al.*, 1987). Les facteurs de croissance FGF et Wnt, qui régulent le développement de nombreux neurones (Bülow *et al.*, 2004; Killeen et Sybingco, 2008), impactent aussi la croissance de la cellule excrétrice (Oosterveen *et al.*, 2007; Polanska *et al.*, 2011). Il a été montré que SLT-1/Slit ainsi que ses deux récepteurs EVA-1 et SAX-3/Robo sont importants pour le développement des canaux, dans une voie qui requiert VAB-8 et la fonction Rac GEF spécifique de UNC-73 (Marcus-Gueret *et al.*, 2012). Cette voie semble très similaire à la régulation de la localisation de SAX-3 à la membrane lors du développement des neurones ALM (Watari-Goshima *et al.*, 2007).

D'un point de vue structurel, le bout d'un canal en croissance ressemble beaucoup à un cône de croissance axonal (Fig. 1.2B-C, (Shaye et Soto, 2021)). Les deux structures sont très riches en F-actine et en MT, excepté au bord de croissance où l'on constate une prépondérance en F-actine (Fig. 1.2C, (Lowery et Van Vactor, 2009; Shaye et Greenwald, 2015)). Le long des canaux, on trouve des centres d'organisation de microtubules non centrosomaux (ncMTOC) et la plupart des microtubules ont une croissance rétrograde (Shaye et Greenwald, 2015), caractéristiques que l'on retrouve lors du développement dans des cônes de

croissances neuronales chez *C. elegans* (Liang *et al.*, 2020; Maniar *et al.*, 2011; Shaye et Soto, 2021; Stone *et al.*, 2009). Aussi, pour réguler ces structures hautement spécialisées, la cellule excrétrice utilise des régulateurs du cytosquelette qui sont communs au développement axonal (Shaye et Soto, 2021). Parmi ceux-ci, on retrouve la Rho GEF UNC-73 (Marcus-Gueret *et al.*, 2012), WVE-1/Wave ainsi que le complexe qu'il active Arp2/3 (Reiner et Lundquist, 2018), la kinase MIG-15/NIK (Shakir *et al.*, 2006), le régulateur d'actine MIG-10/Lamellipodine (Quinn *et al.*, 2008) et la protéine NCK-1, responsable du guidage neuronal dans les neurones HSN (Mohamed et Chin-Sang, 2011). Identiquement aux neurones, la cellule excrétrice fait intervenir des Rho GTPases pour la croissance des canaux. CDC-42 et sa GEF EXC-5 sont impliquées dans l'accumulation apicale de F-actine, dans la polarité apicale ainsi que dans le transport et la fusion vésiculaire nécessaires au bon développement des canaux (Abrams et Nance, 2021; Shaye et Greenwald, 2016). RHO-1/RhoA contrôle la croissance de la cellule excrétrice à travers l'activité Rho GEF spécifique de UNC-73 et UNC-53/NAV2 (Marcus-Gueret *et al.*, 2012), aussi impliquée dans le guidage neuronal (Hekimi et Kershaw, 1993). Les Rac GTPases CED-10 et MIG-2 agissent de manière cellulaire autonome et en parallèle lors du développement de cette cellule, probablement via le contrôle du canal chlorure EXC-4/CLIC (Arena *et al.*, 2022). Finalement, d'autres acteurs moléculaires ancrés à la membrane, comme la molécule d'adhésion RIG-6/Contactine, qui permettent la croissance et le guidage axonal, affectent aussi la croissance des canaux de la cellule excrétrice (Katidou *et al.*, 2013). Tous ces éléments font de la cellule excrétrice un très bon modèle d'étude pour mieux comprendre les principes du développement de cellules polarisées en général.

1.6 Défauts du nombre d'extensions cellulaires

L'étude du mécanisme permettant la régulation du nombre d'extensions mises en place dans des cellules polarisées a été rendue possible grâce à l'observation du défaut d'extensions surnuméraires. J'explique ici en quoi ce phénotype est singulier et quelles sont les raisons connues qui le causent.

1.6.1 Dans les neurones

La morphologie du système nerveux de *C. elegans* comprend de nombreux critères. Puisque le développement du ver est très invariant entre individus, on parle de défauts de la morphologie neuronale lorsque le soma ou les neurites du neurone sont mal placés, mal guidés ou encore lorsqu'ils montrent des structures anormales. Les défauts de migration du soma, ou encore de guidage axonal sont les plus fréquents puisque ces processus mettent en jeu de nombreux mécanismes finement régulés dont toute perturbation mène à ce genre de phénotype. Le développement de structures « anormales » ou surnuméraires à partir des neurites préexistants a également été caractérisé. Par exemple, avec le vieillissement du nématode, on peut

observer l'apparition de gonflement ou de perles le long de la dendrite des neurones mécanosensoriels ALM et PLM (Fig. 1.9A, (Pan *et al.*, 2011)). Dans cette même catégorie, les défauts de branchements rassemblent la formation d'un nouveau neurite le long d'un neurite préexistant, ou bien l'altération de l'arborisation de la dendrite d'un neurone. Des défauts de branchement neuronal ont été observés avec le vieillissement dans les neurones mécanosensoriels (Fig. 1.9A), ainsi que les neurones GABAergiques de *C. elegans* (Khandekar, 2015; Pan *et al.*, 2011; Tank *et al.*, 2011; Toth *et al.*, 2012). Dans ces contextes, la formation de nouvelles branches le long des neurites est liée à la perte d'adhésion neuronale, à la présence de mitochondrie et à la chaîne respiratoire (Pan *et al.*, 2011; Tank *et al.*, 2011; Toth *et al.*, 2012). Cependant, les défauts de branchement ne sont pas forcément reliés au vieillissement (Tank *et al.*, 2011). On observe aussi ces défauts dans les neurones AIY, PVD et CAN chez des nématodes plus jeunes, qui sont mutants pour des voies affectant les HSPG (Blanchette *et al.*, 2017; Bülow *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2015). Une mutation dans le gène qui code pour la spectrine, un composant du cytosquelette sous-membranaire, conduit à la déstabilisation du cône de croissance axonal des neurones PQR et à des défauts de branchement (Jia *et al.*, 2020). Il existe cependant un phénotype moins bien décrit : le développement d'extensions polarisées surnuméraires à partir du soma, et non d'une extension préexistante comme pour le branchement, et qui semble lié à des défauts lors de la polarisation de la cellule.

Chez les mammifères, l'altération de plusieurs voies peut mener à la formation d'axones surnuméraires. Tout d'abord, la surexpression d'effecteurs de polarité comme Par-3 ou de la kinase LKB1 peut induire ce phénotype atypique (Schwamborn et Puschel, 2004; Shelly *et al.*, 2007), confirmant une relation entre polarité et contrôle du nombre d'extensions cellulaires. Ensuite, la perturbation des modulateurs du cytosquelette comme les Rho GTPases permet le développement de ce genre de défauts. Parmi celles-ci, on retrouve RhoA/RHO-1, impliquée dans l'inhibition et la restriction du développement d'axones surnuméraires lors de la polarisation neuronale. L'inactivation de la kinase Rock agissant en aval de RhoA/RHO-1 induit la formation de plusieurs axones dans les neurones de l'hippocampe (Da Silva *et al.*, 2003). Le contrôle du nombre d'axones par RhoA passe aussi par la modulation de la myosine II et la formation d'arcs d'actine dans la zone T du cône de croissance. En effet, l'inhibiteur de la myosine II, blebbistatine, déstabilise ces arcs et mène à la formation d'axones surnuméraires dans ces neurones (Dupraz *et al.*, 2019). De son côté, la Rho GTPase Rac1/CED-10 active la croissance neuronale dans la plupart des contextes d'étude. Sa surexpression, ainsi que celle de sa GEF Tiam1/TIAM-1, induit également la formation de plusieurs axones (Kunda *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2005). Finalement, altérer directement les dynamiques du cytosquelette par la stabilisation des MT ou la déstabilisation de l'actine conduit à la spécification de plusieurs axones (Fig. 1.9B) (Bradke et Dotti, 2000; Gomis-Rüth *et al.*, 2008; Witte et Bradke, 2008). Il a été montré qu'appliquer une force mécanique d'élongation suffisante pouvait aussi

déclencher ce phénomène (Lamoureux *et al.*, 2002). L'étude de ces défauts ayant été effectuée chez les mammifères en condition *in cellulo*, aucun défaut similaire n'a encore été observé, à ma connaissance, dans un modèle mammifère *in vivo*. Encore une fois, le modèle *C. elegans* offre ici une opportunité unique d'étudier des mécanismes fondamentaux de la mise en place de la polarité cellulaire.

Chez *C. elegans*, le défaut d'extensions surnuméraires a été rapporté dans plusieurs neurones. Lors du développement des neurones HSN, le récepteur UNC-40/DCC est localisé de manière asymétrique au niveau ventral du soma. Cette localisation marque le départ des neurites qui forment des protrusions, et donc du futur axone. Il a été montré que la localisation asymétrique de UNC-40/DCC spécifiquement au bord ventral dépend du signal UNC-6/Nétrine mais aussi d'autres récepteurs comme SAX-3/Robo, de l'HSPG UNC-52/perlecan, et de la sous-unité d'intégrine INA-1 ainsi que de sa kinase MIG-15/NIK (Fig. 1.9C-D, (Tang et Wadsworth, 2014; Yang *et al.*, 2014)). En impactant la localisation de UNC-40/DCC, ces facteurs modifient le biais directionnel d'où le neurite émerge pour donner le futur axone. Dans la plupart de ces mutants, on voit donc des axones se développer dans une autre direction que ventrale, parfois même dans plusieurs directions, donnant ainsi des neurones bipolaires avec deux extensions au lieu d'une seule. La surexpression de UNC-6/Nétrine induit aussi la formation d'extensions supplémentaires dans les neurones HSN, à travers un mécanisme qui dépend de UNC-5/Unc5, du modulateur d'actine MIG-10/Lamellipodine et de la kinase MIG-15/NIK (Limerick *et al.*, 2018).

Les neurones dopaminergiques PDE peuvent également développer des extensions surnuméraires (**Fig. 1.9E-F**). Des doubles mutants de Rho GTPases CED-10/Rac1, MIG-2/RhoG ou encore RAC-2/3 induisent la formation de branches axonales ou même d'axones surnuméraires à partir du soma. La GEF UNC-73/Trio semble impliquée dans ce mécanisme de régulation du nombre d'extensions dans le neurone PDE, ainsi que le régulateur d'actine UNC-115/abLim (Struckhoff et Lundquist, 2003). De manière intéressante, l'activation constitutive des Rho GTPases susmentionnées mène à la formation d'axones surnuméraires par l'intermédiaire d'un mécanisme qui dépend de MIG-10/Lammellipodine (Struckhoff et Lundquist, 2003). Selon les auteurs, la formation d'un trop grand nombre d'axones pourrait s'expliquer différemment en fonction de la perte de fonction des Rho GTPases, qui pourrait se traduire par une perte de la capacité à inhiber la formation d'axones ectopiques, et de l'activation constitutive des Rho GTPases, qui induirait une trop grande initiation axonale.

Une mutation du gène de *sax-1/Ndr Kinase* mène à la formation de neurites supplémentaires dans les neurones ASE, ASJ et AWC très tôt dans le développement du ver (Zallen *et al.*, 2000). SAX-1 est une

sérine/thréonine kinase qui agit en aval de RHO-1/RhoA et qui peut être régulée par UNC-43/CamKII pour contrôler le nombre d'extensions dans ces neurones.

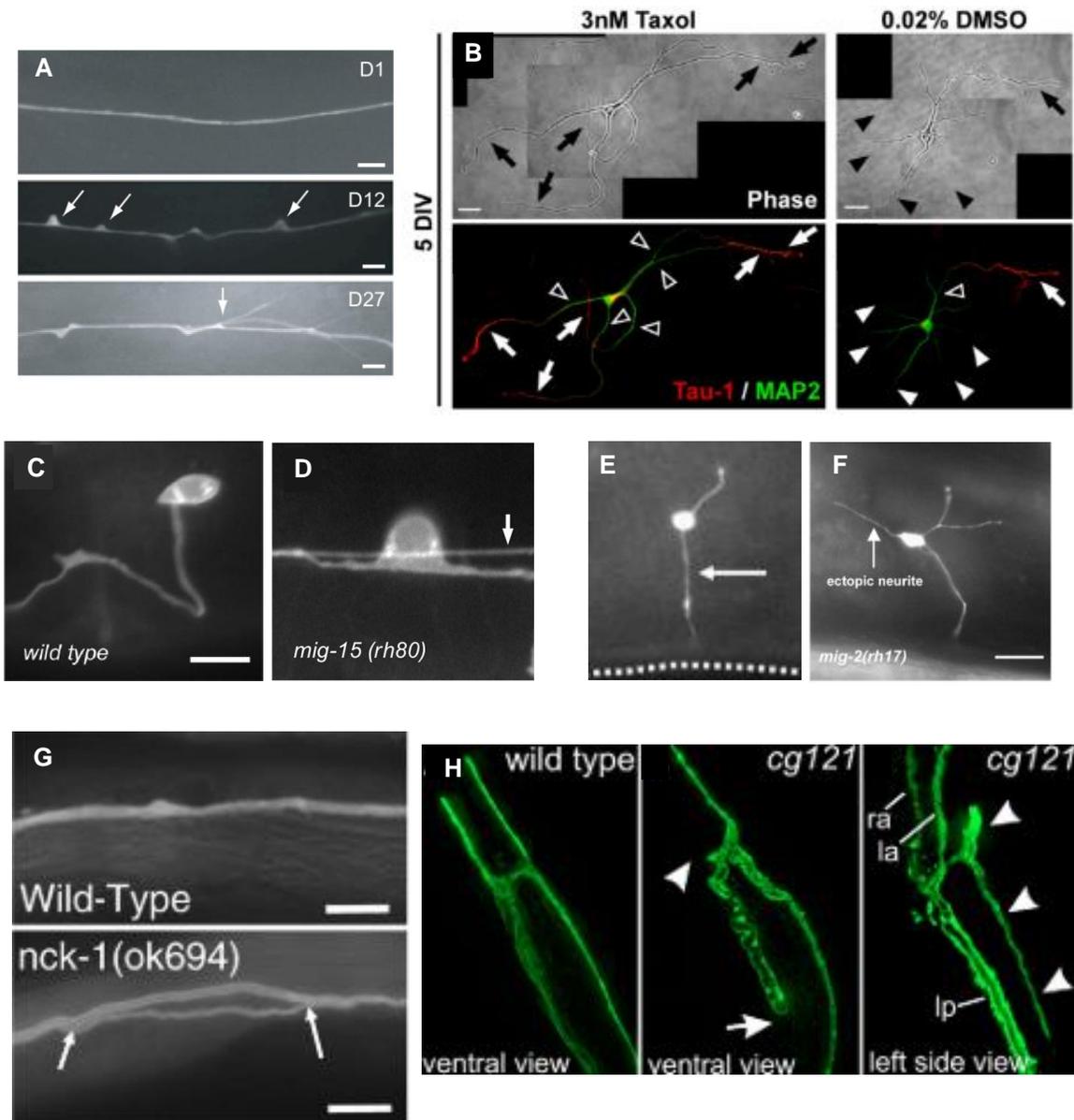


Figure 1.9. Les défauts neuronaux et de la cellule excrétrice

(A) Exemple de défauts qui apparaissent avec le vieillissement le long du neurite du neurone mécanosensoriel ALM. Chez les jeunes adultes (jour 1 d'âge adulte, D1), le neurite d'ALM est longiligne. Avec le temps (jour 12 d'âge adulte, D12), des billes apparaissent le long du neurite (flèches blanches, panneau du milieu). Plus tard (jour 27 d'âge adulte, D27), des branchements se développent le long du neurite (flèche blanche, panneau du bas). Images issues de (Pan *et al.*, 2011). (B) Lors du développement *in vitro* des neurones d'hippocampe de rat, le Taxol, un agent pharmacologique capable d'induire la stabilisation des microtubules, induit la formation de plusieurs axones (ici marqué par le marqueur axonal Tau-1, flèches pleines blanches). Dans le DMSO, la condition contrôle, le neurone ne développe qu'un seul axone. Images issues de (Witte et Bradke, 2008). (C-D) Exemple d'extensions surnuméraires dans les neurones HSN de *C. elegans*. (C) Les neurones HSN sont unipolaires dans les conditions sauvages (« *wild type* » en anglais). (D) Chez les mutants *mig-15(rh80)*, on voit parfois apparaître un neurite surnuméraire (flèche blanche). Images issues de (Yang *et al.*, 2014). (E-F) Exemple d'extensions surnuméraires dans les neurones PDE de *C. elegans*. (E) Dans les

conditions sauvages, les neurones PDE mettent en place un axone principal qui se divise en deux pour parcourir la face ventrale du ver, et une dendrite ciliée vers le côté dorsal du ver. (F) Le mutant *mig-2(rh17)* induit la formation de neurites supplémentaires, aussi appelés neurites ectopiques (« ecotpic neurite » en anglais), depuis le soma du neurone (flèche blanche). Images issues de (Shakir *et al.*, 2008). (G) Les canaux de la cellule excrétrice d'animaux mutants pour *nck-1* montrent parfois la formation de branches le long d'un canal préexistant, aussi appelé phénotype de branchement des canaux. Images issues de (Mohamed et Chin-Sang, 2011) (H) Contrairement aux conditions sauvages, où la cellule excrétrice de *C. elegans* forme invariablement quatre canaux (panneau de gauche), les mutants pour *dgn-1(cg121)* montrent parfois des canaux courts (flèche panneau central) ou manquants (tête de flèche panneau central). Avec une pénétrance plus faible, on y trouve aussi le défaut de canaux surnuméraires (têtes de flèche blanches, panneau de droite). Images issues de (Johnson *et al.*, 2006).

Dans certains contextes, les neurones mécanosensoriels AVM, PVM, ALM et PLM montrent un phénotype identique. Il est important de noter que les neurones ALM développent, avec une faible pénétrance, une deuxième extension dans les conditions sauvages. Néanmoins, l'expression de VAB-8L dans ces neurones conduit à l'augmentation de la pénétrance de ce phénotype à travers un mécanisme qui dépend du récepteur SAX-3/Robo et de son signal SLT-1/Slit (Watari-Goshima *et al.*, 2007). Les mutants de la sous-unité de la tubuline MEC-7/ β -tubuline impactent aussi l'incidence de la formation de neurites surnuméraires dans les neurones ALM par un défaut de polarisation du neurone, qui pourrait être lié à la stabilisation des microtubules (Kirszenblat *et al.*, 2013). La surexpression du récepteur UNC-40/DCC, ou bien l'expression de sa forme constitutivement active depuis le construit MYR::UNC-40, induisent pareillement la formation de neurites supplémentaires dans les neurones ALM, mais aussi dans les neurones AVM et PVM qui n'en développent normalement pas dans des conditions sauvages (Gitai *et al.*, 2003; Levy-Strumpf et Culotti, 2007). Enfin, des défauts d'extensions surnuméraires apparaissent naturellement avec le vieillissement des vers dans les neurones ALM et CAN (Khandekar, 2015; Toth *et al.*, 2012).

Pour résumer, des défauts de neurites surnuméraires sont observés dans différents neurones de *C. elegans*. Ce phénotype est lié à la perturbation des voies de signalisation de guidage telles que UNC-6/Nétrine et ses récepteurs UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 ou bien SLT-1/Slit et son récepteur SAX-3. Une régulation altérée des Rho GTPases telles que RHO-1/RhoA, CED-10/Rac1 ou MIG-2/RhoG dans les neurones, ainsi que des modulateurs du cytosquelette comme MIG-10/Lamellipodine ou UNC-115/abLim mènent à un destin similaire. Finalement, la dérégulation d'HSPG comme UNC-52/perlecan ou de leurs interactions avec les voies de guidage aboutit encore une fois au dérèglement de la polarité neuronale et au développement d'un trop grand nombre de neurites. Bien que toutes ces études aient mis en évidence l'intervention de nombreux facteurs dans la mise en place de la polarité neuronale, aucune n'a encore déchiffré l'existence d'un mécanisme complet permettant aux cellules polarisées de contrôler le nombre d'extensions qu'elles mettent en place. D'autres questions concernant la mise en place des extensions restent sans réponses. Par exemple, dans quelle direction ou à quel emplacement les neurites surnuméraires se développent ? Est-ce que les

facteurs répertoriés dans cette partie agissent dans un mécanisme commun ? Ou encore, est-ce que cette régulation morphogénétique est conservée entre différentes cellules polarisées ? Les travaux décrits au cours de cette thèse essaient de répondre à ces questions.

1.6.2 Dans la cellule excrétrice

Similairement aux neurones, la cellule excrétrice de *C. elegans* peut présenter une variété de défauts morphologiques. Des défauts de guidage des canaux ont été observés dans des mutants de la voie de la Nétrine et de la voie des HSPG (Blanchette *et al.*, 2017; Hedgecock *et al.*, 1990). Les défauts de canaux courts, par rapport à la taille des canaux chez les individus sauvages, ou de canaux manquants, correspondant à une cellule excrétrice avec moins de quatre canaux, sont assez courants. Dans la littérature, ils sont reliés à l'altération des mécanismes de croissance dans la cellule excrétrice (Abrams et Nance, 2021; Hedgecock *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 2006; Lant *et al.*, 2015; Shaye et Soto, 2021; Sundaram et Buechner, 2016). Le branchement des canaux, c'est-à-dire le développement d'un canal à partir d'un canal préexistant, a aussi été observé dans la cellule excrétrice d'animaux mutants pour la kinase NCK-1 et pour la Rho GTPase CDC-42/Cdc42 (Fig. 1.9G, (Abrams et Nance, 2021; Mohamed et Chin-Sang, 2011)). Comparée aux neurones, la subtilité de la cellule excrétrice réside dans la présence d'une lumière au sein des extensions cytoplasmiques qu'elle projette. On retrouve donc des défauts spécifiques à la cellule excrétrice, notamment quand la croissance des membranes basale et apicale au niveau de la lumière est découplée. On peut par exemple observer chez des mutants affectant la croissance de la lumière, des portions de canal dépourvues de lumière (Hisamoto *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2013). À l'inverse, tous les gènes *exc* chez *C. elegans* sont caractérisés par l'apparition de kystes dans les canaux dus à un élargissement de la lumière ou de plusieurs lumières dans un seul canal (Buechner *et al.*, 1999; Shaye et Soto, 2021).

Les exemples de défauts de canaux surnuméraires dans la cellule excrétrice de *C. elegans* sont beaucoup moins nombreux que pour les neurones. Il semblerait que les mutants des gènes de *unc-6* et *unc-5* mènent à l'apparition de plus que quatre canaux dans la cellule excrétrice (Hedgecock *et al.*, 1990). Deux autres articles observent plus clairement l'apparition de ce phénotype de canaux surnuméraires dans des animaux mutants pour un effecteur de la voie Wnt : AXL-1 (pour axin-like molecule), et pour le récepteur de la matrice extracellulaire DGN-1/dystroglycan (Fig. 1.9H, (Johnson *et al.*, 2006; Oosterveen *et al.*, 2007)). Bien que ces trois cas rapportent anecdotiquement l'existence de canaux surnuméraires dans la cellule excrétrice, aucun de ces travaux ne déchiffre les mécanismes à la base du contrôle du nombre d'extensions dans la cellule excrétrice.

1.7 Problématique et hypothèse

On dénote finalement un manque de compréhension dans les mécanismes contrôlant la morphologie des cellules polarisées lors de leur développement. Grâce à l'observation d'extensions surnuméraires, nous proposons ici l'étude du mécanisme qui permet à une cellule polarisée, la cellule excrétrice, de contrôler le nombre d'extensions qu'elle met en place lors de son développement. Nos travaux étudient la relation entre de nombreux acteurs de la mise en place de la polarité tels que les HSPG, des voies de guidage comme celle de UNC-6/Nétrine et des modulateurs du cytosquelette comme les Rho GTPases dans un tel mécanisme. Notre hypothèse est que l'HSPG syndécan peut limiter le nombre de projections cellulaires polarisées dans la cellule excrétrice en développement, en coordonnant le rôle de récepteurs transmembranaires avec les modulateurs du cytosquelette afin d'induire les réarrangements nécessaires à des sites précis de la cellule.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Souches de nématodes et génétique

Les cultures de nématodes ont été maintenues dans un incubateur à 20 °C sur des plaques ngMensemencées avec la bactérie *Escherichia coli* OP50 comme décrit (Brenner, 1974). Les allèles utilisés (tableau B1) ainsi que les souches construites pour cette étude à l'aide de procédures génétiques standard (tableau B2) sont répertoriés en annexe B. Les génotypes ont été confirmés par génotypage PCR classique et ses dérivés « amplification refractory mutation system PCR » (ARMS-PCR) et « super selective PCR » ou (SS-PCR) pour le génotypage de mutation ponctuelle (Touroutine et Tanis, 2020; Ye, 2001), et finalement par séquençage si nécessaire. Les amorces utilisées pour créer des souches sont aussi répertoriées en annexe B (tableau B3). Tous les allèles mutants et souches contenant un gène rapporteur ont été croisés avec la souche de type sauvage Bristol N2 au moins deux fois avant d'être utilisés à des fins d'analyse ou de création de souches.

2.2 Microscopie et observation de la cellule excrétrice

Les vers ont été cultivés dans un incubateur à 20 °C sur au moins trois générations avant analyse. Les vers ont été anesthésiés avec 75 mM de NaN₃ (azoture de sodium) entre une lamelle et un tampon d'agarose à 5 %. Les observations ont été effectuées à l'aide d'un objectif x40 ou x63 sur un microscope à fluorescence Zeiss Axio Imager (M2). Des images de phénotypes représentatifs ont été capturées à l'aide de la caméra Zeiss AxioCam et du logiciel Zen. Les images d'embryons ont été déconvoluées à l'aide du logiciel AutoQuant X3 pour une meilleure résolution.

Les neurones mécanosensoriels ont été examinés chez des larves au stade L4 en utilisant le rapporteur transgénique *zDIs5* (*Pmec-4::gfp*). Nous nous sommes concentrés sur l'observation du neurone mécanosensoriel AVM étant donné que le phénotype d'extension surnuméraire n'apparaît pas chez les individus sauvages contrairement aux neurones ALM. Le neurone AVM est localisé dans la loge ventrale droite du ver. Son unique neurite va se développer d'abord latéralement pour atteindre la corde nerveuse ventrale, puis antérieurement pour remonter vers l'anneau nerveux.

Les neurones contrôlant les muscles de la vulve chez les individus hermaphrodites, HSN, ont été observés avec le rapporteur transgénique *zDIs13* (*Ptph-1::gfp*). Les neurones HSN se trouvent de part et d'autre de la

vulve dans une position légèrement postérieure et ventrale du ver. L'unique neurite des neurones HSN se développe antérieurement pour contourner la vulve et se rendre vers l'anneau nerveux.

Le défaut d'extensions neuronales surnuméraires a été comptabilisé à partir du moment où au moins deux extensions partent du soma des neurones AVM ou HSN, et que leur taille excède celle du soma. D'autres défauts ont été observés tels que des problèmes de guidage des neurites, mais n'ont pas été pris en compte dans cette étude, car nous nous sommes intéressés aux défauts affectant le nombre d'extensions cellulaires dans les cellules polarisées.

La cellule excrétrice et ses canaux ont été examinés chez des larves au stade L4, sauf indication contraire, en utilisant les rapporteurs transgéniques *arIs164* (*Pglt-3::venus*) ou *bgIs312* (*Ppes-6::gfp*). La cellule excrétrice est située ventralement au bulbe terminal du pharynx dans la tête du ver. Elle développe quatre canaux latéraux chez le type sauvage : deux canaux antérieurs situés de chaque côté de la tête de l'animal (un à gauche et un à droite) et deux canaux postérieurs situés le long du corps de l'animal (un sur le côté gauche de l'animal et un sur le côté droit). Un animal était considéré comme ayant des canaux surnuméraires uniquement lorsque plus de quatre canaux se sont développés directement du soma de la cellule excrétrice, quelle que soit la position du canal dans le corps de l'animal (gauche, droit, dorsal, ventral, antérieur ou postérieur). Seuls les canaux qui (1) proviennent du soma de la cellule excrétrice et (2) sont plus longs que le diamètre du soma des cellules excrétrices (environ 25 μm de longueur) ont été comptés comme canaux. Ainsi, les branches qui s'étendent le long d'un canal n'ont pas été comptées comme canal supplémentaire, car elles ne proviennent pas du soma de la cellule excrétrice. Les défauts de canaux manquants, c'est-à-dire la présence de moins de quatre canaux dans la cellule excrétrice, ont également été évalués au cours de cette étude. D'autres types de défauts ont été observés lors de nos analyses, tels que des canaux mal orientés et des canaux plus courts (section 1.6.2), qui n'ont pas été considérés comme défectueux dans cette étude, car nous nous sommes concentrés sur les défauts du nombre de canaux.

Pour les images de microscopie confocale (Fig. 3.2 C-D), des larves au stade L1 cultivées à 20°C ont été montées sur un tampon d'agarose et anesthésiées avec un milieu enrichi (M9) contenant 2,5 μM de lévamisole. Les images ont été acquises à l'aide d'un objectif Plan-Apochromatique 63x/1.4NA à immersion à huile, sur un système confocal Zeiss LSM880 avec acquisition AiryScan. Le cytoplasme (CFP, cyan) et l'actine (LifeAct::TagRFP, magenta) ont été visualisés (Fig. 3.2C) grâce à l'expression du transgène *arIs201* (Shaye et Greenwald, 2016). Pour la CFP (458 nm), la puissance du laser était réglée à 2,4%, tandis que pour LifeAct::TagRFP (561 nm), la puissance du laser était réglée à 2,0%. Les images de la (Fig. 3.2D) montrent LifeAct::TagRFP (magenta), exprimé à partir du transgène multicopie *arIs195*, et le marqueur de

MT EMTB-3xGFP (jaune, (Shaye et Greenwald, 2015)), exprimé à partir du transgène à copie unique *arTi34*, généré par insertion MiniMos (Frokjaer-Jensen *et al.*, 2014). Pour la GFP (488 nm), la puissance du laser était de 2,4%, et pour TagRFP (561 nm), la puissance du laser était de 2,0%. Le gain du détecteur était équivalent (800V) pour tous. Après acquisition, toutes les images ont été traitées avec AiryScan et FIJI/ImageJ en maintenant des paramètres identiques entre les souches sauvages et les mutants *sdn-1(zh20)*. Les images représentatives montrées ici sont des projections d'intensité maximale de piles de 20 à 30 coupes Z de 0,5 µm.

2.3 Microinjection et animaux transgéniques

Les animaux transgéniques ont été générés par des techniques de microinjection standard (Mello et Fire, 1995) et améliorées par la technique du pinceau (Gibney *et al.*, 2023). La concentration à laquelle chaque plasmide a été injecté, le marqueur de co-injection utilisé ainsi que sa concentration dans le mix d'injection sont répertoriés en annexe B (tableau B4). Le vecteur pBluescript SK+ a été utilisé pour augmenter la concentration d'ADN totale à 200 ng/µL dans le mix d'injection afin d'augmenter les chances d'obtenir des animaux transgéniques. Comme dans les procédures standard de microinjection chez *C. elegans*, plusieurs lignées ont été générées et analysées pour chaque plasmide d'intérêt, afin de réduire les variabilités causées par cette technique.

2.4 Transgènes de sauvetage et d'expression

Les [nombre] réfèrent à la position le long du plasmide et [nombre pb] à la taille des construits.

Pmec-7::sdn-1 ADNc (pCB242): l'ADNc de *sdn-1* a été amplifié à partir de yk139f3 et inséré dans le vecteur pPD96.41 contenant le promoteur *Pmec-7* à l'aide des enzymes *XmaI* – *XhoI* comme décrit précédemment (Blanchette *et al.*, 2015).

Pglt-3::sdn-1 ADNc (pCB420): le vecteur pCB242 (*Pmec-7::sdn-1* ADNc) a été digéré avec *SphI* [11] et *XmaI* [888] pour libérer *Pmec-7* et le remplacer par l'insert *Pglt-3* [303 pb] amplifié à partir du vecteur pDS629 (*Pglt-3::zif-1*) à l'aide des amorces oCBQc48 (GCTTGCATGCTTTTCGAATCG) et oCBQc49 (CATGATCCCGGTATGGATCCGGTACCTCC) pour ajouter le site de restriction de *XmaI*, et donc pouvoir digérer le produit de PCR avec *SphI* [9] et *XmaI* [292].

Pgrd-10::sdn-1 ADNc (pCB265): l'ADNc de *sdn-1* a été amplifié avec les amorces oCB1032 et oCB1033, digéré avec *EcoRI* [1700] et *AgeI* [809] et inséré dans le vecteur pPD95.75 contenant *Pgrd-10::GFP* pour remplacer la GFP avec *EcoRI* [3306] et *AgeI* [4197].

Prgef-1::sdn-1 ADNc (pCB425): le vecteur pCB199 (*Prgef-1::rib-1* ADNc) a été digéré avec *XmaI* [3480] et *ApaI* [5441] afin de libérer l'ADNc de *rib-1* et le 3'UTR de *unc-54* pour être remplacé par un fragment

contenant l'ADNc de *sdn-1* ainsi que le 3'UTR de *unc-54*, provenant de pCB242 (*Pmec-7::sdn-1* ADNc) et digéré avec *XmaI* [888] et *ApaI* [2734].

Pmyo-3::sdn-1 ADNc (pCB423): le vecteur pCB332 (*Pmyo-3::lon-2* ADNc) a été digéré avec *XbaI* [2414] et *SacI* [3998] pour libérer l'ADNc de *lon-2* et le remplacer par un fragment contenant l'ADNc de *sdn-1* amplifié à partir du vecteur pCB420 (*Pglt-3::sdn-1* ADNc) à l'aide des amorces oCB1715 (CATGATTCTAGACCATACCCGGGATGATTCTG) et oCB1716 (AAGATCTCGGGAGCTCCTC) afin d'ajouter le site de restriction pour *XbaI* et ainsi pouvoir être digéré par *XbaI* [7] et *SacI* [901].

Prab-3::sdn-1 ADNc (pCB436): le vecteur pCB428 (*Prab-3::sax-7* ADNc) a été digéré avec *XmaI* [1528] et *XhoI* [5091] pour libérer l'ADNc de *sax-7* et le remplacer par un fragment contenant l'ADNc de *sdn-1* provenant de pCB420 (*Pglt-3::sdn-1* ADNc) [4737 pb] libéré à l'aide des enzymes *XmaI* [294] et *XhoI* [1167].

Pmyo-2::sdn-1 ADNc (pCB427): Le vecteur pCB242 (*Pmec-7::sdn-1* ADNc) a été digéré avec *XbaI* [25] et *XmaI* [888] pour libérer le promoteur *Pmec-7* et le remplacer par le promoteur *Pmyo-2* [863 pb] provenant de pCB230 (*Pmyo-2::rib-2* ADNc) digéré avec *XbaI* [25] et *AgeI* [1309].

Phlh-17::sdn-1 ADNc (pCB445): le promoteur *Phlh-17* a été amplifié à partir du vecteur pGR125 (*Phlh-17::myr::gfp*, don de Georgia Rapti, (Rapti *et al.*, 2017)) à l'aide des amorces oCB1833 (CTCACAACGATGGATACG) et oCB1834 (CATGATCCCGGGTACCTTTGGGTCCTTTGG) de manière à ajouter le site de restriction à *XmaI* en 3'. Le promoteur *Pglt-3* dans le plasmide pCB420 (*Pglt-3::sdn-1* ADNc) a été libéré en utilisant les enzymes *SphI* [11] et *XmaI* [294], pour être remplacé par le promoteur *Phlh-17* libéré de l'amplicon à l'aide des mêmes amorces ([50] et [2024] respectivement).

Pglt-3::lon-2 ADNc (pCB458): l'ADNc de *lon-2* a été libéré du vecteur pCB268 (*Pdpy-7::lon-2*) avec *XmaI* [271] et *SacI* [1844] pour remplacer l'ADNc de *sdn-1* dans le plasmide pCB420 (*Pglt-3::sdn-1* ADNc) à l'aide des mêmes enzymes de restriction ([294] et [1777] respectivement).

Pglt-3::lon-2ΔHS (pCB528): le variant *lon-2ΔHS*, correspondant à l'ADNc de *lon-2* dépourvu de ses sites d'attachement des chaînes HS, a été libéré du vecteur pCB314 (*Plon-2::lon-2ΔHS* décrit dans (Blanchette *et al.*, 2015)) avec *XmaI* [3024] et *ApaI* [5560] pour remplacer l'ADNc de *sdn-1* dans le plasmide pCB496 (*Pglt-3::sdn-1ΔSTOP*) à l'aide des mêmes enzymes de restriction ([294] et [2122] respectivement).

Pglt-3::gpn-1 ADNc (pCB529): l'ADNc de *gpn-1* ainsi que la région 3'UTR du gène *unc-54* ont été libérés du vecteur pCB517 (*Prab-3::gpn-1* ADNc) avec *XmaI* [1528] et *ApaI* [4001] pour remplacer l'ADNc de *sdn-1* dans le plasmide pCB496 (*Pglt-3::sdn-1ΔSTOP*) à l'aide des mêmes enzymes de restriction ([294] et [2122] respectivement).

Les variants de l'ADNc de *sdn-1* ont été synthétisés par l'entreprise IDT™, puis digéré de leur vecteur original (pUCIDT-AMP) avec *XmaI* et *XhoI* (position pour chaque plasmide dans la liste ci-dessous) pour être réintroduit dans le plasmide pCB420 (*Pglt-3::sdn-1* ADNc) à l'aide des mêmes enzymes ([489] et [1362] respectivement) et remplacer l'ADNc sauvage de *sdn-1*. De cette manière, les plasmides suivants ont été générés :

- pCB442 : *Pglt-3::sdn-1ΔDEGSY* (*XmaI* [491] et *XhoI* [1347])
- pCB443 : *Pglt-3::sdn-1ΔFRIRKK* (*XmaI* [491] et *XhoI* [1344])
- pCB444 : *Pglt-3::sdn-1ΔYtoA* (*XmaI* [491] et *XhoI* [1362])
- pCB446 : *Pglt-3::sdn-1ΔHS* (*XmaI* [491] et *XhoI* [1362])

Pglt-3::sdn-1ΔICD (pCB526): l'ADNc de *sdn-1* a été amplifiée de son côté N-terminal jusqu'à sa région transmembranaire avec l'ajout d'un codon stop et du site de restriction pour *XhoI* directement après cette dernière, à partir du plasmide pCB420 (*Pglt-3::sdn-1* ADNc) à l'aide des amorces oCB2439 (AGGAAGTGCAAACATTCC) et oCB2571 (TAGATCCTCGAGTTAAAAGACTACAAAGAGCAGC). Cet amplicon contenant la séquence recombinante du variant *sdn-1ΔICD* a ensuite été digéré avec les enzymes de *NcoI* [548] et *XhoI* [1167] pour être réintroduite dans le plasmide pCB420 (*Pglt-3::sdn-1* ADNc) à la place de l'ADNc sauvage de *sdn-1* avec les mêmes enzymes ([88] et [610] respectivement).

Pglt-3::sp_mNG_nlg-1ECD+TM_sdn-1ICD (pCB525): le promoteur *Pglt-3* a été amplifié avec les amorces oCB2569 (CATGATGAATTCCATGCTTTCGAATCGTTG) et oCB2570 (TAGTACGAATTCTATGGATCCGGTACCTCC) de manière à ajouter un site de restriction pour *EcoRI* de part et d'autre du promoteur, à partir du vecteur pCB420 (*Pglt-3::sdn-1* ADNc). Le promoteur amplifié a ensuite été digéré avec l'enzyme de restriction *EcoRI* [7] et [299] pour remplacer le promoteur *Pmyo-3* dans le plasmide pXZ102 (*Pmyo-3::sp_mNG_nlg-1ECD+TM_sdn-1ICD*, (Zhou *et al.*, 2021)), supprimé à l'aide de la même enzyme de restriction ([31] et [2810]).

Pglt-3::myr::unc-5::gfp (pCB454): le promoteur *Pglt-3* a été libéré du vecteur pCB420 (*Pglt-3::sdn-1* ADNc) avec *SphI* [11] et *XmaI* [294] pour remplacer le promoteur *Punc-25* dans le plasmide pEL964 (*Punc-25::myr::unc5::gfp*, don de Eric Lundquist, (Norris *et al.*, 2014)) contenant la séquence de la partie cytoplasmique de *unc-5*, à l'aide des mêmes enzymes de restriction ([11] et [1861] respectivement).

Pglt-3::myr::unc-40::gfp (pCB453): le promoteur *Pglt-3* a été libéré du vecteur pCB420 (*Pglt-3::sdn-1* ADNc) avec *SphI* [11] et *XmaI* [294] pour remplacer le promoteur *Punc-25* dans le plasmide pEL588 (*Punc-25::myr::unc40::gfp*, don de Eric Lundquist, (Gitai *et al.*, 2003)) contenant la séquence de la partie cytoplasmique de *unc-40*, à l'aide des mêmes enzymes de restriction ([11] et [1861] respectivement).

Pglt-3::mig-2 ADNc (pCB474): l'ADNc de *mig-2* a été amplifié avec les amorces oCB2119 (TAGTACACCGGTATGTCTTCACCGTCGAG) et oCB2120 (TTCTGCAGCTAGCAGATC) afin d'ajouter un site de restriction pour *AgeI* en 3', à partir du plasmide pJE16 (*Pglt-3::mig-2::FLAG*, construit par l'équipe du Dr. Daniel Shaye, (Arena *et al.*, 2022)). L'amplicon a ensuite été digéré avec *AgeI* [7] et *NcoI* [608] pour remplacer libérer l'ADNc de *mig-2* dépourvu du marqueur *FLAG* et être réintroduit dans le vecteur pJE16 à la place de la séquence codante pour *mig-2::FLAG* supprimée avec les mêmes enzymes ([462] et [1115] respectivement).

Pglt-3::mig-2(gm103) (pCB477): l'allèle *mig-2(gm103)* a été amplifié à partir d'ADN génomique de vers mutant *mig-2(gm103)* avec les amorces oCB2243 (CATGATCCCGGGCAGATGTCTTCACCGTCG) et oCB2244 (CATGATCTCGAGGATCGGGAAGAAGAGCCT) ajoutant les sites de restriction de *XmaI* et de *XhoI* en amont et en aval de cet allèle. Cette séquence a été libérée de l'amplicon à l'aide des amorces

XmaI [7] et de *XhoI* [1619] pour l'insérer dans le plasmide pCB420 (*Pglt-3::sdn-1* ADNc) à la place de l'ADNc de *sdn-1* supprimé avec les mêmes amorces ([294] et [1167] respectivement).

Pglt-3::ced-10(G12V) (pCB500): l'allèle *ced-10(G12V)* a été libéré du vecteur pEL206 (*Posm-6::ced-10(G12V)*), don de Eric Lundquist, (Lundquist *et al.*, 2001)) à l'aide des enzymes *XmaI* [2432] et de *SacI* [3129] pour être ensuite introduit dans le vecteur pCB420 (*Pglt-3::sdn-1* ADNc) à la place de l'ADNc de *sdn-1* libéré avec les mêmes enzymes ([294] et [2893] respectivement).

ced-10 ARNi (pCB478): l'ADNc de *ced-10* a été libéré du vecteur pJE13 (*Pglt-3::FLAG::ced-10* ADNc, (Arena *et al.*, 2022)) avec *AgeI*-HF [507] et *NcoI*-HF [1103], puis inséré dans le vecteur L4440 (Timmons et Fire, 1998) à l'aide des mêmes enzymes de restriction ([2105] et [2098] respectivement).

Tous les inserts de clones finalisés ont été vérifiés soit par séquençage lorsqu'une PCR intervenait dans le clonage, soit par digestion et/ou amplification par PCR pour les fragments provenant de vecteurs déjà séquencés.

2.5 ARN interférence

L'ARN interférence ou ARNi a été réalisée via la méthode de nutrition comme décrite précédemment (Timmons et Fire, 1998). Une colonie de bactéries HT115 transformée avec un vecteur vide L4440 (conditions témoins) ou un vecteur contenant une partie de la séquence du gène ciblé pour la déplétion a été cultivée pendant 16 heures à 37°C dans un milieu LB contenant 75 µg/mL d'ampicilline et 12,5 µg/mL de tétracycline pour sélection. Les bactéries ont ensuite été amplifiées pendant 16 heures à 37°C dans un milieu LB contenant 75 µg/mL d'ampicilline, puis concentrées dans un ratio de 15/1,ensemencées sur des plaques contenant 75 µg/mL d'ampicilline et 1 mM d' isopropyl β D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), et laissées toute la nuit à température ambiante pour induire l'expression d'ARNdb. Dans le cas de *cdc-42*, 1 mM d'IPTG a également été ajouté lors de la phase d'amplification de la bactérie contrôle et de celle contenant l'ARNi dirigée contre *cdc-42*, afin d'augmenter l'expression d'ARNdb. Des larves au stade L4 des génotypes sélectionnés ont été disposées sur ces bactéries, et leur descendance a été analysée par microscopie à fluorescence au stade L4 pour rechercher des défauts dans le nombre de canaux. Les clones permettant l'ARNi dirigée contre *cdc-42* et *unc-73* proviennent de la librairie d'ARNi Ahringer (Kamath et Ahringer, 2003), tandis que celui dirigé contre *ced-10* a été généré dans le cadre de ces travaux (pCB478).

2.6 Statistiques

Les analyses statistiques pour comparer la moyenne des différents génotypes ont été réalisées avec un test z sur Microsoft® 365 Excel. Le seuil de significativité des comparaisons multiples a été ajusté avec la correction de Bonferroni.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Note : Ces travaux représentent le fruit de plusieurs années de travail. J'ai généré la majorité des outils, des résultats et des analyses exposés dans cette thèse, mais je tiens à souligner la contribution d'autres étudiant.e.s du laboratoire de la Pre Claire Bénard qui ont aidé à faire avancer ce projet. Un tableau récapitulatif de la contribution détaillée de chaque étudiant.e/collaborateur.rice se trouve en annexe B (tableau B5).

Certains résultats qui ne concernent pas directement le sujet principal dans cette thèse, c'est-à-dire l'étude d'un mécanisme limitant le nombre d'extensions mises en place par une cellule polarisée, mais qui permettent de comprendre le contexte général sont regroupés en annexe A.

3.1 Des HSPG limitent le nombre d'extensions dans des cellules polarisées

Comme décrit précédemment (section 1.4.1), la synthèse des chaînes HS commence par l'ajout d'un lien tétrasaccharidique à des sites spécifiques le long de la partie extracellulaire des protéoglycanes. Après cela, la polymérisation des chaînes en tant que telle débute par l'ajout d'un résidu N-acétylglucosamine par l'enzyme RIB-2/EXTL-3, puis par l'ajout alternatif de résidus d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine par la co-polymérase, constituée des sous-unités RIB-1/EXT1 et RIB-2/EXTL-3. La perte, partielle ou totale, des enzymes RIB-1 et RIB-2 perturbe la polymérisation des chaînes HS spécifiquement (Blanchette *et al.*, 2017; Kitagawa *et al.*, 2007; Morio *et al.*, 2003). Les allèles nuls pour *rib-1* et *rib-2* menant à de la létalité embryonnaire (Kitagawa *et al.*, 2007; Morio *et al.*, 2003), l'unique moyen d'étudier le rôle des chaînes HS est via la déplétion partielle par l'ARNi ou encore l'utilisation d'allèles hypomorphes. Les allèles hypomorphes *rib-1(qm32)* et *rib-2(qm46)* ont déjà permis de montrer l'implication des chaînes HS dans la mise en place du système nerveux et de la morphologie de nombreuses cellules polarisées (Blanchette *et al.*, 2017). Ici, l'étude de ces allèles nous a permis d'observer un phénotype atypique : l'apparition d'extensions cellulaires surnuméraires dans des cellules polarisées.

Un premier exemple de ce phénotype est observable dans le neurone mécanosensoriel AVM, situé sublatéralement le long des parois musculaires ventrales droites du ver (Fig. 3.1A). AVM est un neurone unipolaire qui développe son neurite en direction de la corde nerveuse ventrale puis, une fois qu'il l'a atteinte, en direction antérieure vers l'anneau nerveux (Fig. 3.1A). Dans les mutants *rib-1(qm32)* et *rib-2(qm46)*, en plus des défauts de guidage déjà décrits (Blanchette *et al.*, 2017), nous avons observé des neurones AVM bipolaires. Dans ces cas-là, le neurone AVM présente un neurite supplémentaire développé depuis le soma,

avec une pénétrance de $10.8 \pm 2.3\%$ pour *rib-1(qm32)* et de $11.9 \pm 3.2\%$ pour *rib-2(qm46)* au stade de développement larvaire L4 (Fig. 3.1A).

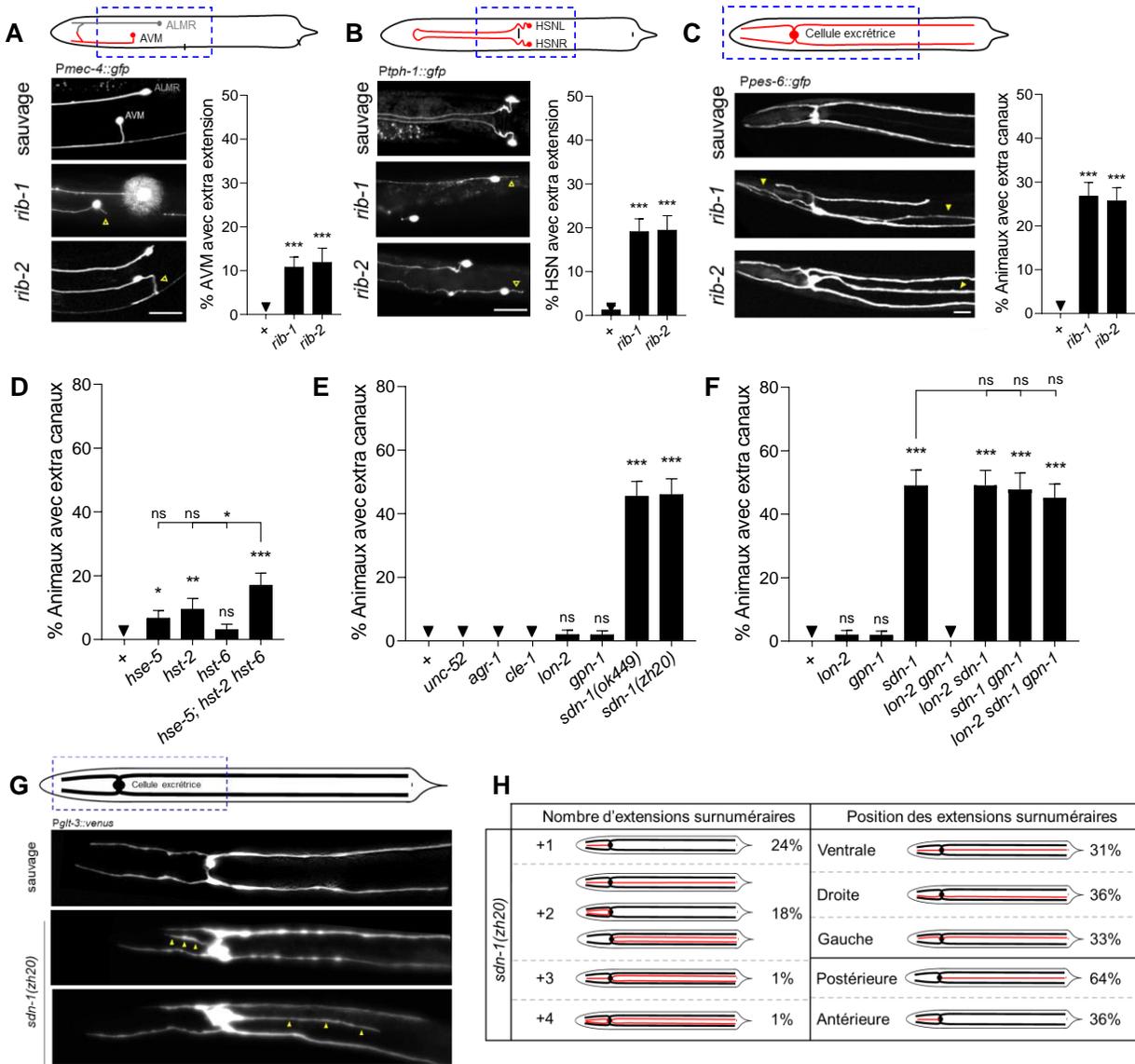


Figure 3.1. La perturbation des HSPG mène à des neurites et des extensions cellulaires surnuméraires

(A-C) Représentation schématique des neurones AVM (A), HSN (B) et de la cellule excrétrice (C) dans le ver. Les images par microscopie à fluorescence montrent une vue ventrale de larve au stade L4, excepté pour HSN dont les images représentent de jeunes adultes à cause de l'expression tardive du marqueur spécifique. Les marqueurs utilisés sont *Pmec-4::gfp* (neurones mécanosensoriels AVM et ALM), *Ptph-1::gfp* (neurones HSN) et *Ppes-6::gfp* (cellule excrétrice). Les animaux mutants pour les gènes *rib-1(qm32)* et *rib-2(qm36)* montrent des extensions surnuméraires dans leurs neurones AVM et HSN, ainsi que dans leur cellule excrétrice. Les flèches jaunes pointent vers ces neurites surnuméraires (pour les neurones, flèche vide) ou canaux surnuméraires (pour la cellule excrétrice, flèche pleine). Barre d'échelle 20 μ m. La quantification de la pénétrance du défaut de neurite/canal surnuméraire est affichée sur le côté. (D) Quantification de la pénétrance du défaut de canaux surnuméraires, aussi appelés extra canaux, chez les mutants des gènes codant les enzymes de modifications des chaînes HS. (E) Quantification du défaut de nombre de canaux chez les mutants des gènes codants pour le corps protéique des HSPG. (F) Quantification du défaut d'extra canaux chez les animaux doubles et triples mutants des gènes codants pour les corps protéiques des HSPG. (G) Représentation schématique de la position de la cellule excrétrice (visualisée à l'aide de *Pgl-3::venus*) dans le ver et

images de vue ventrale de vers sauvages et mutants pour *sdn-1(zh20)* au stade L4. Les têtes flèches jaunes pointent vers les canaux surnuméraires. (H) Représentation graphique et proportion du nombre et de la position des canaux surnuméraires (rouge). À noter que la position des canaux surnuméraires est symbolisée ici entre les canaux « normaux » pour faciliter la compréhension. Cependant, les canaux surnuméraires étant indifférenciables des autres canaux, il est impossible de connaître leur réelle localisation. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.001$ (test Z, les valeurs p ont été corrigées à l'aide de la correction de Bonferroni); ns, non significatif.

Un deuxième exemple est celui des neurones HSN qui contrôlent les muscles de la vulve chez les hermaphrodites. Le soma des neurones HSN se trouve de part et d'autre de la vulve (un à droite et un à gauche), légèrement postérieur à celle-ci. Les neurones HSN sont aussi unipolaires et développent un neurite qui migre ventralement vers la corde ventrale, puis vers l'anneau nerveux (Fig. 3.1B). Chez des animaux mutants, nous avons observé des neurones HSN bipolaires – formant un deuxième neurite depuis le soma – avec une pénétrance de $19.1 \pm 2.9\%$ pour *rib-1(qm32)* et de $19.4 \pm 3.4\%$ pour *rib-2(qm46)*, au stade de jeune adulte (Fig. 3.1B).

Un troisième exemple est celui de la cellule excrétrice. Dans les conditions sauvages, la cellule excrétrice développe invariablement quatre canaux le long de la paroi de l'animal (Fig. 3.1C). Chez les animaux mutants pour *rib-1(qm32)* et *rib-2(qm46)*, des extensions surnuméraires aux quatre canaux ont été observées avec une pénétrance de $26.8 \pm 3.1\%$ et de $25.7 \pm 3\%$ respectivement, au stade larvaire L4 (Fig. 3.1C). Deux marqueurs différents ont été utilisés pour étudier la morphologie de la cellule excrétrice : *Ppes-6::gfp* (Fig. 3.1C), puis *Pglt-3::venus* (le reste de cette étude, (Shaye et Greenwald, 2015)). Dans les conditions sauvages, aucun de ces deux marqueurs n'a induit de phénotype morphologique visible dans la cellule excrétrice. L'ensemble de ces résultats indique que la synthèse des chaînes HS, et probablement les HSPG sur lesquels elles sont polymérisées, intervient dans un mécanisme permettant à différents types de cellules polarisées, dont les neurones AVM et HSN ainsi que la cellule excrétrice, de réguler le nombre d'extensions qu'elles développent. À noter que dans les conditions sauvages, aucune extension surnuméraire n'a été observée pour aucun de ces trois types cellulaires. Nous appelons alors extension surnuméraire, extra extension ou extension supplémentaire toute extension qui est développée à partir du soma, qui supplémente le nombre d'extensions normalement trouvé dans la cellule d'intérêt en conditions sauvages, et dont la longueur dépasse celle du soma de la cellule d'étude. La pénétrance étant plus forte pour la cellule excrétrice, et ses mécanismes de développement étant fortement conservés avec ceux des neurones (section 1.5.4), nous avons décidé de poursuivre la caractérisation du mécanisme de contrôle du nombre d'extensions dans ce modèle cellulaire.

Nous nous sommes ensuite interrogés sur l'importance des modifications chimiques des chaînes HS, car celles-ci dictent leurs rôles dans certains contextes (Bulow *et al.*, 2008; Gysi *et al.*, 2013; Kinnunen, 2014; Saied-Santiago *et al.*, 2017). Nous avons étudié l'impact de mutations dans les gènes *hse-5*, *hst-2* et *hst-6* codant pour les enzymes responsables d'épimérisation ou de sulfatation des chaînes HS, puisque celles-ci ont un fort impact sur le développement du système nerveux du ver (section 1.3.4). Des analyses de données transcriptomiques à l'échelle unicellulaire pendant le développement embryonnaire de *C. elegans* (Packer *et al.*, 2019) permettent de montrer que les gènes codant pour ces enzymes sont exprimés dans la cellule excrétrice pendant son développement (Fig. A.1A). Les allèles nuls *hse-5(tm472)*, *hst-2(ok595)* et *hst-6(ok273)* mènent à la formation d'extensions surnuméraires, bien que non significativement pour l'allèle *hst-6(ok273)* (Fig. 3.1D), indiquant leur implication dans la régulation du nombre d'extensions dans la cellule excrétrice de *C. elegans*. Le triple mutant *hse-5(tm472); hst-2(ok595) hst-6(ok273)* ne montre pas d'augmentation significative de la pénétrance, comparé au mutant le plus pénétrant, *hst-2(ok595)* (Fig. 3.1D). On peut en déduire qu'il ne semble pas y avoir de synergie entre ces enzymes, et qu'elles agissent dans la même voie pour contrôler le nombre d'extensions dans la cellule excrétrice.

Certains HSPG peuvent aussi posséder des chaînes CS chez les mammifères (section 1.3.5). C'est pourquoi nous avons évalué l'importance des chaînes CS pour la régulation du nombre d'extensions dans cette cellule polarisée. SQV-5 est la polymérase responsable de la polymérisation des chaînes CS chez *C. elegans*, et est également exprimée dans la cellule excrétrice pendant le développement embryonnaire (Fig. A.1A). La perte totale de *sqv-5* conduit à l'absence de chaînes CS, qui se traduit par une inhibition développementale ainsi qu'une stérilité chez les vers adultes (Suzuki *et al.*, 2006). L'allèle hypomorphe *sqv-5(k172)* permet de surpasser cette stérilité, et nous avons pu observer des extensions surnuméraires dans la cellule excrétrice d'animaux portant cet allèle (Fig. A.1C). La synthèse des chaînes CS, soit sur des HSPG si c'est effectivement le cas chez *C. elegans*, ou bien sur des CSPG, semble alors également contribuer à la régulation du nombre d'extensions dans la cellule excrétrice. Toutefois, nous nous sommes concentrés dans ce travail sur l'étude des HSPG.

3.2 L'HSPG syndécan limite le nombre d'extensions dans la cellule excrétrice

Afin de déterminer quel.s HSPG sont spécifiquement impliqués dans le mécanisme régulant le nombre d'extensions dans la cellule excrétrice, nous avons testé les six gènes connus chez *C. elegans* pour coder pour les corps protéiques qui portent les chaînes HS. Tous les gènes classiques des HSPG, c'est-à-dire *unc-52/perlécan*, *cle-1/Col XVIII*, *lon-2/glypican*, *gpn-1/glypican* et *sdn-1/syndécan*, sont exprimés dans la cellule excrétrice lors de son développement, à l'exception de *agr-1/agrine* (Fig. A.1B). Pour rappel, la cellule excrétrice naît à environ 270 min de développement embryonnaire. Une lumière commence à se

former par fusion vésiculaire aux alentours de 400 min de développement. Les bras latéraux commencent à se former aux alentours de 460 min de développement, puis les quatre canaux se subdivisent vers le stade 2 repliements à environ 500 min de développement (Fig. 1.8C). Il est intéressant de noter que *sdn-1/syndécan* est en moyenne le gène le plus exprimé dans la cellule excrétrice durant le développement de celle-ci, et plus spécifiquement dans les périodes où les canaux se mettent en place (450-510 min et 510-580 min). Les HSPG pouvant néanmoins être libérés ou sécrétés dans la matrice afin d’agir à distance depuis les cellules environnantes de la cellule excrétrice, nous avons étudié les six gènes classiques. Les allèles spécifiques aux HSPG sécrétés dans la matrice, responsables d’une perte de fonction partielle (*cle-1(cg120)* et *unc-52(e444)*) ou totale (*agr-1(tm2051)*) ne provoquent pas la formation d’extensions surnuméraires dans la cellule excrétrice (Fig. 3.1E). Les allèles nuls pour les glypicans *lon-2(e678)* ou *gpn-1(tm595)* induisent des extensions surnuméraires avec une pénétrance très faible, qui n’est pas significativement différente des individus sauvages. En revanche, le mutant nul affectant le seul HSPG transmembranaire, *sdn-1(zh20)*, entraîne l’apparition d’extensions surnuméraires avec une forte pénétrance ($49 \pm 4.9\%$). Nous avons confirmé ces résultats avec un deuxième allèle, *sdn-1(ok449)*, qui montre une pénétrance d’extensions surnuméraires similaire, soit $45.5 \pm 4.7\%$ (Fig. 3.1E). L’allèle *sdn-1(ok449)* correspond à une délétion dans le cadre de lecture du gène *sdn-1* menant à une perte d’une partie du domaine extracellulaire de SDN-1 portant deux sites d’attachement des chaînes HS. La protéine SDN-1 issue de cet allèle peut être détectée sur des extraits totaux de vers à l’aide d’anticorps dirigés contre sa partie intracellulaire, mais pas avec des anticorps dirigés contre ses chaînes HS (Minniti *et al.*, 2004). Pour faciliter l’interprétation des résultats, nous avons choisi de ne poursuivre ces travaux qu’avec l’allèle nul *sdn-1(zh20)*, qui ne produit aucun transcrite *sdn-1* détectable (Rhiner *et al.*, 2005).

La déplétion de *lon-2* ou de *gpn-1* menant à de rares extensions surnuméraires, nous avons construit des doubles et triples mutants pour les allèles *lon-2(e678)*, *gpn-1(tm595)* et *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.1F). Le double mutant *lon-2(e678) gpn-1(tm595)* ne montre pas d’extensions surnuméraires, ce qui signifie que les deux gènes codant pour les glypicans n’agissent pas de manière redondante dans ce contexte. Les doubles mutants *lon-2(e678) sdn-1(zh20)* et *sdn-1(zh20) gpn-1(tm595)* ainsi que le triple mutant *lon-2(e678) sdn-1(zh20) gpn-1(tm595)* ne sont pas plus pénétrants que *sdn-1(zh20)* seul. On peut en déduire que l’HSPG SDN-1/syndécan régule le nombre d’extensions dans la cellule excrétrice de manière centrale, et que les HSPG LON-2/glypican et GPN-1/glypican n’ont ici pas de fonction redondante avec SDN-1.

Chez les individus avec l’allèle *sdn-1(zh20)*, nous avons observé dans la majorité des cas une seule extension surnuméraire par animal. Cependant, dans certains cas, deux, trois et jusqu’à un maximum de quatre extensions surnuméraires, soit une cellule excrétrice avec huit extensions au lieu de quatre, ont pu être

observées chez les animaux mutants (Fig. 3.1H). Les extensions surnuméraires observées dans *sdn-1(zh20)* sont morphologiquement très similaires à celles retrouvées dans les mutants *rib-1(qm32)* et *rib-2(qm46)*, mais aussi au set des quatre canaux normalement trouvés dans la cellule excrétrice d'animaux sauvages (Fig. 3.1G). Dans les conditions sauvages, la cellule excrétrice développe quatre canaux le long des parois du ver, avec un canal par loge (antérieure droite/antérieure gauche/postérieure droite/postérieure gauche). Nous avons donc présumé les extensions surnuméraires comme étant celles qui supplémentent les canaux normalement trouvés dans chaque loge du ver, ou bien celles ayant une position ectopique, c'est-à-dire en dehors de ces loges. Suivant ces critères, nous avons observé que les extensions surnuméraires des individus portant l'allèle *sdn-1(zh20)* peuvent être localisées dans la loge à droite, à gauche ou dans une position ventrale, sans tendance particulière pour un côté (Fig. 3.1H). À noter qu'aucune extension en position complètement dorsale n'a clairement été observée dans les animaux mutants pour *sdn-1(zh20)*. Les extensions surnuméraires peuvent aussi être orientées vers l'antérieur ou le postérieur, avec une légère tendance vers ce dernier (Fig. 3.1H).

En plus des extensions surnuméraires, nous avons relevé d'autres défauts dans la cellule excrétrice des animaux mutants pour *sdn-1*. Premièrement, des canaux courts, par rapport aux canaux dans les conditions sauvages au même stade de développement, ont été observés avec une pénétrance d'environ 40%. Ce défaut est assez fréquent dans la cellule excrétrice et a été relié à un problème de croissance des canaux lors du développement de la cellule (Abrams et Nance, 2021; Arena *et al.*, 2022; Hedgecock *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 2006; Lant *et al.*, 2015; Shaye et Soto, 2021; Sundaram et Buechner, 2016). Deuxièmement, des défauts de guidage des canaux mènent au développement anormal d'un canal, dans une loge différente de celle où il devrait se trouver. Par exemple, un animal dont les quatre canaux sont du côté droit (deux en antérieur et deux en postérieur) est catégorisé comme ayant un défaut de guidage de ses canaux (Fig. A.1D, panneau du bas). Différentes configurations de canaux mal guidés ont été trouvées, par exemple trois canaux antérieurs et un canal postérieur ou inversement, menant à une pénétrance du phénomène de défaut de guidage des canaux d'environ 17% chez les mutants *sdn-1(zh20)*. À noter que les défauts de guidage et les défauts d'extensions surnuméraires ont parfois été retrouvés de manière concomitante. Finalement, un autre défaut dans la cellule excrétrice a été observé chez les mutants de *sdn-1* : les canaux manquants (Fig. A.1D, panneau du milieu). Le phénotype de canal manquant comprend tout animal possédant une cellule excrétrice dont le nombre de canaux est inférieur à quatre. Le défaut de canaux manquants représentant aussi un défaut dans le nombre de projections mises en place par une cellule polarisée, il m'est paru pertinent d'en parler dans cette thèse. Cependant, les résultats obtenus au cours de cette étude pointent vers une indépendance au moins partielle des mécanismes régulant les défauts de canaux manquants et de canaux surnuméraires (chapitre 4). De plus, le mécanisme inhibant la formation d'extensions surnuméraires n'ayant pas encore

été déchiffré, il reste l'objet d'étude principal de cette thèse. Pour ces raisons et pour plus de clarté, les données concernant le phénotype de canaux manquants sont affichées en figures supplémentaires dans l'annexe A, sont décrites tout au long de cette section *résultats*, en parallèle du phénotype de canaux surnuméraires, mais sont discutées dans une section à part dans la partie *discussion*. Les animaux mutants pour les deux allèles *sdn-1(ok449)* et *sdn-1(zh20)* montrent ce phénotype de manière significative (Fig. A.1E). De plus, l'analyse des doubles mutants et du triple mutant entre les glypicans et syndécan ne montre aucune augmentation dans la pénétrance du défaut de canaux manquants, et donc aucune redondance dans la fonction de ces HSPG dans les mécanismes garantissant la formation des quatre canaux excréteurs (Fig. A.1F).

Pour conclure, l'HSPG SDN-1/syndécan est central dans la régulation du nombre d'extensions développées par la cellule excrétrice, et intervient aussi dans la croissance et le guidage des canaux. L'altération des voies développementales régulant la migration et les extensions cellulaires résulte généralement en des extensions/neurites trop courtes et/ou mal guidées. Nous nous sommes donc penchés sur l'étude du défaut inhabituel d'extensions surnuméraires, qui offre la possibilité de découvrir un nouveau mécanisme de développement cellulaire.

3.3 Syndécan contrôle le nombre de canaux lors du développement de la cellule excrétrice

Afin de mieux caractériser ces extensions surnuméraires, nous avons défini quand la cellule excrétrice des mutants *sdn-1(zh20)* les développe. Chez le type sauvage, les canaux commencent à se former à partir des bras latéraux de la cellule excrétrice entre les stades 2 et 3 repliements du développement embryonnaire (Fig. 1.8C). Le marqueur *Pglt-3::venus* étant exprimé très tôt lors du développement de la cellule excrétrice, nous pouvons observer la présence des canaux chez les embryons sauvages à partir du stade 3 repliements (Fig. 3.2A). Chez les mutants *sdn-1(zh20)*, les extensions surnuméraires sont déjà visibles au stade 2.5 et 3 repliements du développement embryonnaire (Fig. 3.2A). De plus, ni la pénétrance du défaut d'extensions surnuméraires (Fig. 3.2B), ni celle du défaut de canaux manquants (Fig. A.2A), ne varient entre les stades de développement larvaire L1 et L4 chez les mutants *sdn-1(zh20)*. Ces résultats suggèrent que SDN-1/syndécan agit lors du développement de la cellule excrétrice afin de réguler le nombre de canaux mis en place lors de la morphogenèse de cette cellule polarisée.

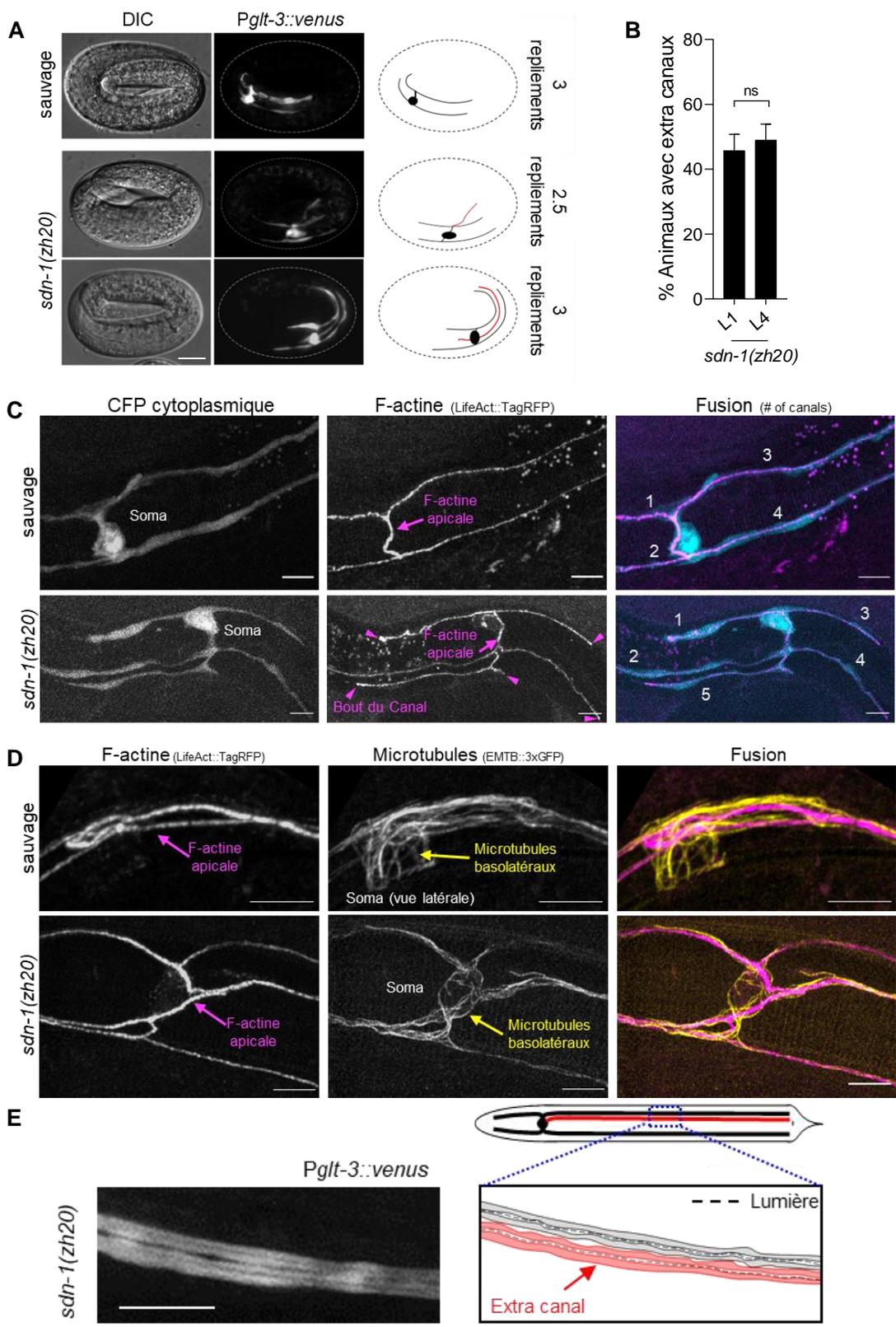


Figure 3.2. Les canaux surnuméraires dans la cellule excrétrice des mutants pour *sdn-1/syndécan* se développent pendant l'embryogenèse

(A) Images de microscopie à fluorescence d'un embryon sauvage au stade 3 repliements et d'embryons mutants pour *sdn-1(zh20)* au stade 2.5 et 3 repliements. La cellule excrétrice est visualisée avec le marqueur *Pglt-3::venus*. Les canaux surnuméraires se développent en même temps que les autres canaux lors de l'embryogenèse. Les panneaux de droite schématisent la cellule excrétrice avec le canal présumé comme surnuméraire en rouge. Barre d'échelle 10 μm . (B) Quantification du défaut de canaux surnuméraires aux stades larvaires L1 et L4 dans les mutants *sdn-1(zh20)*. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. ns, non significatif. (C-D) Vue ventrale (sauf pour le ver sauvage en D où la vue est latérale) de vers sauvages et mutants pour *sdn-1(zh20)* au stade L1. La visualisation dans la cellule excrétrice a été faite avec les marqueurs CFP (cytoplasme en cyan, C), LifeAct::TagRFP (F-actine en magenta, C-D) et EMTB::3xGFP (microtubules en jaune, D) tous exprimés sous le promoteur *Pglt-3*. Les flèches magenta pointent l'extrémité des canaux et les numérations chiffrent les canaux présents dans le ver (D). Barre d'échelle 5 μm . (E) Vue ventrale de deux canaux visualisés avec le marqueur *Pglt-3::venus* au stade larvaire L4. Un des deux canaux est présumé comme étant le canal surnuméraire; les deux canaux montrent la présence d'une lumière (zone plus faible en signal au milieu du canal). Représentation schématique de la région magnifiée (panneau de droite).

Pour savoir si ces extensions surnuméraires ne sont que des extensions cytoplasmiques sans spécificités structurelles, ou bien si elles constituent de réels canaux similaires à ceux formés normalement par la cellule excrétrice, nous avons étudié l'organisation du cytosquelette chez les vers sauvages et mutants pour *sdn-1*. La F-actine s'organise majoritairement au niveau du réseau terminal sous la membrane apicale. Chez les vers sauvages, la F-actine, visualisée à l'aide du marqueur LifeAct::TagRFP exprimé uniquement dans la cellule excrétrice, est présente au niveau de la lumière unique qui part du soma, longe les bras latéraux puis les quatre canaux de la cellule (Fig. 3.2C). Chez les mutants *sdn-1(zh20)*, la F-actine est organisée de manière très similaire entre chaque canal, même les canaux surnuméraires, mais aussi en comparaison avec les canaux des individus sauvages. Le signal de la F-actine est donc localisé au niveau de la membrane apicale dans tous les canaux, aussi bien chez les individus sauvages que mutants pour *sdn-1* (Fig. 3.2C). L'étude de l'organisation des microtubules a par ailleurs montré la similitude entre les extensions surnuméraires des animaux mutants *sdn-1(zh20)* et les canaux des animaux sauvages (Fig. 3.2D). Les microtubules marqués (EMTB::3xGFP) dans la cellule excrétrice s'organisent le long des canaux et dans le soma avec une position basolatérale. Dans tous les canaux des animaux portant l'allèle *sdn-1(zh20)*, les MT sont pareillement organisés au niveau basolatéral dans la cellule excrétrice (Fig. 3.2D). De plus, toutes les extensions des vers mutants *sdn-1(zh20)*, y compris les surnuméraires, possèdent une zone dépourvue de cytoplasme (Fig. 3.2E) qui est entourée d'un réseau terminal de F-actine (Fig. 3.2C), ce qui est caractéristique de la lumière des canaux de la cellule excrétrice. La fonction principale de cette cellule étant l'osmorégulation de l'organisme, la présence d'une lumière dans les extensions surnuméraires indique une potentielle fonction de celles-ci. Ensemble, ces résultats montrent que les extensions surnuméraires des animaux mutants pour *sdn-1* se développent en même temps que les canaux « normaux », qu'elles sont indifférenciables des autres canaux au point de vue de leur organisation en F-actine et en MT, et qu'elles

possèdent une lumière caractéristique de la fonction excrétrice. Sur la base de ces observations, nous appelons alors les extensions surnuméraires des canaux surnuméraires.

3.4 Syndécan agit de manière cellule autonome dans le contrôle du nombre de canaux

Lors de son développement, la cellule excrétrice est en contact avec de nombreux tissus. À environ 500 min de développement embryonnaire (Fig. 3.3A), moment auquel les canaux commencent à se subdiviser depuis les bras latéraux, la cellule excrétrice est en contact avec le pharynx, de nombreux neurones, et à proximité des parois musculaires du ver. Au même moment, certaines cellules gliales comme les cellules CEPsh (pour « cephalic sheath cell ») se mettent en place proche du bulbe terminal du pharynx, non loin de la cellule excrétrice, afin d'initier la mise en place de l'anneau nerveux (Rapti *et al.*, 2017). Lorsque les canaux sont formés, leur croissance se fait sur les côtés du ver, proche des cellules latérales de l'épiderme, aussi appelées cellules de couture. Pour savoir d'où syndécan agit pour réguler le nombre de canaux dans la cellule excrétrice, nous avons généré des animaux mutants *sdn-1(zh20)* qui expriment de manière transgénique des copies sauvages *sdn-1(+)* dirigés par des promoteurs tissu-spécifiques. De cette manière, nous pouvons évaluer depuis quels tissus l'expression de copies sauvages *sdn-1(+)* permet de supprimer le phénotype de canaux surnuméraires retrouvé dans les mutants nuls pour *sdn-1*, que l'on appelle aussi essai de sauvetage. Tout d'abord, l'expression de copies sauvages *sdn-1(+)* sous son propre promoteur dans *opIs170* (intégration de nombreuses copies du construit *Psdn-1::sdn-1::gfp*) (Rhiner *et al.*, 2005) entraîne un fort sauvetage du défaut de canaux surnuméraires chez les mutants *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.3B). Cela confirme que la perte de *sdn-1* est responsable du défaut de canaux surnuméraires, et que ce type de défaut peut être supprimé par la réexpression de copies sauvages *sdn-1(+)*. Malheureusement, cette intégration ne permet pas de visualiser la localisation de *sdn-1::gfp* dans la cellule excrétrice, puisque les niveaux y sont trop faibles, comparés aux tissus avoisinants (principalement les neurones et l'hypoderme). L'expression de *sdn-1(+)* dirigée par des promoteurs hétérologues dans les tissus environnants de la cellule excrétrice comme les cellules de couture, les neurones, les muscles, le pharynx, ou encore dans les cellules gliales CEPsh n'a pas induit de sauvetage du phénotype (Fig. 3.3B). Étant donné que l'expression de *sdn-1(+)* dans les neurones (*Prgef-1*) entraîne une très faible tendance (non significative) à diminuer la pénétrance des canaux surnuméraires, nous avons testé un autre promoteur pan neuronal (*Prab-3*), ainsi qu'un promoteur spécifique des neurones mécanosensoriels (*Pmec-7*) où *sdn-1* est connu pour être exprimé et agir de manière cellule autonome (Blanchette *et al.*, 2015). L'expression transgénique de *sdn-1(+)* sous ces deux promoteurs hétérologues spécifiques des neurones n'induit pas non plus de sauvetage du phénotype de canaux surnuméraires chez les mutants *sdn-1(zh20)* infirmant l'hypothèse selon laquelle *sdn-1* agirait depuis ce type cellulaire pour réguler le nombre de canaux dans la cellule excrétrice (Fig. 3.3B). L'expression de copies sauvages *sdn-1(+)* sous le promoteur hétérologue de la cellule excrétrice (*Pglt-3*) entraîne un fort

sauvetage du phénotype de canaux surnuméraires (Fig. 3.3B), similaire au sauvetage obtenu par l'expression des copies sauvages *sdn-1(+)* sous le promoteur de *sdn-1* dans *opIs170*. Ces résultats indiquent que SDN-1/syndécan agit de manière cellule autonome, c'est-à-dire depuis la cellule excrétrice dans laquelle il est exprimé, pour réguler le nombre d'extensions polarisées. Les neurites des neurones CAN sont spatialement et physiologiquement proches des canaux de la cellule excrétrice (Hedgecock *et al.*, 1987). Pour tester l'implication des neurones CAN dans le contrôle du nombre de canaux mis en place, nous avons utilisé l'allèle *unc-39(e257)* qui affecte fortement leur migration cellulaire ainsi que le guidage de leurs neurites (Yanowitz *et al.*, 2004). Les mutants *unc-39(e257)* ne montrent pas de défaut de canaux surnuméraires (Fig. A.2B), signifiant que la position ou le développement des neurones CAN n'influence pas le nombre de canaux dans la cellule excrétrice.

Afin de mieux comprendre le rôle de *sdn-1* dans la cellule excrétrice, nous avons testé différentes concentrations du construit *Pglt-3::sdn-1(+)* dans le mix d'injection utilisé pour générer les animaux transgéniques. Une plus grande concentration du plasmide augmentera le nombre de copies se trouvant dans la structure extrachromosomique à partir de laquelle le transgène est exprimé (Mello *et al.*, 1991), et donc possiblement les niveaux d'expression de *sdn-1(+)*. L'injection de *Pglt-3::sdn-1(+)* à faible concentration (0.2 ng/ μ L) permet de sauver le phénotype de canaux surnuméraires dans les mutants *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.3B), sans pour autant augmenter la pénétrance du phénotype de canaux manquants (Fig. A.2D). En revanche, l'injection de *Pglt-3::sdn-1(+)* à forte concentration (25 ng/ μ L) augmente nettement la pénétrance des canaux manquants chez les mutants *sdn-1(zh20)*, atteignant jusqu'à $60.8 \pm 6.8\%$ pour la lignée #3 (Fig. A.2D), et résulte en des canaux très courts par rapport à la normale (Fig. A.2C). Ces phénotypes sont couramment accompagnés par la présence de larges vacuoles dans le soma ou dans les canaux (Fig. A.2C), synonyme de problèmes dans la croissance ou le maintien de la membrane apicale (Buechner *et al.*, 1999; Shaye et Soto, 2021). À noter que chez le type sauvage, l'injection du transgène *Pglt-3::sdn-1(+)* à faible concentration (0.2 ng/ μ L) n'entraîne ni canaux surnuméraires (Fig. A.2E) ni canaux manquants (Fig. A.2F) dans la cellule excrétrice. À l'inverse, le transfert de la structure extrachromosomique produit par l'injection de *Pglt-3::sdn-1(+)* à forte concentration (25 ng/ μ L), dans un fond génétique sauvage, entraîne le défaut de canaux manquants (Fig. A.2F). Ces résultats supportent la notion qu'à une concentration de 0.2 ng/ μ L dans le mix d'injection, le construit *Pglt-3::sdn-1(+)* permet l'expression transgénique de *sdn-1(+)* à des niveaux presque physiologiques. À l'inverse, la surexpression de *sdn-1(+)* suite à l'injection du même construit à forte concentration semble inhiber la formation et la croissance des canaux excréteurs, potentiellement en altérant la formation de la membrane apicale.

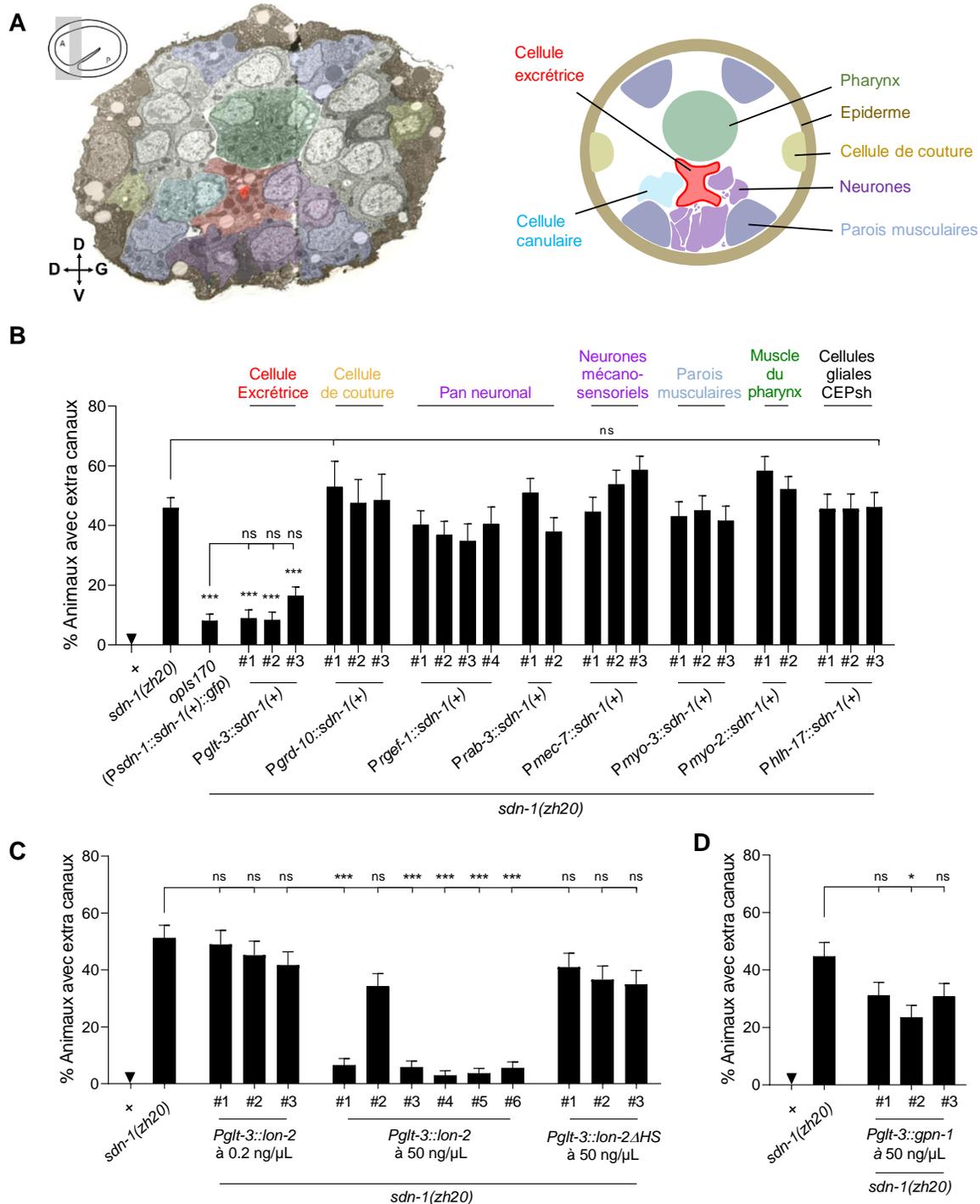


Figure 3.3. *sdn-1*/syndécan contrôle de manière cellule autonome le nombre de canaux dans la cellule excrétrice (A) Vue transversale (panneau de gauche) par microscopie électronique à transmission d'un embryon âgé d'environ 500 minutes de développement (Durbin; Durbin *et al.*, 1987). A= antérieur, P= postérieur, D/V = dorsal/ventral, D/G = droite/gauche. Représentation schématique (panneau de droite) de la coupe transversale. La cellule excrétrice (rouge) est entourée de nombreux tissus comme la cellule canalaire (cyan), des neurones (violet), les parois musculaires (bleu), les cellules de couture (beige), ou encore l'épiderme (brun). (B) Quantification du défaut de canaux surnuméraires

dans des expériences de sauvetage par la réexpression de copies sauvages de *sdn-1(+)* induites par des promoteurs hétérologues tissus spécifiques dans des animaux mutants pour *sdn-1(zh20)*. *opIs170* est une intégration d'une structure contenant de nombreuses copies du construit *Psdn-1::sdn-1::gfp*. (C) Quantification dans des expériences de suppression des défauts de canaux surnuméraires chez les animaux mutants *sdn-1(zh20)* exprimant des copies sauvages de *lon-2(+)* suite à l'injection du construit *Pglt-3::sdn-1* à faible (0.2 ng/μL) ou forte (50 ng/μL) concentration, ou une version recombinante de *lon-2* dont les sites d'attachement des chaînes HS ont été modifiées (*lon-2ΔHS*, Blanchette et al 2015), dans la cellule excrétrice (*Pglt-3*). (D) Quantification dans des expériences de suppression des défauts de canaux surnuméraires chez les animaux mutants pour *sdn-1(zh20)* exprimant des copies sauvages de *gpn-1(+)* dans la cellule excrétrice (*Pglt-3*). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.001$ (test Z, les valeurs p ont été corrigées à l'aide de la correction de Bonferroni); ns, non significatif.

3.5 L'HSPG LON-2/glypican peut partiellement compenser SDN-1/syndécan

Afin d'analyser si le sauvetage des canaux surnuméraires chez les animaux mutants pour *sdn-1(zh20)* est spécifique de l'expression de copies sauvages de *sdn-1(+)* depuis la cellule excrétrice, nous avons essayé d'exprimer un autre HSPG, *lon-2/glypican*. L'injection du construit *Pglt-3::lon-2(+)*, capable d'exprimer des copies sauvages *lon-2(+)* dans la cellule excrétrice, à faible concentration (0.2 n/μL) ne permet pas de supprimer les défauts de canaux surnuméraires dans les animaux mutants *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.3C). Néanmoins, l'injection de ce construit à une concentration de 50 ng/μL supprime parfaitement le phénotype de canaux surnuméraires des mutants *sdn-1(zh20)* dans cinq des six lignées générées (Fig. 3.3C), et ce sans augmenter la pénétrance du phénotype de canaux manquants (Fig. A.2I). Comme contrôle, nous avons transféré une des lignées sauvant le mieux le phénotype de canaux surnuméraires, la lignée #5, dans un fond génétique sauvage et nous avons observé que dans ces conditions, le transgène *Pglt-3::lon-2(+)* n'induit pas de canaux surnuméraires (Fig. A.2G) mais quelques canaux manquants (Fig. A.2H). Les canaux manquants générés par le transgène *Pglt-3::lon-2(+)* injecté à forte concentration ne supplément pas les canaux manquants induits par la perte de *sdn-1*, signifiant que dans le mécanisme assurant la formation de quatre canaux excréteurs, la surexpression de *lon-2(+)* perturbe une voie de signalisation où *sdn-1* est impliqué. Dans l'ensemble, ces résultats pointent vers une fonction de LON-2 qui, à forte concentration, pourrait partiellement compenser l'absence de SDN-1 pour réguler le nombre de canaux surnuméraires. Afin de mieux comprendre comment les copies sauvages *lon-2(+)* peuvent sauver le phénotype de canaux surnuméraires dans les mutants *sdn-1(zh20)*, nous nous sommes interrogés sur le rôle des chaînes HS de LON-2 dans ce contexte. Le transgène *Pglt-3::lon-2ΔHS* code pour un variant de l'ADN complémentaire de *lon-2*, dont les trois sérines impliquées dans l'attachement des chaînes HS ont été mutées en alanines, et permet donc l'expression de LON-2 dépourvue de ses chaînes HS (Blanchette *et al.*, 2015). L'injection du construit *Pglt-3::lon-2ΔHS* à une concentration de 50 ng/μL ne sauve plus le phénotype de canaux surnuméraires chez les mutants *sdn-1(zh20)*, signifiant que les chaînes HS de LON-2 pourraient jouer un

rôle significatif dans la capacité de LON-2 à supprimer le phénotype de canaux surnuméraires en absence de SDN-1.

À la même concentration (50 ng/μL), l'expression transgénique de copies sauvages de l'autre gène codant pour un glypican, *gpn-1(+)* n'induit qu'un sauvetage partiel du défaut de canaux surnuméraires des mutants *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.3D), sans affecter significativement la pénétrance du défaut de canaux manquants (Fig. A.2J). On peut alors penser que, à forte concentration, LON-2 paraît plus apte à compenser la perte de SDN-1 pour réguler les canaux surnuméraires que GPN-1.

3.6 Besoins fonctionnels des domaines protéiques de SDN-1/syndécan dans la régulation du nombre de canaux de la cellule excrétrice

Peu de domaines protéiques de SDN-1/syndécan ont été clairement identifiés chez *C. elegans*, mais la fonction relative de certains domaines chez les versions humaines SDC-1 à SDC-4 a été élucidée. Par homologie, nous avons étudié la fonction potentielle de certains des domaines qui semblent conservés chez SDN-1/syndécan de *C. elegans*. Pour cela, nous nous sommes servis du fait que l'expression transgénique de copies sauvages *sdn-1(+)* dans la cellule excrétrice peut sauver le phénotype de canaux surnuméraires chez les mutants *sdn-1(zh20)*. Pour commencer, nous nous sommes questionnés sur le rôle des chaînes HS spécifiquement sur SDN-1/syndécan dans ce mécanisme, étant donné que la perturbation de la synthèse des chaînes HS dans les mutants de *rib-1* et *rib-2* entraîne la formation de canaux surnuméraires. Comme pour *lon-2ΔHS*, nous avons généré une version recombinante de l'ADNc de *sdn-1*, dont chaque sérine des trois sites d'attachement des chaînes HS (S71, S86 et S214, Fig. 3.4A) a été substituée par une alanine (*sdn-1ΔHS*), et qui est considéré comme dépourvue de chaînes HS (Saied-Santiago et Bulow, 2018; Zhou *et al.*, 2021). L'expression du transgène *Pglt-3::sdn-1ΔHS* dans la cellule excrétrice ne sauve pas de manière significative le phénotype de canaux surnuméraires chez les mutants *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.4B). La substitution des sites d'attachement des chaînes HS s'avère alors affecter la capacité des structures extrachromosomiques contenant de nombreuses copies de ce transgène à pouvoir sauver la fonction de *sdn-1* dans les mutants *sdn-1(zh20)*. Les allèles *sdn-1(kr388)* [*sdn-1::S71A,S86A::DEGRON::mNG*] et *sdn-1(kr475)* [*sdn-1::S71A,S86A,214A::DEGRON::mNG*] (gentiment partagés par l'équipe du professeur J-L Bessereau) ont été construits par la modification des deux premiers sites (*kr388*) ou des trois sites (*kr475*) d'attachement des chaînes HS, de sérine à alanine, directement dans le locus génomique endogène de *sdn-1* par la technique CRISPR/Cas9 (Zhou *et al.*, 2021). L'allèle *sdn-1(kr388)* induit le défaut de canaux surnuméraires avec une plus faible pénétrance que l'allèle nul *sdn-1(zh20)*, suggérant que les chaînes HS sur les deux premiers sites jouent un rôle partiel dans la fonction de SDN-1 sur la limitation du nombre de canaux excréteurs (Fig. 3.4B). De manière surprenante, l'allèle *sdn-1(kr475)* induit le défaut de canaux

surnuméraires avec une très faible pénétrance, qui n'est pas significativement différente de celle retrouvée chez les individus sauvages (Fig. 3.4B). Ces résultats sont donc en désaccord sur l'importance des chaînes HS dans la fonction de SDN-1/syndécan sur la régulation du nombre de canaux dans la cellule excrétrice. Bien qu'une tendance vers un rôle au moins partiellement important des chaînes HS dans ce contexte se dégage des deux premiers résultats, nous discutons dans le chapitre 4 des potentielles causes responsables des divergences observées ici.

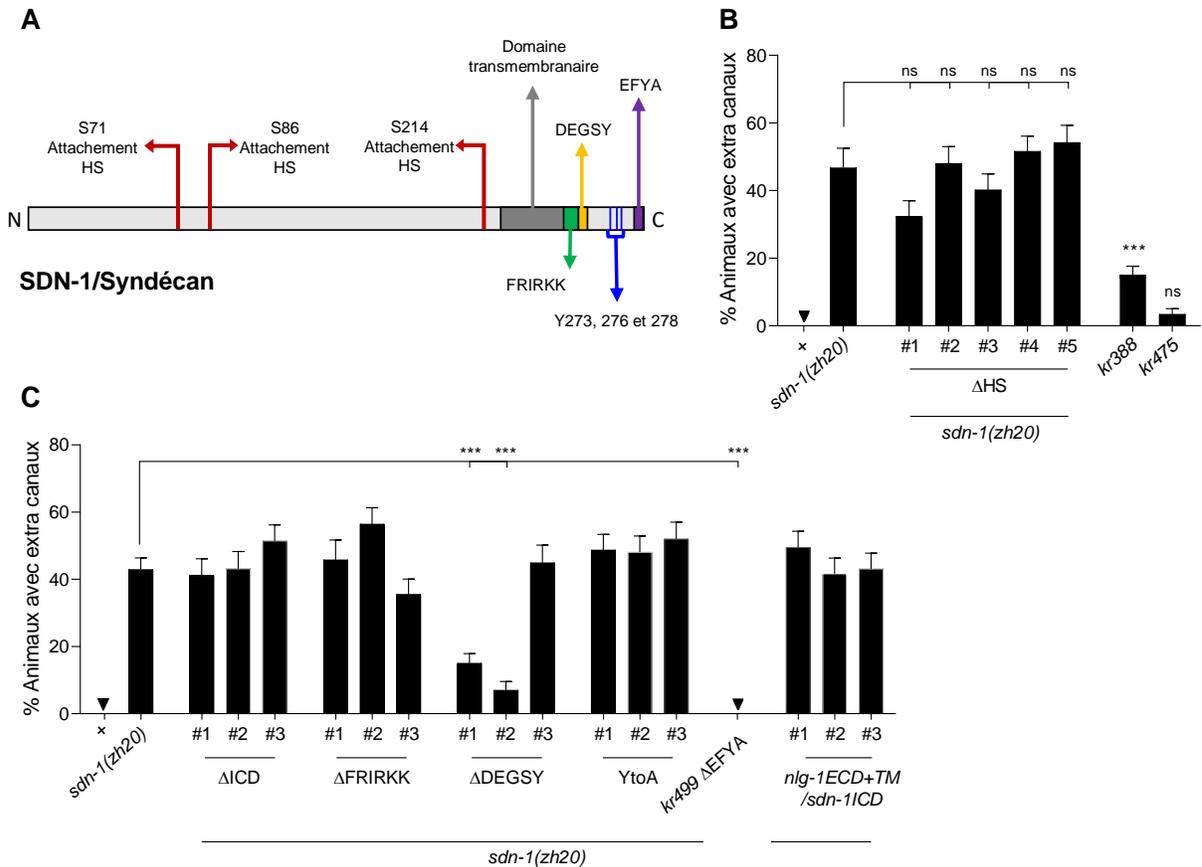


Figure 3.4. Dépendance des domaines protéiques de SDN-1/syndécan pour sa fonction de contrôle du nombre de canaux

(A) Représentation schématique des domaines protéiques de SDN-1/syndécan. Attachement HS (rouge) indique les sites d'attachement des liens tétrasaccharidiques sur lesquels seront ensuite synthétisées les chaînes HS. Les domaines FRIRKK (vert), DEGSY (jaune), les trois tyrosines (Y273, 276 et 278, bleu) ainsi que le domaine EFYA (violet) se trouvent dans la partie intracellulaire de SDN-1. (B) Quantification du défaut de canaux surnuméraires chez des animaux mutants pour *sdn-1(zh20)* exprimant une version recombinante de l'ADNc de *sdn-1* pour laquelle les trois sites d'attachement des chaînes HS (S71, S86 et S214) ont été mutés de sérine en alanine. Les allèles *sdn-1(kr388)* [*sdn-1(S71A,S86A)*] et *sdn-1(kr475)* [*sdn-1(S71A,S86S,S214A)*] ont été créés par édition des deux premiers sites (pour *kr388*) ou des trois sites (pour *kr475*) d'attachement des chaînes HS, de sérine à alanine, directement dans le locus génomique de *sdn-1* par CRISPR/Cas9 (Zhou *et al.*, 2021). (C) Quantification du défaut de canaux surnuméraires dans des expériences de sauvetage par l'expression (sous *Pglt-3*) de versions recombinantes de *sdn-1* manquant des domaines spécifiques chez des animaux mutants pour *sdn-1(zh20)*. ΔICD = perte du domaine intracellulaire, ΔFRIRKK = perte du domaine FRIRKK, ΔDEGSY = perte du domaine DEGSY, YtoA = mutation des tyrosines Y273, 276 et 278 en alanine. Le construit *Pglt-3::nlg-1ECD+TM::sdn-1ICD* permet d'exprimer une protéine de fusion entre les parties extracellulaire et transmembranaire de la neurologine/NLG-1 et du domaine intracellulaire de SDN-1/syndécan. L'allèle *sdn-1(kr499)* a été créé par la déplétion du motif EFYA (ΔEFYA) directement dans le locus

génomique de *sdn-1* par CRISPR/Cas9 (Zhou *et al.*, 2021). Tous les construits exprimant une version recombinante de *sdn-1* ont été injectés à 0.2 ng/μL. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : *** $p \leq 0.001$ (test Z, les valeurs p ont été corrigées à l'aide de la correction de Bonferroni); ns, non significatif.

Syndécan étant le seul HSPG transmembranaire, nous nous sommes ensuite interrogés sur l'importance de la partie intracellulaire de SDN-1. Le transgène *Pglt-3::sdn-1ΔICD* code pour un variant de SDN-1 qui est dépourvu de sa région intracellulaire et qui ne contient donc que sa partie extracellulaire et son domaine transmembranaire. Contrairement aux copies sauvages *sdn-1(+)*, l'expression transgénique de *sdn-1ΔICD* ne permet pas de sauver le phénotype de canaux surnuméraires chez les mutants *sdn-1*. Ces résultats indiquent la probable importance du domaine intracellulaire de SDN-1 dans sa capacité à réguler le nombre de canaux excréteurs. Comme indiqué précédemment (section 1.4.3.1), la région intracellulaire des syndécans se divise en deux régions hautement conservées (régions C1 et C2), flanquant une région plus variable (région V) (Fig. 1.7A). Chez l'humain, on retrouve dans la région intracellulaire des syndécans des motifs conservés qui sont reliés à des fonctions précises. Ces motifs conservés chez les humains comprennent YRMKKK et DEGSY dans la région C1, l'unique tyrosine de la région V, et le motif EFYA de la région C2. Chez *C. elegans*, on retrouve des motifs avec une forte homologie. En effet, on retrouve le motif FRIRKK, qui semble plus proche de la variation YRMRKK retrouvée dans la séquence de SDC-2, et le motif DEGSY dans la région C1, trois tyrosines dans la région V, ainsi que le motif terminal EFYA dans la région C2 (Fig. 1.7B).

Afin d'évaluer la contribution de ces motifs dans la capacité du transgène exprimant *sdn-1* à sauver le phénotype de canaux surnuméraires chez les animaux mutant pour *sdn-1*, nous avons généré des variants de *sdn-1* qui manquaient certains de ces domaines (Δ) ou alors avec des variations de certains acides aminés (YtoA). Le transgène *Pglt-3::sdn-1ΔFRIRKK* codant pour une version recombinante de SDN-1 sans son domaine FRIRKK, exprimé spécifiquement dans la cellule excrétrice, n'est pas capable de sauver le phénotype de canaux surnuméraires, signifiant la potentielle importance du motif FRIRKK de SDN-1/syndécan dans la régulation du nombre d'extensions surnuméraires (Fig. 3.4C). Pour rappel, le motif RMKKK pourrait être nécessaire à l'endocytose et à la localisation nucléaire de SDC-1/syndécan dans différents contextes (Chen et Williams, 2013; Zong *et al.*, 2009).

À l'inverse, l'expression de variant de *sdn-1* dépourvu du domaine DEGSY, *Pglt-3::sdn-1ΔDEGSY*, sauve le phénotype de canaux surnuméraires dans les mutants pour *sdn-1(zh20)* dans deux des trois lignées générées (Fig. 3.4C). Ce motif permet l'interaction de l'ézrine avec SDC-2 et donc avec le cytosquelette (Granés *et al.*, 2003). De plus, la tyrosine de ce motif est également importante pour le recyclage de certaines

sous-unités d'intégrines (Morgan *et al.*, 2013). Si ces fonctions sont conservées chez *C. elegans*, SDN-1 pourrait ne pas avoir directement besoin d'interagir avec l'ézrine ni de réguler le recyclage des intégrines pour pouvoir contrôler le nombre de canaux dans la cellule excrétrice.

La région V des différents syndécans chez l'être humain et de l'unique syndécan chez *C. elegans* ont très peu d'homologie de séquence. La tyrosine présente dans cette région chez SDC-4 est une cible potentielle de phosphorylation et importante dans l'interaction de sa partie intracellulaire avec la PKC α pour réguler l'activation de Rho GTPases dans divers contextes (Bass *et al.*, 2007; Dovas *et al.*, 2006). Cette tyrosine figure être un des acides aminés les mieux conservés entre les différents syndécans chez l'humain (Fig. 1.7B). La région V de SDN-1/syndécan chez *C. elegans* comporte trois tyrosines qui pourraient correspondre à cette cible de phosphorylation. Pour s'assurer de ne négliger aucun site potentiel de phosphorylation, nous avons généré un variant de syndécan en mutant ces trois tyrosines en alanines (*sdn-1YtoA*). Le transgène *Pglt-3::sdn-1YtoA* ne sauve pas le phénotype de canaux surnuméraires dans les mutants *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.4C), signifiant que ces tyrosines pourraient intervenir dans la capacité de *sdn-1* à réguler le développement de la cellule excrétrice.

Le motif EFYA de la région C2 permet l'interaction avec des protéines contenant un domaine PDZ. Pour étudier ce motif, nous avons profité de l'existence d'un allèle où ce domaine a été directement supprimé dans le locus génomique de *sdn-1* par CRISPR/Cas9 : *sdn-1(kr499)* [*sdn-1(Δ EFYA)*] (gentiment partagé par l'équipe du professeur J-L Bessereau, (Zhou *et al.*, 2021)). Tandis que cet allèle affecte la localisation des récepteurs à l'acétylcholine dans la corde nerveuse dorsale (Zhou *et al.*, 2021), elle n'entraîne aucun défaut du nombre de canaux dans la cellule excrétrice (Fig. 3.4C).

Finalement, nous avons voulu tester l'importance de la présence de la partie extracellulaire de SDN-1/syndécan dans sa capacité à contrôler le nombre d'extensions dans la cellule excrétrice. Pour ce faire, nous avons utilisé un construit (gentiment partagé par l'équipe du professeur J-L Bessereau, (Zhou *et al.*, 2021)) codant pour une protéine chimérique qui contient la partie intracellulaire de SDN-1 (*sdn-1ICD*) fusionnée au domaine transmembranaire et à la région extracellulaire de NLG-1/neuroligine (*nlg-1ECD+TM*). NLG-1/neuroligine est une protéine d'adhésion synaptique impliquée dans le regroupement de récepteurs spécifiques et le contrôle du relargage de neurotransmetteurs aux synapses des jonctions neuromusculaires (Hu *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2021). Le gène *nlg-1/neuroligine* n'est donc pas exprimé dans la cellule excrétrice dans les conditions sauvages. Cette approche a pour but d'évaluer l'impact de la région intracellulaire de SDN-1 (*sdn-1ICD*) sur la pénétrance du phénotype de canaux surnuméraires dans les mutants *sdn-1(zh20)*, en utilisant *sdn-1ICD* fusionnée avec une protéine ectopique à la cellule excrétrice qui

ne devrait pas avoir d'effet sur son développement. Le transgène *Pglt-3::nlg-1ECD+TM/sdn-1ICD* exprimant cette fusion spécifiquement dans la cellule excrétrice n'impacte pas la pénétrance du défaut de canaux surnuméraires chez les mutants *sdn-1(zh20)*, ce qui suggère que le domaine extracellulaire de SDN-1 est important dans ce contexte. Mis ensemble, ces résultats montrent l'importance du domaine intracellulaire, et plus spécifiquement du motif FRIRKK et des tyrosines de la région V, ainsi que du domaine extracellulaire dans la capacité de sauvetage des canaux surnuméraires de *sdn-1* exprimé de manière transgénique chez les mutants *sdn-1(zh20)*.

3.7 Les récepteurs UNC-40/DCC, UNC-5/Unc5 et possiblement SAX-3/Robo agissent avec SDN-1/syndécan pour réguler le nombre de canaux dans la cellule excrétrice

Les HSPG étant des corécepteurs majeurs de voies de guidage, nous nous sommes tournés vers certaines de ces voies pour chercher des interacteurs potentiels de SDN-1/syndécan dans le contrôle du nombre de canaux surnuméraires. Comme mentionné précédemment (section 1.6.2), des extensions surnuméraires dans la cellule excrétrice auraient été observées anecdotiquement dans les mutants *unc-6(ev400)*, *unc-5(e53)* et *unc-40(rh66)* (Hedgecock *et al.*, 1990). Nous avons donc premièrement voulu confirmer l'implication du guidage UNC-6/Nétrine, ainsi que celle de ses deux récepteurs principaux UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 (Fig. 3.5A), dans le contrôle du nombre de canaux dans la cellule excrétrice. Les analyses de transcriptomique unicellulaire dans l'embryon confirment que les gènes *unc-40* et *unc-5* sont exprimés dans la cellule excrétrice au cours de son développement (Fig. A.3A), ce qui est en accord avec leur rôle dans la morphogenèse de cette cellule (Hedgecock *et al.*, 1990). De plus, des transcrits du gène *unc-6* sont aussi retrouvés en faible quantité dans la cellule excrétrice pendant son développement (Fig. A.3A), insinuant que celle-ci fasse partie des sources ventrales de UNC-6/Nétrine dans l'embryon (Asakura *et al.*, 2007; Wadsworth *et al.*, 1996).

L'allèle nul *unc-6(ev400)* entraîne le défaut de canaux surnuméraires avec une pénétrance de $16.1 \pm 2\%$ (Fig. 3.5C). Nous avons confirmé ce résultat en utilisant un deuxième allèle induisant une perte de fonction partielle de UNC-6/Nétrine, *unc-6(e78)*, qui conduit aussi au défaut de canaux surnuméraires avec une pénétrance de $6.6 \pm 1.7\%$ (Fig. 3.5C). On peut observer des canaux surnuméraires chez les mutants *unc-40(e1430)* et *unc-40(e251)* avec une pénétrance respective de $5.2 \pm 1.1\%$ et de $8.2 \pm 1.9\%$ (Fig. 3.5C). Les deux allèles *unc-40(e1430)* et *unc-40(e251)* sont des substitutions induisant l'apparition d'un codon-stop précoce et sont donc supposés comme nuls. Comme le codon-stop précoce dans *unc-40(e1430)* intervient plus tôt dans la séquence que celui dans *unc-40(e251)*, nous avons décidé de continuer nos travaux avec *unc-40(e1430)*. Finalement, l'allèle nul *unc-5(e53)* entraîne aussi des canaux surnuméraires avec une pénétrance de $18.7 \pm 1.8\%$ (Fig. 3.5C). Les mutants des membres de la voie de guidage UNC-6/Nétrine

induisent tous des défauts de canaux surnuméraires, signifiant que cette voie est impliquée dans le contrôle du nombre d'extensions dans la cellule excrétrice. Le double mutant *unc-40(e1430); unc-5(e53)* ne montre pas une pénétrance du défaut supérieure à celle du plus pénétrant des mutants simples (Fig. 3.5C), *unc-5(e53)*. Ceci suggère une action conjointe des récepteurs UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 dans la régulation du nombre de canaux.

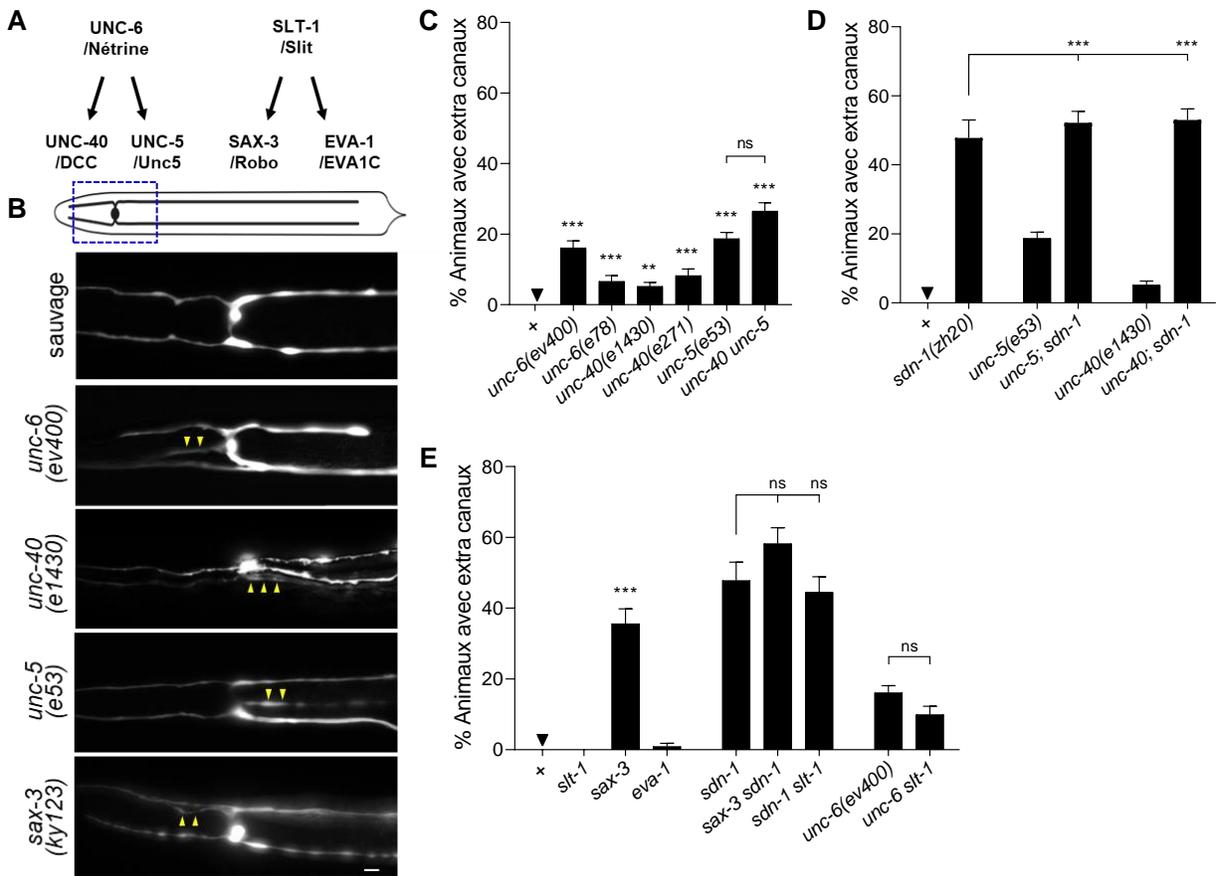


Figure 3.5. La perturbation des voies de guidage spécifiques affecte le nombre de canaux dans la cellule excrétrice (A) Représentation schématique des voies impliquées dans le guidage de cellules en migration et d'extensions cellulaires polarisées. Dans de nombreux contextes développementaux, le signal UNC-6/Nétrine agit sur ses récepteurs principaux UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5, tandis que le signal SLT-1/Slit agit majoritairement au moyen de ses récepteurs SAX-3/Robo et EVA-1/EVA1C. (B) Représentation schématique de la position de la cellule excrétrice dans le ver et images en vue ventrale de vers sauvages et mutants pour les gènes *unc-6*, *unc-40*, *unc-5* et *sax-3*. La cellule excrétrice est visualisée à l'aide du marqueur *Pglt-3::venus*, les flèches jaunes pointent les canaux présumés surnuméraires. Barre d'échelle 10 μ m. (C) Quantification du défaut de nombre de canaux chez les mutants des gènes codants pour les membres de la voie de *unc-6/Nétrine*. (D) Quantification du défaut de nombre de canaux chez les doubles mutants de *sdn-1(zh20)* et des récepteurs de guidage *unc-40(e1430)* et *unc-5(e53)*. (E) Quantification du défaut de canaux surnuméraires chez les mutants des gènes codants pour les membres de la voie de *slt-1/slit*. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.001$ (test Z, les valeurs p ont été corrigées à l'aide de la correction de Bonferroni); ns, non significatif.

Nous avons par la suite analysé le degré d'interaction entre les récepteurs UNC-40/DCC ou UNC-5/Unc5 avec SDN-1/syndécan dans ce contexte. D'abord, d'un point de vue morphologique, les défauts de canaux surnuméraires retrouvés dans les mutants de la voie de UNC-6/Nétrine sont morphologiquement identiques à ceux retrouvés chez les mutants *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.5B). Ensuite, afin de savoir si *unc-40* ou *unc-5* agissent dans la même voie génétique que *sdn-1*, nous avons construit les doubles *unc-5(e53); sdn-1(zh20)* et *unc-40(e1430); sdn-1(zh20)*. La pénétrance chez ces doubles mutants n'est pas significativement différente de celle retrouvée dans le mutant le plus pénétrant, *sdn-1(zh20)*, dans les deux cas (Fig. 3.5D). Ces résultats évoquent la possibilité que les récepteurs de guidage UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 agissent dans la même voie que SDN-1/syndécan pour limiter le nombre de canaux excréteurs.

Comme détaillé précédemment (section 1.4.2.3), syndécan interagit avec le signal de guidage Slit/SLT-1 et son récepteur principal Robo/SAX-3 dans des contextes de développement neuronal aussi bien chez la drosophile (Johnson *et al.*, 2004; Steigemann *et al.*, 2004) que chez le nématode (Blanchette *et al.*, 2015; Rhiner *et al.*, 2005). Nous avons alors voulu évaluer le rôle du signal de guidage SLT-1/Slit et de ces deux récepteurs principaux SAX-3/Robo et EVA-1/EVA1C (Fig. 3.5A) dans le contrôle du nombre de canaux dans la cellule excrétrice. L'analyse des transcrits de la cellule excrétrice lors de son développement montre que les gènes *sax-3* et *eva-1* y sont exprimés, notamment avec un fort niveau pour le gène *eva-1* (Fig. A.3A). De même, on retrouve quelques transcrits du gène *slt-1* à la fin du développement de la cellule excrétrice (Fig. A.3A). L'allèle *slt-1(eh15)*, issu d'une duplication et une délétion dans le gène de *slt-1* résultant en un décalage dans le cadre de lecture et donc supposé nul, ne conduit pas à la formation de canaux surnuméraires (Fig. 3.5E). Nous avons tout de même voulu explorer le rôle de ses récepteurs dans le contrôle du nombre de canaux. L'allèle *eva-1(ok1133)* est une délétion et insertion qui affecte théoriquement toutes les isoformes de EVA-1/EVA1C. Cependant, la conséquence de cette mutation sur la fonction de la protéine n'est pas exactement connue. Les seuls éléments présents dans la littérature sur l'effet de cet allèle rapportent qu'il altère le comportement d'attardement des vers lors de leur locomotion (Nordquist *et al.*, 2018) et qu'il affecte la formation des bras musculaires (Chan *et al.*, 2014) dans le sens d'une perte de fonction de la protéine. Bien que le gène *eva-1* semble fortement exprimé dans la cellule excrétrice pendant son développement, l'allèle mutant *eva-1(ok1133)* n'entraîne que très rarement le défaut de canaux surnuméraires, suggérant un rôle plutôt secondaire de EVA-1/EVA1C dans ce contexte (Fig. 3.5E). De manière surprenante, l'allèle *sax-3(ky123)*, causant une forte perte de fonction de la protéine, entraîne l'apparition de canaux surnuméraires qui ressemblent fortement à ceux retrouvés dans les mutants *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.5B) et avec une pénétrance de $35.6 \pm 4.2\%$ (Fig. 3.5E). Afin de confirmer que *slt-1* ne joue pas de rôle dans le contrôle du nombre de canaux, et que son effet n'est pas caché par une redondance avec d'autres voies, nous avons construit les doubles mutants *sdn-1(zh20) slt-1(eh15)* et *unc-6(ev400) slt-1(eh15)*.

La pénétrance dans ces deux fonds génétiques n'est pas significativement différente de celle du simple mutant le plus pénétrant, c'est-à-dire *sdn-1(zh20)* et *unc-6(ev400)* respectivement (Fig. 3.5E). Cela signifie que ni la voie de UNC-6/Nétrine, ni celle de SDN-1/syndécan n'est redondante avec SLT-1/Slit pour limiter le nombre de canaux excréteurs, et que *sax-3* semble agir indépendamment du signal de guidage *slt-1* dans ce contexte.

Similairement aux récepteurs UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5, nous avons évalué si SAX-3/Robo agit dans la même voie que *sdn-1* pour réguler le nombre de canaux dans la cellule excrétrice. La pénétrance du défaut de canaux surnuméraires dans le double mutant *sax-3(ky123) sdn-1(zh20)* n'est pas significativement supérieure à celle du plus pénétrant des deux mutants, *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.5E). Cela pourrait signifier que SAX-3/Robo agit dans la même voie que SDN-1 pour réguler le nombre de canaux, cependant l'allèle *sax-3(ky123)* n'étant pas nul, il se pourrait que SAX-3/Robo conserve une fonction résiduelle suffisante pour ne pas aggraver les défauts induits par le mutant *sdn-1(zh20)*. Somme toute, nos résultats concernant les voies de guidage montrent que le signal de guidage UNC-6/Nétrine ainsi que les récepteurs UNC-40, UNC-5 et SAX-3 limitent, potentiellement dans la même voie que SDN-1, le nombre de canaux mis en place par la cellule excrétrice au cours de son développement.

Concernant le phénotype de canaux manquants, seuls les mutants affectant les gènes *unc-6*, *unc-5* et *sax-3* génèrent ce type de défaut (Fig. A.3B-D). Il se pourrait alors que le signal de guidage UNC-6/Nétrine, son récepteur UNC-5/Unc5 et le récepteur SAX-3/Robo soient impliqués dans un mécanisme assurant la formation d'au moins quatre canaux dans la cellule excrétrice, mais pas UNC-40/DCC. L'analyse du double mutant *unc-5(e53); sdn-1(zh20)* (Fig. A.3C) insinue que ces deux protéines transmembranaires pourraient agir dans une voie commune pour empêcher le défaut de canaux manquants. Les doubles mutants impliquant les membres de la voie de SLT-1/Slit ne révèlent aucun effet de synergie ou de redondance avec SDN-1/syndécan ou UNC-6/Nétrine (Fig. A.3D). La pénétrance de ces défauts étant très basse dans les génotypes étudiés ici, il est cependant risqué de conclure avec certitude sur des coopérations génétiques.

3.8 L'activation constitutive des récepteurs UNC-40 et UNC-5 atténue le défaut de canaux surnuméraires des mutants de syndécan

Pour mieux comprendre la relation entre SDN-1/syndécan et les récepteurs de guidage UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 dans la régulation du nombre de canaux excréteurs, nous avons évalué les conséquences de l'expression transgénique de récepteurs myristoylés dans différents fonds génétiques. Les transgènes *Pglt-3::myr::unc-40* et *Pglt-3::myr::unc-5* permettent l'expression spécifiquement dans la cellule excrétrice des récepteurs UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5, dont les domaines transmembranaire et extracellulaire sont

remplacés par un signal de myristoylation : MYR::UNC-40 et MYR::UNC-5 respectivement. Comme indiqué précédemment (section 1.2.1.1, Fig. 1.3B-C), la perte de la partie extracellulaire de ces récepteurs induit leur activation constitutive, tandis que la myristoylation permet leur ciblage à la membrane plasmique (Gitai *et al.*, 2003; Norris *et al.*, 2014). L'expression transgénique de MYR::UNC-5 montre une tendance à la suppression partielle du défaut de canaux surnuméraires dans les mutants *sdn-1(zh20)*, bien que cette suppression ne soit significative pour une seule des trois lignées générées (Fig. 3.6A) et une légère tendance à augmenter la pénétrance du défaut de canaux manquants (Fig. A.4C). En revanche, ce même transgène n'induit pas de défauts de canaux surnuméraires (Fig. A.4A) ou de canaux manquants (Fig. A.4B) dans les conditions sauvages. Ces résultats signifient que la seule présence du domaine intracellulaire de UNC-5/Unc5 a l'effet inverse de la perte de *unc-5*, c'est-à-dire inhiber l'apparition des canaux surnuméraires, et ce uniquement dans un contexte où le gène *sdn-1* est muté. Nous avons ensuite évalué la dépendance des effets de MYR::UNC-5 à la fonction du gène *unc-40* dans la suppression des canaux surnuméraires, comme cela peut être le cas dans d'autres contextes développementaux (Norris *et al.*, 2014). MYR::UNC-5 dans la cellule excrétrice ne supprime pas le défaut de canaux surnuméraires dans le mutant simple *unc-40(e1430)*, ni dans le double mutant *unc-40(e1430); sdn-1(zh20)* (Fig. 3.6A). Il semble alors que pour pouvoir supprimer le phénotype de canaux surnuméraires des mutants *sdn-1*, MYR::UNC-5 nécessite la présence de UNC-40/DCC ou de la voie de signalisation en aval de ce récepteur.

Nous avons ensuite coexprimé les deux transgènes, *Pglt-3::myr::unc-5* et *Pglt-3::myr::unc-40*, pour évaluer si leur effet de suppression de canaux surnuméraires était additif. Tout d'abord, dans le fond génétique de type sauvage, la coexpression de MYR::UNC-5 et de MYR::UNC-40 n'affecte pas le nombre de canaux (Fig. A.4G-H). Sans étonnement, l'expression conjointe de MYR::UNC-5 et de MYR::UNC-40 dans la cellule excrétrice supprime le défaut de canaux surnuméraires des mutants *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.6C). En comparant avec la lignée exprimant uniquement MYR::UNC-40 qui supprime le mieux le phénotype de canaux surnuméraires, on peut toutefois observer que l'expression simultanée de MYR::UNC-5 et MYR::UNC-40 ne supprime pas significativement plus le défaut de canaux surnuméraires (Fig. 3.6C). Identiquement, la coexpression de MYR::UNC-5 et MYR::UNC-40 augmente la pénétrance du défaut de canaux manquants dans les mutants *sdn-1(zh20)*, mais pas significativement plus que l'expression de MYR::UNC-40 seule (Fig. A.4I). Cela suggère alors que l'action des deux récepteurs myristoylés n'est pas cumulative et pointe donc vers l'action conjointe, au moins partiellement, des récepteurs UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 dans la régulation de la formation d'extensions surnuméraires dans la cellule excrétrice. Pour conclure, l'expression transgénique des récepteurs MYR::UNC-5 et MYR::UNC-40 depuis la cellule excrétrice permet de supprimer partiellement le défaut de canaux surnuméraires dans les mutants *sdn-1(zh20)*, sans pour autant impacter ce phénotype dans les conditions sauvages. En prenant en compte que

UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 semblent agir dans la même voie que SDN-1/syndécan dans ce mécanisme, on pourrait supposer qu'en absence de SDN-1/syndécan, l'activation des voies en aval des récepteurs myristoylés MYR::UNC-40 et MYR::UNC-5 paraît suffisante pour rétablir partiellement l'inhibition de la formation des canaux surnuméraires. Ainsi, ces résultats ont l'air de pointer vers un rôle des récepteurs UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 en aval des voies de signalisations de SDN-1/syndécan.

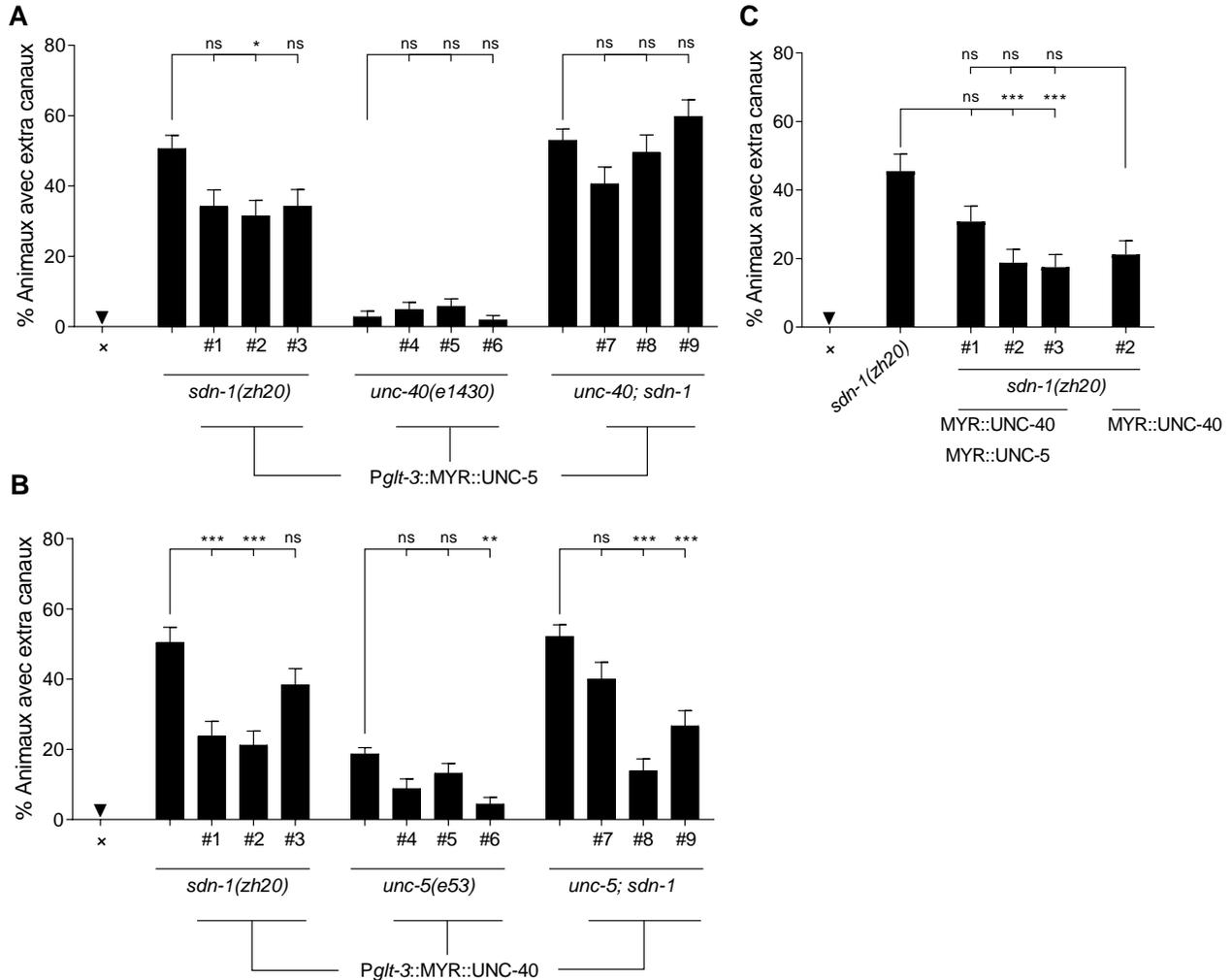


Figure 3.6. L'activation constitutive des récepteurs *unc-40/Dcc* et *unc-5/Unc5* supprime partiellement les défauts de canaux surnuméraires dans les mutants *sdn-1/syndécan*

(A-C) Quantification du défaut de canaux surnuméraires chez des animaux mutants pour *sdn-1(zh20)*, *unc-40(e1430)*, *unc-40(e1430); sdn-1(zh20)*, *unc-5(e53)* ou *unc-5(e53); sdn-1(zh20)*, qui expriment le récepteur myristoylé MYR::UNC-5 (A), MYR::UNC-40 (B), ou une combinaison des deux récepteurs myristoylés (C). L'expression des récepteurs myristoylés est transgénique et spécifiquement dans la cellule excrétrice (*Pglt-3*). Une comparaison entre la combinaison de l'expression des récepteurs MYR::UNC-5 et MYR::UNC-40 et l'expression seule de MYR::UNC-40 est faite en (C). L'absence du signe # sur l'axe des abscisses (A et B) signifie l'absence de structure extrachromosomique exprimant un transgène, et représente la souche contrôle à partir de laquelle les lignées ont été générées. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.001$ (test Z, les valeurs p ont été corrigées à l'aide de la correction de Bonferroni); ns, non significatif.

Nous nous sommes également intéressés à la capacité du transgène *Pglt-3::myr::unc-40* à supprimer le défaut de canaux surnuméraires chez les mutants *sdn-1*. Similairement à MYR::UNC-5, mais avec plus d'amplitude, l'expression de MYR::UNC-40 dans la cellule excrétrice supprime partiellement les défauts de canaux surnuméraires dans les animaux mutants pour le gène *sdn-1* (Fig. 3.6B) et augmente la pénétrance du défaut de canaux manquants (Fig. A.4F). Dans le fond génétique sauvage, l'expression de MYR::UNC-40 n'induit toutefois pas les défauts de canaux surnuméraires (Fig. A.4D) ou manquants (Fig. A.4E). En plus, le transgène MYR::UNC-40 induit une suppression partielle du défaut de canaux surnuméraires dans le mutant simple *unc-5(e53)*, ainsi que dans le double mutant *unc-5(e53); sdn-1(zh20)* (Fig. 3.6B). Conséquemment, la présence seule du domaine intracellulaire de UNC-40/DCC inhibe la formation de canaux surnuméraires, un effet inverse à la perte de fonction du gène *unc-40*. Cette inhibition ne dépend pas de la présence de UNC-5/Unc5, signifiant que UNC-40/DCC pourrait aussi jouer un rôle indépendant de UNC-5/Unc5 dans la régulation du nombre d'extensions polarisées dans la cellule excrétrice.

3.9 La Rho GTPase MIG-2/RhoG agit de manière cellule autonome dans la voie de SDN-1/syndécan pour réguler le nombre de canaux

Après avoir identifié des partenaires membranaires de SDN-1/syndécan, nous avons cherché des interacteurs intracellulaires via lesquels SDN-1/syndécan pourrait réguler la formation des canaux. Les Rho GTPases sont d'excellents candidats, étant donné qu'elles peuvent agir en aval des voies de guidage (Reiner et Lundquist, 2018), en aval de la signalisation des syndécans (Bass *et al.*, 2007; Keller-Pinter *et al.*, 2017; Okina *et al.*, 2009) et qu'elles régulent les dynamiques du cytosquelette lors du développement d'extensions polarisées telles que les neurites (Reiner et Lundquist, 2018; Schelski et Bradke, 2017). De plus, la perturbation de certaines Rho GTPases induit la formation de neurites surnuméraires aussi bien dans les neurones de l'hippocampe que dans les neurones de *C. elegans* (section 1.6.1). Par exemple, l'activation de la voie de Rac1/CED-10 dans les axones de l'hippocampe mène à la spécification de plusieurs axones (Kunda *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2005). On retrouve aussi des axones surnuméraires dans les neurones PDE de *C. elegans* mutants pour les gènes *ced-10/rac1* et *mig-2/rhoG* (Struckhoff et Lundquist, 2003). Nous avons donc étudié l'implication des Rho GTPases MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1, qui sont exprimées au cours du développement de la cellule excrétrice (Fig. A.5A), dans la régulation du nombre de canaux.

Nous avons débuté avec l'étude de MIG-2/RhoG dans ce contexte. La séquence protéique de MIG-2/RhoG contient cinq boîtes G responsables de la liaison au GTP/GDP et de l'activité GTPase, un domaine

d'interaction avec ses effecteurs et un domaine de localisation comprenant le motif CAAX, où une modification lipidique a lieu, afin de cibler la GTPase à la membrane (Fig. 3.7A).

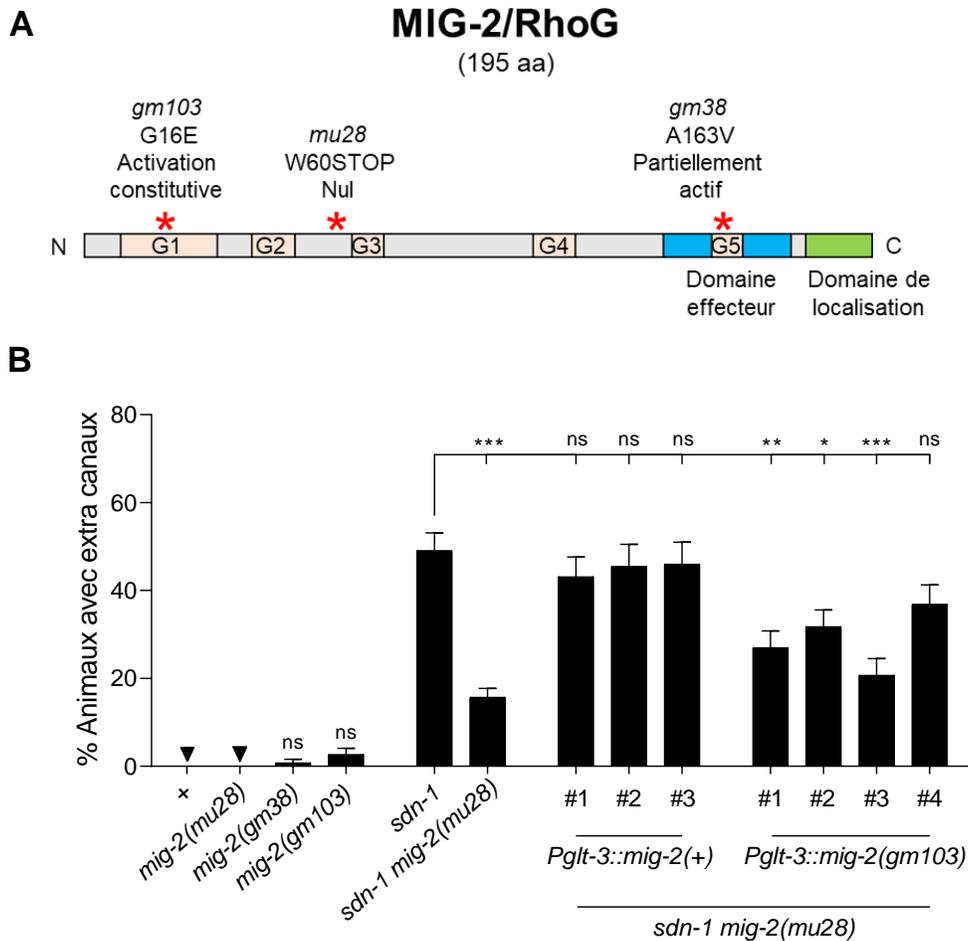


Figure 3.7. La Rho GTPases MIG-2/RhoG est nécessaire au développement des extensions surnuméraires (A) Représentations schématiques de la structure protéique MIG-2/RhoG (isoforme A, la plus longue). G = boîte G. Les mutations étudiées sont représentées par un astérisque rouge le long de la structure des protéines. (B) Quantification du défaut de canaux surnuméraires chez les mutants de *mig-2*, *mig-2 sdn-1* et d'expérience de sauvetage par transgénèse. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.001$ (test Z, les valeurs p ont été corrigées à l'aide de la correction de Bonferroni); ns, non significatif.

Pour étudier le rôle de MIG-2/RhoG dans le développement de la cellule excrétrice, nous avons utilisé différents allèles : *mig-2(mu28)*, qui crée un codon-stop précoce et résulte d'une perte totale de la fonction protéique, *mig-2(gm38)*, qui affecte la boîte G5 et mène à une forme partiellement active de la Rho GTPase, et *mig-2(gm103)*, qui inhibe complètement la fonction GTPase de MIG-2/RhoG, résultant alors en une forme dite constitutivement active ((Zipkin *et al.*, 1997), Fig. 3.7A). Aucun de ces allèles n'entraîne de

manière significative la formation de canaux surnuméraires, comparés aux conditions sauvages (Fig. 3.7B). Nous observons cependant une forte suppression du phénotype de canaux surnuméraires dans le double mutant *sdn-1(zh20) mig-2(mu28)*, en comparaison avec le mutant simple *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.7B), témoignant du rôle de MIG-2/RhoG dans la formation des canaux surnuméraires suite à la perte de SDN-1/syndécan. L'expression transgénique de copies sauvages *mig-2(+)* depuis la cellule excrétrice (*Pglt-3*) des animaux mutants *sdn-1(zh20) mig-2(mu28)* permet de ramener la pénétrance des défauts de canaux surnuméraires au niveau de celle du mutant simple *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.7B). On peut en déduire que MIG-2/RhoG agit de manière cellule autonome pour réguler la formation des extensions surnuméraires dans le mutant *sdn-1*. Étonnamment, l'expression transgénique de la forme constitutivement active *mig-2(gm103)* ne sauve que partiellement la suppression des défauts de canaux surnuméraires dans le double mutant *sdn-1(zh20) mig-2(mu28)* (Fig. 3.7B). Il se pourrait alors que pour assurer la formation du bon nombre de canaux dans la cellule excrétrice, la Rho GTPase MIG-2/RhoG nécessite de pouvoir alterner entre un état actif et inactif.

Concernant le phénotype de canaux manquants, tous les allèles affectant *mig-2* semblent induire ce phénotype (Fig. A.5B), ce qui pourrait signifier l'importance de MIG-2/RhoG dans les mécanismes assurant le développement d'au moins quatre canaux. La combinaison des allèles *sdn-1(zh20)* et *mig-2(mu28)* augmente significativement la pénétrance du défaut de canaux manquants, comparé aux mutants simples (Fig. A.5B), signifiant que dans le mécanisme qui assure le développement d'au moins quatre canaux, SDN-1/syndécan et MIG-2/RhoG pourraient agir indépendamment l'un de l'autre. L'expression du construit *Pglt-3::mig-2(+)* dans les animaux mutants *sdn-1(zh20) mig-2(mu28)* permet de supprimer cette augmentation de la pénétrance du défaut de canaux manquants (Fig. A.5B), signifiant que MIG-2 agit de manière cellule autonome dans ce contexte également. À l'inverse, l'expression du construit *Pglt-3::mig-2(gm103)*, où MIG-2 est constitutivement active, ne supprime pas cette augmentation de la pénétrance du défaut de canaux manquants (Fig. A.5B), suggérant également que MIG-2 doit être finement régulé pour assurer la formation du bon nombre de canaux.

3.10 La Rho GTPase CED-10/Rac1 fonctionne depuis la cellule excrétrice pour réguler la formation des canaux surnuméraires dans la voie de SDN-1/syndécan

La séquence protéique de CED-10/Rac1 contient des domaines similaires à celle de MIG-2/RhoG (Fig. 3.8A). Nous avons étudié l'incidence de cinq allèles impactant différemment les fonctions de la CED-10/Rac1 (cartographiés en Fig. 3.8A) sur l'apparition de canaux surnuméraires. Les allèles menant à une perte de fonction partielle par altération de la région switch pour *ced-10(rp100)*, et du motif CAAX impliqué dans le ciblage membranaire pour *ced-10(n1993)*, ne mènent pas à la formation de canaux surnuméraires

(Fig. 3.8B). L'allèle *ced-10(n3417)*, considéré comme nul, n'entraîne pas non plus le défaut de canaux surnuméraires (Fig. 3.8B). L'allèle *ced-10(n3246)* correspond à une substitution dans la région switch 2, responsable d'adapter la conformation de CED-10/Rac1 en fonction de son état d'activation. Cet allèle est décrit dans certains contextes comme entraînant une perte de fonction partielle (Reddien et Horvitz, 2000), mais un gain de fonction dans d'autres (Locke *et al.*, 2009; Shakir *et al.*, 2006). Dans notre contexte, l'allèle *ced-10(n3246)* est le seul allèle affectant *ced-10* à entraîner le défaut de canaux surnuméraires dans la cellule excrétrice (Fig. 3.8B). Cela indique qu'il agirait plutôt comme un allèle gain de fonction dans la régulation des canaux excréteurs surnuméraires. Pour étudier la relation avec *sdn-1*, la létalité affectant les embryons provenant de parents homozygotes pour l'allèle nul *ced-10(n3417)* nous a obligés à utiliser un allèle hypomorphe de *ced-10*. Le double mutant *ced-10(n1993); sdn-1(zh20)* montre une suppression du phénotype de canaux surnuméraires, comparé au mutant simple *sdn-1(zh20)*, qui peut être sauvé par la réexpression de copies sauvages de *ced-10(+)* dans la cellule excrétrice (Fig. 3.8B). En effet, *vasTi2* (fournie par notre collaborateur Daniel Shaye) correspond à une insertion par la technique de MiniMos (Frokjaer-Jensen *et al.*, 2008) d'une copie unique du construit *Pglt-3::FLAG::ced-10(+)* permettant l'expression de copies sauvages *ced-10(+)* spécifiquement dans la cellule excrétrice (Arena *et al.*, 2022). Cette insertion est capable de ramener la pénétrance du défaut de canaux surnuméraires dans le double mutant *ced-10(n1993); sdn-1(zh20)* au niveau du mutant simple *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.8B), mais n'induit pas de canaux surnuméraires dans les conditions sauvages ni dans le fond génétique *ced-10(n1993)*, et n'amplifie pas la pénétrance du défaut dans le mutant *sdn-1(zh20)* (Fig. A.5D). Cela suggère que CED-10/Rac1 agit de façon cellule autonome dans la cellule excrétrice afin de promouvoir la formation de canaux, et que sa fonction est importante dans la formation des canaux surnuméraires survenant chez le mutant *sdn-1(zh20)*.

Comme pour nos études de *mig-2*, nous avons essayé de sauver la suppression du phénotype de canaux surnuméraires chez les doubles mutants *ced-10(n1993); sdn-1(zh20)* en utilisant la forme constitutivement active *ced-10(G12V)* (Lundquist *et al.*, 2001) qui correspond moléculairement à la même modification que *mig-2(gm103)*. L'expression transgénique de *ced-10(G12V)* dans la cellule excrétrice permet de sauver le phénotype de canaux surnuméraires du double mutant *ced-10(n1993); sdn-1(zh20)* (Fig. 3.8B, lignée #1). Dans le mutant *sdn-1(zh20)* seul, l'expression transgénique de la forme dominante *ced-10(G12V)* n'augmente pas la pénétrance du défaut de canaux surnuméraires (Fig. A.5E), signifiant que son effet est spécifique au sauvetage du défaut dans le double mutant *ced-10(n1993); sdn-1(zh20)*. Pour mieux comprendre la hiérarchie entre les acteurs *sdn-1* et *ced-10*, nous avons par la suite utilisé deux autres allèles entraînant des gains de fonctions de *ced-10* dans le fond génétique *sdn-1(zh20)*. L'allèle gain de fonction *ced-10(n3246)* induit des canaux surnuméraires avec une pénétrance qui ne supplémentent pas celle générée par le mutant *sdn-1(zh20)* dans le double mutant *sdn-1(zh20); ced-10(n3246)* (Fig. 3.8B). Ceci suggère aussi

que *ced-10* et *sdn-1* agissent dans la même voie pour limiter le nombre de canaux excréteurs. Nous avons par ailleurs saisi l'opportunité de pouvoir travailler avec l'allèle *ced-10(knu268)*, dont la substitution induit le maintien de l'activité GTPase de la protéine et la liaison excessive à du GTP. En effet, cet allèle *ced-10(knu268)* mène à une Rho GTPase qui alternera plus rapidement entre ses cycles d'activation/inactivation (Davis *et al.*, 2013) – on parle alors d'activation spontanée – contrairement à un scénario de Rho GTPase constitutivement active, qui serait bloquée dans sa conformation liée au GTP. Alors que le simple mutant *ced-10(knu268)* ne montre aucun défaut de canaux surnuméraires, étonnamment, le double mutant *sdn-1(zh20); ced-10(knu268)* montre une pénétrance de canaux surnuméraires de $82.6 \pm 3.6\%$ (Fig. 3.8B), bien supérieure à celle du mutant *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.8B). Cela suggère premièrement que la pénétrance du défaut de canaux surnuméraires avec la mutation *sdn-1(zh20)* n'est pas restreinte à un palier à environ 50%. Deuxièmement, ce résultat confirme la nécessité des Rho GTPases à pouvoir alterner entre leur conformation active et inactive afin de pouvoir contrôler le développement des canaux. Finalement, cela indique que SDN-1/syndécan semble intervenir sur la signalisation en aval de CED-10/Rac1, puisqu'il faut l'absence de *sdn-1* pour que l'allèle *ced-10(knu268)* puisse entraîner la formation de canaux surnuméraires.

Inversement aux allèles de *mig-2*, aucun des allèles de *ced-10* n'entraîne significativement le phénotype de canaux manquants, excepté l'allèle *ced-10(rp100)* qui agirait alors comme un gain de fonction dans ce contexte (Fig. A.5C). L'allèle supposé nul *ced-10(n3417)* n'entraînant pas de canaux manquants (Fig. A.5C), on peut alors penser que le gène *ced-10* ne contrôle pas le nombre minimum de canaux développés, ou bien qu'un autre partenaire redondant cache la fonction de CED-10/Rac1 dans ce mécanisme. La pénétrance du défaut de canaux manquants dans le double mutant *ced-10(n1993); sdn-1(zh20)* est supérieure à la somme des pénétrances des simples mutants (Fig. A.5C). Cette augmentation de la pénétrance du défaut de canaux manquants dans le double mutant peut être sauvée par la réexpression de copies sauvages *ced-10(+)* dans la cellule excrétrice (*vasTi2*) (Fig. A.5C). Mis ensemble, ces résultats indiquent que CED-10/Rac1 pourrait avoir une fonction cellule autonome et redondante à la voie de SDN-1/syndécan dans le mécanisme garantissant la formation de quatre canaux excréteurs. L'expression de la version constitutivement active *ced-10(G12V)* ne permet pas de sauver l'augmentation de la pénétrance du défaut de canaux manquants dans le mutant *ced-10(n1993); sdn-1(zh20)* (Fig. A.5C) et augmente la pénétrance du défaut de canaux manquants dans le simple mutant *sdn-1(zh20)* (dans une des trois lignées générées, Fig. A.5F). L'activation constitutive de CED-10/Rac1 (*ced-10(G12V)*) est donc suffisante pour jouer son rôle dans la formation des canaux surnuméraires induits par la perte de *sdn-1*, mais il se pourrait qu'elle entraîne une altération dans sa fonction d'assurer le développement d'au moins quatre canaux dans la cellule excrétrice. Cela semble indiquer que les mécanismes à la base de la formation de canaux surnuméraires et les mécanismes garantissant le développement d'au moins quatre canaux dans la cellule

excrétrice soient au moins partiellement indépendants. De plus, contrairement au contexte des canaux surnuméraires, aucun effet n'est observé pour les mutants *ced-10(knu268)* et *ced-10(knu268); sdn-1(zh20)* au niveau du défaut de canaux manquants (Fig. A.5C), suggérant également que les mécanismes régulant ces deux types de défaut sont indépendants.

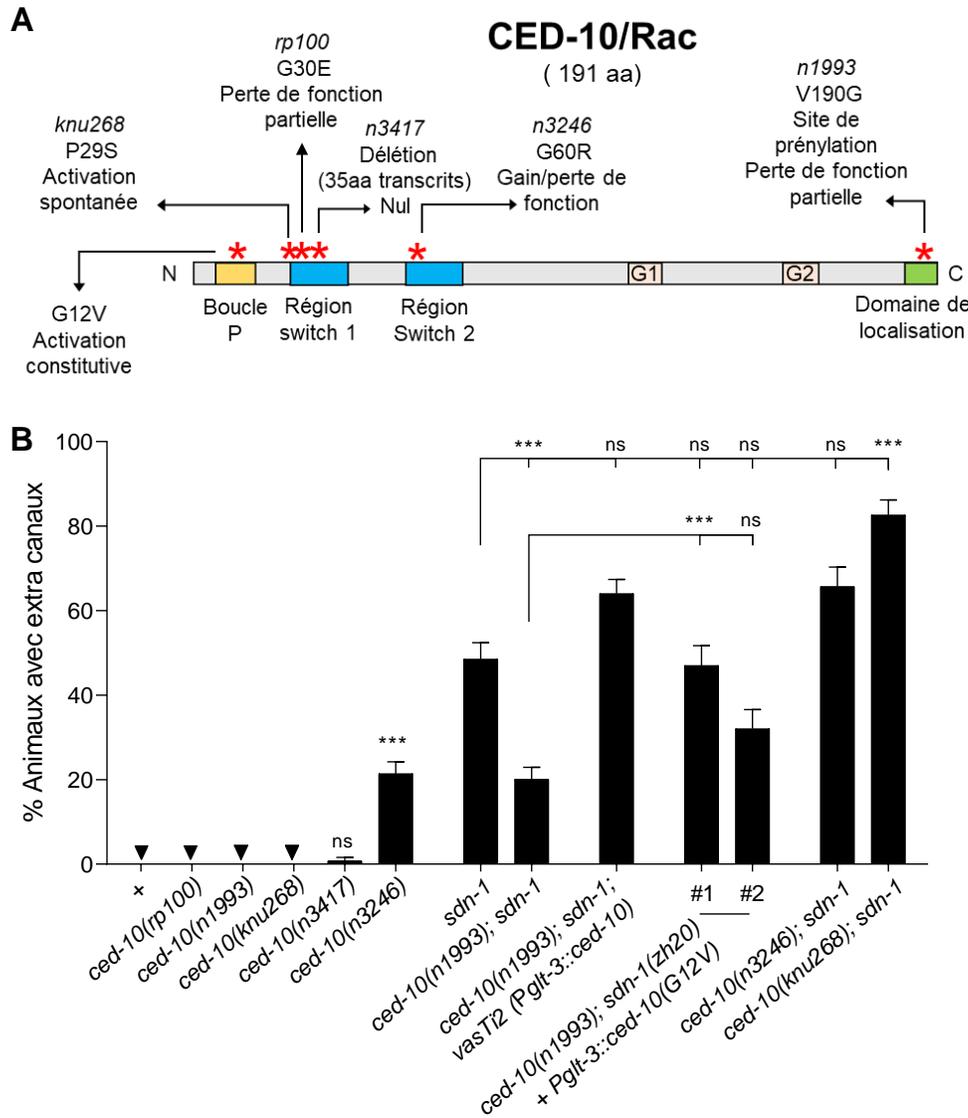


Figure 3.8. La Rho GTPases CED-10/Rac1 est nécessaire au développement des extensions surnuméraires (A) Représentations schématiques de la structure protéique de CED-10/Rac1 (isoforme B, la plus longue). G = boîte G. Les mutations étudiées sont représentées par un astérisque rouge le long de la structure des protéines. (B) Quantification du défaut de canaux surnuméraires chez les mutants de *ced-10*, *ced-10; sdn-1* et d'expérience de sauvetage par transgénèse. *vasTi2* a été généré par l'intégration d'une copie unique du construit [P_{glt-3}::*ced-10*(+)]. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : *** $p \leq 0.001$ (test Z, les valeurs p ont été corrigées à l'aide de la correction de Bonferroni); ns, non significatif.

3.11 MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 agissent indépendamment pour contrôler le nombre d'extensions surnuméraires

Étant donné que les deux Rho GTPases MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 sont requises pour induire le développement d'extensions surnuméraires dans le mutant *sdn-1(zh20)*, et qu'elles fonctionnent de façon redondante dans de nombreux contextes (section 1.2.2.4), nous avons voulu vérifier si elles agissent ensemble dans le développement de la cellule excrétrice. Nous avons observé que la perte de fonction de l'allèle nul *mig-2(mu28)* ne supprime pas significativement les canaux surnuméraires induits par l'allèle gain de fonction *ced-10(n3246)* dans le double mutant *ced-10(n3246); mig-2(mu28)* (Fig. 3.9A). Ceci implique donc que MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 pourraient agir indépendamment pour réguler la formation de canaux surnuméraires, ou qu'au moins, *mig-2* ne fonctionne pas en aval de *ced-10* dans ce mécanisme.

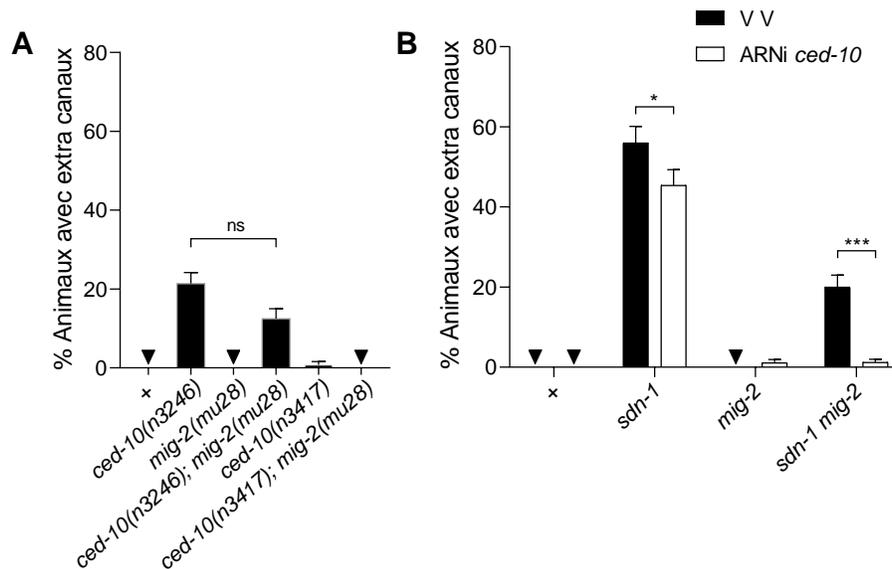


Figure 3.9. Les Rho GTPases MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 agissent indépendamment dans le développement des extensions surnuméraires

(A) Quantification du défaut de canaux surnuméraires dans les mutants doubles pour *mig-2* et *ced-10*. (B) Quantification du défaut de canaux surnuméraires dans des expériences d'ARNi dirigée contre *ced-10* sur des animaux sauvages ou mutants nuls pour *sdn-1* et/ou *mig-2*. La référence correspond à des animaux nourris avec des bactéries contenant un Vecteur Vide (VV). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ (test Z, les valeurs p ont été corrigées à l'aide de la correction de Bonferroni); ns, non significatif.

Pour confirmer la théorie que *mig-2* et *ced-10* ont des rôles indépendants dans ce contexte, nous avons examiné les conséquences de la perte de fonction simultanée de ces deux Rho GTPases. Nous avons déplété *ced-10* par ARNi dans les fonds génétiques sauvage et mutant *sdn-1(zh20)*, combiné, ou non, à la mutation

mig-2(mu28). L'ARNi dirigée contre *ced-10* dans le mutant *sdn-1(zh20)* supprime partiellement le défaut de canaux surnuméraires. Cette suppression est de plus faible intensité qu'avec l'allèle *ced-10(n1993)*, ce qui n'est pas surprenant étant donné que l'ARNi déplete souvent partiellement le gène ciblé, mais ceci confirme tout de même que l'ARNi *ced-10* fonctionne au moins partiellement (Fig. 3.9B). Ainsi, l'ARNi dirigée contre *ced-10* supprime les défauts de canaux surnuméraires dans le double mutant nul *sdn-1(zh20) mig-2(mu28)* (Fig. 3.9B), montrant un effet additif des pertes de fonction de *mig-2* et *ced-10*. Ceci appuie la notion que les rôles de MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 sont indépendants dans la régulation de la formation des canaux surnuméraires de la cellule excrétrice.

Par ailleurs, la perte de fonction totale des deux Rho GTPases dans le double mutant *mig-2(mu28); ced-10(n3417)* n'induit pas de canaux surnuméraires (Fig. 3.9A). Par contre, une synergie est observée entre ces deux allèles au niveau de la pénétrance du défaut de canaux manquants (Fig. A.5G). Effectivement, la pénétrance du défaut de canaux manquants est nettement supérieure dans le double mutant *mig-2(mu28); ced-10(n3417)* à la somme des pénétrances des deux mutants simples. Similairement, l'ARNi dirigée contre *ced-10* amplifie de façon synergique le défaut de canaux manquants dans les fonds génétiques contenant l'allèle *mig-2(mu28)* (Fig. A.5H). Cela indique que MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 ont une fonction redondante dans le mécanisme garantissant la formation de quatre canaux lors du développement de la cellule excrétrice. De plus, cela laisse penser une fois de plus que ce mécanisme est au moins partiellement différent de celui qui contrôle la formation des canaux surnuméraires dans lequel ces Rho GTPases ont l'air d'avoir une fonction indépendante.

3.12 La Rho GEF UNC-73/Trio régule le nombre de canaux surnuméraires avec de SDN-1/syndécan

Nous avons finalement adressé la possible contribution de Rho GEF dans la régulation des Rho GTPases MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1. Nous nous sommes tournés vers la Rho GEF TIAM-1/Tiam1 car, dans le guidage neuronal et la régulation de neurites surnuméraires dans les neurones PDE, elle agit en aval du récepteur UNC-40/DCC pour réguler MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 (Demarco *et al.*, 2012). Nous avons noté une quasi-absence de transcrits du gène *tiam-1* lors du développement de cellule excrétrice (Fig. A.6A). L'allèle *tiam-1(tm1556)* correspond à une grande délétion et cause un décalage du cadre de lecture menant à une perte de fonction de la protéine Rho GEF TIAM-1/Tiam1 (Demarco *et al.*, 2012). Nous n'avons observé ni phénotype de canaux surnuméraires (Fig. 3.10A), ni phénotype de canaux manquants (Fig. A.6B) dans le mutant *tiam-1(tm1556)*. Ces résultats indiquent que la Rho GEF TIAM-1/Tiam1 n'intervient pas dans la régulation du nombre de canaux dans la cellule excrétrice ou qu'une autre Rho GEF redondante à TIAM-1/Tiam1 dissimule l'effet de la perte de fonction de cette dernière.

Nous avons également évalué l'implication de la Rho GEF UNC-73/Trio qui contrôle l'activation de MIG-2/RhoG et de CED-10/Rac1 dans de nombreux contextes développementaux (Kishore et Sundaram, 2002; Lundquist *et al.*, 2001; Struckhoff et Lundquist, 2003). L'allèle *unc-73(rh40)* affectant spécifiquement la fonction Rac GEF de la protéine (Steven *et al.*, 1998) n'entraîne pas de défaut de canaux surnuméraires (Fig. 3.10A) mais induit des défauts de canaux manquants (Fig. A.6B), suggérant un rôle de cette GEF dans le mécanisme du développement des canaux excréteurs. En comparant avec la pénétrance des défauts de canaux manquants dans le double mutant nul *mig-2(mu28); ced-10(n3417)*, on remarque cependant que la pénétrance du mutant *unc-73(rh40)* est moindre. L'allèle *unc-73(rh40)* affecte spécifiquement le domaine responsable de l'activité GEF spécifique aux Rac GTPases MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 et non l'activité du domaine GEF spécifique de la Rho GTPase RHO-1/RhoA (Norris *et al.*, 2014; Steven *et al.*, 1998). Cela suggère que la régulation de MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 ne passe que partiellement par la GEF UNC-73/Trio dans le contexte du mécanisme de conservation des quatre canaux dans la cellule excrétrice.

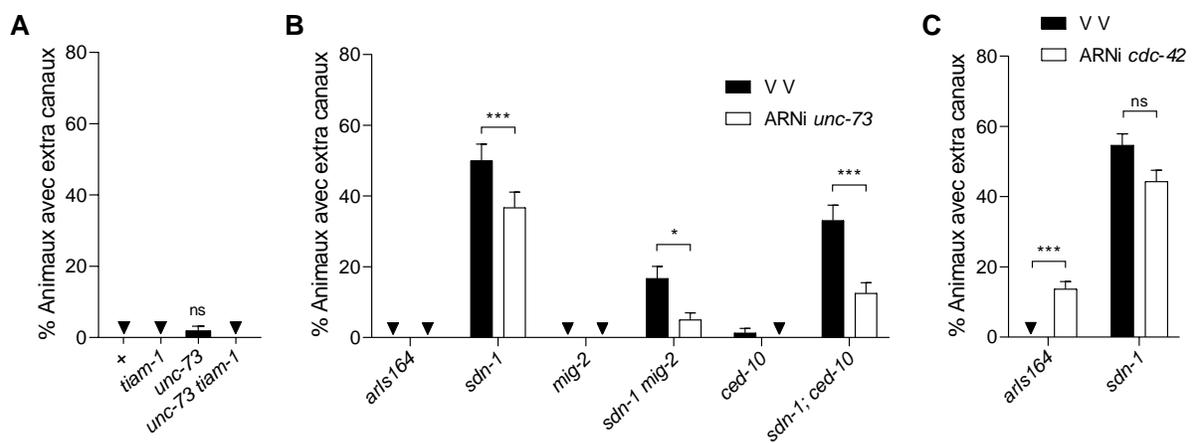


Figure 3.10. CDC-42/Cdc42 et UNC-73/Trio participent à la régulation du nombre de canaux dans la cellule excrétrice (A) Quantification du défaut de canaux surnuméraires dans des animaux mutants pour les Rho GEF *tiam-1/tiam1* et/ou *unc-73/Trio*. (B) Quantification du défaut de canaux surnuméraires dans des expériences d'ARNi dirigée contre *unc-73* sur des animaux sauvages ou mutants pour *sdn-1*, *mig-2* et/ou *ced-10*. La référence correspond à des animaux nourris avec des bactéries contenant un Vecteur Vide (VV). (C) Quantification du défaut de canaux surnuméraires dans des expériences d'ARNi dirigée contre *cdc-42* sur des animaux sauvages ou mutants pour *sdn-1*. La référence correspond à des animaux nourris avec des bactéries contenant un Vecteur Vide (VV). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : *** $p \leq 0.001$ (test Z, les valeurs p ont été corrigées à l'aide de la correction de Bonferroni); ns, non significatif.

Le double mutant *unc-73(rh40) tiam-1(tm1556)* n'entraîne pas de canaux surnuméraires (Fig. 3.10A), mais une faible suppression du défaut de canaux manquants en comparaison avec le mutant *unc-73(rh40)* seul (Fig. A.6B). Cela signifie que la Rho GEF TIAM-1/Tiam1 n'est pas redondante avec UNC-73/Trio dans ce

contexte, et que, bien que peu ou pas exprimée dans la cellule pendant son développement, la perte de fonction *tiam-1(tm1556)* peut prévenir du défaut de canaux manquants du mutant *unc-73(rh40)*.

Nous avons finalement voulu tester l'implication de cette Rho GEF UNC-73/Trio dans la voie de SDN-1 pour la régulation des canaux surnuméraires. Après de nombreuses tentatives infructueuses pour construire le double mutant *sdn-1(zh20); unc-73(rh40)*, nous avons déplété la fonction de *unc-73* par ARNi dans des fonds génétiques mutants pour *sdn-1(zh20)*, *mig-2(mu28)* et/ou *ced-10(n1993)*. La déplétion de *unc-73* par ARNi induit une suppression du phénotype de canaux surnuméraires dans le mutant *sdn-1(zh20)*, signalant que *unc-73* intervient dans la formation des canaux surnuméraires développés dans ce mutant (Fig. 3.10B). Dans les doubles mutants *sdn-1(zh20) mig-2(mu28)* et *sdn-1(zh20); ced-10(n1993)*, l'ARNi dirigée contre *unc-73* supprime aussi la pénétrance du défaut de canaux surnuméraires, suggérant que UNC-73/Trio ne régule pas uniquement MIG-2/RhoG, ni uniquement CED-10/Rac1.

3.13 La Rho GTPase CDC-42/Cdc42 promeut le développement de canaux surnuméraires dans la voie de SDN-1/syndécan

Après avoir étudié le rôle des Rho GTPases MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 dans les mécanismes régulant le nombre d'extensions développées dans la cellule excrétrice, nous nous sommes finalement intéressés à CDC-42/Cdc42. La Rho GTPase CDC-42/Cdc42 agit en aval du récepteur de guidage UNC-40/DCC et en amont des Rho GTPases CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG dans le guidage des neurones PDE, et son activation constitutive mène à la formation de neurites surnuméraires dans ce neurone (Demarco *et al.*, 2012). Dans la cellule excrétrice, les auteurs J. Abrams et J. Nance stipulent que la perte de fonction de CDC-42/Cdc42 (par dégradation) conduit à des défauts de croissance en longueur des canaux, ainsi qu'à un défaut où un bras de la cellule excrétrice se divise en deux pour donner deux canaux, chacun doté d'une lumière (Abrams et Nance, 2021).

Nous avons donc vérifié si ce phénotype donnant deux canaux était similaire au phénotype de canaux surnuméraires que nous observons, ou s'il s'agissait plutôt d'un défaut de branchement des canaux, c'est-à-dire la formation d'un deuxième canal à partir d'un canal préexistant (et non à partir du soma de la cellule excrétrice comme nous l'avons défini pour un "canal supplémentaire"). Nous avons premièrement vérifié que des transcrits du gène *cdc-42* sont détectables dans la cellule excrétrice lors de son développement (Fig. A.6A). Ensuite, nous avons déplété la fonction de *cdc-42* par ARNi dans les conditions sauvages, ce qui mène à la formation de canaux surnuméraires, mais n'amplifie pas la pénétrance du même défaut dans le mutant *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.10C). On peut en déduire que CDC-42/Cdc42 est impliqué dans l'inhibition de la formation des extensions surnuméraires dans la même voie que celle de SDN-1/syndécan. Par ailleurs,

l'ARNi dirigée contre *cdc-42* induit aussi le défaut de canaux manquants dans les conditions sauvages et augmente significativement la pénétrance de ce défaut dans le mutant *sdn-1(zh20)* (Fig. A.6C). Cela évoque alors que CDC-42/Cdc42 agit indépendamment de SDN-1/syndécan afin de conserver au moins quatre canaux lors du développement de la cellule excrétrice et renforce l'idée que les mécanismes mis en jeu dans les défauts de canaux surnuméraires et de canaux manquants sont différents.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

La fonction de certaines cellules polarisées nécessite la mise en place d'une morphologie complexe et de structures polaires, comme les extensions cellulaires ou les neurites. Les mécanismes de croissance et de guidage d'extensions polarisées ont été intensément étudiés dans les neurones et dans d'autres cellules lors des dernières décennies. Cependant, une forte lacune réside dans la compréhension des mécanismes à la base de la formation de ces extensions et de leur régulation dans les étapes précoces de leur mise en place (Schelski et Bradke, 2017; Takano *et al.*, 2015). Ainsi, parmi les questions de la biologie développementale, celle de savoir comment le nombre exact d'extensions développées par une cellule polarisée est régulé reste sans réponse claire.

4.1 Extensions surnuméraires, un défaut rarement observé et encore plus rarement caractérisé

Nous rapportons ici que l'altération de la biosynthèse des chaînes HS chez les mutants *rib-1* et *rib-2* mène au développement d'un trop grand nombre d'extensions dans plusieurs dans les neurones unipolaires AVM et HSN ainsi que dans la cellule excrétrice de *C. elegans* (Fig. 3.1A-C). Chez les individus mutants, ces extensions surnuméraires se mettent en place au cours du développement, tel que nous l'avons caractérisé pour la cellule excrétrice (Fig. 3.2A), et la pénétrance de ce défaut ne varie pas au cours du développement larvaire (Fig. 3.2B). De même, nous avons mis en évidence la similitude de l'organisation du cytosquelette d'actine et des microtubules dans les canaux surnuméraires, comparés aux canaux d'animaux sauvages. Par ailleurs, tant dans les canaux des animaux sauvages que dans les canaux supplémentaires des mutants, nous avons observé une zone au milieu des canaux qui est dépourvue de cytoplasme et bordée par un réseau riche en actine. Celle-ci est caractéristique de la lumière des canaux qui est nécessaire à la fonction d'osmorégulation de cette cellule. Nous avons donc saisi l'opportunité de pouvoir travailler avec ce phénotype peu courant – de nombreux mutants mènent plutôt au raccourcissement ou à l'absence d'extensions – et jamais caractérisé, pour déchiffrer l'existence d'un mécanisme développemental à la base du contrôle du nombre d'extensions cellulaires mises en place dans une cellule polarisée.

Nous tenons tout d'abord à différencier ce phénotype d'extensions surnuméraires, où l'extension se met en place depuis le soma de la cellule polarisée, de celui de ramification, où l'extension se met en place depuis une extension préexistante. Tout d'abord parce que le défaut de ramification semble plutôt intervenir avec le vieillissement (Khandekar, 2015; Pan *et al.*, 2011; Tank *et al.*, 2011; Toth *et al.*, 2012), mais surtout parce que la décision de former une extension à partir du soma d'une cellule au cours de la rupture de symétrie

pourrait nécessiter un contexte moléculaire très différent de celui retrouvé lors de la bifurcation d'une extension en deux pendant sa croissance.

Une fois ce postulat pris en compte, on peut diviser la littérature rapportant l'existence de neurites surnuméraires lors du développement neuronal en deux catégories. Premièrement, lors de l'étude du développement des neurones de l'hippocampe de mammifères cultivés en conditions *in vitro*, le développement de plusieurs axones a déjà été observé (section 1.6.1). Ces études font état de ce qu'on appelle la spécification axonale, où un neurite immature est spécialisé en axone tandis que les autres neurites immatures deviennent les dendrites. Un équilibre entre les mécanismes promouvant la croissance au niveau du futur axone d'un côté, inhibant la croissance au niveau des autres neurites immatures d'un autre, garantit la spécification axonale. Un débalancement dans cet équilibre serait à la base du développement de plusieurs axones dans ces neurones. Des progrès dans la compréhension des voies affectant l'induction de la croissance du futur axone ont été faits dans les dernières années (Schelski et Bradke, 2017; Takano *et al.*, 2015). Cependant, les mécanismes à la base de l'inhibition de la croissance axonale dans les futures dendrites restent encore mal connus (Takano *et al.*, 2015).

Dans la deuxième catégorie de neurites surnuméraires, on peut regrouper les travaux réalisés dans des neurones en conditions *in vivo*, comme c'est le cas pour *C. elegans*. Ces travaux ont rapporté l'apparition de neurites surnuméraires se développant à partir du soma dans différents contextes neuronaux. Les travaux rapportant ce type de défaut se concentrent majoritairement sur la croissance et le guidage axonal (Gitai *et al.*, 2003; Levy-Strumpf et Culotti, 2007; Struckhoff et Lundquist, 2003), sans déchiffrer directement les mécanismes contrôlant la formation des extensions lors de la polarisation neuronale. Nous tenons à souligner l'exception des travaux qui, bien qu'ils se concentrent sur l'analyse des mécanismes à la base de la croissance axonale, proposent un modèle plus complexe qui semble tenir compte de la polarité dans les neurones HSN (Adler *et al.*, 2006; Limerick *et al.*, 2018; Tang et Wadsworth, 2014; Yang *et al.*, 2014). Dans ces travaux, il a été décrit qu'une localisation asymétrique du récepteur de guidage UNC-40/DCC dans le neurone HSN était à l'origine de la polarisation et de la formation du cône de croissance dans une direction donnée (Adler *et al.*, 2006). De nombreux facteurs, comme des HSPG, les intégrines et d'autres acteurs intracellulaires, impactent cette localisation (Tang et Wadsworth, 2014; Yang *et al.*, 2014). Dans ces études, la perte de l'asymétrie de UNC-40/DCC mène à une multipolarisation de HSN et ainsi à la formation de plusieurs axones.

Quant à la cellule excrétrice, de rares travaux rapportent l'observation de canaux surnuméraires (Johnson *et al.*, 2006; Oosterveen *et al.*, 2007) et, à notre connaissance, aucune étude ne s'est encore attardée sur un

mécanisme régulant le nombre d'extensions mises en place lors du développement de cette cellule polarisée. Nos résultats indiquent que l'existence d'un tel mécanisme est conservée entre des neurones et la cellule excrétrice, et que la synthèse des chaînes HS est importante dans ces contextes cellulaires. Les chaînes HS partagent alors un rôle conservé entre des neurones et la cellule excrétrice, ce qui s'ajoute à leurs rôles conservés dans la migration et le guidage des extensions (Blanchette *et al.*, 2017). De plus, ce rôle partagé des chaînes HS entre les neurones et la cellule excrétrice dans la régulation du nombre d'extensions polarisées confirme encore une fois que la cellule excrétrice est un modèle très proche des neurones et qu'elle utilise de nombreux mécanismes en commun avec ceux-ci pour se développer (Shaye et Soto, 2021).

Au cours de ces travaux, nous avons observé un autre phénotype, celui de canaux manquants, où moins de quatre canaux sont développés chez certains animaux. Ce type de défaut pourrait être considéré à premier abord comme inverse à celui des canaux surnuméraires. Cependant, plusieurs éléments pointent vers une indépendance entre les mécanismes garantissant le développement de quatre canaux et ceux inhibant la formation des canaux surnuméraires. Parmi ces éléments, on retrouve (1) des mutants qui engendrent le défaut de canaux manquants sans induire des canaux surnuméraires et inversement, (2) l'expression transgénique de construits capables de sauver le phénotype de canaux surnuméraires sans sauver celui de canaux manquants, ou bien capables d'induire des canaux manquants sans affecter la pénétrance de canaux surnuméraires. De plus, on trouve (3) des relations de coopération entre certains gènes qui diffèrent entre la régulation des quatre canaux de la cellule excrétrice ou des canaux surnuméraires. Le mécanisme inhibant l'apparition du défaut de canaux manquants sera donc traité dans une section individuelle à la fin de cette discussion.

4.2 L'HSPG SDN-1/syndécan inhibe la formation d'extensions surnuméraires de manière cellule autonome

Nous avons montré que parmi les six gènes codant pour les HSPG classiques, le mutant impactant *sdn-1* est le seul à entraîner le défaut de canaux surnuméraires. Parmi tous les allèles étudiés au cours de cette étude, *sdn-1(ok449)* et *sdn-1(zh20)* entraînent le défaut de canaux surnuméraires avec la plus forte pénétrance en simple mutant. Cela signifie que SDN-1/syndécan tient une place centrale dans le mécanisme d'inhibition de la formation de canaux surnuméraires et c'est pourquoi nous avons centré nos efforts sur ce gène clé. Il reste toutefois possible que des gènes codant pour d'autres HSPG contribuent au mécanisme. Par exemple, le gène *unc-52* code pour de nombreuses isoformes et l'allèle hypomorphe de référence *unc-52(e444)* que nous avons utilisé n'affecte pas toutes ces isoformes. Il se pourrait alors que nous n'ayons pas réussi à évaluer le rôle de certaines isoformes de *unc-52/perlecan* dans la régulation des canaux surnuméraires. De plus, la liste des HSPG identifiés n'est pas exhaustive à ce jour et de nouvelles protéines en contact avec la

matrice extracellulaire capable de porter des chaînes HS sont encore ajoutées à cette famille, comme c'est le cas pour la neurexine (Zhang *et al.*, 2018). Quoi qu'il en soit, SDN-1/syndécan est clairement un élément critique dans le mécanisme régulant le nombre d'extensions cellulaires de la cellule excrétrice.

Pour mieux comprendre le rôle de *sdn-1* lors du développement de la cellule excrétrice, j'ai caractérisé en profondeur les canaux surnuméraires retrouvés chez les mutants *sdn-1(zh20)*. Ces analyses révèlent qu'il peut y avoir jusqu'à quatre canaux surnuméraires, avec une majorité de un à deux canaux surnuméraires par animal montrant ce défaut. De plus, ces canaux peuvent se développer de n'importe quel côté du ver (droit, ventral ou gauche) et dans n'importe quelle direction (antérieure ou postérieure) sans tendance majeure (Fig. 3.1H). Nous avons aussi montré que *sdn-1/syndécan* joue un rôle développemental pour réguler le nombre de canaux et non de maintien après le développement (Fig. 3.2A-B). Toutefois, il serait intéressant d'étudier l'évolution de la pénétrance du défaut chez des animaux mutants pour *sdn-1* au cours du vieillissement, étant donné que l'apparition de neurites surnuméraires dans les neurones ALM augmente avec l'âge des vers (Khandekar, 2015). Il a été rapporté que les niveaux de SDC-4/syndécan dans les cerveaux de souris (Chmelova *et al.*, 2023) et de SDN-1 dans les neurones de *C. elegans* (Gao *et al.*, 2024) augmentent avec le vieillissement. De plus, les niveaux des syndécans ont l'air d'être reliés à la progression de maladies neurodégénératives comme Alzheimer (Balistreri et Monastero, 2025). On pourrait alors se demander si les taux d'expression de *sdn-1/syndécan* augmentent lors du vieillissement à l'image d'un mécanisme compensatoire pour assurer le maintien de la morphologie neuronale. Dans ce cas, étudier la pénétrance du défaut de canaux surnuméraires chez les mutants *sdn-1(zh20)* et l'effet de la déplétion tardive de SDN-1/syndécan par induction de sa dégradation à l'auxine (Zhou *et al.*, 2021) pourrait permettre de mieux comprendre pourquoi se développent des extensions surnuméraires avec l'âge dans certaines cellules.

Afin d'élucider le mode d'action de *sdn-1*, j'ai effectué des essais de sauvetage. L'expression transgénique de copies sauvages *sdn-1(+)* dans la cellule excrétrice a permis un sauvetage majeur des défauts, indiquant que ce gène fonctionne de façon cellule autonome. En revanche, l'expression transgénique de copies sauvages *sdn-1(+)* dans divers tissus tels que les neurones, les cellules épithéliales de couture, les muscles de la paroi corporelle, le pharynx ou encore des cellules gliales n'a pas sauvé le défaut de canaux surnuméraires chez les mutants *sdn-1(zh20)*. Par ailleurs, SDN-1/syndécan est une protéine transmembranaire et pourrait donc se retrouver à la membrane apicale de la cellule excrétrice, c'est-à-dire au niveau de la lumière de celle-ci. Les lumières de toutes les cellules du système excréteur étant connectées, il aurait été pertinent d'examiner si l'expression de *sdn-1(+)* depuis la cellule du pore ou la cellule canulaire peut diffuser le long de cette membrane et impacter le nombre de canaux dans la cellule excrétrice; malheureusement, il n'existe pas de promoteurs spécifiques décrits pour ces cellules. Il aurait également été

intéressant d'évaluer l'effet de l'expression de *sdn-1(+)* depuis l'hypoderme, puisque ce dernier sécrète de nombreux composants de la matrice extracellulaire et de membranes basales (Chisholm et Xu, 2012). De plus, l'hypoderme exprime *sdn-1* lors de son développement (basé sur des données d'analyses transcriptomiques à l'échelle unicellulaire, (Packer *et al.*, 2019)) qui pourrait être clivé pour agir à distance, comme c'est le cas chez les mammifères (Manon-Jensen *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2005). Néanmoins, en priorisant les essais de sauvetage avec expression de *sdn-1(+)* à partir des tissus adjacents à la cellule excrétrice lors du développement embryonnaire des canaux, j'ai pu observer que l'expression de *sdn-1(+)* depuis la cellule excrétrice sauve le phénotype de canaux surnuméraires aussi bien que l'expression de *sdn-1(+)* dirigée par son propre promoteur (*opIs170*, Fig. 3.3B). Cela signifie que SDN-1/syndécan agit de manière cellule autonome dans l'inhibition des canaux surnuméraires, comme dans bien d'autres contextes développementaux (Blanchette *et al.*, 2015; Rhiner *et al.*, 2005; Saied-Santiago *et al.*, 2017; Sundararajan *et al.*, 2015).

4.3 Le rôle des chaînes HS dans l'inhibition de la formation de canaux surnuméraires

À l'aide des mutants hypomorphes *rib-1(qm32)* et *rib-2(qm46)*, nous avons montré l'importance de la polymérisation des chaînes HS dans l'inhibition du développement de canaux surnuméraires (Fig. 3.1C). J'ai démontré que les modifications chimiques d'épimérisation et de sulfatation, réalisées par les enzymes HSE-5 et HST-2, sont impliquées dans la même voie afin de réguler le nombre d'extensions surnuméraires. Les sulfatations induites par HST-6 semblent plus accessoires dans ce contexte, pointant alors vers la nécessité d'un ensemble spécifique de modifications chimiques des chaînes HS pour réguler le nombre d'extensions dans la cellule excrétrice, comme c'est le cas pour le guidage neuronal (Bulow, 2021). Il serait intéressant d'étudier la régulation spatiotemporelle des modifications des chaînes afin de mieux comprendre leur impact sur les HSPG impliqués dans ce mécanisme. Bien qu'une technique de marquage par anticorps des patrons de modifications des chaînes HS ait été développée (Attreed *et al.*, 2012; Attreed *et al.*, 2016; Cizeron *et al.*, 2021), elle reste limitée dans l'identification précise de divers motifs de modifications. Une alternative serait de chercher à contrôler dans le temps la déplétion des enzymes de modifications une à une, spécifiquement dans la cellule excrétrice.

Dans le but de comprendre si les chaînes HS sont requises précisément sur SDN-1/syndécan pour réguler le nombre de canaux surnuméraires, nous avons essayé deux stratégies. Premièrement, nous avons exprimé le transgène variant *sdn-1ΔHS*, dont les trois sites d'attachement des chaînes HS (S71, S86 et S214) ont été mutés, et observé que le phénotype de canaux surnuméraires d'animaux mutants *sdn-1(zh20)* n'était pas sauvé. Ces résultats indiquent un rôle important des chaînes HS sur SDN-1/syndécan pour inhiber la formation de canaux surnuméraires. Deuxièmement, j'ai examiné des animaux où deux ou trois des sites

d'attachement des chaînes HS ont été directement édités dans le locus génomique de *sdn-1* par CRISPR/Cas9 (Zhou *et al.*, 2021). La mutation *kr388[sdn-1(S71A,S86A)]*, correspondant à une modification de deux des trois sites d'attachement des chaînes HS, entraîne le défaut de canaux surnuméraires. Ces résultats pointent également vers un rôle important des chaînes HS de SDN-1/syndécan dans l'inhibition de la formation de canaux surnuméraires, ce qui est en concordance avec la littérature (Saied-Santiago *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2021). Le rôle des chaînes HS de SDN-1/syndécan paraît cependant partiel, étant donné que la pénétrance du défaut dans cette souche est plus faible que celle du mutant nul *sdn-1(zh20)*. Étrangement, une autre mutation *kr475[sdn-1(S71A,S86S,S214A)]*, correspondant à la modification des trois sites d'attachement des chaînes HS, n'entraîne pas le défaut de canaux surnuméraires. Contrairement aux résultats obtenus précédemment, cela pointe vers un rôle plutôt minime des chaînes HS dans l'inhibition de la formation de canaux surnuméraires par SDN-1/syndécan.

Il existe plusieurs explications pour les différences entre ces résultats. Tout d'abord, l'expression transgénique de *Pglt-3::sdn-1ΔHS* est faite à partir d'une multitude de copies présentes de la structure extrachromosomique, ce qui résulte en des niveaux d'expression du transgène plutôt éloignés des niveaux physiologiques de l'expression endogène de *sdn-1*. De tels niveaux d'expression pourraient affecter la traduction réelle de SDN-1ΔHS ou encore le trafic et la localisation finale de ce variant à la membrane plasmique. Il pourrait également y avoir des différences dans les niveaux d'expression entre les lignées exprimant *sdn-1(+)* et *sdn-1ΔHS*, ce qui expliquerait pourquoi certaines lignées peuvent sauver le phénotype, mais pas d'autres. Par ailleurs, il y a une différence du site d'expression de la version de *sdn-1ΔHS* dans les deux approches. Le transgène *Pglt-3::sdn-1ΔHS* est exprimé spécifiquement dans la cellule excrétrice (sous le promoteur *Pglt-3*) chez des vers mutants *sdn-1(zh20)* qui sont totalement dépourvus de *sdn-1* (Rhiner *et al.*, 2005), tandis que le variant généré par CRISPR est exprimé depuis son locus génomique dans toutes les cellules exprimant *sdn-1*, qui sont nombreuses (Packer *et al.*, 2019). Il se pourrait alors que, bien que *sdn-1* fonctionne de façon cellule autonome dans ce contexte, il y ait une contribution d'autres cellules, et que le transgène *Pglt-3::sdn-1ΔHS* ne soit pas suffisant pour compenser l'absence de SDN-1/syndécan dans tout l'organisme dans le contexte de l'inhibition de la formation des extensions surnuméraires.

Voici mon hypothèse concernant les différences retrouvées entre l'édition génomique des deux premiers ou des trois sites d'attachement des chaînes HS. Parmi les sites d'attachements canoniques des chaînes HS, les sites de sérines S71 et S86 sont importants pour les rôles que SDN-1/syndécan joue dans la migration des neurones AVM et ALM (Saied-Santiago *et al.*, 2017), ainsi que pour sa localisation à la membrane synaptique des jonctions neuromusculaires (Zhou *et al.*, 2021). Sur la base d'immunobuvardage de SDN-1/syndécan, il a même été suggéré que le site d'attachement S214 pourrait ne pas porter de chaîne HS (Zhou

et al., 2021). D'un autre côté, il a été démontré que chez les mammifères, certaines isoformes de syndécan étaient capable de porter une chaîne CS au niveau des sites d'attachement les plus proches de sa région transmembranaire (Deepa *et al.*, 2004; Gould *et al.*, 1992; Kokenyesi et Bernfield, 1994; Ueno *et al.*, 2001). Chez le ver, ce site correspondrait à la sérine S214 pour SDN-1/syndécan. Nous pourrions alors nous demander si ce site n'est pas capables de porter une chaîne CS chez *C. elegans* et si la perte des sites d'attachement des chaînes HS et CS ait un impact différent sur le contrôle de la formation de canaux surnuméraires. D'autant plus que les vers mutants pour *sqv-5*, l'enzyme responsable de la polymérisation des chaînes CS, montrent aussi le défaut de canaux surnuméraires, signifiant l'importance des chaînes CS dans ce contexte. Qui plus est, la perturbation de la synthèse des chaînes CS par ARNi mène à l'augmentation de la synthèse des chaînes HS (Mizuguchi *et al.*, 2003). On peut alors se demander s'il n'y a pas des mécanismes de compensations entre ces différents types de GAG qui peuvent impacter le rôle des HSPG. Il serait intéressant de savoir si la synthèse des chaînes CS impacte la fonction de SDN-1/syndécan, ou bien d'un autre CSPG. Pour étudier cette hypothèse plus en profondeur, il faudrait comparer par immunobuvardage le poids moléculaire de SDN-1/syndécan sauvage, SDN-1/syndécan traité avec une chondroïtinase (Kokenyesi et Bernfield, 1994), et le variant de SDN-1/syndécan dépourvu de son site d'attachement S214.

La majorité des résultats que nous avons obtenus pointent vers une importance partielle des chaînes HS sur SDN-1/syndécan dans le contexte de la cellule excrétrice, ce qui est concordant avec la littérature dans d'autres contextes. Il est néanmoins difficile de conclure avec certitude sur leur degré d'intervention. Le mutant *sdn-1(ok449)* constitue une délétion dans le cadre de lecture de *sdn-1* qui supprime 69 acides aminés dans la partie du domaine extracellulaire, dont les sites d'attachement S71 et S86 (Minniti *et al.*, 2004). La protéine produite par cet allèle n'est plus détectable par des anticorps dirigés contre des chaînes HS, renforçant l'hypothèse que les celles-ci soient portées par les deux premiers sites d'attachement S71 et S86. Il semble cependant que *sdn-1(ok449)* soit exprimé au même niveau que le gène *sdn-1(+)*, et que la protéine exprimée à partir de cet allèle conserve une partie de ses fonctions, puisqu'on retrouve une phosphorylation de son domaine DEGSY dans certains neurones (Minniti *et al.*, 2004). Dans notre contexte d'étude, l'allèle *sdn-1(ok449)* entraîne le défaut de canaux surnuméraires avec la même pénétrance que l'allèle nul *sdn-1(zh20)*. Si les sites d'attachement des chaînes HS ne sont effectivement que partiellement ou nullement nécessaires à la fonction de SDN-1/syndécan ici, il se peut que la délétion dans l'allèle *sdn-1(ok449)* supprime un autre domaine extracellulaire nécessaire à la fonction de SDN-1/syndécan, ou bien qu'elle affecte sa localisation ou son repliement tout aussi essentiel à sa fonction.

De plus, si les chaînes HS de SDN-1/syndécan sont en effet dispensables à sa fonction, il y a une contradiction avec l'observation d'une pénétrance forte de canaux surnuméraires dans les mutants *rib-1(qm32)* et *rib-2(qm46)*, où la polymérisation des chaînes est altérée. Plusieurs théories pourraient expliquer cela. Premièrement, il se pourrait que la synthèse des chaînes HS soit cruciale pour d'autres HSPG dont la fonction n'a pas pu être mise en évidence dans ces travaux, soit par ce qu'ils ont une fonction redondante avec d'autres HSPG non testés, ou alors sur des protéines qui n'ont pas encore été identifiées comme étant des HSPG. Deuxièmement, Il se pourrait qu'en absence de sites d'attachement des chaînes HS sur SDN-1/syndécan, des mécanismes de compensation interviennent entre SDN-1/syndécan et d'autres HSPG avec des chaînes HS, comme LON-2/glypican, GPN-1/glypican ou UNC-52/perlécan. Pour vérifier cela, on pourrait croiser l'allèle *sdn-1(kr475)* [*sdn-1(S71A, S86S, S214A)*] où les trois sites des chaînes HS ont été mutées dans un fond génétique nul pour *lon-2*, *gpn-1*, et/ou *unc-52(e444)*.

4.4 Différents domaines de SDN-1/syndécan participent à sa fonction dans le mécanisme d'inhibition des extensions surnuméraires

Comme mentionné pour le transgène *Pglt-3::sdn-1ΔHS*, l'approche de sauvetage des mutants *sdn-1(zh20)* par expression de multiples copies des variants de *sdn-1* peut potentiellement poser des problèmes. Toutefois, les résultats présentés ici suggèrent une importance du domaine intracellulaire de SDN-1/syndécan pour la régulation du nombre de canaux (Fig. 3.4C). Pour être plus précis, le domaine FRIRKK ainsi que les tyrosines dans la région variable du domaine intracellulaire de SDN-1/syndécan paraissent nécessaires au sauvetage du défaut de canaux surnuméraires dans le mutant *sdn-1*. À l'inverse, mes résultats indiquent une fonction plutôt accessoire du motif DEGSY, qui est pourtant impliqué dans la régulation du cytosquelette (Granés *et al.*, 2003) et dans la régulation de sous-unités d'intégrines (Morgan *et al.*, 2013). Il en est de même pour le motif EFYA, qui lui est nécessaire pour l'interaction avec des protéines à domaine PDZ (section 1.4.1.3.3).

Pour rappel, le motif R-M-R/K-K-K chez les mammifères est impliqué dans l'endocytose du syndécan SDC-1 (Chen et Williams, 2013) et dans la localisation nucléaire des syndécans (Zong *et al.*, 2009). Afin de confirmer l'implication du motif correspondant et de mieux comprendre le mode d'action de SDN-1/syndécan dans ce contexte, il conviendrait de comparer la localisation des versions sauvages et mutées pour le domaine FRIRKK de SDN-1/syndécan, en suivant une approche d'édition du génome pour muter ce domaine au niveau du locus génomique et faire des analyses à des niveaux physiologiques. Cela permettrait de vérifier que la protéine variante soit bien synthétisée et localisée, mais aussi de savoir si ce motif joue un rôle identique chez *C. elegans* dans le tri, le recyclage ou le transport nucléaire de SDN-1/syndécan, et comment cela impacte la régulation du nombre d'extensions surnuméraires.

Chez les mammifères, la tyrosine de la région variable du syndécan SDC-4 est impliquée dans l'interaction avec la kinase PKC α , qui mène à sa super-activation (Lim *et al.*, 2003). L'interaction entre SDC-4 et la PKC α joue un rôle dans la formation d'adhésions focales (Dovas *et al.*, 2006) et la migration des fibroblastes lors de la cicatrisation (Bass *et al.*, 2007). Pour évaluer le rôle de ces tyrosines dans notre contexte de recherche, nous aurions besoin d'étudier le rôle de l'orthologue de la PKC α chez le nématode, PKC-2. Si PKC-2 est impliqué dans ce mécanisme, l'interaction avec SDN-1/syndécan pourrait être testée par une expérience de capture par affinité (« pull-down » en anglais). L'interaction entre PKC-2 et des versions variantes de SDN-1/syndécan pour lesquelles chacune des trois tyrosines testées ici serait mutée pourrait également être testée, afin de mieux cerner lesquelles sont importantes dans cette interaction. Finalement, des expériences de phosphomimétisme pourraient confirmer le rôle de la phosphorylation sur une ou plusieurs de ces tyrosines dans le recrutement de la PKC-2/PKC α , ainsi que sur le contrôle du nombre d'extensions surnuméraires.

J'ai montré que le domaine extracellulaire de SDN-1/syndécan paraît jouer un rôle dans ce contexte. En effet, l'expression transgénique d'une protéine de fusion entre le domaine intracellulaire de SDN-1/syndécan et les domaines extracellulaires et transmembranaires de NLG-1/neurologine n'ont pas sauvé le défaut de canaux surnuméraires des mutants *sdn-1* (Fig. 3.4C). Il faut prendre en compte que le domaine transmembranaire utilisé dans ce transgène est celui de NLG-1/neurologine, or le domaine transmembranaire de SDN-1/syndécan a l'air d'être important pour la dimérisation des syndécans chez les mammifères (Chen *et al.*, 2021; Dews et Mackenzie, 2007), qui elle-même est nécessaire pour de nombreuses fonctions des syndécans (Jang *et al.*, 2018). Par ailleurs, le fait que la perte d'une partie du domaine extracellulaire de SDN-1/syndécan dans l'allèle *sdn-1(ok449)* (Minniti *et al.*, 2004) induise la même pénétrance que l'allèle nul *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.1E) renforce l'idée que le domaine extracellulaire de SDN-1/syndécan est important dans l'inhibition des extensions surnuméraires. En plus de porter les sites d'attachement des chaînes HS, le domaine extracellulaire des syndécans chez les mammifères peut être à l'origine de fonctions spécifiques. Parmi celles-ci, on retrouve le clivage des syndécans pour agir à distance (Manon-Jensen *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2005), ce qui ne semble pas être le cas dans notre contexte, ou encore l'interaction avec des sous-unités d'intégrines (Multhaupt *et al.*, 2009). L'étude du rôle des intégrines dans le mécanisme d'inhibition des canaux surnuméraires et de leur potentielle interaction avec SDN-1/syndécan dans ce contexte devrait ainsi être explorée – d'autant plus qu'il a été montré que des variations dans les forces mécaniques du milieu peuvent induire la formation d'axones surnuméraires dans les neurones d'hippocampe cultivés en condition *in vitro* (Lamoureux *et al.*, 2002), et que les intégrines représentent un des principaux récepteurs de mécanotransduction (Ross *et al.*, 2013). De plus, les intégrines impactent la localisation de récepteurs de guidage comme UNC-40/DCC (Hagedorn *et al.*, 2009), un autre récepteur que nous avons impliqué dans

ce contexte. Ceci ajoute une interaction possible pour la fine régulation de la mise en place des extensions polarisées.

4.5 LON-2/glypican compense partiellement SDN-1/syndécan

Nous avons montré ici qu'à faible concentration, le transgène *lon-2* ne permet pas de sauver le défaut de canaux surnuméraires des mutants *sdn-1*. En revanche, à forte concentration, l'expression de *lon-2* dans la cellule excrétrice compense la perte de *sdn-1* pour réguler le nombre de canaux et sauver le défaut de canaux surnuméraires. En effet, lorsqu'un transgène pour exprimer *lon-2*/glypican (sous le contrôle du promoteur *Pglt-3*) est injecté à une concentration 250 fois plus grande que celle utilisée pour le sauvetage de *sdn-1(zh20)* par *sdn-1(+)*, *lon-2(+)* supprime aussi bien le phénotype de canaux surnuméraires que ce sauvetage (Fig. 3.3C). De plus, la capacité de *lon-2(+)* à compenser pour la perte de *sdn-1* dans l'inhibition des canaux surnuméraires paraît nécessiter la présence des chaînes HS. En effet, même à forte concentration d'injection, le transgène codant pour le variant *lon-2ΔHS* est incapable de supprimer les canaux surnuméraires des mutants *sdn-1(zh20)*. Même à forte concentration, l'expression de l'autre gène de glypican, *gpn-1*, supprime partiellement les défauts de canaux surnuméraires des mutants *sdn-1(zh20)*, signifiant que *gpn-1* compense moins bien la perte de *sdn-1* que ne peut le faire *lon-2* (Fig. 3.3D).

Les mutants *lon-2(e678)* et *gpn-1(tm595)* induisent très faiblement le défaut de canaux surnuméraires, mais aucune redondance entre la fonction de ces gènes et celle de *sdn-1* n'a été mise en évidence par nos analyses génétiques de double et triple perte de fonction (Fig. 3.1F). Nous remarquons cependant que lors de la mise en place des canaux, c'est le gène *sdn-1* qui produit le plus de transcrits parmi les gènes classiques des HSPG (à partir de 500 min de développement embryonnaire, Fig. A.1B). La plus forte expression de *sdn-1* à cette étape du développement de la cellule excrétrice pourrait alors offrir une piste d'explication à son rôle central dans l'inhibition des canaux surnuméraires, comparé à celui de *lon-2* et de *gpn-1*. En effet, il se pourrait que LON-2/glypican et GPN-1/glypican possèdent des fonctions redondantes à celle de SDN-1/syndécan, mais qu'au moment de la formation des canaux, *sdn-1* soit le plus exprimé et ainsi responsable d'inhiber la formation d'extensions surnuméraires.

Chez la drosophile, l'expression de *dlp/glypican* peut partiellement sauver les défauts retrouvés chez les mutants de *sdn/syndécan*, comme démontré dans le contexte du guidage axonal médié par la voie Slit/SLT-1 le long de la ligne médiane chez les embryons (Johnson *et al.*, 2004). Selon les auteurs, l'expression de *Sdc/syndécan* sauverait mieux les défauts de guidage que celle de *Dlp/glypican*, potentiellement grâce à sa partie intracellulaire, qui posséderait une fonction modulatrice plus fine. Évaluer la capacité de sauvetage de la partie extracellulaire de LON-2/glypican fusionnée aux domaines transmembranaire et intracellulaire

de SDN-1/syndécan pourrait apporter un premier élément de réponse sur l'interchangeabilité des domaines extracellulaires des HSPG dans ce contexte.

Bien que notre analyse génétique n'ait pas révélé de redondance entre les HSPG codés par les gènes *sdn-1*, *lon-2* et *gpn-1* (Fig. 3.1F), nous envisageons une fonction au moins partiellement compensatoire de LON-2/glypican et GPN-1/glypican dans la régulation du nombre d'extensions surnuméraires. De plus, la fonction compensatoire de LON-2/glypican semble reposer sur la présence des chaînes HS. Ces résultats rappellent la redondance observée entre SDN-1/syndécan et LON-2/glypican ou GPN-1/glypican dans la migration des neurones ALM (Saied-Santiago *et al.*, 2017), dans le guidage des motoneurones (Gysi *et al.*, 2013) ainsi que dans le branchement des neurones AIY (Díaz-Balzac *et al.*, 2014; Schwieterman *et al.*, 2016).

4.6 Les récepteurs de guidage UNC-5/Unc5 et UNC-40/DCC inhibent aussi la formation de canaux surnuméraires

Au cours de ces travaux, il a été montré que les allèles de perte de fonction affectant les gènes de *unc-6* et des récepteurs *unc-40* et *unc-5* induisent des canaux surnuméraires (Fig. 3.5C). On en déduit que le signal de guidage UNC-6/Nétrine et ses récepteurs principaux sont impliqués dans l'inhibition de la formation des canaux surnuméraires.

4.6.1 Interaction entre UNC-5/Unc5 et SDN-1/syndécan

L'analyse génétique du double mutant nul *unc-5(e53); sdn-1(zh20)* met en évidence que le récepteur UNC-5/Unc5 agit ici dans la même voie que SDN-1/syndécan (Fig. 3.5D). De plus, l'expression de la partie intracellulaire MYR::UNC-5, considérée comme constitutivement active (Norris *et al.*, 2014) dans la cellule excrétrice d'animaux mutants *sdn-1(zh20)*, permet de supprimer partiellement les défauts de canaux surnuméraires (Fig. 3.6A). Cela confirme que UNC-5/Unc5 inhibe la formation d'extensions surnuméraires, ce qui pourrait se rapprocher du rôle qu'il joue dans l'inhibition des protrusions de cônes de croissance (Norris et Lundquist, 2011; Norris *et al.*, 2014). Mais cela nous renseigne surtout sur la hiérarchie de UNC-5/Unc5 qui pourrait alors agir en aval de SDN-1/syndécan dans ce mécanisme. En effet, si le récepteur UNC-5/Unc5 agissait en amont de SDN-1/syndécan, l'activation de sa signalisation en aval n'aurait aucun impact sur le défaut de canaux surnuméraires chez les mutants *sdn-1(zh20)*. Bien que des hypothèses de l'interaction entre SDN-1/syndécan et la voie de guidage de UNC-6/Nétrine aient déjà été formulées (Gysi *et al.*, 2013; Schwabiuk *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2021), nous apportons ici pour la première fois de réelles preuves d'une interaction génétique entre le récepteur de guidage UNC-5/Unc5 et cet HSPG.

4.6.2 Interaction entre UNC-40/DCC et SDN-1/syndécan

Par ailleurs, nous avons testé l'interaction génétique de *unc-40* avec *sdn-1* dans la régulation du nombre de canaux. La pénétrance du double mutant nul *unc-40(e1430); sdn-1(zh20)* (Fig. 3.5D) n'est pas significativement différente de celle du plus pénétrant des deux simples mutants, à savoir *sdn-1(zh20)*. Ceci pourrait suggérer que UNC-40/DCC et SDN-1/syndécan agissent dans la même voie pour inhiber la formation d'extensions surnuméraires. Cependant, la faible pénétrance du mutant nul *unc-40(e1430)* complexifie l'interprétation des résultats. Par exemple, il pourrait être difficile de montrer une différence significative entre un effet additif de la pénétrance des simples mutants et son absence. Toutefois, l'expression de MYR::UNC-40 dans la cellule excrétrice s'avère suffisante à induire l'inhibition partielle de la formation de ces canaux surnuméraires des mutants *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.6B), alors que dans la cellule excrétrice chez les animaux sauvages, ce même transgène n'impacte pas le nombre de canaux. La région intracellulaire de UNC-40/DCC seule semble suffisante pour inhiber le développement d'extensions surnuméraires depuis la cellule excrétrice via une voie commune à celle de SDN-1/syndécan. De plus, UNC-40 semble agir en aval de SDN-1/syndécan dans cette voie de contrôle du nombre de canaux; toutefois, des expériences supplémentaires pourraient conforter cette hypothèse et prouver l'interaction des deux protéines.

4.6.3 Interaction entre UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5

Étant donné l'implication des récepteurs UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 dans ce contexte, nous avons étudié leur interaction génétique. Le double mutant *unc-40(e1430); unc-5(e53)* se comporte comme le plus sévère des deux simples mutants, soit *unc-5* (Fig. 3.5C). Bien que ce résultat soit compatible avec la notion que UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 agissent conjointement lors de l'inhibition des canaux surnuméraires, nous ne pouvons pas l'affirmer avec certitude, car, encore une fois, la faible pénétrance du défaut de canaux surnuméraires dans le mutant *unc-40(e1430)* complexifie l'interprétation de l'analyse génétique.

L'utilisation des récepteurs constitutivement actifs MYR::UNC-40 et MYR::UNC-5 nous ont tout de même permis de mieux comprendre cette interaction. Pour rappel, l'expression de la partie intracellulaire MYR::UNC-5, considérée comme constitutivement active (Norris *et al.*, 2014), dans la cellule excrétrice d'animaux mutants *sdn-1(zh20)* supprime partiellement les défauts de canaux surnuméraires. Ici, la capacité du transgène MYR::UNC-5 à supprimer le phénotype de canaux surnuméraires est abolie par la perte du gène *unc-40* dans le double mutant *unc-40(e1430); sdn-1(zh20)* (Fig. 3.6A). Cela signifie que la signalisation de UNC-5/Unc5 requiert UNC-40/DCC pour pouvoir inhiber le développement de canaux surnuméraires. De nombreuses évidences montrent la coopération entre UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 pour induire une réponse répulsive au signal de guidage UNC-6/Nétrine (Chilton, 2006; Finci *et al.*, 2014; Gysi *et al.*, 2013; Hedgecock *et al.*, 1990; Leung-Hagesteijn *et al.*, 1992) et dénotent un rôle similaire de leur

interaction dans l'inhibition de la protrusivité du cône axonal (Gujar *et al.*, 2018; Norris et Lundquist, 2011; Norris *et al.*, 2014). À l'inverse, nous avons observé que l'expression du transgène MYR::UNC-40 supprime des canaux surnuméraires tant chez les simples mutants *unc-5(e53)* que chez les doubles mutants *sdn-1(zh20); unc-5(e53)* (Fig. 3.6B). Nous gardons à l'esprit les limitations et variabilités issues de l'expression tissu-spécifique de nombreuses copies de ces transgènes qui pourraient en partie expliquer l'incapacité de MYR::UNC-5 à supprimer le défaut de canaux surnuméraires en absence de *unc-40*. Il faudrait confirmer ces résultats en utilisant des méthodes permettant de se rapprocher des niveaux physiologiques, comme les techniques d'insertion d'une copie unique (Frokjaer-Jensen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2023; Nonet, 2023). Il est toutefois surprenant que dans notre contexte d'étude, MYR::UNC-40 inhibe la formation des canaux surnuméraires d'une manière indépendante de UNC-5/Unc5. En effet, dans un contexte neuronal, MYR::UNC-40 peut inhiber la protrusion du cône de croissance des motoneurones VD, mais en interagissant génétiquement avec UNC-5/Unc5 (Norris et Lundquist, 2011). Ou alors, MYR::UNC-40 peut agir indépendamment de UNC-5/Unc5, mais pour induire plutôt un excès de la croissance axonale dans les neurones AVM (Gitai *et al.*, 2003). Nous renforçons alors ici l'idée que ces récepteurs aient des fonctions plus complexes que simplement attractives ou répulsives. Le modèle déterministe attribuant une fonction intrinsèque à ces récepteurs ne paraît donc plus convenir et nous confirmons ici la nécessité de définir des modèles plus élaborés pour essayer de mieux les caractériser en fonction de leur contexte (Limerick *et al.*, 2018).

Nous avons finalement montré que l'expression conjointe de MYR::UNC-40 et MYR::UNC-5 dans la cellule excrétrice d'animaux mutants *sdn-1(zh20)* supprime le phénotype de canaux surnuméraires (Fig. 3.6C). Cette suppression n'est pas significativement différente de celle induite par l'expression seule de MYR::UNC-40 chez ce mutant, ce qui pourrait pointer vers une action conjointe de ces récepteurs dans la voie. Cependant, les niveaux d'expression des transgènes peuvent beaucoup varier d'une lignée à l'autre, ce qui pourrait fausser l'interprétation de ces résultats. Une option serait de faire des intégrations de copie unique des construits *Pglt-3::myr::unc-5* et *Pglt-3::myr::unc-40* (Frokjaer-Jensen *et al.*, 2008), puis de construire une souche qui contient ces deux intégrations. De cette manière, en plus d'être plus proches des conditions physiologiques, les niveaux d'expression de ces récepteurs seraient invariants entre les simples et le double intégrant.

4.6.4 Questions et perspectives sur le rôle des molécules de guidage dans la régulation de la formation de canaux de la cellule excrétrice

De nombreuses *questions* subsistent encore sur le fonctionnement de ces récepteurs dans le contexte de la régulation du nombre d'extensions polarisées lors du développement cellulaire.

Le signal de guidage UNC-6/Nétrine est-il important dans la fonction des récepteurs UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 sur ce mécanisme, ou d'autres signaux pourraient-ils entrer en ligne de compte ? Il faudra premièrement analyser les doubles mutants *unc-6; unc-5* et *unc-6; unc-40*. Ensuite, il faudra confirmer le rôle de UNC-6/Nétrine sur ces récepteurs dans l'inhibition de la formation de canaux surnuméraires. Une telle interaction pourrait être étudiée par l'utilisation d'allèles qui impactent directement la capacité des récepteurs à se lier entre eux ou avec le signal UNC-6/Nétrine (Priest *et al.*, 2024). Mais il a également été rapporté que UNC-40/DCC possède des fonctions indépendantes du signal UNC-6/Nétrine (Alexander *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 1996; Honigberg et Kenyon, 2000; Kim *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2002). En parallèle, UNC-5 pourrait posséder des fonctions via son interaction avec d'autres ligands comme PXN-1 (Nawrocka *et al.*, 2024). Si UNC-6/Nétrine n'agissait pas sur ces récepteurs pour réguler le nombre de canaux dans la cellule, il faudrait alors explorer plus en profondeur ces voies alternatives.

Comment SDN-1/syndécan, UNC-5/Unc5 et UNC-40/DCC interagissent pour réguler la formation des extensions polarisées ? Les HSPG étant des co-récepteurs de voies de guidage, SDN-1/syndécan pourrait moduler l'interaction des récepteurs UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 entre eux ou avec leur ligand afin d'inhiber la formation d'extensions surnuméraires. Comme mentionné précédemment (section 1.4.2.3), UNC-6/Nétrine, UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 sont capables d'interagir avec l'héparine (Bennett *et al.*, 1997; Geisbrecht *et al.*, 2003; Priest *et al.*, 2024), un composé semblable aux chaînes HS des HSPG. Il a été suggéré à plusieurs reprises que les HSPG pourraient réguler les dynamiques d'interaction de UNC-6/Nétrine avec ses récepteurs et de favoriser certains complexes plutôt que d'autres (Finci *et al.*, 2014; Meijers *et al.*, 2020; Priest *et al.*, 2024). Les HSPG chez les souris (Matsumoto *et al.*, 2007) et glypican en particulier chez le ver (Blanchette *et al.*, 2015) rentrent en jeu dans la voie de guidage de UNC-6/Nétrine avec son récepteur UNC-40/DCC lors du guidage axonal. Cependant, jamais une interaction n'a été réellement observée entre syndécan et cette voie. Étudier la potentielle interaction physique entre SDN-1/syndécan et les récepteurs de guidage UNC-40/DCC ou UNC-5/Unc5, par transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) ou bien par technique de co-immunoprécipitation, permettrait d'établir pour la première fois une telle relation et une meilleure compréhension du mode d'action de syndécan.

D'un autre côté, le contrôle de la localisation des récepteurs de guidage ou leur présence à la membrane joue aussi un rôle primordial lors de la morphogénèse de cellules polarisées. La localisation de tels récepteurs impacte la migration neuronale (Nguyen *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2015; Niftullayev et Lamarche-Vane, 2019) ainsi que la mise en place d'axones et de leur guidage (Adler *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2013; Norris et Lundquist, 2011; Xu *et al.*, 2009). C'est plus précisément la localisation du récepteur

UNC-40 qui détermine la mise en place d'un axone dans le neurone HSN, et elle peut être affectée par de nombreux facteurs (Limerick *et al.*, 2018; Tang et Wadsworth, 2014; Yang *et al.*, 2014). SDN-1/syndécan pourrait alors réguler la fonction de ces récepteurs en modulant leur localisation dans la cellule (Fig. 4.1B). Il serait intéressant d'étudier la localisation des récepteurs UNC-5/Unc5 et UNC-40/DCC lors du développement de la cellule excrétrice ainsi que l'impact de la perte de *sdn-1* sur cette localisation. Dans cette optique, la génération de transgènes *Pglt-3::sdn-1::mScarlet* et *Pglt-3::unc-40::gfp* stables par intégration dans le génome (Noma et Jin, 2018) est en cours au laboratoire afin de pouvoir étudier leur localisation relative en condition sauvage.

Comment les récepteurs UNC-5/Unc5 et UNC-40/DCC inhibent-ils la formation de canaux surnuméraires ?

Lors du guidage axonal, les récepteurs de guidage UNC-5/Unc5 et UNC-40/DCC réorganisent le cytosquelette pour orienter la progression du bord de croissance. Pour ce faire, une des voies les plus importantes de ces récepteurs est l'activation des Rho GTPases telles que CED-10/Rac1 ou MIG-2/RhoG (Demarco *et al.*, 2012; Gitai *et al.*, 2003; Niftullayev et Lamarche-Vane, 2019; Reiner et Lundquist, 2018). Cette voie est également activée lors de processus de guidage de la migration neuronale ou même de cellules non neuronales, comme la cellule distale de la gonade (Shakir *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2000). Nous avons mis en évidence l'implication de ces Rho GTPases dans la régulation du nombre de canaux dans la cellule excrétrice, que je discute plus loin dans ce chapitre. Il faudra donc s'assurer que les Rho GTPases agissent bien avec les récepteurs de guidage dans ce contexte, étant donné qu'il pourrait y avoir des hypothèses alternatives. En effet, il a été démontré que les récepteurs de guidage peuvent affecter le cytosquelette en agissant sur d'autres régulateurs que les Rho GTPases. Par exemple, le récepteur UNC-5/Unc5 contrôle la protrusivité au cône de croissance via au moins trois voies indépendantes. Celles-ci comprennent les flavines mono-oxygénases capables de déstabiliser l'actine filamenteuse, UNC-33/CRMP, qui inhibe la pénétration des microtubules à extrémité positive vers le domaine périphérique, et finalement TOM-1/Tomosyne, qui peut inhiber la formation du complexe SNARE responsable de la fusion vésiculaire (Mahadik et Lundquist, 2023b). Il existe donc des pistes alternatives à explorer, si une indépendance est montrée entre les récepteurs de guidage et les Rho GTPases dans l'inhibition des canaux surnuméraires.

Est-ce que les isoformes du récepteur UNC-5/Unc5 ont des fonctions spécifiques dans l'inhibition de la formation de canaux surnuméraires ?

L'allèle que nous avons utilisé, *unc-5(e53)*, compte parmi des allèles les plus communément utilisés pour l'étude de UNC-5/Unc5, et impacte toutes les isoformes de *unc-5*. Il a cependant été rapporté que l'isoforme la plus courte, UNC-5B, joue un rôle en faveur de la protrusion dans le cône de croissance des neurones GABAergiques VD et DD, contrairement aux isoformes longues (Mahadik et Lundquist, 2023a). Il serait alors intéressant d'étudier l'impact de l'allèle *unc-5(lq190)* qui

affecte supposément uniquement l'isoforme UNC-5B, pour mieux comprendre les divers rôles de ce récepteur.

Comment MYR::UNC-40 régule le nombre de canaux en dehors de son interaction avec UNC-5/Unc5 ? Plusieurs pistes pourraient être explorées. Premièrement, MYR::UNC-40 pourrait dimériser avec la partie intracellulaire d'un autre UNC-40/DCC endogène (Gitai *et al.*, 2003). L'introduction d'un mutant nul pour *unc-40* ne semble pas affecter l'effet de MYR::UNC-40 sur la protrusion du cône de croissance des neurones VD (Norris et Lundquist, 2011). On peut alors se demander si MYR::UNC-40 peut interagir avec d'autres récepteurs ou interacteurs intracellulaires encore inconnus ou moins bien caractérisés. Par exemple, le récepteur couplé à une protéine G FMIL-1 (Nawrocka *et al.*, 2024) et le récepteur de guidage SAX-3/Robo (Su *et al.*, 2024; Yu *et al.*, 2002) sont capables d'interagir physiquement avec le récepteur UNC-40/DCC dans d'autres contextes. MYR::UNC-40 pourrait aussi ne pas nécessiter d'interagir avec un autre récepteur pour inhiber la formation de canaux surnuméraires. Évaluer la déplétion de ces interacteurs potentiels sur la capacité de MYR::UNC-40 à supprimer le défaut de canaux surnuméraires dans le mutant *sdn-1(zh20)* permettra toutefois de mieux comprendre son mode d'action dans ce contexte.

Quelle importance possède le domaine intracellulaire dans la régulation de la fonction des récepteurs de guidage? La partie intracellulaire des récepteurs UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 est potentiellement la partie nécessaire pour induire leur activité (Gitai *et al.*, 2003; Norris *et al.*, 2014), mais leur partie extracellulaire permet la fine régulation de cette activité. Par exemple, c'est la partie extracellulaire du récepteur UNC-5/Unc5 qui peut interagir avec l'héparine pour moduler sa réponse en fonction du contexte cellulaire (Priest *et al.*, 2024). Par ailleurs, la Nétrine interagit avec les récepteurs UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 au niveau de leur domaine extracellulaire (Finci *et al.*, 2014; Priest *et al.*, 2024) – une multimérisation qui passe par ces interactions extracellulaires serait alors possible. On se demande si les récepteurs myristoylés reflètent réellement leur activation dans ce contexte, et s'ils montrent toutes les fines spécificités de leur fonction. Par ailleurs, le double mutant nul *unc-40(e1430); unc-5(e53)* induit le défaut de canaux surnuméraires avec une plus faible pénétrance que le mutant *sdn-1(zh20)* seul. De plus, l'expression conjointe de MYR::UNC-5 et de MYR::UNC-40 ne supprime que partiellement les défauts de canaux surnuméraires développés chez les animaux mutants *sdn-1(zh20)*. Bien que ce dernier résultat puisse en partie être expliqué par les niveaux d'expression variables entre les transgènes, SDN-1/syndécan pourrait contrôler une ou plusieurs autres voies en parallèle des récepteurs de guidage UNC-5/Unc5 et UNC-40/DCC pour inhiber la formation de canaux surnuméraires. Par exemple, le récepteur SAX-3/Robo, ou d'autres interacteurs encore non identifiés seraient des pistes à approfondir. Un crible non biaisé pour des interacteurs physiques, basé sur la technique

de TurboID (Branon *et al.*, 2018), est en cours de mise au point au laboratoire afin de trouver de nouvelles cibles d'interaction avec SDN-1/syndécan.

4.7 Le récepteur SAX-3/Robo semble agir avec SDN-1/syndécan pour réguler le nombre de canaux dans la cellule excrétrice

Nos résultats montrent que le ligand de guidage SLT-1/Slit ne jouerait pas de rôle dans l'inhibition des canaux surnuméraires, ou alors qu'il serait fortement redondant avec une voie indépendante de SDN-1/syndécan et de UNC-6/Nétrine. Le mutant simple *slt-1(eh15)* n'entraîne pas de défaut de canaux surnuméraires, et les doubles *slt-1(eh15) sdn-1(zh20)* et *slt-1(eh15) unc-6(ev400)* ne montrent pas d'aggravation des défauts, comparé au mutant simple *sdn-1(zh20)* et *unc-6(ev400)* respectivement (Fig. 3.5E). En revanche, une perte de fonction du récepteur principal de SLT-1/Slit avec l'allèle *sax-3(ky123)* induit le défaut de canaux surnuméraires avec une forte pénétrance (Fig. 3.5E), impliquant ce récepteur dans le mécanisme de contrôle du nombre de canaux. D'autre part, le mutant *eva-1(ok1133)*, supposé nul (Chan *et al.*, 2014; Rella *et al.*, 2021), n'affecte pas le nombre de canaux (Fig. 3.5E). EVA-1/EVA-1C est un autre récepteur canonique de SLT-1/Slit et il y a de nombreux transcrits de *eva-1* lors du développement de la cellule excrétrice ((Packer *et al.*, 2019), Fig. A.3A). On peut alors supposer que ce récepteur soit impliqué dans d'autres processus que la régulation du nombre de canaux lors du développement de la cellule excrétrice. Il a en effet été démontré que SLT-1/Slit, SAX-3/Robo et EVA-1/EVA1C collaborent pour réguler la croissance longitudinale des canaux (Marcus-Gueret *et al.*, 2012). En plus d'apporter de la spécificité sur le rôle de ces protéines, nous remarquons ici que SLT-1/Slit et EVA-1/EVA1C sont impliqués dans la croissance des canaux, mais pas dans l'inhibition de la formation d'extensions cellulaires pour en réguler le nombre, signifiant que ces deux mécanismes sont distincts et indépendants. De plus, EVA-1/EVA1C semble servir à spécifier la fonction du récepteur SAX-3/Robo dans une réponse au signal de guidage SLT-1/Slit (Fujisawa *et al.*, 2007). Ici, le fait que ni le signal SLT-1/Slit ni EVA-1/EVA1C n'affectent le nombre de canaux va dans le sens d'une fonction de SAX-3/Robo indépendante de ce signal de guidage.

Des rôles de SAX-3/Robo indépendant du signal SLT-1/Slit ont déjà été rapportés lors du guidage axonal de neurones (Fujisawa *et al.*, 2007; Hao *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2015) sans qu'on sache réellement si ces rôles sont dépendants d'un autre signal de guidage ou indépendants d'un ligand extracellulaire. Comment SAX-3/Robo peut contrôler le nombre de canaux dans la cellule excrétrice sans être activé par son ligand SLT-1/Slit serait intéressant à étudier. Une des pistes potentielles est l'interaction que SAX-3/Robo pourrait avoir avec le récepteur UNC-40/DCC, lui aussi impliqué dans ce mécanisme. En absence du signal SLT-1/Slit, SAX-3/Robo peut inhiber la signalisation en aval du récepteur UNC-40/DCC lors du guidage axonal

du neurone AVM (Fujisawa *et al.*, 2007). Dans les neurones HSN, SAX-3/Robo et UNC-40/DCC peuvent interagir physiquement avec le signal SYD-1/SYDE2 pour induire l'activation du cytosquelette nécessaire au guidage de l'axone (Xu *et al.*, 2015). Lors du guidage neuronal, SAX-3/Robo peut même interagir physiquement avec UNC-40/DCC et le régulateur du cytosquelette UNC-34/Enabled, pour médier une réponse indépendante du signal UNC-6/Nétrine (Yu *et al.*, 2002). De plus, SAX-3/Robo impacte la localisation des récepteurs UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5 pendant le guidage neuronal (Limerick *et al.*, 2018; Tang et Wadsworth, 2014). Tout cela renforce l'intérêt d'étudier les relations génétiques, physiques ou spatiales entre le récepteur SAX-3/Robo et les récepteurs UNC-40/DCC ou UNC-5/Unc5 dans l'inhibition de la formation d'extensions surnuméraires dans des cellules polarisées.

Le double mutant *sax-3(ky123); sdn-1(zh20)* n'entraîne pas significativement plus de canaux surnuméraires que le plus pénétrant des deux mutants, c'est-à-dire *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.5E). Il semble alors que SAX-3/Robo et SDN-1/syndécan agissent dans une voie commune pour réguler le nombre de canaux dans la cellule excrétrice. Il faut cependant garder à l'esprit que l'allèle *sax-3(ky123)* n'entraîne qu'une perte de fonction partielle de la protéine, mais mène quand même à une très forte létalité embryonnaire (Zallen *et al.*, 1999). Il se pourrait donc que les animaux portant cet allèle conservent une fonction résiduelle de SAX-3/Robo, capable de couvrir la partie indépendante de cette protéine dans ce processus. Chez la drosophile et chez *C. elegans*, syndécan/SDN-1 peut moduler le rôle de Robo/SAX-3 en réponse à son signal de guidage Slit/SLT-1. Plus précisément, SDC/syndécan peut moduler la distribution du signal Slit/SLT-1 et interagir physiquement avec le récepteur Robo/SAX-3 pour réguler cette voie (Johnson *et al.*, 2004; Steigemann *et al.*, 2004). Chez *C. elegans*, SDN-1/syndécan intervient également dans la voie de SLT-1/Slit et de son récepteur SAX-3/Robo pour réguler le guidage de plusieurs neurones (Blanchette *et al.*, 2015; Rhiner *et al.*, 2005). Ici, nous mettons en évidence une probable interaction entre SDN-1/syndécan et le récepteur SAX-3/Robo pour réguler le nombre d'extensions mises en place dans une cellule polarisée d'une manière indépendante de son signal de guidage classique, SLT-1/Slit. La coopération de SAX-3/Robo et SDN-1/syndécan restera à être confirmée par différentes approches. D'un point de vue génétique, une déplétion tissu-spécifique de SAX-3/Robo pourrait permettre de surpasser la létalité embryonnaire et ainsi d'analyser la perte totale de SAX-3/Robo dans un mutant *sdn-1(zh20)*. Comme pour les récepteurs de la Nétrine, suivre la localisation de SAX-3/Robo lors du développement de la cellule excrétrice permettra de savoir si ces molécules peuvent interagir. Une possible interaction physique entre SAX-3/Robo et SDN-1/syndécan pourrait être indiquée par le crible de TurboID (Branon *et al.*, 2018) en cours de développement, ou bien évaluée plus en profondeur grâce à Alphafold2 (Jumper *et al.*, 2021) et des expériences de co-immunoprécipitation.

4.8 Rôle des Rho GTPases dans la régulation des canaux surnuméraires

4.8.1 MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 : Un rôle cellule autonome qui intervient dans la formation des extensions surnuméraires

Avec ces travaux, nous montrons que les Rho GTPases interviennent dans la régulation du nombre d'extensions dans la cellule excrétrice. Aucun des mutants affectant *mig-2* n'entraîne significativement le défaut de canaux surnuméraires, qu'il s'agisse de gain ou de perte de fonction (Fig. 3.7B). Nous rapportons cependant que la perte de *mig-2* dans le double mutant nul *sdn-1(zh20) mig-2(mu28)* provoque une suppression partielle du défaut de canaux surnuméraires, comparé au mutant simple *sdn-1(zh20)*. On peut voir cette suppression disparaître lorsqu'on exprime l'ADN complémentaire de l'isoforme a de *mig-2(+)* dans la cellule excrétrice (Fig. 3.7B). Ces résultats définissent un rôle de la Rho GTPase MIG-2/RhoG dans la formation des extensions surnuméraires qui se développent suite à la perte de *sdn-1*. De plus, nous montrons ici que MIG-2/RhoG agit de manière cellule autonome dans ce processus biologique, c'est-à-dire depuis la cellule dans laquelle il est exprimé.

Identiquement, les mutants de *ced-10* n'induisent pas le phénotype de canaux surnuméraires (Fig. 3.8B), à l'exception de l'allèle *ced-10(n3246)* auquel je reviendrai plus tard. La perte de fonction de *ced-10(n1993)* supprime aussi partiellement le défaut de canaux surnuméraires dans le double mutant *ced-10(n1993); sdn-1(zh20)*. Cette suppression disparaît suite à l'expression de l'ADN complémentaire de l'isoforme b de *ced-10(+)* depuis la cellule excrétrice (Fig. 3.8B). CED-10/Rac1 possède donc une fonction identique à MIG-2/RhoG dans ce contexte, c'est-à-dire d'être impliqué dans la formation des extensions surnuméraires se développant chez le mutant *sdn-1(zh20)* en agissant de manière cellule autonome. La létalité engendrée par la perte totale de *ced-10* nous a obligé à utiliser le mutant *ced-10(n1993)*. Pour rappel, la mutation présente dans l'allèle *ced-10(n1993)* affecte le site de prénylation qui impacte la localisation membranaire de la Rho GTPase (Norgaard *et al.*, 2018). La localisation de CED-10/Rac1 à la membrane paraît alors nécessaire à son bon fonctionnement pour promouvoir la réorganisation du cytosquelette nécessaire au développement de ces extensions surnuméraires.

4.8.2 MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 : Une nécessité d'alterner entre l'état actif et inactif pour fonctionner correctement

L'utilisation d'allèles entraînant l'activation constitutive des Rho GTPases nous a permis de mieux comprendre leur mode de fonctionnement ainsi que leur hiérarchie par rapport à SDN-1/syndécan lors de la formation des extensions surnuméraires. Les modifications présentes dans les Rho GTPases MIG-2(G16E) (produite par l'allèle *mig-2(gm103)*) et CED-10(G12V) inhibent l'activité GTPasique de ces interrupteurs moléculaires, les bloquant ainsi dans leur conformation dite active, c'est-à-dire liée à du GTP (Alan *et al.*,

2013). L'expression de MIG-2(G16E) ou CED-10(G12V) dans la cellule excrétrice de doubles mutants *mig-2(mu28) sdn-1(zh20)* ou *ced-10(n1993); sdn-1(zh20)* respectivement, ne permet pas de sauver la suppression du défaut de canaux surnuméraires aussi bien que le peuvent les copies sauvages *mig-2(+)* et *ced-10(+)* (Fig. 3.7B et 3.8B). Il se pourrait alors que la forme constitutivement active de ces Rho GTPases ne soit pas capable de pleinement endosser leur rôle dans la régulation du nombre de canaux. À plusieurs reprises, la nécessité des Rho GTPases à pouvoir alterner entre leur forme active et inactive pour pouvoir fonctionner correctement a été soulevée (Kawauchi, 2003; Takano *et al.*, 2015; Zipkin *et al.*, 1997).

Encore une fois, les différences de capacité de sauvetage de la suppression du défaut de canaux surnuméraires entre la version sauvage ou constitutivement active des Rho GTPases CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG pourraient être dues à la variabilité d'expression des transgènes et à leur niveau non physiologique. Cependant, l'allèle *ced-10(knu268)* combiné au mutant *sdn-1(zh20)* augmente fortement la pénétrance du défaut de canaux surnuméraires, alors qu'il n'entraîne pas ce défaut seul (Fig. 3.8B). Pour rappel, l'allèle *ced-10(knu268)* est produit par une substitution dans la région switch 1 et induit un excès de liaison de GTP, provoquant non pas une activation constitutive de la protéine, mais la capacité d'auto-activation, appelée également activation spontanée (Davis *et al.*, 2013; Norgaard *et al.*, 2018). Les conséquences de cette mutation font que la RhoGTPase varie bien plus entre ses états d'activation et d'inactivation, et ne reste pas bloquée dans un seul état. Ces résultats confirment notre hypothèse que pour réguler la formation de canaux surnuméraires, la Rho GTPase CED-10/Rac1 a besoin de pouvoir alterner entre son état d'activation et d'inactivation. De plus, étant donné que l'activation spontanée de CED-10/Rac1 n'entraîne pas de canaux surnuméraires en présence de la fonction normale de SDN-1/syndécan, on pense que SDN-1/syndécan vient réguler des cibles en aval de CED-10/Rac1 de manière à inhiber son activité procroissance dans la cellule excrétrice. En lien avec ceci, il est intéressant de noter que lors de la différenciation musculaire chez l'humain, syndécan-4 peut également inhiber l'activité de Rac1 (Szabo *et al.*, 2022). À l'heure actuelle, aucune mutation correspondante entraînant l'activation spontanée de MIG-2/RhoG n'a été identifiée. Caractériser les Rho GEF régulant l'activité de cette GTPase (que je traite plus loin) et étudier l'effet de leur modulation sur le rôle de MIG-2/RhoG permettra de s'assurer d'un besoin d'être activé et inactivé pour fonctionner dans ce contexte.

4.8.3 L'allèle *ced-10(n3246)* entraîne un gain de fonction de CED-10/Rac1 dans le contrôle du nombre de canaux

Sachant que CED-10/Rac1 est impliqué dans la formation des extensions surnuméraires dans la cellule excrétrice, nous pouvons mieux comprendre l'effet de l'allèle *ced-10(n3246)*. Comme spécifié précédemment, l'allèle *ced-10(n3246)* induit une perte de fonction pour CED-10/Rac1 dans certains

contextes (Moody *et al.*, 2024; Quinn *et al.*, 2008; Reddien et Horvitz, 2000) mais un gain de fonction dans d'autres (Locke *et al.*, 2009; Shakir *et al.*, 2006). Dans notre cas, l'allèle *ced-10(n3246)* est le seul allèle simple de *ced-10* à induire le phénotype de canaux surnuméraires (Fig. 3.8B). En comparaison, aucun des allèles provoquant une perte de fonction, qu'elle soit partielle ou totale, ou même des formes dites constitutivement active et spontanément active de CED-10/Rac1 n'entraîne le défaut. Il semble donc que l'allèle *ced-10(n3246)* entraîne un gain de fonction de la Rho GTPase qui agirait potentiellement sur d'autres aspects que son activation. Contrairement aux autres, cette forme de CED-10/Rac1 pourrait contourner l'inhibition faite par la fonction normale de SDN-1/syndécan sur la formation de canaux surnuméraires. On pourrait alors se demander si ce variant de protéine est capable d'interagir avec des partenaires dont la version sauvage de CED-10/Rac-1 ne serait pas capable d'interagir en présence de SDN-1/syndécan. On pense cependant que la version mutante produite par *ced-10(n3246)* agit toujours dans la même voie que SDN-1/syndécan, étant donné que la pénétrance du défaut de canaux surnuméraires dans le double mutant *ced-10(n3246); sdn-1(zh20)* n'est pas significativement différente de celle du mutant simple *sdn-1(zh20)*. La mutation *ced-10(n3246)* est produite par une substitution d'un acide aminé dans un motif très conservé parmi les GTPases et qui pourrait être impliqué dans les changements conformationnels de la GTPase suite à la liaison au GTP (Reddien et Horvitz, 2000). Comprendre l'impact de cet allèle en fonction des contextes s'avère crucial, étant donné l'augmentation de son utilisation notamment pour l'étude de la phagocytose et du développement des phases précoces de la maladie de Parkinson (Cabello *et al.*, 2014; Munoz-Juan *et al.*, 2024). Dans notre contexte, il serait intéressant d'exprimer de manière transgénique la séquence codante pour *ced-10(n3246)* dans des animaux sauvages et d'étudier la capacité à induire la formation de canaux surnuméraires. Ceci clarifierait si cette mutation est dominante négative, ou non.

4.8.4 MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 agissent indépendamment pour permettre la formation de canaux surnuméraires

Bien que CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG aient des rôles très similaires dans la formation de canaux surnuméraires et qu'elles soient connues pour être redondantes dans de nombreux contextes (section 1.2.24), elles agissent ici de manière indépendante. Plusieurs lignes d'évidence pointent vers cette direction. Tout d'abord, l'allèle nul *mig-2(mu28)* n'est pas capable de supprimer les défauts de canaux surnuméraires induits par le gain de fonction *ced-10(n3246)* dans le double mutant *ced-10(n3246); mig-2(mu28)* (Fig. 3.9A). Or, l'allèle nul *mig-2(mu28)* peut partiellement supprimer les défauts de canaux surnuméraires dans le double mutant *sdn-1(zh20) mig-2(mu28)*. Les résultats obtenus par le double mutant *ced-10(n3246); mig-2(mu28)* suggèrent que soit MIG-2/RhoG agit en amont de CED-10/Rac1, et donc que sa perte n'a pas d'impact sur le gain de fonction de *ced-10(n3246)*, soit que les deux Rho GTPase agissent indépendamment l'une de l'autre. Cette deuxième hypothèse est confirmée par le fait que l'ARNi déplétant *ced-10* accroît la

suppression du défaut de canaux surnuméraires dans le double mutant nul *sdn-1(zh20) mig-2(mu28)* (Fig. 3.9B). On comprend alors que les Rho GTPases MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 ont des fonctions distinctes pour permettre la formation de canaux surnuméraires dans la cellule excrétrice en absence de SDN-1/syndécan. Des rôles indépendants de ces GTPases ont déjà été décrits dans d'autres contextes développementaux chez *C. elegans*. L'importance de *ced-10* mais pas de *mig-2* dans la signalisation en aval du récepteur UNC-40/DCC lors de la croissance axonale des neurones HSN et AVM (Gitai *et al.*, 2003), ou encore l'action combinée de UNC-40/DCC et SAX-3/Robo sur MIG-2/RhoG dans une voie qui semble indépendante de CED-10/Rac1 pour contrôler le guidage axonal des neurones HSN (Xu *et al.*, 2015) en sont des exemples. Enfin, CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG agiraient même dans des voies parallèles et indépendantes pour réguler le guidage axonal du neurone PDE et pour inhiber l'apparition de branches ectopiques (Shakir *et al.*, 2008).

4.8.5 Les potentielles Rho GEF régulant l'activité de MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1

Afin de mieux comprendre les dynamiques d'activation des Rho GTPases MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1, nous avons cherché à identifier les potentielles Rac GEF qui les régulent. Malgré l'absence de redondance des fonctions de MIG-2/RhoG et de CED-10/Rac1 dans la formation de canaux surnuméraires, nous nous sommes penchés sur des Rho GEF connues pour réguler ces deux Rho GTPases spécifiquement. Par exemple, la Rho GEF TIAM-1 régule MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 en aval du récepteur UNC-40/DCC pour contrôler le développement du neurone PDE chez *C. elegans*. Ici, la perte de fonction *tiam-1(tm1556)* n'a entraîné aucun défaut de morphologie des canaux surnuméraires (Fig. 3.10A). La non-intervention de TIAM-1/Tiam1 dans la formation des canaux surnuméraires pourrait être confirmée avec l'utilisation d'une perte de fonction totale de la protéine, *tiam-1(syb4244)* (Zhu *et al.*, 2024), et en vérifiant l'absence de suppression du défaut dans le double mutant *tiam-1(syb4244); sdn-1(zh20)*. Cependant, la quasi-absence de transcrite de *tiam-1* observée lors du développement de la cellule excrétrice ((Packer *et al.*, 2019), Fig. A.6A) va dans le même sens que nos résultats.

Le mutant *unc-73(rh40)* a montré le défaut de canaux surnuméraires, même si de manière non significative (Fig. 3.10A), ainsi que le défaut de canaux manquants (Fig. A.6B), que l'on retrouve également pour les pertes de fonction de *mig-2* et *ced-10*. L'allèle *unc-73(rh40)* supprime l'activité GEF qui est spécifique aux Rac GTPases, c'est-à-dire CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG (Lundquist *et al.*, 2001; Steven *et al.*, 1998; Struckhoff et Lundquist, 2003), signifiant que UNC-73/Trio pourrait réguler au moins une de ces deux GTPases dans ce mécanisme. De plus, la déplétion partielle de *unc-73* par ARNi supprime partiellement le défaut de canaux surnuméraires chez le mutant *sdn-1(zh20)*, signifiant que cette Rho GEF intervient aussi dans la formation des extensions surnuméraires entraînée par la perte de *sdn-1*. Le même traitement d'ARNi

déplétant *unc-73* dirigé contre les doubles mutants *ced-10(n1993); sdn-1(zh20)* et *mig-2(mu28) sdn-1(zh20)* montre une augmentation de la suppression des canaux surnuméraires, ce qui voudrait dire que UNC-73/Trio ne contrôle ni uniquement MIG-2/RhoG, ni uniquement CED-10/Rac1. Cependant, ces résultats ne nous permettent malheureusement pas d'identifier avec précision les cibles spécifiques de cette Rho GEF. Pour cela, il faudra explorer plus en profondeur la fonction du domaine Rac GEF spécifique de UNC-73/Trio dans la voie de SDN-1/syndécan avec un double mutant *unc-73(rh40); sdn-1(zh20)* (actuellement en cours de construction). De plus, il faudra caractériser le rôle de la GTPase RAC-2 dans ce contexte, car elle peut avoir des fonctions très similaires à CED-10/Rac1 (Lundquist *et al.*, 2001; Reiner et Lundquist, 2018), et pourrait d'ailleurs être régulée par le domaine Rac GEF spécifique de UNC-73/Trio (Lundquist *et al.*, 2001). Finalement, RHO-1/RhoA devra être évaluée dans ce contexte puisqu'elle est également une cible potentielle de UNC-73/Trio (Debant *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 2011; Marcus-Gueret *et al.*, 2012; Spencer *et al.*, 2001), mais surtout par ce qu'à l'heure actuelle, RHO-1/RhoA compte parmi les seuls éléments identifiés à faire partie de la voie d'inhibition de la spécification axonale dans les neurones de l'hippocampe pour assurer le développement d'un seul axone (Takano *et al.*, 2015).

4.8.6 CDC-42 inhibe la formation d'extensions surnuméraires avec SDN-1/syndécan

Avec de l'ARNi dirigée contre le gène *cdc-42*, nous avons montré que la Rho GTPase CDC-42/Cdc42 est impliquée dans l'inhibition de la formation des canaux surnuméraires. Contrairement à *ced-10* et *mig-2*, la déplétion de *cdc-42* mène à la formation de canaux surnuméraires de manière significative (Fig. 3.10C). De plus, CDC-42/Cdc42 semble agir ici dans la même voie que SDN-1/syndécan puisque la déplétion par ARNi de *cdc-42* n'augmente pas le défaut de canaux surnuméraires dans le mutant *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.10C). CDC-42/Cdc42 a été rapporté comme étant impliqué dans la polarité apicale et la fusion vésiculaire à la lumière des canaux de la cellule excrétrice pour assurer la bonne croissance des canaux pendant le développement (Abrams et Nance, 2021; Lant *et al.*, 2015). Il serait donc possible que SDN-1/syndécan régule via cette Rho GTPase, ou inversement, des mécanismes au niveau de la membrane apicale, pour pouvoir inhiber la formation de canaux surnuméraires. Par ailleurs, CDC-42/Cdc42 agit en aval du récepteur UNC-40/DCC et contrôle l'activation des Rho GTPases MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 pour réguler la formation des protrusions du cône de croissance dans le neurone PDE (Demarco *et al.*, 2012). Il serait alors intéressant d'étudier le degré d'interaction entre tous ces acteurs dans la régulation du nombre de canaux, comme je le propose dans la partie suivante.

4.8.7 Perspectives sur les Rho GTPases

Afin de continuer le déchiffrement de ce mécanisme permettant l'inhibition de la formation d'un trop grand nombre d'extensions, il faudra explorer plus en profondeur la relation entre les Rho GTPases CED-10/Rac1,

MIG-2/RhoG et CDC-42/Cdc42, SDN-1/syndécan, ainsi que les récepteurs de guidage dont nous avons mis en évidence l'implication. Nous avons montré que les récepteurs UNC-5/Unc5 et UNC-40/DCC pourraient agir en aval de SDN-1/syndécan, leur version active pouvant supprimer les défauts des mutants *sdn-1(zh20)*, et que le récepteur SAX-3/Robo semble agir dans la même voie que SDN-1/syndécan. MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 sont importantes pour la formation d'extensions surnuméraires développées suite à la perte de SDN-1/syndécan, et ce dernier pourrait inhiber des cibles en aval de CED-10/Rac1 pour empêcher la formation des canaux surnuméraires. Comme expliqué précédemment (section 1.2.2.3), les Rho GTPases peuvent agir en aval des HSPG, des récepteurs de guidage, et même en amont de ceux-ci (section 1.2.2.5, Fig. 4.1B). Étudier l'interaction entre ces Rho GTPases et ces récepteurs de guidage pourrait clarifier la hiérarchie et nous permettre de savoir si tous ces membres agissent dans une voie commune sous SDN-1/syndécan ou bien en plusieurs voies distinctes, toutes reliées à SDN-1/syndécan. Pour cela, la construction de doubles et triples mutants avec des allèles de perte de fonction, mais aussi l'utilisation des versions constitutivement actives des récepteurs de guidage ou des Rho GTPases aiderait à mieux comprendre les connections génétiques en jeu. Par ailleurs, le crible d'interacteurs potentiels par TurboID de la région intracellulaire de SDN-1 permettrait de valider des cibles directes de cet HSPG et aider ainsi à comprendre davantage les degrés d'interaction entre ces différentes molécules.

En outre, il a été démontré que la localisation des récepteurs de guidage dans une cellule impacte grandement sa morphogenèse et serait même un événement clé dans la polarisation neuronale (Adler *et al.*, 2006; Limerick *et al.*, 2018; Niftullayev et Lamarche-Vane, 2019). Les Rho GTPases comme MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 peuvent agir en amont des récepteurs de guidage tels que SAX-3/Robo, UNC-40/DCC ou encore UNC-5/Unc5, soit en régulant leur fonction (Levy-Strumpf *et al.*, 2015), soit en régulant leur localisation (Levy-Strumpf et Culotti, 2007; Watari-Goshima *et al.*, 2007). L'utilisation des formes constitutivement active ou spontanément active des récepteurs MYR::UNC-40 et MYR::UNC-5 ou des Rho GTPases pourrait apporter de la lumière sur leur degré de relation et leur hiérarchie relative. D'un autre côté, suivre la localisation des récepteurs de guidage lors du développement de la cellule excrétrice chez des animaux sauvages et mutants pour les Rho GTPases pourrait nous renseigner sur la potentielle régulation spatiale des récepteurs par ces interrupteurs moléculaires.

Finalement, les cibles en aval de la voie des Rho GTPases, si ce n'est les récepteurs de guidage, pourraient être explorées afin de continuer la caractérisation du mécanisme permettant à une cellule polarisée de contrôler le nombre d'extensions qu'elle met en place. Parmi celles identifiées dans la littérature, la régulation de la dynamique du cytosquelette pourrait impacter la morphogénèse cellulaire. Par exemple, le complexe de nucléation d'actine Arp2/3 et la protéine d'adhésion à l'actine UNC-115/abLim sont les plus

récurrents dans la voie de signalisation médiée par CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG pour réguler le développement neuronal, en modulant les dynamiques d'assemblage du cytosquelette dans les cônes de croissance (Lundquist *et al.*, 1998; Shakir *et al.*, 2008; Struckhoff et Lundquist, 2003; Yang et Lundquist, 2005).

4.9 Un mécanisme garantissant la formation des quatre canaux canoniques de la cellule excrétrice

Au cours de nos travaux, nous avons documenté un phénotype qui accompagnait souvent le défaut de canaux surnuméraires : l'absence d'au moins un des quatre canaux « normaux » de la cellule excrétrice, que nous appelons ici canaux canoniques. Le défaut de canaux manquants a déjà été rapporté dans la littérature (Abrams et Nance, 2021; Johnson *et al.*, 2006; Knop *et al.*, 2024; Marcus-Gueret *et al.*, 2012) et est associé dans l'ensemble des cas à des défauts de croissance des canaux. Jusqu'alors, à l'exception de DGN-1/dystroglycan (Johnson *et al.*, 2006), aucune observation simultanée de canaux manquants et de canaux surnuméraires n'a été faite. Cela informe donc que les perturbations mécanistiques à la base de l'apparition du défaut de canaux manquants peuvent être indépendantes de la présence de canaux surnuméraires. À l'inverse, nous avons constaté que la majorité des mutants entraînant le défaut de canaux surnuméraires montrent aussi à un certain degré le défaut de canaux manquants, ainsi qu'une diminution variable de la longueur des canaux. Cela pourrait signifier que (1) les mécanismes régulant la formation des canaux canoniques et des canaux surnuméraires demandent tous les deux le contrôle de la croissance des canaux ou (2) que les deux mécanismes sont indépendants, mais qu'ils mettent en jeu les mêmes interacteurs. La nécessité de contrôler la croissance des extensions pour permettre la bonne polarisation des cellules n'est pas une théorie nouvelle (Takano *et al.*, 2015) et nous pensons que la réalité pourrait se trouver à mi-chemin entre ces deux hypothèses. Il est alors difficile de savoir si dans une souche montrant certains animaux avec des canaux manquants et d'autres animaux avec des canaux surnuméraires, les problèmes mécanistiques à la base de ces deux défauts sont les mêmes. Nous avons cependant remarqué des différences dans la régulation des canaux surnuméraires et des canaux manquants, que nous allons détailler et essayer de comprendre ici.

4.9.1 SDN-1/syndécan régule spécifiquement les canaux manquants

Nous retrouvons dans les mutants *sdn-1(zh20)* la présence du défaut de canaux manquants, et c'est le seul mutant du corps protéique des HSPG classiques à induire significativement ce défaut (Fig. A.1E). SDN-1/syndécan, dont la perte de fonction résulte dans ce défaut de canaux manquants, agirait depuis la cellule excrétrice pour assurer le développement des canaux canoniques, puisque l'expression de copies sauvages de *sdn-1(+)* depuis cette cellule sauve le phénotype (Fig. A.2D). La surexpression de nombreuses copies sauvages de *sdn-1(+)* depuis la cellule excrétrice a un effet inverse, augmentant considérablement la

pénétrance du défaut de canaux manquants (Fig. A.2C-D). S'accompagne à ce défaut une diminution de la longueur des canaux ainsi que l'apparition de larges vacuoles (Fig. A.2C) représentatives d'un problème de fusion vésiculaire et de formation de la lumière (Abrams et Nance, 2021). Il s'avère alors que dans la cellule excrétrice, SDN-1/syndécan inhibe la croissance des canaux, possiblement en agissant au niveau de la lumière. Nous ne pensons néanmoins pas que SDN-1/syndécan contrôle le nombre de canaux dans la cellule excrétrice uniquement via la régulation de la croissance des canaux. En effet, un excès de croissance des canaux peut se traduire par des canaux plus longs qu'à la normale (Marcus-Gueret *et al.*, 2012), un phénotype bien différent de la formation de canaux surnuméraires, et que nous n'observons pas dans le mutant *sdn-1(zh20)*. Il se pourrait alors que SDN-1/syndécan régule la croissance des canaux ainsi qu'un autre aspect de la polarisation cellulaire qui lui permette d'inhiber la formation de canaux surnuméraires.

L'expression de copies sauvages de *lon-2(+)*, qui code pour l'HSPG glypican, depuis la cellule excrétrice permet de sauver partiellement le phénotype de canaux surnuméraires chez le mutant *sdn-1(zh20)* (Fig. 3.3C) sans impacter la pénétrance du défaut de canaux manquants (Fig. A.2I). LON-2/glypican semble alors pouvoir compenser la perte de SDN-1/syndécan dans la régulation de canaux surnuméraires, mais pas des canaux manquants, indiquant une indépendance des deux phénotypes. D'un autre côté, cette même expression de *lon-2(+)* dans la cellule excrétrice d'animaux sauvages induit le défaut de canaux manquants de manière significative (Fig. A.2H). L'expression de *lon-2(+)* depuis la cellule excrétrice est alors capable d'induire le défaut de canaux manquants qui ne supplémentent pas ceux induits par la perte de *sdn-1*, insinuant que SDN-1/syndécan est l'HSPG central qui contrôle la formation des quatre canaux canoniques de la cellule excrétrice.

4.9.2 Les récepteurs de guidage régulent aussi la formation des canaux canoniques

La majorité des mutants affectant la voie de UNC-6/Nétrine induit aussi le défaut de canaux manquants, excepté pour les mutants de UNC-40/DCC. Cela signifie que le signal de guidage UNC-6/Nétrine et le récepteur UNC-5/Unc5 sont importants pour la formation des quatre canaux canoniques de la cellule excrétrice, comme identifié précédemment (Hedgecock *et al.*, 1990). D'un autre côté, le mutant *sax-3(ky123)* montre aussi le défaut de canaux manquants, suggérant sa participation à ce mécanisme qui assure la formation d'au moins quatre canaux. La pénétrance du défaut de canaux manquants chez tous ces mutants étant très basse, il est malheureusement plus difficile de conclure avec certitude de l'interaction génétique entre ces différentes protéines en se basant sur nos analyses.

Concernant les récepteurs myristoylés considérés comme constitutivement actifs (Gitai *et al.*, 2003; Norris *et al.*, 2014), l'expression de MYR::UNC-5 et/ou MYR::UNC-40 ne suffit pas à induire le phénotype de

canaux manquants chez les vers sauvages (Fig. A.4B-E). L'expression de MYR::UNC-40 chez les mutants *sdn-1(zh20)* induit cependant une augmentation significative de la pénétrance du défaut de canaux manquants (Fig. A.4F), qui ne dépend pas de la présence de *unc-5*. En gardant à l'esprit les potentiels problèmes qui peuvent être attribués à l'expression multicopies de transgènes, il semblerait qu'en absence de SDN-1/syndécan uniquement, la partie intracellulaire de UNC-40/DCC soit capable d'inhiber la formation des quatre canaux de la cellule excrétrice d'une manière indépendante de UNC-5/Unc5. Cela placerait SDN-1/syndécan comme inhibiteur de cible(s) en aval du récepteur UNC-40/DCC dans le mécanisme assurant la formation des canaux canoniques, ou bien indiquerait que la perte de SDN-1/syndécan crée un environnement plus propice à la formation de canaux manquants par l'activation de UNC-40/DCC. Il se pourrait aussi que les défauts mécanistiques induits par l'activation constitutive de ces récepteurs sur les canaux manquants soient différents, ou même impactent un mécanisme différent de celui touché par la perte de fonction des gènes *unc-5* et *unc-40*. Comme dit précédemment, les récepteurs myristoylés n'ont pas leur partie extracellulaire qui pourrait jouer un rôle important dans la spécification de leur fonction. Par conséquent, les phénotypes induits par leur expression pourraient sortir du cadre des fonctions physiologiques de ces récepteurs.

4.9.3 Les Rho GTPases interviennent aussi dans la régulation des canaux canoniques

4.9.3.1 MIG-2/RhoG est potentiellement redondante à SDN-1/syndécan

Tous les allèles impactant la fonction, perte et gain confondus, de MIG-2/RhoG induisent le défaut de canaux manquants (Fig. A.5B), signifiant que la fine régulation de cette Rho GTPase est nécessaire pour le bon développement des canaux canoniques. La pénétrance du défaut de canaux manquants du double mutant *mig-2(mu28) sdn-1(zh20)* est supérieure à la somme des pénétrances des deux mutants simples, ce qui montre une synergie de ces deux protéines (Fig. A.5B). La synergie peut témoigner d'une redondance entre des gènes, de la sensibilisation d'une mutation pour l'effet de l'autre ou encore de deux voies qui convergent à un point donné (Perez-Perez *et al.*, 2009). Il se pourrait alors que dans ce contexte, contrairement à l'inhibition de la formation de canaux surnuméraires, SDN-1/syndécan et MIG-2/RhoG agissent dans des voies indépendantes, mais redondantes.

4.9.3.2 CED-10/Rac1 est potentiellement redondante à SDN-1/syndécan

Aucun des allèles affectant *ced-10* étudié ici n'entraîne le défaut de canaux manquants à part *ced-10(rp100)* (Fig. A.5C), qui a l'air d'agir comme un allèle gain de fonction dans notre contexte. Il est intéressant de noter que parmi ces allèles n'entraînant pas le défaut de canaux manquants de manière significative, on retrouve *ced-10(n3246)*, qui engendre des canaux surnuméraires. Bien que les conséquences de ce gain de

fonction de CED-10/Rac1 ne soient pas bien comprises ici, la perturbation du mécanisme inhibant la formation de canaux surnuméraires semble avoir lieu sans affecter celui contrôlant la formation des canaux canoniques. C'est un des arguments majeurs qui nous oriente vers une indépendance des deux mécanismes.

Le fait que l'allèle nul *ced-10(n3417)* n'entraîne pas le défaut de canaux manquants pointe soit vers l'hypothèse que CED-10/Rac1 n'a pas de rôle dans la mise en place des quatre canaux canoniques de la cellule excrétrice, soit qu'une ou plusieurs autres molécules ont ici une fonction redondante à celle-ci. Il faut cependant garder à l'esprit que l'allèle nul *ced-10(n3417)* entraîne des défauts qui peuvent être sauvés maternellement. En effet, les vers homozygotes mutants *ced-10(n3417)* meurent au stade embryonnaire, sauf s'ils descendent d'un ver hétérozygote *ced-10(n3417)/+*, auquel cas les copies sauvages de *ced-10(+)* transmises par la mère (probablement de l'ARN messenger) au début du développement embryonnaire sont suffisantes pour assurer le développement de la descendance. Les vers *ced-10(n3417)* analysés dans cette étude proviennent de parents hétérozygotes, ce qui pourrait induire un masquage de l'effet réel de la perte totale de *ced-10* sur le défaut de canaux manquants. Une déplétion tissu-spécifique de *ced-10* chez la mère et tôt lors du développement, comme avec le système ZIF-1 et le marquage de CED-10 avec un dégron (Schwartz *et al.*, 2023), permettrait de confirmer ou non l'implication de cette Rho GTPase dans la mise en place des canaux canoniques de la cellule excrétrice.

Comme pour MIG-2/RhoG, le double mutant *ced-10(n1993); sdn-1(zh20)* montre un effet synergique puisque la pénétrance du double mutant dépasse nettement la somme des simples mutants (Fig. A.5C). D'autant plus que l'allèle *ced-10(n1993)* n'entraîne qu'une perte de fonction partielle de la protéine. On ne peut pas conclure avec certitude sur le degré d'interaction de ces deux protéines. La synergie pointe toutefois vers une redondance entre elles.

4.9.3.3 MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 nécessitent une fine régulation depuis la cellule excrétrice

L'augmentation de la pénétrance du défaut de canaux manquants dans les doubles mutants *mig-2(mu28) sdn-1(zh20)* et *ced-10(n1993); sdn-1(zh20)* est sauvée par l'expression de copies sauvages de *mig-2(+)* et *ced-10(+)*, signifiant l'action cellule autonome des Rac GTPases pour assurer la formation d'au moins quatre canaux (Fig. A.5B-C). L'expression des versions constitutivement actives *mig-2(G16E)* et *ced-10(G12V)* dans les souches susmentionnées ne permet pas le sauvetage du défaut de canaux manquants (Fig. A.5B-C). Cela suggère donc que pour assurer la formation d'au moins quatre canaux dans la cellule excrétrice, MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 doivent aussi pouvoir alterner entre leur état actif et inactif. De plus, la présence du défaut de canaux manquants dans le simple mutant *mig-2(gm103=G16E)* confirme que l'activation constitutive altère la fonction de la protéine et invalide ainsi la théorie que ceci serait dû à

l'approche d'expression transgénique. Finalement, l'utilisation de la version constitutivement active CED-10(G12V) nous apprend plus de choses. D'un côté, l'expression de CED-10(G12V) dans la cellule excrétrice d'animaux mutants *sdn-1(zh20)* n'affecte pas la pénétrance du défaut de canaux surnuméraires, mais augmente celle du défaut de canaux manquants (Fig. A.5E-F). De l'autre, l'expression de CED-10(G12V) dans le double mutant *ced-10(n1993); sdn-1(zh20)* permet de sauver le défaut de canaux surnuméraires (Fig. 3.8B), mais pas celui de canaux manquants (Fig. A.5C). Ces deux résultats pointent vers une indépendance des deux mécanismes.

Quant à l'allèle *ced-10(knu268)*, qui entraîne une activation spontanée de la protéine, il n'induit pas le défaut de canaux manquants – ni dans le simple mutant ni dans le double avec *sdn-1(zh20)* (Fig. A.5C). L'activation spontanée de CED-10/Rac1 permet probablement la fonction de la GTPase nécessaire pour assurer la formation d'au moins quatre canaux excréteurs, mais pas sa fonction dans l'inhibition de la formation des canaux surnuméraires. Ceci pointe une fois de plus vers l'indépendance des deux mécanismes.

4.9.3.4 MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 sont redondantes dans la formation des canaux canoniques

L'étude de l'interaction entre MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 a permis de montrer que ces deux Rho GTPases semblent avoir une fonction redondante dans le mécanisme assurant la formation d'au moins quatre canaux. Le double mutant nul *ced-10(n3417); mig-2(mu28)* entraîne une pénétrance du défaut de canaux manquants incomparablement plus haute que la somme des pénétrances des mutants simples, révélant ainsi une synergie dans leur fonction (Fig. A.5G). Le fait que l'allèle *ced-10(n3417)* puisse être sauvé par les copies maternelles sauvages de *ced-10* pourrait être une explication concevable de cette accentuation de la pénétrance du défaut de canaux manquants. Effectivement, la perte de *mig-2* pourrait créer un fond génétique plus sensible, capable de perturber le sauvetage de la perte de *ced-10* par les copies maternelles. Cependant, la déplétion par ARNi de *ced-10* montre une augmentation accentuée du défaut de canaux manquants dans les mutants *mig-2(mu28)* et *mig-2(mu28) sdn-1(zh20)* (Fig. A.5H), confirmant l'hypothèse selon laquelle CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG ont une fonction synergique et probablement redondante afin d'assurer la formation d'au moins quatre canaux.

Par ailleurs, il a été récemment rapporté (Arena *et al.*, 2022) que le double mutant nul *ced-10(n3417); mig-2(mu28)* montre un effet cumulatif sur la pénétrance du défaut de canaux plus courts que les canaux observés dans les simples mutants. CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG agissent alors dans des voies séparées pour réguler la croissance des canaux de la cellule excrétrice. De plus, nous avons précédemment montré que CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG agissent aussi indépendamment dans l'inhibition de la formation de canaux surnuméraires. Cela témoigne du fait que le mécanisme assurant la formation d'au moins quatre canaux

dans la cellule excrétrice, où CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG sont redondantes, ne semble pas complètement dépendre de la croissance des canaux, ni du mécanisme inhibant la formation des canaux surnuméraires.

4.9.4 Rôles des GEF UNC-73/Trio et TIAM-1/Tiam1 dans la régulation des canaux principaux

Parmi les Rho GEF testées, nous avons montré que UNC-73/Trio est impliqué dans la formation des quatre canaux principaux de la cellule excrétrice. De fait, le mutant *unc-73(rh40)* induit le défaut de canaux manquants (Fig. A.6B). Plus précisément, compte tenu de la nature de la mutation, l'activité Rac GEF spécifique paraît importante pour la formation des quatre canaux. D'un autre côté, vu qu'aucun phénotype visible n'ait été observé dans le mutant *tiam-1(tm1556)* (Fig. A.6B), TIAM-1/Tiam1 ne s'avère pas impliqué dans la formation des canaux. Une fois de plus, l'utilisation d'un allèle nul comme *tiam-1(syb4244)* (Zhu *et al.*, 2024) permettra de confirmer la non-intervention de cette GEF dans ce contexte. Cependant, le double mutant *unc-73(rh40) tiam-1(tm1556)* montre une légère suppression, significative, du défaut de canaux manquants comparé au mutant simple *unc-73(rh40)* (Fig. A.6B). Il se pourrait alors que TIAM-1/Tiam-1 joue tout de même un rôle dans le mécanisme assurant la formation de quatre canaux et dans la même voie que UNC-73/Trio. Il est par ailleurs intéressant de noter que la pénétrance du mutant *unc-73(rh40)*, qui supprime l'activité Rac GEF spécifique de UNC-73/Trio, est moindre que celle du double mutant nul *ced-10(n3417); mig-2(mu28)*. On peut en conclure que si UNC-73/Trio régule l'une et/ou l'autre Rac GTPase via son activité GEF, elle n'est probablement pas la seule à réguler leur activation afin de maintenir la formation des canaux canoniques dans la cellule excrétrice.

4.9.5 CDC-42/Cdc42 régule la formation des quatre canaux canoniques

L'ARNi que nous avons effectué contre les transcrits de *cdc-42* pour évaluer son implication dans le mécanisme inhibant la formation de canaux surnuméraires nous a révélé que cette Rho GTPase régule aussi la formation des quatre canaux canoniques de la cellule excrétrice. En effet, l'ARNi contre *cdc-42* entraîne le défaut de canaux manquants dans les animaux sauvages et augmente même significativement ce défaut dans le mutant simple *sdn-1(zh20)*, comparé aux animaux nourris avec le vecteur contrôle (Fig. A.6C). Cette augmentation significative pointe vers un rôle indépendant de CDC-42/Cdc42 et SDN-1/syndécan dans la régulation des quatre canaux canoniques de la cellule excrétrice, ce qui en fait un point de divergence supplémentaire avec le mécanisme régulant la formation de canaux surnuméraires, où ils semblent agir ensemble.

4.9.6 Théories sur la régulation de la mise en place des canaux canoniques de la cellule excrétrice

Au cours de ces travaux, nous avons montré l'existence d'un mécanisme assurant la formation d'au moins quatre canaux dans la cellule excrétrice. Ce mécanisme met en jeu l'HSPG SDN-1/syndécan, le signal de guidage UNC-6/Nétrine ainsi que les récepteurs de guidage SAX-3/Robo, UNC-5/Unc5 et UNC-40/DCC et les Rho GTPases MIG-2/RhoG, CED-10/Rac1 ainsi que CDC-42/Cdc42. Toutes les molécules mises en évidence ici se montrent comme promouvant la formation des canaux canoniques de la cellule excrétrice, à l'exception de UNC-40/DCC dont l'activation induit l'apparition du défaut de canaux manquants. Nous avons révélé la redondance entre les Rho GTPases MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 pour permettre la formation d'au moins quatre canaux et possiblement une plus faible redondance de ces Rho GTPases avec SDN-1/syndécan dans ce même contexte. Finalement, nous avons révélé le rôle de la Rho GTPase CDC-42/Cdc42 qui n'a pas l'air d'agir avec SDN-1/syndécan pour réguler ce mécanisme.

Il existe encore de nombreuses lacunes dans la compréhension de ce mécanisme, notamment au niveau de l'interaction entre toutes ces molécules, qui devront être abordées afin d'approfondir les connaissances sur les moyens que possèdent les cellules polarisées pour contrôler exactement le nombre d'extensions qu'elles mettent en place lors du développement. Nous avons néanmoins montré, et à de nombreuses reprises, que le mécanisme régulant la formation des canaux canoniques de la cellule excrétrice et celui inhibant la formation de canaux surnuméraires sont au moins partiellement indépendants l'un de l'autre. Par ailleurs, nous avons abordé le fait que le mécanisme permettant la formation des canaux canoniques de la cellule excrétrice pourrait aussi être indépendant de la croissance des canaux, ce qui n'avait pas encore été envisagé. On pourrait également penser que l'apparition du défaut de canaux manquants provient de différentes origines mécanistiques qui pourraient toucher à la croissance des canaux, mais aussi possiblement à des mécanismes de polarisation cellulaire plus précoces. Prendre en compte dans de futurs travaux le défaut de canaux manquants dans la cellule excrétrice indépendamment de la longueur des canaux constituerait un premier pas pour une meilleure compréhension de tels mécanismes.

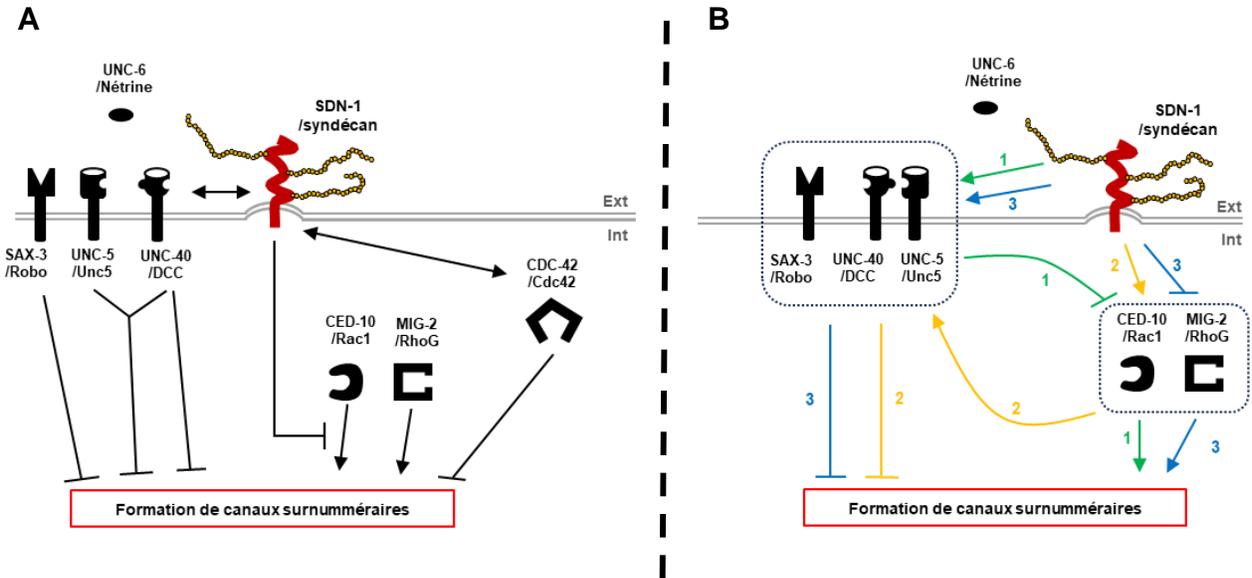


Figure 4.1. Résumé graphique et hypothèses

(A) Représentation graphique des résultats présentés dans cette thèse. Ces travaux placent SDN-1/syndécan au centre du contrôle de la formation d'extensions surnuméraires dans la cellule excrétrice. SDN-1/syndécan semble coopérer avec les récepteurs de guidage UNC-5/Unc5, UNC-40/DCC ou SAX-3/Robo. UNC-5 nécessiterait la présence de UNC-40 pour inhiber la formation de canaux surnuméraires tandis que UNC-40 peut jouer un rôle indépendant de UNC-5. Dans la cellule, SDN-1/syndécan inhibe la fonction des Rho GTPases CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG, qui stimulent la formation d'extensions surnuméraires de manière indépendante l'une de l'autre. SDN-1/syndécan agit également dans la même voie que la Rho GTPase CDC-42/Cdc42 qui inhibe la formation de ces extensions surnuméraires. (B) Représentation graphique de trois scénarios possibles sur les interactions entre SDN-1/syndécan, les récepteurs de guidage et les Rac GTPases dans ce mécanisme, basée sur la littérature. (1, vert) SDN-1/syndécan pourrait réguler l'activation des récepteurs de guidage, par exemple en modulant l'interaction avec leur ligand ou en favorisant la formation de certains complexes de récepteurs (Finci *et al.*, 2014; Priest *et al.*, 2024). Cette activation pourrait mener à la régulation des Rho GTPases CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG (Reiner et Lundquist, 2018) de manière à limiter la formation des canaux excréteurs. (2, jaune) SDN-1/syndécan pourrait interagir directement avec les Rho GTPases CED-10/Rac1 et MIG-2/RhoG (Bass *et al.*, 2007; Bass *et al.*, 2011; Keller-Pinter *et al.*, 2017). Leur fine régulation permettrait alors le contrôle de la localisation des récepteurs de guidage à la membrane plasmique (Levy-Strumpf et Culotti, 2007; Watari-Goshima *et al.*, 2007) pour limiter la formation du nombre de canaux dans la cellule. (3, bleu) SDN-1/syndécan intervient dans la voie des récepteurs de guidage et dans la régulation des Rho GTPases de manière indépendante l'une de l'autre pour limiter le nombre de canaux développés.

CONCLUSION

La question de savoir comment les cellules polarisées régulent le nombre d'extensions qu'elles forment au cours de leur développement demeure un problème non résolu en biologie développementale. Ces travaux mettent en évidence un mécanisme qui permet d'inhiber la formation excessive d'extensions dans la cellule excrétrice du modèle biologique *C. elegans*. La synthèse des chaînes HS et leur modification post-traductionnelle jouent un rôle clé dans le contrôle du nombre approprié d'extensions, non seulement dans les neurones AVM et HSN, mais aussi dans la cellule excrétrice, une cellule épithéliale partageant plusieurs mécanismes de développement avec les neurones. Nous démontrons ici que l'HSPG hautement conservé SDN-1/syndécan agit comme un coordinateur majeur lors d'événements morphogénétiques, en régulant le nombre de canaux dans la cellule excrétrice. En effet, chez les animaux mutants pour *sdn-1*, des canaux surnuméraires se développent simultanément et présentent une architecture de cytosquelette similaire à celle des canaux canoniques de la cellule excrétrice. Dans ce contexte, SDN-1/syndécan semble exercer son effet de façon cellule autonome, et possiblement via ses chaînes HS, pour contrôler le nombre d'extensions cellulaires. Bien que les gènes codant pour les HSPG glypicans (*lon-2* et *gpn-1*) ne paraissent pas réguler directement le nombre d'extensions dans la cellule excrétrice, leur surexpression montre un effet compensatoire à la perte de *sdn-1* dans ce mécanisme. SDN-1/syndécan interagit avec les récepteurs de guidage UNC-40/DCC et UNC-5/Unc5, une interaction génétique qui est, à ma connaissance, démontrée ici pour la première fois. Par ailleurs, nous montrons que le récepteur SAX-3/Robo limite aussi le nombre de canaux excréteurs, potentiellement dans la même voie que SDN-1/syndécan. Au sein de la cellule, SDN-1/syndécan semble inhiber des cibles en aval des Rho GTPases CED-10/Rac1 et peut-être MIG-2/RhoG, modulant ainsi le nombre d'extensions formées par la cellule excrétrice. Ces Rho GTPases régulent le cytosquelette de manière cellule autonome et sont nécessaires à la formation des extensions surnuméraires dans le mutant *sdn-1*. De même, la Rho GTPase CDC-42/Cdc42 joue un rôle dans ce mécanisme, puisqu'elle inhibe la formation de ces extensions dans la même voie de signalisation que SDN-1/syndécan (Fig. 4.1A).

Ces travaux ont également révélé l'existence d'un mécanisme qui régule la formation des quatre canaux canoniques de la cellule excrétrice, assurant la formation d'au moins quatre canaux chez le type sauvage. Ce mécanisme paraît au moins partiellement indépendant de celui inhibant la formation des canaux surnuméraires résumé ci-dessus, voire indépendant des mécanismes régulant la croissance des canaux. L'indépendance entre un mécanisme promouvant la formation des canaux canoniques et d'un autre inhibant la formation de canaux surnuméraires pourrait se rapprocher des boucles de rétrocontrôles permettant la spécification axonale dans les neurones hippocampiques cultivés *in vitro* (Takano *et al.*, 2015). En effet, il existe des boucles positives qui favorisent la spécification d'un neurite immature en axone (qui

s'apparenterait au mécanisme induisant la formation des canaux canoniques de la cellule excrétrice ici), et des boucles négatives qui inhibent la spécification de plusieurs axones (similaires à l'inhibition de la formation d'un trop grand nombre de canaux dans la cellule excrétrice). Dans ce contexte neuronal, les boucles positives et négatives pourraient être reliées à certains niveaux, mais semblent aussi passer par des voies indépendantes (Takano *et al.*, 2019; Takano *et al.*, 2015).

Il existe une forte conservation évolutive des molécules impliquées dans la polarisation, à la fois entre les différentes espèces et entre les différents types cellulaires (Naturale *et al.*, 2023; Pellettieri et Seydoux, 2002; Wilson *et al.*, 2022). Étant donné cette conservation et le fait que la perturbation de la synthèse des chaînes HS est reliée à la formation d'extensions surnuméraires dans différents types cellulaires, comme les neurones AVM et HSN, nous pensons que ce modèle pourrait servir de base pour élargir notre compréhension de la relation entre la polarisation cellulaire et la morphogenèse dans divers types cellulaires.

ANNEXE A
FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

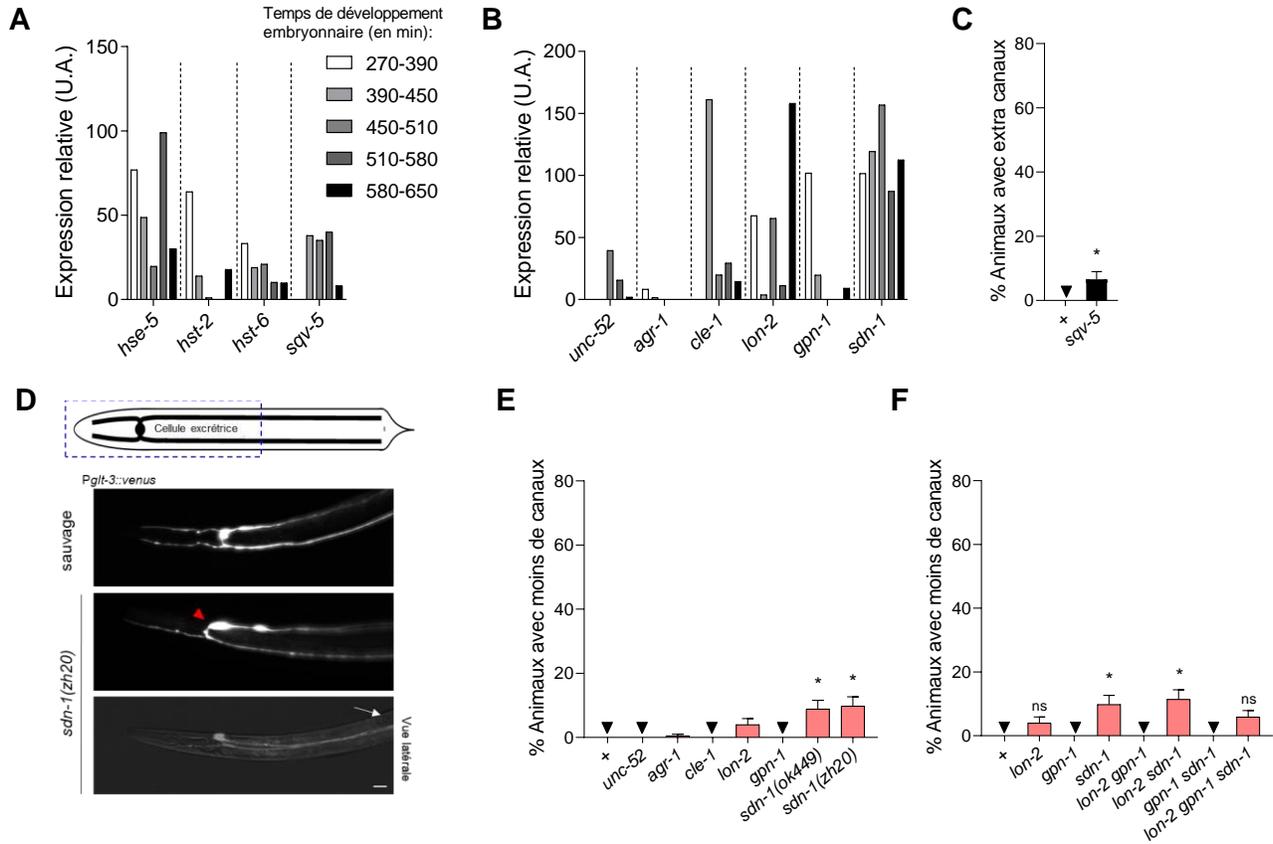


Figure A.1. Informations relatives à la figure 3.1

(A-B) Niveaux d'expression relatifs (en Unité Arbitraire) des enzymes de modification des chaînes HS, de l'enzyme de synthèse des chaînes CS (A) et des corps protéiques des HSPG (B) spécifiquement au cours du développement de la cellule excrétrice. Ces données ont été acquises par la mesure du transcriptome à l'échelle unicellulaire au cours du développement embryonnaire (en minutes) par (Packer *et al.*, 2019). (C) Quantification du défaut de canaux surnuméraires dans le mutant pour le gène *sqv-5* qui code pour la polymérase responsable de la synthèse des chaînes CS. (D) Représentation schématique de la position de la cellule excrétrice dans le ver et images de vue ventrale (et latérale pour le dernier panneau) de vers sauvage et mutants pour *sdn-1(zh20)* au stade L4. Les mutants pour *sdn-1* montrent parfois un défaut de canaux manquants dans la cellule excrétrice, c'est-à-dire une cellule excrétrice avec moins de quatre canaux (panneau central, tête de flèche rouge). On voit aussi occasionnellement des canaux mal localisés (~17%). Les quatre canaux de la cellule excrétrice peuvent par exemple se trouver d'un seul côté du ver, comme c'est le cas ici où deux canaux se trouvent dans la loge antérieure droite, et deux dans la loge postérieure droite (D, panneau du bas, la flèche blanche indique la position de la vulve en formation en position ventrale). Les loges de gauche sont donc dépourvues de canaux, ce qui ne se produit jamais chez les individus sauvages. Barre d'échelle 20 μ m. (E-F) Quantification du défaut de canaux manquants dans les mutants pour les gènes des corps protéiques des HSPG (E) et des doubles et du triple mutant (F) relatifs à la (Fig. 3.1E-F). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : * $p \leq 0.05$ (test Z, les valeurs p ont été corrigées à l'aide la correction de Bonferroni); ns, non significatif.

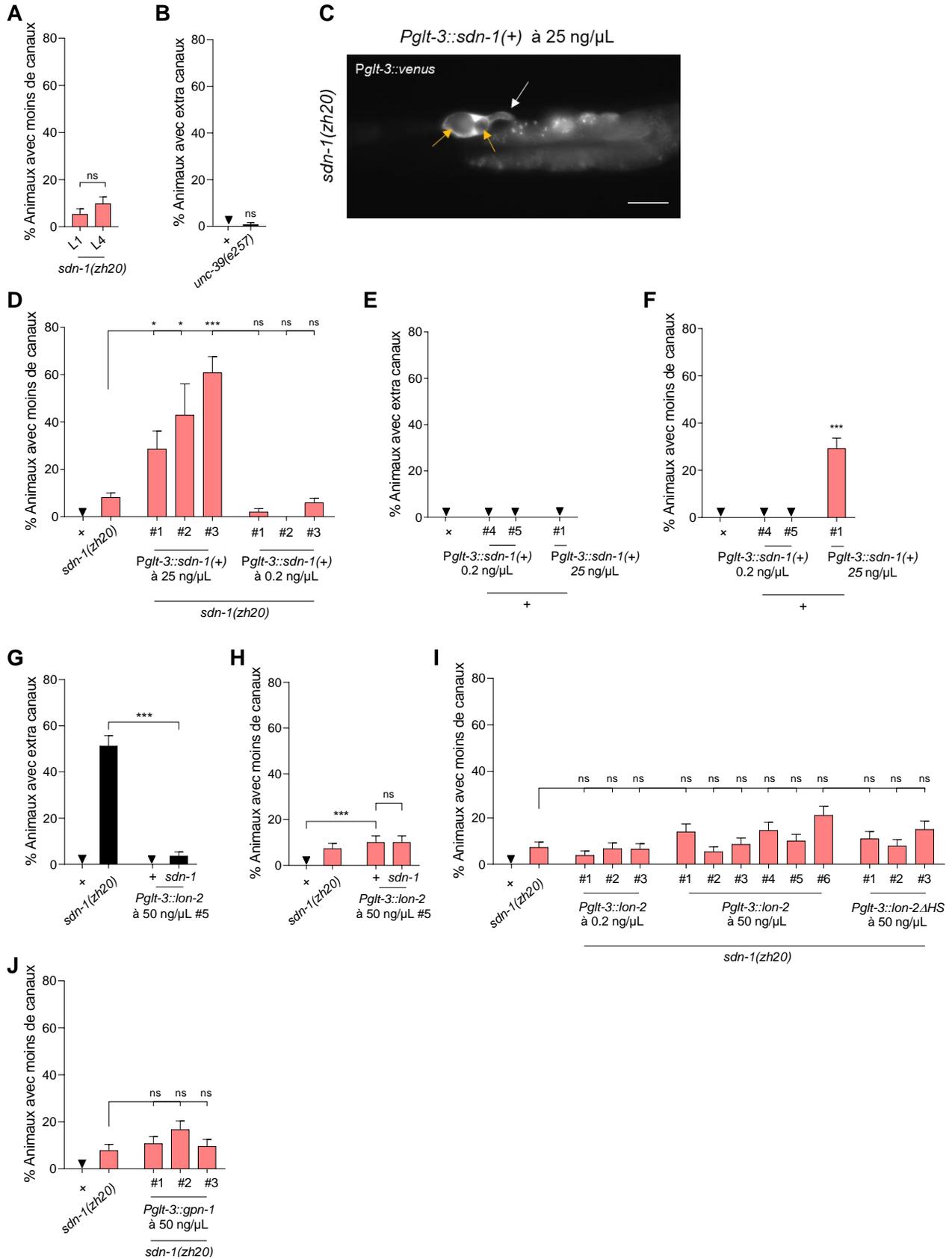


Figure A.2. Informations relatives aux figures 3.2 et 3.3

(A) Quantification du défaut de canaux manquants aux stades larvaires L1 et L4 dans les mutants *sdn-1(zh20)*. (B) Quantification du défaut de canaux surnuméraires dans des vers portant l'allèle *unc-39(e257)* qui affecte le développement des neurones CAN. (C) Vue latérale d'un ver mutant pour *sdn-1(zh20)* exprimant le transgène *Pglt-3::sdn-1(+)* dont la concentration dans le mix d'injection est de 25 ng/μL. On peut voir que dans cet exemple, la cellule excrétrice contient de larges vacuoles (flèches orange) et ne possède qu'un seul canal très court (flèche blanche). Barre d'échelle 20 μm. (D) Quantification du défaut de canaux manquants dans des expériences de sauvetage du mutant *sdn-1(zh20)* exprimant de manière transgénique le construit *Pglt-3::sdn-1(+)* à forte (25 ng/μL) ou faible concentration (0.2 ng/μL) dans le mix d'injection. (E) Quantification des défauts de canaux surnuméraires et (F) de canaux manquants dans des animaux sauvages exprimant de manière transgénique le construit *Pglt-3::sdn-1(+)* à forte (25 ng/μL) ou faible concentration (0.2 ng/μL) dans le mix d'injection. (G) Quantification des défauts de canaux surnuméraires (H) et de canaux manquants en fonction de l'expression du construit *Pglt-3::lon-2(+)* chez des animaux sauvages et mutants pour *sdn-1(zh20)*. (I) Quantification du défaut de canaux manquants relative à la (Fig. 3.3C). (J) Quantification du défaut de canaux manquants relative à la (Fig. 3.3D). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ (test Z, les valeurs p ont été corrigées à l'aide de la correction de Bonferroni); ns, non significatif.

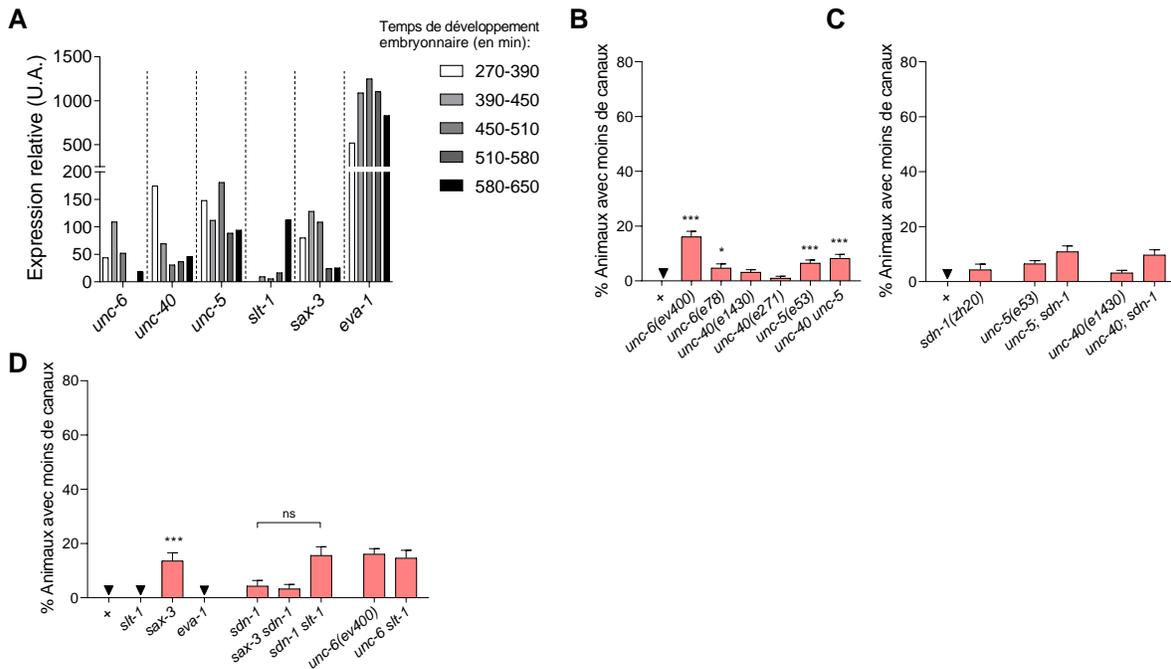


Figure A.3. Informations relatives à la figure 3.5

(A) Quantification des niveaux d'expression relatifs (en Unité Arbitraire) lors du développement embryonnaire (en minutes) dans la cellule excrétrice selon (Packer *et al.*, 2019). Ici sont montrés les taux d'expression relatifs des signaux et récepteurs de guidage. (B à D) Quantifications des défauts de canaux manquants relatifs aux figures (Fig. 3.5C) en (B), (Fig. 3.5D) en (C) et (Fig. 3.5E) en (D). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ (test Z, les valeurs p ont été corrigées à l'aide de la correction de Bonferroni); ns, non significatif.

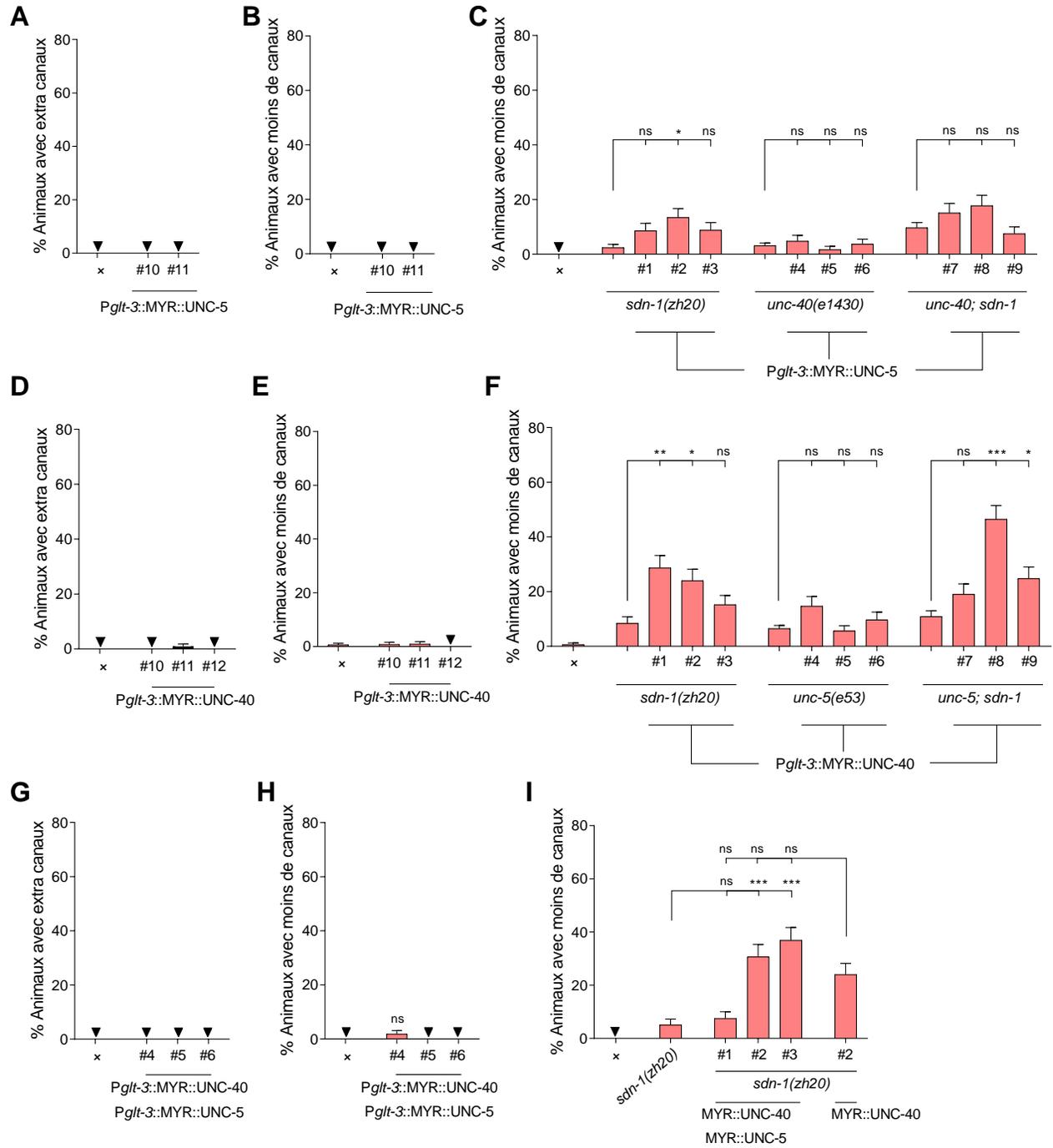


Figure A.4. Informations relatives à la figure 3.6

(A, D et G) Quantification des défauts de canaux surnuméraires et (B, E et F) de canaux manquants chez des animaux sauvages exprimant MYR::UNC-5 et/ou MYR::UNC-40. (C, F et I) Quantification du défaut de canaux manquants chez des animaux mutants pour *sdn-1(zh20)*, *unc-40(e1430)*, *unc-40(e1430); sdn-1(zh20)*, *unc-5(e53)* ou *unc-5(e53); sdn-1(zh20)* qui expriment le récepteur myristoylé MYR::UNC-5 (E), MYR::UNC-40 (F), ou une combinaison des deux (I). L'expression des récepteurs myristoylés est transgénique et spécifiquement dans la cellule excrétrice (Pglt-3). L'absence du signe # sur l'axe des abscisses (C et F) signifie l'absence de structure extrachromosomique exprimant un transgène, et représente la souche contrôle à partir de laquelle les lignées ont été générées. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : * $p \leq 0.05$,

Figure A.5. Informations relatives aux figures 3.7 à 3.9

(A) Quantification des niveaux d'expression relatifs (en Unité Arbitraire) lors du développement embryonnaire (en minutes) dans la cellule excrétrice selon (Packer *et al.*, 2019). Les taux d'expression relatifs des Rho GTPases MIG-2/RhoG et CED-10/Rac1 sont montrés ici. (B) Quantification du défaut de canaux manquants relative à la figure (Fig. 3.7C) (C) Quantification du défaut de canaux manquants relative à la figure (Fig. 3.7D) (D) Quantification du défaut de canaux surnuméraires chez des mutants *sdn-1* et *ced-10* portant l'intégration du transgène *Pglt-3::ced-10(+)* (*vasTi2*), ou non. (E) Quantification du défaut de canaux surnuméraires et (F) de canaux manquants chez des animaux mutants pour *sdn-1* exprimant de manière transgénique la version constitutivement active *ced-10(G12V)* dans la cellule excrétrice spécifiquement (*Pglt-3*). (G) Quantification du défaut de canaux manquants relative à la figure (Fig. 3.7E). (H) Quantification du défaut de canaux manquants dans des expériences d'ARNi dirigée contre *ced-10* sur des animaux sauvages ou mutants nuls pour *sdn-1* et/ou *mig-2*. La référence correspond à des animaux nourris avec des bactéries contenant un Vecteur Vide (V V). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.001$ (test Z, les valeurs p ont été corrigées à l'aide de la correction de Bonferroni); ns, non significatif.

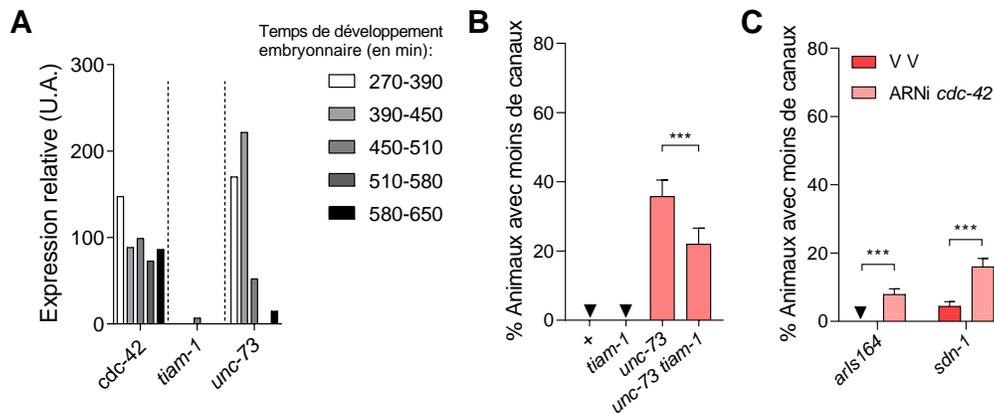


Figure A.6. Informations relatives à la figure 3.10

(A) Quantification des niveaux d'expression relatifs (en Unité Arbitraire) lors du développement embryonnaire (en minutes) dans la cellule excrétrice selon (Packer *et al.*, 2019). Les taux d'expression relatifs de la Rho GTPase CDC-42/Cdc-42 et des Rho GEF TIAM-1/Tiam1 et UNC-73/Trio sont montrés ici. (B) Quantification du défaut de canaux manquants pour les Rho GEF *tiam-1* et/ou *unc-73*. (C) Quantification du défaut de canaux manquants dans des expériences d'ARNi dirigée contre *cdc-42* sur des animaux sauvages ou mutants pour *sdn-1*. La référence correspond à des animaux nourris avec des bactéries contenant un Vecteur Vide (V V). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la proportion. Les astérisques indiquent la différence significative avec : ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.001$ (test Z, les valeurs p ont été corrigées à l'aide de la correction de Bonferroni); ns, non significatif.

ANNEXE B
TABLES D'INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

Tableau B.1. Liste des allèles mutants utilisés

Gène	Allèle	Nature de l'allèle	Référence
<i>rib-1</i>	<i>qm32</i>	Codon stop converti en Lys, étend le cadre de lecture dans la région 3'UTR. Perte de fonction partielle.	(Blanchette <i>et al.</i> , 2017)
<i>rib-2</i>	<i>qm46</i>	Substitution de Arg 434 Gln. Perte de fonction partielle.	(Blanchette <i>et al.</i> , 2017)
<i>sqv-5</i>	<i>k172</i>	Substitution Gly 663 Glu. Perte de fonction partielle.	(Suzuki <i>et al.</i> , 2006)
<i>hse-5</i>	<i>tm472</i>	Délétion de 1249 pb qui supprime la majorité de l'exon 4 jusqu'à l'exon 7, et ajout d'une adénosine qui décale le cadre de lecture après l'exon 4. nul	(Bulow et Hobert, 2004)
<i>hst-2</i>	<i>ok595</i>	Délétion de 1336 pb délétion qui supprime de l'exon 4 jusqu'à une partie de l'exon 7. Prédiction de nul	(Bulow et Hobert, 2004)
<i>hst-6</i>	<i>ok273</i>	Délétion de 1064 pb qui supprime les exons 4 et 5 puis ajout des nucléotides CTTT qui décalent le cadre de lecture après l'exon 3. Prédiction de nul.	(Bulow et Hobert, 2004)
	<i>zh20</i>	Délétion de 1258 pb délétion. Pas de transcrit détecté.	(Rhiner <i>et al.</i> , 2005)
<i>sdn-1</i>	<i>ok449</i>	Délétion de 483 pb dans le cadre de lecture, protéine toujours exprimée mais qui manque deux sites de glycosylation. Perte de fonction partielle.	(Minniti <i>et al.</i> , 2004)

<i>lon-2</i>	<i>e678</i>	Délétion ~9 kb. Nul.	(Gumienny <i>et al.</i> , 2007)
<i>gpn-1</i>	<i>tm595</i>	Délétion de 1411 pb, supprime une partie des exons 2, 3 et introduit un codon stop précoce. Supposé nul.	(Blanchette <i>et al.</i> , 2015; Hudson <i>et al.</i> , 2006)
<i>agr-1</i>	<i>tm2051</i>	Délétion de 423 pb, supprime les exons 26 et 27 résultants en une perte dans le cadre de 42 acides aminés. Perte de fonction partielle.	(Hrus <i>et al.</i> , 2007)
<i>unc-52</i>	<i>e444</i>	Substitution Arg en codon stop précoce dans l'exon 18. Perte de fonction partielle.	(Rogalski <i>et al.</i> , 1995)
<i>cle-1</i>	<i>cg120</i>	Délétion ~2 kb, supprime les exons 18 à 20 et ajout d'un stop prématuré. Perte de fonction partielle.	(Ackley <i>et al.</i> , 2001)
<i>unc-6</i>	<i>ev400</i>	Substitution Gln78 en codon stop précoce. Nul.	(Wadsworth <i>et al.</i> , 1996)
	<i>e78</i>	Substitution Cys410Tyr. Perte de fonction partielle.	(Lim <i>et al.</i> , 2002)
<i>unc-40</i>	<i>e271</i>	Substitution Arg824 en codon stop précoce. Nul.	(Stavoe <i>et al.</i> , 2012)
	<i>e1430</i>	Substitution Arg157 en codon stop précoce. Supposé nul.	(Chan <i>et al.</i> , 1996)
<i>unc-5</i>	<i>e53</i>	Substitution Trp283 en codon stop précoce. Nul.	(Killeen <i>et al.</i> , 2002)
<i>slt-1</i>	<i>eh15</i>	Duplication et délétion. La première copie contient une délétion de 1900 pb. Les deux copies ont une délétion de 100 pb. La deuxième copie produit des ARNm avec	(Hao <i>et al.</i> , 2001)

		un décalage dans le cadre de lecture. Forte perte de fonction voire nul.	
sax-3	<i>ky123</i>	Délétion du peptide signal et du premier exon. Perte de fonction partielle.	(Zallen <i>et al.</i> , 1998)
eva-1	<i>ok1133</i>	Délétion entre 501 et 1731pb avec insertion à la base 501. Probablement nul.	(Chan <i>et al.</i> , 2014; Consortium, 2012; Rella <i>et al.</i> , 2021)
	<i>mu28</i>	Substitution de Trp60 en codon stop précoce. Prédiction de nul.	(Zipkin <i>et al.</i> , 1997)
mig-2	<i>gm38</i>	Substitution de Ala163Val, dans le domaine de liaison au nucléotide guanine G5. Gain de fonction.	(Zipkin <i>et al.</i> , 1997)
	<i>gm103</i>	Substitution Gly16Glu dans le codon 16 empêchant l'hydrolyse du GTP. Constitutivement active.	(Zipkin <i>et al.</i> , 1997)
	<i>n3246</i>	Substitution de Gly60Arg. Gain de fonction.	(Reddien et Horvitz, 2000)
ced-10	<i>knu268</i>	Substitution de Pro29Ser affectant la région switch 1 et donc un excès de liaison à du GTP. Activation spontanée.	(Norgaard <i>et al.</i> , 2018)
	<i>n1993</i>	Substitution de Val190Gly, site de prénylation qui affecte le ciblage à la membrane. Perte de fonction partielle.	(Reddien et Horvitz, 2000)
	<i>rp100</i>	Substitution de Gly30Glu dans la région switch 1. Perte de fonction partielle.	(Norgaard <i>et al.</i> , 2018)

	<i>n3417</i>	Délétion de 977 bp, supprimer les exons 2 et 3. Prédiction de nul.	(Lundquist <i>et al.</i> , 2001)
	<i>G12V</i>	Substitution de Gly12Val. Prédiction d'activation constitutive.	(Lundquist <i>et al.</i> , 2001)
<i>unc-73</i>	<i>rh40</i>	Substitution de Ser1216Phe. Perte de la fonction Rac- GEF (mais pas Rho-GEF).	(Steven <i>et al.</i> , 1998)
<i>tiam-1</i>	<i>tm1556</i>	Délétion de 851 pb affectant le domaine d'homologie Dbl. Forte perte de fonction.	(Demarco <i>et al.</i> , 2012)

Tableau B.2. Liste des souches utilisées

Souche	Génotype	Transgène	Référence
Souches références			
N2			(Brenner, 1974)
SK4005	<i>zDIs5</i> I	[<i>Pmec-4::gfp</i>]	(Clark et Chiu, 2003)
SK4013	<i>zDIs13</i> IV	[<i>Ptph-1::gfp</i>]	(Clark et Chiu, 2003)
VQ1157	<i>arIs164</i> V	[<i>Pglt-3::venus</i>]	(Shaye et Greenwald, 2015)
VQ1158	<i>arIs195</i>	[<i>Pglt-3::LifeAct::tagrfp</i>]	(Shaye et Greenwald, 2015)
OH1360	<i>bgIs312</i>	<i>bgIs312</i> [<i>Ppes-6::gfp</i>]	(Berry <i>et al.</i> , 2003)
HSPG ou enzymes reliées			
VQ252	<i>rib-1(qm32)</i> IV; <i>zDIs5</i>		
VQ200	<i>rib-2(qm46)</i> III; <i>zDIs5</i>		
VQ661	<i>rib-1(qm32)</i> III; <i>zDIs13</i>		
VQ402	<i>rib-2(qm46)</i> III; <i>zDIs13</i>		
VQ342	<i>rib-1(qm32)</i> IV; <i>bgIs312</i>		(Blanchette <i>et al.</i> , 2017)
VQ343	<i>rib-2(qm46)</i> III; <i>bgIs312</i>		(Blanchette <i>et al.</i> , 2017)
VQ1373	<i>hse-5(tm472)</i> III; <i>arIs164</i> V		
VQ1322	<i>hst-2(ok595)</i> X; <i>arIs164</i> V		
VQ1374	<i>hst-6(ok273)</i> X; <i>arIs164</i> V		
VQ1356	<i>hse-5(tm472)</i> III; <i>hst-2(ok595)</i> <i>hst-6(ok273)</i> X; <i>arIs164</i> V		
VQ1315	<i>sqv-5(k172)</i> I; <i>arIs164</i> V		
VQ1166	<i>unc-52(e444)</i> II; <i>arIs164</i> V		
VQ1217	<i>agr-1(tm2051)</i> II; <i>arIs164</i> V		
VQ1184	<i>cle-1(cg120)</i> I; <i>arIs164</i> V		
VQ1170	<i>lon-2(e678)</i> X; <i>arIs164</i> V		
VQ1171	<i>gpn-1(tm595)</i> X; <i>arIs164</i> V		
VQ1230	<i>sdn-1(ok449)</i> X; <i>arIs164</i> V		
VQ1183	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V		
VQ1331	<i>arIs198</i> X; <i>opIs170</i> III	<i>opIs170</i> insertion de multiples copies [<i>Psdn-1::sdn-1::gfp</i>]	(Rhiner <i>et al.</i> , 2005)
VQ2065	<i>sdn-1(kr475)</i> X; <i>arIs164</i> V	<i>Kr475</i> édition CRISPR [<i>sdn-1::S71A, S86A, S214A::DEGRON::mNG</i>]	(Zhou <i>et al.</i> , 2021)
VQ2422	<i>sdn-1(kr388)</i> X; <i>arIs164</i> V	<i>Kr388</i> édition CRISPR	(Zhou <i>et al.</i> , 2021)

		[<i>sdn-1::S71A</i> , <i>S86A::DEGRON::mNG</i>]	
VQ2078	<i>sdn-1(kr499) X; arIs164 V</i>	<i>Kr499</i> édition CRISPR [<i>sdn-1ΔEFYA</i>]	(Zhou <i>et al.</i> , 2021)
VQ1191	<i>lon-2(e678) gpn-1(tm595) X;</i> <i>arIs164 V</i>		
VQ1192	<i>lon-2(e678) sdn-1(zh20) X; arIs164</i> <i>V</i>		
VQ1189	<i>gpn-1(tm595) sdn-1(zh20) X;</i> <i>arIs164 V</i>		
VQ1165	<i>lon-2(e678) gpn-1(tm595)</i> <i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V</i>		
Signaux/récepteurs de guidage			
VQ1280	<i>unc-6(ev400) X; arIs164 V</i>		
VQ1431	<i>unc-6(e78) X; arIs164 V</i>		
VQ1765	<i>unc-40(e1430) I; arIs164 V</i>		
VQ1471	<i>unc-40(e271) I; arIs164 V</i>		
VQ1806	<i>unc-5(e53) IV; arIs164 V</i>		
VQ1818	<i>unc-40(e1430) I; unc-5(e53) IV;</i> <i>arIs164 V</i>		
VQ1467	<i>unc-5(e53) IV; sdn-1(zh20) X;</i> <i>arIs164 V</i>		
VQ1577	<i>unc-40(e1430) I; sdn-1(zh20) X;</i> <i>arIs164 V</i>		
VQ1277	<i>slt-1(eh15) X; arIs164 V</i>		
VQ1332	<i>sax-3(ky123) X; arIs164 V</i>		
VQ1517	<i>eva-1(ok1133) I; arIs164 V</i>		
VQ1416	<i>sdn-1(zh20) sax-3(ky123) X;</i> <i>arIs164 V</i>		
VQ1286	<i>sdn-1(zh20) slt-1(eh15) X; arIs164</i> <i>V</i>		
VQ1313	<i>SlT-1(eh15) unc-6(ev400) X;</i> <i>arIs164 V</i>		
Rho GTPases et GEF			
QN68	<i>mig-2(mu28) X; arIs164 V</i>		(Arena <i>et al.</i> , 2022)
QN69	<i>mig-2(gm38) X; arIs164 V</i>		
QN70	<i>mig-2(gm103) X; arIs164 V</i>		
VQ1462	<i>sdn-1(zh20) mig-2(mu28) X;</i> <i>arIs164 V</i>		
QN214	<i>ced-10(rp100) IV; arIs198 V</i>		(Arena <i>et al.</i> , 2022)
VQ1730	<i>ced-10(n1993) IV; arIs164 V</i>		
VQ1832	<i>ced-10(knu268) IV; arIs164 V</i>		
VQ1758	<i>ced-10(n3417)/oxTi915</i> <i>dpy13(e184) IV; arIs164 V</i>	<i>oxTi915</i> [<i>Peft-3p::GFP::2xNLS</i>]	
QN323	<i>ced-10(n3246) IV; arIs164 V</i>		

VQ1740	<i>ced-10(n1993)</i> IV; <i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V		
VQ1731	<i>arIs164</i> V; <i>vasTi2</i>	<i>vasTi2</i> MiniMos insertion [Pgl-3:: <i>FLAG</i> :: <i>ced-10(+)</i>]	(Arena <i>et al.</i> , 2022)
VQ1733	<i>ced-10(n1993)</i> IV; <i>arIs164</i> V; <i>vasTi2</i>	<i>vasTi2</i> MiniMos insertion [Pgl-3:: <i>FLAG</i> :: <i>ced-10(+)</i>]	
VQ1734	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>vasTi2</i>	<i>vasTi2</i> MiniMos insertion [Pgl-3:: <i>FLAG</i> :: <i>ced-10(+)</i>]	
VQ1748	<i>ced-10(n1993)</i> IV; <i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>vasTi2</i>	<i>vasTi2</i> MiniMos insertion [Pgl-3:: <i>FLAG</i> :: <i>ced-10(+)</i>]	
VQ1716	<i>ced-10(n3246)</i> IV; <i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V		
VQ1801	<i>ced-10(knu268)</i> IV; <i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V		
QN322	<i>ced-10(n3246)/tmC25</i> IV; <i>mig-2(mu28)</i> X; <i>arIs164</i> V	<i>tmC25</i> [<i>unc-5(tmIs1241)</i>] + [Pmyo-2:: <i>venus</i>]	(Arena <i>et al.</i> , 2022)
QN438	<i>ced-10(n3417)/tmC25</i> IV; <i>mig-2(mu28)</i> X; <i>arIs164</i> V	<i>tmC25</i> [<i>unc-5(tmIs1241)</i>] + [Pmyo-2:: <i>venus</i>]	(Arena <i>et al.</i> , 2022)
VQ1624	<i>tiam-1(tm1556)</i> I; <i>arIs164</i> V		
VQ1620	<i>unc-73(rh40)</i> I; <i>arIs164</i> V		
VQ1635	<i>unc-73(rh40)</i> <i>tiam-1(tm1556)</i> I; <i>arIs164</i> V		
Visualisation du cytosquelette			
GS6602	<i>arIs201</i>	[Pgl-3:: <i>LifeAct</i> :: <i>TagRFP</i>]	(Shaye et Greenwald, 2016)
QN456	<i>arTi34</i> III; <i>arIs195</i> V	[Pgl-3:: <i>3xGFP</i> :: <i>EMTB</i>] + [Pgl-3:: <i>LifeAct</i> :: <i>TagRFP</i>]	
Autres			
VQ1288	<i>unc-39(e257)</i> <i>arIs164</i> V		

À moins d'être référencées, les souches dans ce tableau ont été construites dans le cadre de cette étude.

Tableau B.3. Liste des amorces utilisées pour le génotypage et le séquençage

Gène	Amorce	Séquence	Frag ment (pb)	Coordonnées sur le cosmide
<i>rib-1(qm32)</i> séquençage				
	oCB1026	gggtgcgtaaggagatgagg	456	F12F6 39341...39360, sens
	oCB1027	ggcaaccagccatcacagcc		F12F6 39797...39816, anti-sens
<i>rib-2(qm46)</i> séquençage				
	oCB1028	caacttatcggatcttcaacc	437	K01G5 4053...4073, sens
	oCB1029	ttccagcgggtccaaggagg		K01G5 4508...4490, anti-sens
<i>hse-5(tm472)</i>				
Amorces mutant	oCB1055	atcgtgtacgatgtgtcagc	546	B0285 15457...15476, sens
	oCB1056	atcgccctacacggtttcc		B0285 16217...16236, anti-sens
Amorces sauvage	oCB1055	atcgtgtacgatgtgtcagc	779	B0285 15457...15476, sens
	oCB1057	aactttctctcggaattg		B0285 17233...17251, anti-sens
<i>hst-2(ok595)</i>				
Amorces mutant	oCB1052	tattacaacatggacggagc	692	C34F6 17093...17112, sens
	oCB1054	aacattatgcgcatgaacgc		C34F6 15085...15104, anti-sens
Amorces sauvage	oCB1052	tattacaacatggacggagc	486	C34F6 17093...17112, sens
	oCB1053	ttagcagtgtattcaattacg		C34F6 16626...16645, anti-sens
<i>hst-6(ok273)</i>				
Amorces mutant	oCB1049	ttagacgtggctgttctcac	723	Y34B4A 39244...39263, sens
	oCB1051	tgtgagtctgttaagggtgg		Y34B4A 41012...41031, anti-sens
Amorces sauvage	oCB1049	ttagacgtggctgttctcac	804	Y34B4A 39244...39263, sens
	oCB1212	agaaatgttgtgtagaagtag		Y34B4A 40028...40048, anti-sens
<i>sdn-1(zh20)</i>				
Amorces mutant	oCB837	aaagagatgccggtcaggtg	410	F57C7 28510...28529, sens
	oCB842	aatggacgggatgagtgcc		F57C7 26861...26880, anti-sens
Amorces sauvage	oCB837	aaagagatgccggtcaggtg	293	F57C7 28510...28529, sens
	oCB876	cttcagattcgagcctgctttgc		F57C7 28237...28259, anti-sens
<i>sdn-1(ok449)</i>				
Amorces mutant	oCB1114	ttctgcctgtcgacttactc	297	F57C7 28453...28472, sens
	oCB1125	aagattgcggtaaacacatc		F57C7 27692...27712, anti-sens
Amorces sauvage	oCB1114	ttctgcctgtcgacttactc	478	F57C7 28453...28472, sens
	oCB1115	ttctgcctgcggttggtagc		F57C7 27994...28013, anti-sens
<i>gpn-1(tm595)</i>				
Amorces mutant	oCB1309	agtcgattgcaaacgaatacg	468	F59D12 36353...36373, sens
	oCB1310	tcacacagtacgcttggcagc		C03H12 356...376, anti-sens

Amorces sauvage	oCB1309 oCB1311	agtcgattgcaaacgaatac aagctttccatgcatactgc	393	F59D12 36353...36373, sens C03H12 1822...1842, anti-sens
<i>agr-1(tm2051)</i>				
Amorces mutant	oCB891 oCB893	cgaaaaatcgagagcaaaagg tcagattcttgacacatccc	362	F41G3 22649...22669, sens F41G3 21037...21056, anti-sens
Amorces sauvage	oCB890	tttgaactcttgacgaacc	1210	F41G3 22308...22327, anti-sens
	oCB891	cgaaaaatcgagagcaaaagg		F41G3 22649...22669, sens
<i>cle-1(cg120)</i>				
Amorces mutant	oCBQc45	ggtactggacatggatctgg	751	F39H11 14593...14612, anti-sens
Amorces sauvage	oCBQc46 oCBQc47	tgccaaactcgcttatctgg gctttcgagtaatgtacagg	879	F39H11 11859...11878, sens F39H11 12718...12737, anti-sens
	oCBQc46	tgccaaactcgcttatctgg		F39H11 11859...11878, sens
<i>unc-6(ev400)</i>				
ARMS-PCR				
Amorces mutant	oCB1712	gacacttgtgatgctagaacat tgct	217	F41C6 21346...21374, sens interne
	oCB1711	cagacttgtaaagtgcattgaat ctgg		F41C6 21536...21563, anti-sens externe
Amorces sauvage	oCB1713	ttgaaaagggtgtgcccaaaag tatac	198	F41C6 21202...21229, sens externe
	oCB1714	gttagaagagaggctggatggg agtg		F41C6 21374...21399, anti-sens interne
Fragment externe	oCB1711 + oCB1713		362	
<i>unc-40(e271)</i>				
For sequencing	oCB1076 oCB1077	ttgaatatttcggaggtgc aattcgtgtaactgcttcc	367	T19B4 8859...8878, anti-sens T19B4 9418...9436, sens
<i>unc-40(e1430)</i>				
For sequencing	oCB1078 oCB1079	agagaccagggagttacagg atcaatcgcgtgtacatgtg	367	T19B4 12759...12778, sens T19B4 13106...13125, anti-sens
<i>unc-5(e53)</i>				
ARMS-PCR				
Amorces mutant	oCB1757	gatgacaactcgaagagcaagc acgct	280	B0273 15164...15190, sens interne
	oCB1760	aatttcagttgacggtggttggtc cgaatg		B0273 15415...15444, anti-sens externe
Amorces sauvage	oCB1758	gatggaggatggagttcatgga gtgagtg	126	B0273 15190...15218, anti-sens interne
	oCB1759	tcagatcatctccaaaacatggct gtcc		B0273 15092...152119, sens externe
Fragment externe	oCB1759 + oCB1760		353	
<i>slt-1(eh15)</i>				
Amorces mutant	oCB919 oCB920	tatgacgtgtccggaaacc atttctctaatacgggtagc	467	C26G2 26145...26164, sens C26G2 28538...28557, anti-sens
Amorces sauvage	oCB922	tctcaattctaaccatccatgtc	339	C26G2 28199...28220, sens

	oCB920	atttctctaatacgggtagc		C26G2 28538...28557, anti-sens
<hr/>				
<i>sax-3(ky123)</i>				
Amorces mutant	oCB1038	agaatgtggctctctagtc	~330	ZK377 15840...15859, sens
	oCB1039	tcgtttccgcgcattcagtc		ZK377 16580...16599, anti-sens
Amorces sauvage	oCB1038	agaatgtggctctctagtc	527	ZK377 15840...15859, sens
	oCB1042	agcttcggattactgcttgc		ZK377 16348...16367, anti-sens
<hr/>				
<i>eva-1(ok1133)</i>				
Amorces mutant	oCB1792	cctcagagagtcacttcg	304	F32A7 6252...6269, anti-sens
	oCB1794	cgtgccctctattaatagc		F32A7 4747...4766, sens
Amorces sauvage	oCB1792	cctcagagagtcacttcg	531	F32A7 6252...6269, anti-sens
	oCB1793	ccttcctacactctaaacg		F32A7 5739...5758, sens
<hr/>				
<i>mig-2(mu28)</i>	ARMS-PCR			
Amorces mutant	oCB1717	ggaacgttgtgaacttaggattg	539	C35C5 20375...20400, sens interne
	oCB2088	gga cacattgaacctctgcactttacg		C35C5 20619...20642, anti-sens externe
Amorces sauvage	oCB1718	cataatcctcctgtccagcagtag cc	268	C35C5 20400...20425, anti-sens interne
	oCB2087	aacgccctcttctgagtatttcg		C35C5 19887...19910, sens externe
Fragment externe	oCB2087 + oCB2088		756	
<hr/>				
<i>ced-10(n3246)</i>				
For sequencing	oCB2008	actcgccggattgttcag	392	C09G12 34872...34889, sens
	oCB2009	gtcggccgataaatctcg		C09G12 35246...35263, anti-sens
<hr/>				
<i>ced-10(knu268)</i>	Mix ARMS-PCR et SS-PCR			
Amorces mutant	oCB2143	atgcccgttgtgatttgg	467	C09G12 36539...36556, anti-sens
	oCB2145	gggatgta ctc accgga		C09G12 36093...36109, sens
Amorces sauvage	oCB2055	aaaatgactcaccgtcgg ttgct	484	C09G12 36077...36105, sens
	oCB2057	attctc cttgatgcccggttgtgatttgg		C09G12 36539...36530, anti-sens
<hr/>				
<i>ced-10(n1993)</i>	SS-PCR			
Amorces mutant	oCB2019	cgccacaagagccaaa atct cgttca gtacggg	369	C09G12 34086...34120, anti-sens mutant
	oCB2017	tagagagtggaaacgccccag		C09G12 33752...33771, sens
Amorces sauvage	oCB2018	cgccacaagagccaaa atct cgttca gtacggt	369	C09G12 34086...34120, anti-sens sauvage
	oCB2017	tagagagtggaaacgccccag		C09G12 33752...33771, sens
<hr/>				
<i>ced-10(rp100)</i>	ARMS-PCR			
Amorces mutant	oCB1661	ctacaccacaaacgcatttcc ag a	858	C09G12 36105...36129, anti-sens interne
	oCB1860	catcacatttgcgtgagtgttgcg		C09G12 35271...35295, sens externe
Amorces sauvage	oCB1859	cccgttgtgatttggtttctc	476	C09G12 36531...36553, anti-sens externe

	oCB1862	aaatgactcaccgctcgaatat t atc		C09G12 36078...36105, sens interne
Fragment externe	oCB1859 + oCB1860		1283	
<i>ced-10(n3417)</i>				
Amorces mutant	oCB2010	ggagaatatattccgacgg	975	C09G12 36088...36106, anti-sens
	oCB2011	tgtttcagaccacgttgc		C09G12 34155...34172, sens
Amorces sauvage	oCB2012	ctgatctgcgtgaggatc	635	C09G12 34772...34789, anti-sens
	oCB2011	tgtttcagaccacgttgc		C09G12 34155...34172, sens
<i>unc-73(rh40)</i>				
	SS-PCR			
Amorces mutant	oCB2024	atgcttgagccaatgcgag tcag cttcaact	337	F55C7 26701...26732, sens mutant
	oCB2025	acgatgcaccaacagcttc		F55C7 26396...26414, anti-sens
Amorces sauvage	oCB2034	atgcttgagccaatgcgag tcag cttcaacc	337	F55C7 26701...26732, sens sauvage
	oCB2025	acgatgcaccaacagcttc		F55C7 26396...26414, anti-sens
<i>tiam-1(ok1556)</i>				
Amorces mutant	oCB1899	caaatggacgtcttgac	457	C11D9 1358...1375, sens
	oCB1901	taggaaacggttgacttc		C11D9 2649...2666, anti-sens
Amorces sauvage	oCB1899	caaatggacgtcttgac	929	C11D9 1358...1375, sens
	oCB1900	acggattaccaagtttcg		C11D9 2270...2287, anti-sens

Les souches générées dans le cadre de cette étude et comprenant un génotype qui ne se trouve pas dans ce tableau ont été construites sur la base du phénotype.

Pour les ARMS-PCR et SS-PCR : Les bases en **bleu** représentent des mésappariements face au brin matrice (peu importe le génotype) et les bases en **rouge** représentent des mésappariements spécifiques de l'allèle inverse (mésappariement de l'amorce sauvage sur le brin matrice, mais pas sur le brin sauvage et inversement).

Par exemple : l'amorce oCB2019 spécifique de l'allèle mutant *ced-10(n1993)* a pour séquence : ccgccacaaagagccaaa**atctcgttca**gttacgg

La séquence **atctcgttca** n'est pas correspondante au brin matrice du gène *ced-10*, ni de l'allèle sauvage ni du mutant. La base terminale **g** n'est spécifiquement pas correspondante avec la séquence de l'allèle sauvage du gène *ced-10*, mais est correspondante avec la séquence de l'allèle mutant *ced-10(n1993)*.

Tableau B.4. Liste des souches transgéniques utilisées

Souche	Génotype	Transgène
Sauvetage <i>sdn-1</i> tissu-spécifique		
VQ1434	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx437</i>	pCB420 [P <i>glt-3::sdn-1(+)</i>] à 0.2 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ1435	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx438</i>	pCB420 [P <i>glt-3::sdn-1(+)</i>] à 0.2 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ1645	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx509</i>	pCB420 [P <i>glt-3::sdn-1(+)</i>] à 0.2 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ2412	<i>arIs164 V; qvEx775</i>	pCB420 [P <i>glt-3::sdn-1(+)</i>] à 0.2 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #4
VQ2413	<i>arIs164 V; qvEx776</i>	pCB420 [P <i>glt-3::sdn-1(+)</i>] à 0.2 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #5
VQ1292	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx348</i>	pCB420 [P <i>glt-3::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ1293	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx349</i>	pCB420 [P <i>glt-3::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ1303	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx354</i>	pCB420 [P <i>glt-3::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ1603	<i>arIs164 V; qvEx348</i>	pCB420 [P <i>glt-3::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ1301	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx352</i>	pCB265 [P <i>grd-10::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ1302	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx353</i>	pCB265 [P <i>grd-10::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ1303	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx354</i>	pCB265 [P <i>grd-10::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ1488	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx445</i>	pCB425 [P <i>rgef-1::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ1647	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx511</i>	pCB425 [P <i>rgef-1::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ1648	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx512</i>	pCB425 [P <i>rgef-1::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ1649	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx513</i>	pCB425 [P <i>rgef-1::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #4
VQ1652	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx516</i>	pCB436 [P <i>rab-3::sdn-1(+)</i>] à 5 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ1564	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx474</i>	pCB436 [P <i>rab-3::sdn-1(+)</i>] à 5 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ1646	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx510</i>	pCB242 [P <i>mec-7::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ1446	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx439</i>	pCB242 [P <i>mec-7::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, Punc-122:: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #2

VQ1447	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx440</i>	pCB242 [<i>Pmec-7::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ1650	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx514</i>	pCB423 [<i>Pmyo-3::sdn-1(+)</i>] à 10 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ1651	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx515</i>	pCB423 [<i>Pmyo-3::sdn-1(+)</i>] à 10 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ1533	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx465</i>	pCB423 [<i>Pmyo-3::sdn-1(+)</i>] à 10 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ1565	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx475</i>	pCB427 [<i>Pmyo-2::sdn-1(+)</i>] à 1 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ1653	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx517</i>	pCB427 [<i>Pmyo-2::sdn-1(+)</i>] à 1 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ1773	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx571</i>	pCB445 [<i>Phlh-17::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, <i>Plgc-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ1774	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx572</i>	pCB445 [<i>Phlh-17::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, <i>Plgc-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ1775	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx573</i>	pCB445 [<i>Phlh-17::sdn-1(+)</i>] à 25 ng/μL, <i>Plgc-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #3
Expression de <i>lon-2</i> et <i>gpn-1</i>		
VQ2308	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx748</i>	pCB458 [<i>Pglt-3::lon-2(+)</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ2309	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx749</i>	pCB458 [<i>Pglt-3::lon-2(+)</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ2310	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx750</i>	pCB458 [<i>Pglt-3::lon-2(+)</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ2256	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx725</i>	pCB458 [<i>Pglt-3::lon-2(+)</i>] à 50 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ2257	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx726</i>	pCB458 [<i>Pglt-3::lon-2(+)</i>] à 50 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ2258	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx727</i>	pCB458 [<i>Pglt-3::lon-2(+)</i>] à 50 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ2259	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx728</i>	pCB458 [<i>Pglt-3::lon-2(+)</i>] à 50 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #4
VQ2260	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx729</i>	pCB458 [<i>Pglt-3::lon-2(+)</i>] à 50 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #5
VQ2261	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx730</i>	pCB458 [<i>Pglt-3::lon-2(+)</i>] à 50 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #6
VQ2320	<i>arIs164 V; qvEx729</i>	pCB458 [<i>Pglt-3::lon-2(+)</i>] à 50 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #5
VQ2354	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx760</i>	pCB528 [<i>Pglt-3::lon-2ΔHS</i>] à 50 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ2355	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx761</i>	pCB528 [<i>Pglt-3::lon-2ΔHS</i>] à 50 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #2

VQ2356	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx762</i>	pCB528 [Pgl-3:: <i>lon-2ΔHS</i>] à 50 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ2357	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx763</i>	pCB529 [Pgl-3:: <i>gpn-1(+)</i>] à 50 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ2358	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx764</i>	pCB529 [Pgl-3:: <i>gpn-1(+)</i>] à 50 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ2359	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx765</i>	pCB529 [Pgl-3:: <i>gpn-1(+)</i>] à 50 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
Recombinants domaines de <i>sdn-1</i>		
VQ1735	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx557</i>	pCB446 [Pgl-3:: <i>sdn-1ΔHS</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ1736	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx558</i>	pCB446 [Pgl-3:: <i>sdn-1ΔHS</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ1737	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx559</i>	pCB446 [Pgl-3:: <i>sdn-1ΔHS</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ1738	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx560</i>	pCB446 [Pgl-3:: <i>sdn-1ΔHS</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #4
VQ1739	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx561</i>	pCB446 [Pgl-3:: <i>sdn-1ΔHS</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #5
VQ2332	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx757</i>	pCB526 [Pgl-3:: <i>sdn-1ΔICD</i>] à 0.2 g/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ2333	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx758</i>	pCB526 [Pgl-3:: <i>sdn-1ΔICD</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ2334	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx759</i>	pCB526 [Pgl-3:: <i>sdn-1ΔICD</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ1691	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx545</i>	pCB443 [Pgl-3:: <i>sdn-1ΔFRIRKK</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ2018	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx627</i>	pCB443 [Pgl-3:: <i>sdn-1ΔFRIRKK</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plg-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ2027	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx633</i>	pCB443 [Pgl-3:: <i>sdn-1ΔFRIRKK</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plg-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ1643	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx508</i>	pCB442 [Pgl-3:: <i>sdn-1ΔDEGSY</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ2009	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx625</i>	pCB442 [Pgl-3:: <i>sdn-1ΔDEGSY</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plg-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ2010	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx626</i>	pCB442 [Pgl-3:: <i>sdn-1ΔDEGSY</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plg-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ2019	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx628</i>	pCB444 [Pgl-3:: <i>sdn-1YtoA</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plg-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ2020	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx629</i>	pCB444 [Pgl-3:: <i>sdn-1YtoA</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plg-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ2021	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx630</i>	pCB444 [Pgl-3:: <i>sdn-1YtoA</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plg-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #3

VQ2312	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx752</i>	pCB525 [Pgl-3::sp_mNG_nlg-1ECD+TM::sdn-1ICD] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ2330	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx755</i>	pCB525 [Pgl-3::sp_mNG_nlg-1ECD+TM::sdn-1ICD] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ2331	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx756</i>	pCB525 [Pgl-3::sp_mNG_nlg-1ECD+TM::sdn-1ICD] à 0.2 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
Récepteurs myristoylés		
VQ2212	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx707</i>	pCB454 [Pgl-3::myr::unc-5::gfp] à 15 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ2213	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx708</i>	pCB454 [Pgl-3::myr::unc-5::gfp] à 15 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ2214	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx709</i>	pCB454 [Pgl-3::myr::unc-5::gfp] à 15 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ2298	<i>unc-40(e1430) I; arIs164 V; qvEx742</i>	pCB454 [Pgl-3::myr::unc-5::gfp] à 15 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #4
VQ2299	<i>unc-40(e1430) I; arIs164 V; qvEx743</i>	pCB454 [Pgl-3::myr::unc-5::gfp] à 15 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #5
VQ2230	<i>unc-40(e1430) I; arIs164 V; qvEx744</i>	pCB454 [Pgl-3::myr::unc-5::gfp] à 15 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #6
VQ2424	<i>unc-40(e1430) I; sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx777</i>	pCB454 [Pgl-3::myr::unc-5::gfp] à 15 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #7
VQ2425	<i>unc-40(e1430) I; sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx778</i>	pCB454 [Pgl-3::myr::unc-5::gfp] à 15 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #8
VQ2426	<i>unc-40(e1430) I; sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx779</i>	pCB454 [Pgl-3::myr::unc-5::gfp] à 15 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #9
VQ2264	<i>arIs164 V; qvEx731</i>	pCB454 [Pgl-3::myr::unc-5::gfp] à 15 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #10
VQ2265	<i>arIs164 V; qvEx732</i>	pCB454 [Pgl-3::myr::unc-5::gfp] à 15 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #11
VQ2215	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx710</i>	pCB453 [Pgl-3::myr::unc-40::gfp] à 25 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ2216	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx711</i>	pCB453 [Pgl-3::myr::unc-40::gfp] à 25 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ2217	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx712</i>	pCB453 [Pgl-3::myr::unc-40::gfp] à 25 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ2269	<i>unc-5(e53) IV; arIs164 V; qvEx733</i>	pCB453 [Pgl-3::myr::unc-40::gfp] à 25 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #4
VQ2270	<i>unc-5(e53) IV; arIs164 V; qvEx734</i>	pCB453 [Pgl-3::myr::unc-40::gfp] à 25 ng/μL, <i>Punc-122::rfp</i> , pBSK+. Lignée #5

VQ2271	<i>unc-5(e53)</i> IV; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx735</i>	pCB453 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-40</i> :: <i>gfp</i>] à 25 ng/μL, <i>Punc-122</i> :: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #6
VQ2272	<i>unc-5(e53)</i> IV; <i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx736</i>	pCB453 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-40</i> :: <i>gfp</i>] à 25 ng/μL, <i>Punc-122</i> :: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #7
VQ2273	<i>unc-5(e53)</i> IV; <i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx737</i>	pCB453 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-40</i> :: <i>gfp</i>] à 25 ng/μL, <i>Punc-122</i> :: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #8
VQ2274	<i>unc-5(e53)</i> IV; <i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx738</i>	pCB453 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-40</i> :: <i>gfp</i>] à 25 ng/μL, <i>Punc-122</i> :: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #9
VQ2229	<i>arIs164</i> V; <i>qvEx719</i>	pCB453 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-40</i> :: <i>gfp</i>] à 25 ng/μL, <i>Punc-122</i> :: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #10
VQ2230	<i>arIs164</i> V; <i>qvEx720</i>	pCB453 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-40</i> :: <i>gfp</i>] à 25 ng/μL, <i>Punc-122</i> :: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #11
VQ2231	<i>arIs164</i> V; <i>qvEx721</i>	pCB453 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-40</i> :: <i>gfp</i>] à 25 ng/μL, <i>Punc-122</i> :: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #12
VQ2311	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx751</i>	pCB454 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-5</i> :: <i>gfp</i>] à 15 ng/μL, pCB453 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-40</i> :: <i>gfp</i>] à 25 ng/μL, <i>Punc-122</i> :: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ2328	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx753</i>	pCB454 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-5</i> :: <i>gfp</i>] à 15 ng/μL, pCB453 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-40</i> :: <i>gfp</i>] à 25 ng/μL, <i>Punc-122</i> :: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ2329	<i>sdn-1(zh20)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx754</i>	pCB454 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-5</i> :: <i>gfp</i>] à 15 ng/μL, pCB453 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-40</i> :: <i>gfp</i>] à 25 ng/μL, <i>Punc-122</i> :: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ2305	<i>arIs164</i> V; <i>qvEx745</i>	pCB454 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-5</i> :: <i>gfp</i>] à 15 ng/μL, pCB453 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-40</i> :: <i>gfp</i>] à 25 ng/μL, <i>Punc-122</i> :: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #4
VQ2306	<i>arIs164</i> V; <i>qvEx746</i>	pCB454 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-5</i> :: <i>gfp</i>] à 15 ng/μL, pCB453 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-40</i> :: <i>gfp</i>] à 25 ng/μL, <i>Punc-122</i> :: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #5
VQ2307	<i>arIs164</i> V; <i>qvEx747</i>	pCB454 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-5</i> :: <i>gfp</i>] à 15 ng/μL, pCB453 [Pgl-3:: <i>myr</i> :: <i>unc-40</i> :: <i>gfp</i>] à 25 ng/μL, <i>Punc-122</i> :: <i>rfp</i> , pBSK+. Lignée #6
Rho GTPases		
VQ1800	<i>sdn-1(zh20)</i> <i>mig-2(mu28)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx585</i>	pCB474 [Pgl-3:: <i>mig-2(+)</i>] à 10 ng/μL, <i>Plgc-11</i> :: <i>mcherry</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ1829	<i>sdn-1(zh20)</i> <i>mig-2(mu28)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx590</i>	pCB474 [Pgl-3:: <i>mig-2(+)</i>] à 10 ng/μL, <i>Plgc-11</i> :: <i>mcherry</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ1830	<i>sdn-1(zh20)</i> <i>mig-2(mu28)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx591</i>	pCB474 [Pgl-3:: <i>mig-2(+)</i>] à 10 ng/μL, <i>Plgc-11</i> :: <i>mcherry</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ1897	<i>sdn-1(zh20)</i> <i>mig-2(mu28)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx598</i>	pCB477 [Pgl-3:: <i>mig-2(gm103)</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plgc-11</i> :: <i>mcherry</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ1898	<i>sdn-1(zh20)</i> <i>mig-2(mu28)</i> X; <i>arIs164</i> V; <i>qvEx599</i>	pCB477 [Pgl-3:: <i>mig-2(gm103)</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plgc-11</i> :: <i>mcherry</i> , pBSK+. Lignée #2

VQ1899	<i>sdn-1(zh20) mig-2(mu28) X;</i> <i>arIs164 V; qvEx600</i>	pCB477 [<i>Pglt-3::mig-2(gm103)</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plgc-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #3
VQ1900	<i>sdn-1(zh20) mig-2(mu28) X;</i> <i>arIs164 V; qvEx601</i>	pCB477 [<i>Pglt-3::mig-2(gm103)</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plgc-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #4
VQ2360	<i>ced-10(n1993) IV; sdn-1(zh20) X;</i> <i>arIs164 V; qvEx766</i>	pCB500 [<i>Pglt-3::ced-10(G12V)</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plgc-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ2361	<i>ced-10(n1993) IV; sdn-1(zh20) X;</i> <i>arIs164 V; qvEx767</i>	pCB500 [<i>Pglt-3::ced-10(G12V)</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plgc-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ2362	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx768</i>	pCB500 [<i>Pglt-3::ced-10(G12V)</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plgc-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #1
VQ2363	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx769</i>	pCB500 [<i>Pglt-3::ced-10(G12V)</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plgc-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #2
VQ2364	<i>sdn-1(zh20) X; arIs164 V; qvEx770</i>	pCB500 [<i>Pglt-3::ced-10(G12V)</i>] à 0.2 ng/μL, <i>Plgc-11::mcherry</i> , pBSK+. Lignée #3

Toutes les lignées transgéniques utilisées ont été générées dans le cadre de cette étude.

Les marqueurs de co-injections utilisés (*Punc-122::rfp* et *Plgc-11::mcherry*) ont été injectés à 50 ng/μL.

Le pBSK+ a été ajouté dans le mix d'injection jusqu'à obtenir une concentration totale de 200 ng/μL

d'ADN (comprenant le plasmide d'intérêt, le marqueur de co-injection et le pBSK+).

Participation des différents contributeurs à ces travaux (les plus importants sont nommés en premiers, puis par ordre décroissant). Les contributeurs (membres du laboratoire de la Pre Claire Bénard sauf si précisé) sont :

- Raphaël Dima (étudiant au doctorat)
- Lise Rivollet (agente de recherche)
- Marianna Bah Tahé (étudiante à la maîtrise)
- Yann Chabi (étudiant à la maîtrise)
- Anna Ramírez-Suárez (étudiante au doctorat)
- Marianne Moore (stagiaire de 1^{er} cycle)
- Alexandra Socovich et Anthony Arena (étudiants au doctorat dans l'équipe de notre collaborateur Dr Daniel Shaye à l'université d'Illinois à Chicago).

De plus, il va de soi que la Pre Claire Bénard a participé à la conception et aux designs expérimentaux de ces travaux. Raphaël Dima a généré les graphiques, analyses statistiques, et assemblé toutes les figures (à l'exception des figures (**Fig. 3.2D-E**)).

Tableau B.5. Liste des contributions détaillées

Figure	Design expérimental	Construction d'outils moléculaires ou génétiques	Acquisition des données
3.1A-C	Lise Rivollet	Lise Rivollet, Marianne Moore	Raphaël Dima , Lise Rivollet, Marianne Moore
3.1D	Raphaël Dima	Raphaël Dima	Raphaël Dima
3.1E-F	Lise Rivollet, Raphaël Dima	Lise Rivollet, Marianne Moore, Marianne Bah Tahé, Raphaël Dima	Lise Rivollet, Marianne Bah Tahé, Raphaël Dima
3.2A	Lise Rivollet	Lise Rivollet	Lise Rivollet
3.2B	Marianne Bah Tahé		Marianne Bah Tahé
3.2C-D	Équipe du Dr Daniel Shaye	Équipe du Dr Daniel Shaye	Alexandra Socovich
3.2E	Raphaël Dima	Raphaël Dima	Raphaël Dima
3.3B	Raphaël Dima	Raphaël Dima , Lise Rivollet	Raphaël Dima
3.3C-D	Raphaël Dima	Raphaël Dima , Anna Ramírez-Suárez, Yann Chabi	Raphaël Dima
3.4B	Raphaël Dima	Raphaël Dima , Marianne Bah Tahé, Anna Ramírez-Suárez	Raphaël Dima
3.4C	Raphaël Dima , Marianne Bah Tahé	Raphaël Dima , Marianne Bah Tahé, Anna Ramírez-Suárez	Raphaël Dima
3.5C-E	Lise Rivollet, Marianne Bah Tahé, Raphaël Dima , Yann Chabi	Lise Rivollet, Marianne Bah Tahé, Raphaël Dima , Yann Chabi	Raphaël Dima , Marianne Bah Tahé, Yann Chabi, Lise Rivollet
3.6A-C	Raphaël Dima	Raphaël Dima	Raphaël Dima

3.7B- 3.8B- 3.9A	Raphaël Dima	Raphaël Dima , Yann Chabi, Anthony Arena (pour le construit <i>vasTi2</i>)	Raphaël Dima , Yann Chabi, Lise Rivollet, Marianne Bah Tahé
3.9B	Raphaël Dima	Raphaël Dima , Yann Chabi	Raphaël Dima , Yann Chabi
3.10A	Raphaël Dima , Yann Chabi	Yann Chabi, Raphaël Dima	Raphaël Dima
3.10B	Raphaël Dima	Raphaël Dima , Yann Chabi	Raphaël Dima , Yann Chabi
3.10C	Raphaël Dima	Raphaël Dima , Yann Chabi	Raphaël Dima , Yann Chabi

BIBLIOGRAPHIE

- Abrams J et Nance J (2021) A polarity pathway for exocyst-dependent intracellular tube extension. *Elife* 10: e65169.
- Ackley BD, Crew JR, Elamaa H, Pihlajaniemi T, Kuo CJ et Kramer JM (2001) The NC1/endostatin domain of *Caenorhabditis elegans* type XVIII collagen affects cell migration and axon guidance. *Journal of Cell Biology* 152: 1219-1232.
- Adler CE, Fetter RD et Bargmann CI (2006) UNC-6/Netrin induces neuronal asymmetry and defines the site of axon formation. *Nature Neuroscience* 9: 511-518.
- Ahn J, Ludecke HJ, Lindow S, Horton WA, Lee B, Wagner MJ, Horsthemke B et Wells DE (1995) Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat Genet* 11: 137-143.
- Alan JK, Struckhoff EC et Lundquist EA (2013) Multiple cytoskeletal pathways and PI3K signaling mediate CDC-42-induced neuronal protrusion in *C. elegans*. *Small GTPases* 4: 208-220.
- Alexander M, Chan KKM, Byrne AB, Selman G, Lee T, Ono J, Wong E, Puckrin R, Dixon SJ et Roy PJ (2009) An UNC-40 pathway directs postsynaptic membrane extension in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 136: 911-922.
- Altun ZF et Hall DH (2009a) Excretory system. *Wormatlas* 1.17.
- Altun ZF et Hall DH (2009b) Introduction to *C. elegans* anatomy. *Wormatlas* 1.1.
- Arena AF, Escudero J et Shaye DD (2022) A metazoan-specific C-terminal motif in EXC-4 and Gα-Rho/Rac signaling regulate cell outgrowth during tubulogenesis in *C. elegans*. *Development* 149: 200748.
- Asakura T, Ogura K et Goshima Y (2007) UNC-6 expression by the vulval precursor cells of *Caenorhabditis elegans* is required for the complex axon guidance of the HSN neurons. *Developmental Biology* 304: 800-810.

- Attreed M, Desbois M, van Kuppevelt TH et Bulow HE (2012) Direct visualization of specifically modified extracellular glycans in living animals. *Nature Methods* 9: 477-479.
- Attreed M, Saied-Santiago K et Bulow HE (2016) Conservation of anatomically restricted glycosaminoglycan structures in divergent nematode species. *Glycobiology* 26: 862-870.
- Bai G, Chivatakarn O, Bonanomi D, Lettieri K, Franco L, Xia C, Stein E, Ma L, Lewcock JW et Pfaff SL (2011) Presenilin-Dependent Receptor Processing Is Required for Axon Guidance. *Cell* 144: 106-118.
- Balistreri CR et Monastero R (2025) Syndecans in Alzheimer's disease: pathogenetic mechanisms and potential therapeutic targets. *Neural Regeneration Research* 20: 2594-2595.
- Bashaw GJ et Goodman CS (1999) Chimeric Axon Guidance Receptors. *Cell* 97: 917-926.
- Bass MD, Morgan MR, Roach KA, Settleman J, Goryachev AB et Humphries MJ (2008) p190RhoGAP is the convergence point of adhesion signals from $\alpha 5 \beta 1$ integrin and syndecan-4. *The Journal of Cell Biology* 181: 1013-1026.
- Bass MD, Roach KA, Morgan MR, Mostafavi-Pour Z, Schoen T, Muramatsu T, Mayer U, Ballestrem C, Spatz JP et Humphries MJ (2007) Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology* 177: 527-538.
- Bass MD, Williamson RC, Nunan RD, Humphries JD, Byron A, Morgan MR, Martin P et Humphries MJ (2011) A syndecan-4 hair trigger initiates wound healing through caveolin- and RhoG-regulated integrin endocytosis. *Developmental Cell* 21: 681-693.
- Beauvais DM, Ell BJ, McWhorter AR et Rapraeger AC (2009) Syndecan-1 regulates $\alpha \nu \beta 3$ and $\alpha \nu \beta 5$ integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor. *Journal of Experimental Medicine* 206: 691-705.
- Beauvais DM et Rapraeger AC (2003) Syndecan-1-mediated cell spreading requires signaling by $\alpha \nu \beta 3$ integrins in human breast carcinoma cells. *Experimental Cell Research* 286: 219-232.
- Bennett KL, Bradshaw J, Youngman T, Rodgers J, Greenfield B, Aruffo A et Linsley PS (1997) Deleted in colorectal carcinoma (DCC) binds heparin via its fifth fibronectin type III domain. *Journal of Biological Chemistry* 272: 26940-26946.

- Berry KL, Bulow HE, Hall DH et Hobert O (2003) A *C. elegans* CLIC-like protein required for intracellular tube formation and maintenance. *Science* 302: 2134-2137.
- Bespalov MM, Sidorova YA, Tumova S, Ahonen-Bishopp A, Magalhães AC, Kuleskiy E, Paveliev M, Rivera C, Rauvala H et Saarma M (2011) Heparan Sulfate Proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *Journal of Cell Biology* 192: 153-169.
- Blanchette CR, Perrat PN, Thackeray A et Bénard CY (2015) Glypican Is a Modulator of Netrin-Mediated Axon Guidance. *PLOS Biology* 13: e1002183.
- Blanchette CR, Thackeray A, Perrat PN, Hekimi S et Bénard CY (2017) Functional Requirements for Heparan Sulfate Biosynthesis in Morphogenesis and Nervous System Development in *C. elegans*. *PLOS Genetics* 13: e1006525.
- Bradke F et Dotti CG (2000) Changes in membrane trafficking and actin dynamics during axon formation in cultured hippocampal neurons. *Microscopy Research and Technique* 48: 3-11.
- Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, Udeshi ND, Svinkina T, Carr SA, Feldman JL, Perrimon N et Ting AY (2018) Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology* 36: 880-887.
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94.
- Brockstedt U, Dobra K, Nurminen M et Hjerpe A (2002) Immunoreactivity to cell surface syndecans in cytoplasm and nucleus: tubulin-dependent rearrangements. *Experimental Cell Research* 274: 235-245.
- Buechner M, Hall DH, Bhatt H et Hedgecock EM (1999) Cystic canal mutants in *Caenorhabditis elegans* are defective in the apical membrane domain of the renal (excretory) cell. *Developmental Biology* 214: 227-241.
- Bulow HE (2021) Roles of glycoconjugates in neural patterning in *C. elegans*. *Current Topics in Developmental Biology* 144: 377-408.

- Bülow HE, Berry KL, Topper LH, Peles E et Hobert O (2002) Heparan Sulfate Proteoglycan-dependent induction of axon branching and axon misrouting by the Kallmann syndrome gene *kal-1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 6346-6351.
- Bülow HE, Boulin T et Hobert O (2004) Differential functions of the *C. elegans* FGF receptor in axon outgrowth and maintenance of axon position. *Neuron* 42: 367-374.
- Bulow HE et Hobert O (2004) Differential sulfations and epimerization define Heparan Sulfate specificity in nervous system development. *Neuron* 41: 723-736.
- Bulow HE et Hobert O (2006) The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22: 375-407.
- Bulow HE, Tjoe N, Townley RA, Didiano D, van Kuppevelt TH et Hobert O (2008) Extracellular sugar modifications provide instructive and cell-specific information for axon-guidance choices. *Current Biology* 18: 1978-1985.
- Cabello J, Sämamann J, Gómez-Orte E, Erazo T, Coppa A, Pujol A, Büssing I, Schulze B, Lizcano JM, Ferrer I, et al. (2014) PDR-1/hParkin negatively regulates the phagocytosis of apoptotic cell corpses in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death and Disease* 5: e1120-e1120.
- Capurro MI, Xu P, Shi W, Li F, Jia A et Filmus J (2008) Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Developmental Cell* 14: 700-711.
- Celestrin K, Díaz-Balzac CA, Tang LTH, Ackley BD et Bülow HE (2018) Four specific immunoglobulin domains in UNC-52/Perlecan function with NID-1/Nidogen during dendrite morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 145: dev158881.
- Chakravarti R, Sapountzi V et Adams JC (2005) Functional Role of syndecan-1 Cytoplasmic V Region in Lamellipodial Spreading, Actin Bundling, and Cell Migration. *Molecular Biology of the Cell* 16: 3678-3691.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW et Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.

- Chan KKM, Seetharaman A, Bagg R, Selman G, Zhang Y, Kim J et Roy PJ (2014) EVA-1 Functions as an UNC-40 Co-receptor to Enhance Attraction to the MADD-4 Guidance Cue in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics* 10: e1004521.
- Chan SSY, Zheng H, Su MW, Wilk R, Killeen MT, Hedgecock EM et Culotti JG (1996) UNC-40, a *C. elegans* Homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), Is Required in Motile Cells Responding to UNC-6 Netrin Cues. *Cell* 87: 187-195.
- Chen J, Wang F, He C et Luo S-Z (2021) Multiple dimerizing motifs at different locations modulate the dimerization of the syndecan transmembrane domains. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 106: 107938.
- Chen K et Williams KJ (2013) Molecular Mediators for Raft-dependent Endocytosis of syndecan-1, a Highly Conserved, Multifunctional Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 288: 13988-13999.
- Cheng P-L, Lu H, Shelly M, Gao H et Poo M-M (2011) Phosphorylation of E3 ligase smurf1 switches its substrate preference in support of axon development. *Neuron* 69: 231-243.
- Chilton JK (2006) Molecular mechanisms of axon guidance. *Developmental biology* 292: 13-24.
- Chisholm AD, Hutter H, Jin Y et Wadsworth WG (2016) The genetics of axon guidance and axon regeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 204: 849-882.
- Chisholm AD et Xu S (2012) The *Caenorhabditis elegans* epidermis as a model skin. II: differentiation and physiological roles. *WIREs Developmental Biology* 1: 879-902.
- Chmelova M, Androvic P, Kirdajova D, Tureckova J, Kriska J, Valihrach L, Anderova M et Vargova L (2023) A view of the genetic and proteomic profile of extracellular matrix molecules in aging and stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 17: 1296455.
- Cizeron M, Granger L, Bulow HE et Bessereau JL (2021) Specific Heparan Sulfate modifications stabilize the synaptic organizer MADD-4/Punctin at *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junctions. *Genetics* 218: iyab073.
- Clark SG et Chiu C (2003) *C. elegans* ZAG-1, a Zn-finger-homeodomain protein, regulates axonal development and neuronal differentiation. *Development* 130: 3781-3794.

- Conde C, Arias C, Robin M, Li A, Saito M, Chuang J-Z, Nairn AC, Sung C-H et Cáceres A (2010) Evidence for the involvement of Lfc and Tctex-1 in axon formation. *The Journal of Neuroscience* 30: 6793-6800.
- Consortium CeDM (2012) large-scale screening for targeted knockouts in the *Caenorhabditis elegans* genome. *G3 (Bethesda)* 2: 1415-1425.
- Consortium CeS (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2018.
- Conway CD, Howe KM, Nettleton NK, Price DJ, Mason JO et Pratt T (2011) Heparan Sulfate sugar modifications mediate the functions of Slits and other factors needed for mouse forebrain commissure development. *Journal of Neuroscience* 31: 1955-1970.
- Corsi AK (2015) A Transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* 1-31.
- Couchman JR, Gopal S, Lim HC, Norgaard S et Multhaupt HA (2015) Fell-Muir Lecture: syndecans: from peripheral coreceptors to mainstream regulators of cell behaviour. *International Journal of Experimental Pathology* 96: 1-10.
- Culetto E et Sattelle DB (2000) A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Human Molecular Genetics* 9: 869-877.
- Da Silva JS, Medina M, Zuliani C, Di Nardo A, Witke W et Dotti CG (2003) RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *Journal of Cell Biology* 162: 1267-1279.
- Daiber T, Vanderzwan-Butler CJ, Bashaw GJ et Evans TA (2021) Conserved and divergent aspects of Robo receptor signaling and regulation between *Drosophila* Robo1 and *C. elegans* SAX-3. *Genetics* 217: iyab018.
- Davis MJ, Ha BH, Holman EC, Halaban R, Schlessinger J et Boggon TJ (2013) RAC1(P29S) is a spontaneously activating cancer-associated GTPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 912-917.

- Debakker CD, Haney LB, Kinchen JM, Grimsley C, Lu M, Klingele D, Hsu P-K, Chou B-K, Cheng L-C, Blangy A, et al. (2004) Phagocytosis of apoptotic cells is regulated by a UNC-73/TRIO-MIG-2/RhoG signaling module and Armadillo repeats of CED-12/ELMO. *Current Biology* 14: 2208-2216.
- Debant A, Serra-Pagès C, Seipel K, O'Brien S, Tang M, Park SH et Streuli M (1996) The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 5466-5471.
- Deepa SS, Yamada S, Zako M, Goldberger O et Sugahara K (2004) Chondroitin Sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with Heparan Sulfate chains to bind growth factors. *Journal of Biological Chemistry* 279: 37368-37376.
- Demarco RS, Struckhoff EC et Lundquist EA (2012) The Rac GTP exchange factor TIAM-1 acts with CDC-42 and the guidance receptor UNC-40/DCC in neuronal protrusion and axon guidance. *PLoS Genetics* 8: e1002665.
- Dews IC et Mackenzie KR (2007) Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 20782-20787.
- Dhoot GK, Gustafsson MK, Ai X, Sun W, Standiford DM et Emerson CP (2001) Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. *Science* 293: 1663-1666.
- Díaz-Balzac CA, Lázaro-Peña MI, Teclé E, Gomez N et Bülow HE (2014) Complex cooperative functions of Heparan Sulfate Proteoglycans shape nervous system development in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)* 4: 1859-1870.
- Dierker T, Shao C, Haitina T, Zaia J, Hinas A et Kjellén L (2016) Nematodes join the family of Chondroitin Sulfate-synthesizing organisms: Identification of an active chondroitin sulfotransferase in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports* 6: 34662.
- Dong S, Cole GJ et Halfter W (2003) Expression of Collagen XVIII and localization of its glycosaminoglycan attachment sites. *Journal of Biological Chemistry* 278: 1700-1707.

Dovas A, Yoneda A et Couchman JR (2006) PKC α -dependent activation of RhoA by syndecan-4 during focal adhesion formation. *Journal of Cell Science* 119: 2837-2846.

Dupraz S, Hilton BJ, Husch A, Santos TE, Coles CH, Stern S, Brakebusch C et Bradke F (2019) RhoA controls axon extension independent of specification in the developing brain. *Current Biology* 29: 3874-3886 e3879.

Durbin RM, WormAtlas (the worm image database) :
<https://www.wormimage.org/image.php?id=106926&page=1>

Durbin RM, University of C et Laboratory of Molecular B (1987) *Studies on the development and organisation of the nervous system of Caenorhabditis elegans.*

Dyer JO, Demarco RS et Lundquist EA (2010) Distinct roles of Rac GTPases and the UNC-73/Trio and PIX-1 Rac GTP exchange factors in neuroblast protrusion and migration in *C. elegans*. *Small GTPases* 1: 44-61.

Edwards TJ et Hammarlund M (2014) Syndecan promotes axon regeneration by stabilizing growth cone migration. *Cell Reports* 8: 272-283.

Eichel K, Uenaka T, Belapurkar V, Lu R, Cheng S, Pak JS, Taylor CA, Südhof TC, Malenka R, Wernig M, et al. (2022) Endocytosis in the axon initial segment maintains neuronal polarity. *Nature* 609: 128-135.

El Mouridi S, Alkhaldi F et Frokjaer-Jensen C (2022) Modular safe-harbor transgene insertion for targeted single-copy and extrachromosomal array integration in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)* 12: jkac184.

El Mouridi S, Lecroisey C, Tardy P, Mercier M, Leclercq-Blondel A, Zariohi N et Boulin T (2017) Reliable CRISPR/Cas9 genome engineering in *Caenorhabditis elegans* using a single efficient sgRNA and an easily recognizable phenotype. *G3 (Bethesda)* 7: 1429-1437.

Elfenbein A, Rhodes JM, Meller J, Schwartz MA, Matsuda M et Simons M (2009) Suppression of RhoG activity is mediated by a syndecan 4–synectin–RhoGDI1 complex and is reversed by PKC α in a Rac1 activation pathway. *Journal of Cell Biology* 186: 75-83.

- Ellis HM et Horvitz HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44: 817-829.
- Esko JD et Selleck SB (2002) Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in Heparan Sulfate. *Annual Review of Biochemistry* 71: 435-471.
- Ethell IM et Yamaguchi Y (1999) Cell surface Heparan Sulfate Proteoglycan syndecan-2 induces the maturation of dendritic spines in rat hippocampal neurons. *Journal of Cell Biology* 144: 575-586.
- Fan X, Labrador JP, Hing H et Bashaw GJ (2003) Slit stimulation recruits Dock and Pak to the Roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline. *Neuron* 40: 113-127.
- Fang J, Wang J, Wang Y, Liu X, Chen B et Zou W (2023) Ribo-On and Ribo-Off tools using a self-cleaving ribozyme allow manipulation of endogenous gene expression in *C. elegans*. *Communications Biology* 6: 816.
- Farrugia BL et Melrose J (2023) The glycosaminoglycan side chains and modular core proteins of Heparan Sulphate Proteoglycans and the varied ways they provide tissue protection by regulating physiological processes and cellular behaviour. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 14101.
- Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al. (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247: 49-56.
- Finci LI, Kruger N, Sun X, Zhang J, Chegkazi M, Wu Y, Schenk G, Mertens HDT, Svergun DI, Zhang Y, et al. (2014) The crystal structure of Netrin-1 in complex with DCC reveals the bifunctionality of Netrin-1 as a guidance cue. *Neuron* 83: 839-849.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE et Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Forrester WC et Garriga G (1995) Genes necessary for *C. elegans* cell and growth cone migrations. *Development* 124: 1831-1843.

- Fothergill T, Donahoo AL, Douglass A, Zalucki O, Yuan J, Shu T, Goodhill GJ et Richards LJ (2014) Netrin-DCC signaling regulates corpus callosum formation through attraction of pioneering axons and by modulating Slit2-mediated repulsion. *Cerebral Cortex* 24: 1138-1151.
- Frokjaer-Jensen C, Davis MW, Hopkins CE, Newman BJ, Thummel JM, Olesen SP, Grunnet M et Jorgensen EM (2008) Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Genetics* 40: 1375-1383.
- Frokjaer-Jensen C, Davis MW, Sarov M, Taylor J, Flibotte S, LaBella M, Pozniakovsky A, Moerman DG et Jorgensen EM (2014) Random and targeted transgene insertion in *Caenorhabditis elegans* using a modified Mos1 transposon. *Nature Methods* 11: 529-534.
- Fujisawa K, Wrana JL et Culotti JG (2007) The slit receptor EVA-1 coactivates a SAX-3/Robo mediated guidance signal in *C. elegans*. *Science* 317: 1934-1938.
- Gao SM, Qi Y, Zhang Q, Guan Y, Lee Y-T, Ding L, Wang L, Mohammed AS, Li H, Fu Y, et al. (2024) Aging atlas reveals cell-type-specific effects of pro-longevity strategies. *Nature Aging* 4: 998-1013.
- Garcia-Mata R et BurrIDGE K (2007) Catching a GEF by its tail. *Trends in Cell Biology* 17: 36-43.
- Geisbrecht BV, Dowd KA, Barfield RW, Longo PA et Leahy DJ (2003) Netrin Binds Discrete Subdomains of DCC and UNC5 and Mediates Interactions between DCC and Heparin. *Journal of Biological Chemistry* 278: 32561-32568.
- Gibney TV, Favichia M, Latifi L, Medwig-Kinney TN, Matus DQ, McIntyre DC, Arrigo AB, Branham KR, Bubrig LT, Ghaddar A, et al. (2023) A simple method to dramatically increase *C. elegans* germline microinjection efficiency. *Developmental Biology* 502: 63-67.
- Gitai Z, Yu TW, Lundquist EA, Tessier-Lavigne M et Bargmann CI (2003) The Netrin receptor UNC-40/DCC stimulates axon attraction and outgrowth through enabled and, in parallel, Rac and UNC-115/AbLIM. *Neuron* 37: 53-65.
- Goldstein B et Macara IG (2007) The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Developmental Cell* 13: 609-622.

- Gomis-Rüth S, Wierenga CJ et Bradke F (2008) Plasticity of polarization: changing dendrites into axons in neurons Integrated in neuronal circuits. *Current Biology* 18: 992-1000.
- Gould SE, Upholt WB et Kosher RA (1992) Syndecan 3: a member of the syndecan family of membrane-intercalated proteoglycans that is expressed in high amounts at the onset of chicken limb cartilage differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 3271-3275.
- Granés F, Berndt C, Roy C, Mangeat P, Reina M et Vilaró S (2003) Identification of a novel Ezrin - binding site in syndecan - 2 cytoplasmic domain. *FEBS Letters* 547: 212-216.
- Gujar MR, Sundararajan L, Stricker A et Lundquist EA (2018) Control of growth cone polarity, microtubule accumulation, and protrusion by UNC-6/Netrin and its receptors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 210: 235-255.
- Gumienny TL, MacNeil LT, Wang H, de Bono M, Wrana JL et Padgett RW (2007) Glypican LON-2 is a conserved negative regulator of BMP-like signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 17: 159-164.
- Gysi S, Rhiner C, Flibotte S, Moerman DG et Hengartner MO (2013) A network of HSPG core proteins and HS modifying enzymes regulates Netrin-dependent guidance of D-type motor neurons in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 8: e74908.
- Hacker U, Nybakken K et Perrimon N (2005) Heparan Sulphate Proteoglycans: the sweet side of development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 530-541.
- Hagedorn EJ, Yashiro H, Ziel JW, Ihara S, Wang Z et Sherwood DR (2009) Integrin acts upstream of Netrin signaling to regulate formation of the anchor cell's invasive membrane in *C. elegans*. *Developmental Cell* 17: 187-198.
- Hahn-Windgassen A et Van Gilst MR (2009) The *Caenorhabditis elegans* HNF4 α homolog, NHR-31, mediates excretory tube growth and function through coordinate regulation of the vacuolar ATPase. *PLoS Genetics* 5: e1000553.
- Hakeda-Suzuki S, Ng J, Tzu J, Dietzl G, Sun Y, Harms M, Nardine T, Luo L et Dickson BJ (2002) Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature* 416: 438-442.

- Hall DH, Lints R et Altun Z (2006) Nematode neurons: anatomy and anatomical methods in *Caenorhabditis elegans*. *International Review of Neurobiology* 69: 1-35.
- Hao JC, Yu TW, Fujisawa K, Culotti JG, Gengyo-Ando K, Mitani S, Moulder G, Barstead R, Tessier-Lavigne M et Bargmann CI (2001) *C. elegans slit* acts in midline, dorsal-ventral, and anterior-posterior guidance via the SAX-3/Robo receptor. *Neuron* 32: 25-38.
- He S, Cuentas-Condori A et Miller DM (2019) NATF (Native and Tissue-Specific Fluorescence): a strategy for bright, tissue-specific GFP labeling of native proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 212: 387-395.
- Hedgecock EM, Culotti JG et Hall DH (1990) The *unc-5*, *unc-6*, and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 4: 61-85.
- Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH et Stern BD (1987) Genetics of cell and axon migrations in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 100: 365-382.
- Hedgecock EM, Sulston JE et Thomson JN (1983) Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220: 1277-1279.
- Hekimi S et Kershaw D (1993) Axonal guidance defects in a *Caenorhabditis elegans* mutant reveal cell-extrinsic determinants of neuronal morphology. *The Journal of Neuroscience* 13: 4254-4271.
- Hengst U, Deglincerti A, Kim HJ, Jeon NL et Jaffrey SR (2009) Axonal elongation triggered by stimulus-induced local translation of a polarity complex protein. *Nature Cell Biology* 11: 1024-1030.
- Herman T, Hartweg E et Horvitz HR (1999) *sqv* mutants of *Caenorhabditis elegans* are defective in vulval epithelial invagination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 968-973.
- Herman T et Horvitz HR (1999) Three proteins involved in *Caenorhabditis elegans* vulval invagination are similar to components of a glycosylation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 974-979.
- Hienola A, Tumova S, Kuleskiy E et Rauvala H (2006) N-syndecan deficiency impairs neural migration in brain. *Journal of Cell Biology* 174: 569-580.

- Hisamoto N, Moriguchi T, Urushiyama S, Mitani S, Shibuya H et Matsumoto K (2008) *Caenorhabditis elegans* WNK–STE20 pathway regulates tube formation by modulating CIC channel activity. *EMBO reports* 9: 70-75.
- Honigberg L et Kenyon C (2000) Establishment of left/right asymmetry in neuroblast migration by UNC-40/DCC, UNC-73/Trio and DPY-19 proteins in *C. elegans*. *Development* 127: 4655-4668.
- Hrus A, Lau G, Hutter H, Schenk S, Ferralli J, Brown-Luedi M, Chiquet-Ehrismann R et Canevascini S (2007) *C. elegans* agrin is expressed in pharynx, IL1 neurons and distal tip cells and does not genetically interact with genes involved in synaptogenesis or muscle function. *PLoS One* 2: e731.
- Hsia E, Richardson TP et Nugent MA (2003) Nuclear localization of basic fibroblast growth factor is mediated by Heparan Sulfate Proteoglycans through protein kinase C signaling. *Journal of Cellular Biochemistry* 88: 1214-1225.
- Hsieh H-H, Hsu T-Y, Jiang H-S et Wu Y-C (2012) Integrin α PAT-2/CDC-42 signaling is required for muscle-mediated clearance of apoptotic cells in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics* 8: e1002663.
- Hsueh Y-P et Sheng M (1999) Regulated expression and subcellular localization of syndecan Heparan Sulfate Proteoglycans and the syndecan-binding protein CASK/LIN-2 during rat brain development. *The Journal of Neuroscience* 19: 7415-7425.
- Hu H-T, Umemori H et Hsueh Y-P (2016) Postsynaptic SDC2 induces transsynaptic signaling via FGF22 for bidirectional synaptic formation. *Scientific Reports* 6: 33592.
- Hu H (2001) Cell-surface Heparan Sulfate is involved in the repulsive guidance activities of Slit2 protein. *Nature Neuroscience* 4: 695-701.
- Hu H, Li M, Labrador J-P, McEwen J, Lai EC, Goodman CS et Bashaw GJ (2005) Cross GTPase-activating protein (CrossGAP)/Vilse links the Roundabout receptor to Rac to regulate midline repulsion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 4613-4618.
- Hu S, Pawson T et Steven RM (2011) UNC-73/Trio RhoGEF-2 activity modulates *Caenorhabditis elegans* motility through changes in neurotransmitter signaling upstream of the GSA-1/G α s pathway. *Genetics* 189: 137-151.

- Hu Z, Hom S, Kudze T, Tong X-J, Choi S, Aramuni G, Zhang W et Kaplan JM (2012) Neurexin and Neuroligin mediate retrograde synaptic inhibition in *C. elegans*. *Science* 337: 980-984.
- Huang C-C, Hall DH, Hedgecock EM, Kao G, Karantza V, Vogel BE, Hutter H, Chisholm AD, Yurchenco PD et Wadsworth WG (2003) Laminin α subunits and their role in *C. elegans* development. *Development* 130: 3343-3358.
- Hudson ML, Kinnunen T, Cinar HN et Chisholm AD (2006) *C. elegans* Kallmann syndrome protein KAL-1 interacts with syndecan and glypican to regulate neuronal cell migrations. *Developmental Biology* 294: 352-365.
- Husson SJ, Gottschalk A et Leifer AM (2013) Optogenetic manipulation of neural activity in *C. elegans*: From synapse to circuits and behaviour. *Biology of the Cell* 105: 235-250.
- Hwang H-Y, Olson SK, Brown JR, Esko JD et Horvitz HR (2003) The *Caenorhabditis elegans* Genes *sqv-2* and *sqv-6*, which are required for vulval morphogenesis, encode glycosaminoglycan galactosyltransferase II and xylosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 278: 11735-11738.
- Imjeti NS, Menck K, Egea-Jimenez AL, Lecointre C, Lembo F, Bouguenina H, Badache A, Ghossoub R, David G, Roche S, et al. (2017) Syntenin mediates SRC function in exosomal cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: 12495-12500.
- Inatani M, Irie F, Plump AS, Tessier-Lavigne M et Yamaguchi Y (2003) Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require Heparan Sulfate. *Science* 302: 1044-1046.
- Izumikawa T, Dejima K, Watamoto Y, Nomura KH, Kanaki N, Rikitake M, Tou M, Murata D, Yanagita E, Kano A, et al. (2016) Chondroitin 4-O-Sulfotransferase is indispensable for sulfation of Chondroitin and plays an important role in maintaining normal life span and oxidative stress responses in nematodes. *Journal of Biological Chemistry* 291: 23294-23304.
- Jang B, Jung H, Hong H et Oh ES (2018) Syndecan transmembrane domain modulates intracellular signaling by regulating the oligomeric status of the cytoplasmic domain. *Cell Signal* 52: 121-126.
- Jia R, Chai Y, Xie C, Liu G, Zhu Z, Huang K, Li W et Ou G (2020) The spectrin-based membrane skeleton is asymmetric and remodels during neural development in *C. elegans*. *Journal of Cell Science* 133: jcs248583.

- Johnson KG, Ghose A, Epstein E, Lincecum J, O'Connor MB et Van Vactor D (2004) Axonal Heparan Sulfate Proteoglycans regulate the distribution and efficiency of the repellent Slit during midline axon guidance. *Current Biology* 14: 499-504.
- Johnson RP, Kang SH et Kramer JM (2006) *C. elegans* dystroglycan DGN-1 functions in epithelia and neurons, but not muscle, and independently of dystrophin. *Development* 133: 1911-1921.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596: 583-589.
- Kage-Nakadai E, Imae R, Suehiro Y, Yoshina S, Hori S et Mitani S (2014) A conditional knockout toolkit for *Caenorhabditis elegans* based on the Cre/loxP recombination. *PLoS ONE* 9: e114680.
- Kaletta T et Hengartner MO (2006) Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery* 5: 387-398.
- Kamath RS et Ahringer J (2003) Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 30: 313-321.
- Kasthuri N, Kenneth, Daniel, Richard, José, Knowles-Barley S, Lee D, Vázquez-Reina A, Kaynig V, Thouis, et al. (2015) Saturated reconstruction of a volume of neocortex. *Cell* 162: 648-661.
- Katidou M, Tavernarakis N et Karagogeos D (2013) The contactin RIG-6 mediates neuronal and non-neuronal cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 373: 184-195.
- Kawauchi T (2003) The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *The EMBO Journal* 22: 4190-4201.
- Keleman K et Dickson BJ (2001) Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 Netrin Receptor. *Neuron* 32: 605-617.
- Keller-Pinter A, Ughy B, Domoki M, Pettko-Szandtner A, Letoha T, Tovari J, Timar J et Szilak L (2017) The phosphomimetic mutation of syndecan-4 binds and inhibits Tiam1 modulating Rac1 activity in PDZ interaction-dependent manner. *PLoS One* 12: e0187094.

Kerr R (2006) Imaging the activity of neurons and muscles. *WormBook* 1.113.111.

Khan LA, Zhang H, Abraham N, Sun L, Fleming JT, Buechner M, Hall DH et Gobel V (2013) Intracellular lumen extension requires ERM-1-dependent apical membrane expansion and AQP-8-mediated flux. *Nature Cell Biology* 15: 143-156.

Khandekar A (2015) *Age-related changes in the neuronal architecture of Caenorhabditis elegans: A dissertation*. University of Massachusetts Graduate School of Biomedical Sciences,

Kidd T, Bland KS et Goodman CS (1999) Slit is the midline repellent for the Robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96: 785-794.

Killeen M, Tong J, Krizus A, Steven R, Scott I, Pawson T et Culotti J (2002) UNC-5 function requires phosphorylation of cytoplasmic tyrosine 482, but its UNC-40-independent functions also require a region between the ZU-5 and death domains. *Developmental Biology* 251: 348-366.

Killeen MT et Sybingco SS (2008) Netrin, Slit and Wnt receptors allow axons to choose the axis of migration. *Developmental Biology* 323: 143-151.

Kim CW, Goldberger OA, Gallo RL et Bernfield M (1994) Members of the syndecan family of Heparan Sulfate Proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Molecular Biology of the Cell* 5: 797-805.

Kim H-M, Hong Y et Chen J (2022) A decade of CRISPR-Cas genome editing in *C. elegans*. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 15863.

Kim S, Ren X-C, Fox E et Wadsworth WG (1999) SDQR migrations in *Caenorhabditis elegans* are controlled by multiple guidance cues and changing responses to Netrin UNC-6. *Development* 126: 3881-3890.

Kimble J (1981) Alterations in cell lineage following laser ablation of cells in the somatic gonad of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 87: 286-300.

Kimble J et Hirsh D (1979) The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 70: 396-417.

- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, et al. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273: 245-248.
- Kinnunen T, Huang Z, Townsend J, Gatlula MM, Brown JR, Esko JD et Turnbull JE (2005) Heparan 2-O-sulfotransferase, *hst-2*, is essential for normal cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS* 102: 1507-1512.
- Kinnunen T, Kaksonen M, Saarinen J, Kalkkinen N, Peng HB et Rauvala H (1998) Cortactin-Src Kinase signaling pathway is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth. *Journal of Biological Chemistry* 273: 10702-10708.
- Kinnunen TK (2014) Combinatorial roles of Heparan Sulfate Proteoglycans and heparan sulfates in *Caenorhabditis elegans* neural development. *PLoS One* 9: e102919.
- Kirszenblat L, Neumann B, Coakley S et Hilliard MA (2013) A dominant mutation in *mec-7/beta-tubulin* affects axon development and regeneration in *Caenorhabditis elegans* neurons. *Molecular Biology of the Cell* 24: 285-296.
- Kishore RS et Sundaram MV (2002) *ced-10 Rac* and *mig-2* function redundantly and act with *unc-73* trio to control the orientation of vulval cell divisions and migrations in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 241: 339-348.
- Kitagawa H, Izumikawa T, Mizuguchi S, Dejima K, Nomura KH, Egusa N, Taniguchi F, Tamura J-I, Gengyo-Ando K, Mitani S, et al. (2007) Expression of *rib-1*, a *Caenorhabditis elegans* homolog of the human tumor suppressor EXT genes, is indispensable for Heparan Sulfate synthesis and embryonic morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 282: 8533-8544.
- Knop F, Zounarova A, Sabata V, Middelkoop TC et Macurkova M (2024) *Caenorhabditis elegans* SEL-5/AAK1 regulates cell migration and cell outgrowth independently of its kinase activity. *Elife* 13: 91054.
- Kokenyesi R et Bernfield M (1994) Core protein structure and sequence determine the site and presence of Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate on syndecan-1. *Journal of Biological Chemistry* 269: 12304-12309.

- Kolotuev I, Hyenne V, Schwab Y, Rodriguez D et Labouesse M (2013) A pathway for unicellular tube extension depending on the lymphatic vessel determinant Prox1 and on osmoregulation. *Nature Cell Biology* 15: 157-168.
- Kulkarni G, Xu Z, Mohamed AM, Li H, Tang X, Limerick G et Wadsworth WG (2013) Experimental evidence for UNC-6 (Netrin) axon guidance by stochastic fluctuations of intracellular UNC-40 (DCC) outgrowth activity. *Biology Open* 2: 1300-1312.
- Kunda P, Paglini G, Quiroga S, Kosik K et Cáceres A (2001) Evidence for the Involvement of Tiam1 in Axon Formation. *The Journal of Neuroscience* 21: 2361-2372.
- Lamoureux P, Ruthel G, Buxbaum RE et Heidemann SR (2002) Mechanical tension can specify axonal fate in hippocampal neurons. *Journal of Cell Biology* 159: 499-508.
- Lant B, Yu B, Goudreault M, Holmyard D, Knight JD, Xu P, Zhao L, Chin K, Wallace E, Zhen M, et al. (2015) CCM-3/STRIPAK promotes seamless tube extension through endocytic recycling. *Nature Communications* 6: 6449.
- Le V, Mei L, Voyvodic PL, Zhao C, Busch DJ, Stachowiak JC et Baker AB (2021) Molecular tension in syndecan-1 is regulated by extracellular mechanical cues and fluidic shear stress. *Biomaterials* 275: 120947.
- Leadbeater WE, Gonzalez AM, Logaras N, Berry M, Turnbull JE et Logan A (2006) Intracellular trafficking in neurones and glia of fibroblast growth factor-2, fibroblast growth factor receptor 1 and Heparan Sulfate Proteoglycans in the injured adult rat cerebral cortex. *J Neurochem* 96: 1189-1200.
- Lee J-S, Von Der Hardt S, Rusch MA, Stringer SE, Stickney HL, Talbot WS, Geisler R, Nüsslein-Volhard C, Selleck SB, Chien C-B, et al. (2004) Axon Sorting in the Optic Tract Requires HSPG Synthesis by *ext2* (dackel) and *extl3* (boxer). *Neuron* 44: 947-960.
- Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL et Tessier-Lavigne M (1997) Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate Netrin receptors. *Nature* 386: 833-838.
- Letoha A, Hudák A et Letoha T (2023) Exploring the syndecan-mediated cellular internalization of the SARS-CoV-2 Omicron variant. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 14140.

- Leung-Hagesteijn C, Spence AM, Stern BD, Zhou Y, Su MW, Hedgecock EM et Culotti JG (1992) UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* 71: 289-299.
- Levy-Strumpf N et Culotti JG (2007) VAB-8, UNC-73 and MIG-2 regulate axon polarity and cell migration functions of UNC-40 in *C. elegans*. *Nature Neuroscience* 10: 161-168.
- Levy-Strumpf N, Krizus M, Zheng H, Brown L et Culotti JG (2015) The Wnt Frizzled receptor MOM-5 regulates the UNC-5 Netrin receptor through small GTPase-dependent signaling to determine the polarity of migrating cells. *PLOS Genetics* 11: e1005446.
- Leyva-Díaz E, Daniel, Maria, Cambray S, Susín R, Tessier-Lavigne M, Klein R, Egea J et López-Bendito G (2014) FLRT3 Is a Robo1-interacting protein that determines Netrin-1 attraction in developing axons. *Current Biology* 24: 494-508.
- Li H, Kulkarni G et Wadsworth WG (2008) RPM-1, a *Caenorhabditis elegans* Protein that functions in presynaptic differentiation, negatively regulates axon outgrowth by controlling SAX-3/Robo and UNC-5/UNC5 activity. *The Journal of Neuroscience* 28: 3595-3603.
- Li J, Qin Y, Shen C, Zhang J, Tu S, Yang J, Wang Y, Zhou R, Zhang K, Chen J, et al. (2023) A new miniMOS tool kit capable of visualizing single copy insertion in *C. elegans*. *PeerJ* 11: e15433.
- Li Y, Chen S, Liu W, Zhao D, Gao Y, Hu S, Liu H, Li Y, Qu L et Liu X (2024) A full-body transcription factor expression atlas with completely resolved cell identities in *C. elegans*. *Nature Communications* 15: 358.
- Liang X, Dong X, Donald, Shen K et Wang X (2015) Sarcomeres pattern proprioceptive sensory dendritic endings through UNC-52/perlecan in *C. elegans*. *Developmental Cell* 33: 388-400.
- Liang X, Kokes M, Fetter RD, Sallee MD, Moore AW, Feldman JL et Shen K (2020) Growth cone-localized microtubule organizing center establishes microtubule orientation in dendrites. *Elife* 9: 56547.
- Lim S-T, Longley RL, Couchman JR et Woods A (2003) Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of Protein Kinase C α (PKC α) increases focal adhesion localization of PKC α . *Journal of Biological Chemistry* 278: 13795-13802.

- Lim YS et Wadsworth WG (2002) Identification of domains of Netrin UNC-6 that mediate attractive and repulsive guidance and responses from cells and growth cones. *Journal of Neuroscience* 22: 7080-7087.
- Limerick G, Tang X, Lee WS, Mohamed A, Al-Aamiri A et Wadsworth WG (2018) A Statistically-Oriented Asymmetric Localization (SOAL) model for neuronal outgrowth patterning by *Caenorhabditis elegans* UNC-5 (UNC5) and UNC-40 (DCC) Netrin receptors. *Genetics* 208: 245-272.
- Lin L, Tran T, Hu S, Cramer T, Komuniecki R et Steven RM (2012) RHGF-2 Is an essential Rho-1 Specific RhoGEF that binds to the Multi-PDZ Domain Scaffold Protein MPZ-1 in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* 7: e31499.
- Lin X (2004) Functions of Heparan Sulfate Proteoglycans in cell signaling during development. *Development* 131: 6009-6021.
- Lin X, Buff EM, Perrimon N et Michelson AM (1999) Heparan Sulfate Proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development* 126: 3715-3723.
- Lindahl U et Li JP (2009) Interactions between Heparan Sulfate and proteins-design and functional implications. *International Review of Cell and Molecular Biology* 276: 105-159.
- Liu J, Bonnard E et Scholz M (2024) Adapting and optimizing GCaMP8f for use in *Caenorhabditis elegans*. *GENETICS* 228: iyae125.
- Locke CJ, Kautu BB, Berry KP, Lee SK, Caldwell KA et Caldwell GA (2009) Pharmacogenetic analysis reveals a post-developmental role for Rac GTPases in *Caenorhabditis elegans* GABAergic neurotransmission. *Genetics* 183: 1357-1372.
- Lowery LA et Van Vactor D (2009) The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 332-343.
- Lundquist EA, Herman RK, Shaw JE et Bargmann CI (1998) UNC-115, a conserved protein with predicted LIM and actin-binding domains, mediates axon guidance in *C. elegans*. *Neuron* 21: 385-392.

- Lundquist EA, Reddien PW, Hartwig E, Horvitz HR et Bargmann CI (2001) Three *C. elegans* Rac proteins and several alternative Rac regulators control axon guidance, cell migration and apoptotic cell phagocytosis. *Development* 128: 4475-4488.
- Ly A, Nikolaev A, Suresh G, Zheng Y, Tessier-Lavigne M et Stein E (2008) DSCAM is a Netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to Netrin-1. *Cell* 133: 1241-1254.
- Macneil LT, Hardy WR, Pawson T, Wrana JL et Culotti JG (2009) UNC-129 regulates the balance between UNC-40 dependent and independent UNC-5 signaling pathways. *Nature Neuroscience* 12: 150-155.
- Mahadik SS et Lundquist EA (2023a) A short isoform of the UNC-6/Netrin receptor UNC-5 is required for growth cone polarity and robust growth cone protrusion in *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 11: 1240994.
- Mahadik SS et Lundquist EA (2023b) TOM-1/tomosyn acts with the UNC-6/Netrin receptor UNC-5 to inhibit growth cone protrusion in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 150: 201031.
- Mancuso VP, Parry JM, Storer L, Poggioli C, Nguyen KCQ, Hall DH et Sundaram MV (2012) Extracellular leucine-rich repeat proteins are required to organize the apical extracellular matrix and maintain epithelial junction integrity in *C. elegans*. *Development* 139: 979-990.
- Maniar TA, Kaplan M, Wang GJ, Shen K, Wei L, Shaw JE, Koushika SP et Bargmann CI (2011) UNC-33 (CRMP) and ankyrin organize microtubules and localize kinesin to polarize axon-dendrite sorting. *Nature Neuroscience* 15: 48-56.
- Manon-Jensen T, Itoh Y et Couchman JR (2010) Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J* 277: 3876-3889.
- Manon-Jensen T, Multhaupt HA et Couchman JR (2013) Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. *FEBS J* 280: 2320-2331.
- Marcus-Gueret N, Schmidt KL et Stringham EG (2012) Distinct cell guidance pathways controlled by the Rac and Rho GEF domains of UNC-73/TRIO in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 190: 129-142.

- Matsumoto Y, Irie F, Inatani M, Tessier-Lavigne M et Yamaguchi Y (2007) Netrin-1/DCC signaling in commissural axon guidance requires cell-autonomous expression of Heparan Sulfate. *The Journal of Neuroscience* 27: 4342-4350.
- Mattingly BC et Buechner M (2011) The FGD homologue EXC-5 regulates apical trafficking in *C. elegans* tubules. *Developmental Biology* 359: 59-72.
- Medeiros GF, Mendes A, Castro RA, Bau EC, Nader HB et Dietrich CP (2000) Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta* 1475: 287-294.
- Meijers R, Smock RG, Zhang Y et Wang J-H (2020) Netrin synergizes signaling and adhesion through DCC. *Trends in Biochemical Sciences* 45: 6-12.
- Mello C et Fire A (1995) DNA transformation. *Methods in Cell Biology* 48: 451-482.
- Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D et Ambros V (1991) Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO Journal* 10: 3959-3970.
- Merris M, Wadsworth WG, Khamrai U, Bittman R, Chitwood DJ et Lenard J (2003) Sterol effects and sites of sterol accumulation in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Lipid Research* 44: 172-181.
- Merz DC, Alves G, Kawano T, Zheng H et Culotti JG (2003) UNC-52/perlecan affects gonadal leader cell migrations in *C. elegans* hermaphrodites through alterations in growth factor signaling. *Developmental Biology* 256: 173-186.
- Minniti AN, Labarca M, Hurtado C et Brandan E (2004) *Caenorhabditis elegans* syndecan (SDN-1) is required for normal egg laying and associates with the nervous system and the vulva. *Journal of Cell Science* 117: 5179-5190.
- Mizuguchi S, Uyama T, Kitagawa H, Nomura KH, Dejima K, Gengyo-Ando K, Mitani S, Sugahara K et Nomura K (2003) Chondroitin Proteoglycans are involved in cell division of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 423: 443-448.
- Mohamed AM et Chin-Sang ID (2011) The *C. elegans nck-1* gene encodes two isoforms and is required for neuronal guidance. *Developmental Biology* 354: 55-66.

- Moody JC, Qadota H et Benian GM (2024) The RhoGAP RRC-1 is required for the assembly or stability of integrin adhesion complexes and is a member of the PIX pathway in muscle. *Molecular Biology of the Cell* 35: E23-03-0095.
- Morgan MR, Hamidi H, Bass MD, Warwood S, Ballestrem C et Humphries MJ (2013) Syndecan-4 phosphorylation is a control point for integrin recycling. *Developmental Cell* 24: 472-485.
- Morgan MR, Humphries MJ et Bass MD (2007) Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 957-969.
- Morio H, Honda Y, Toyoda H, Nakajima M, Kurosawa H et Shirasawa T (2003) EXT gene family member *rib-2* is essential for embryonic development and Heparan Sulfate biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301: 317-323.
- Multhaupt HA, Yoneda A, Whiteford JR, Oh ES, Lee W et Couchman JR (2009) Syndecan signaling: when, where and why? *Journal of Physiology and Pharmacology* 60 Suppl 4: 31-38.
- Munoz-Juan A, Benseny-Cases N, Guha S, Barba I, Caldwell KA, Caldwell GA, Agullo L, Yuste VJ, Laromaine A et Dalfo E (2024) *Caenorhabditis elegans* RAC1/ced-10 mutants as a new animal model to study very early stages of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 234: 102572.
- Nakashiba T, Nishimura S, Ikeda T et Itohara S (2002) Complementary expression and neurite outgrowth activity of Netrin-G subfamily members. *Mechanisms of Development* 111: 47-60.
- Namba T, Kibe Y, Funahashi Y, Nakamuta S, Takano T, Ueno T, Shimada A, Kozawa S, Okamoto M, Shimoda Y, et al. (2014) Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Neuron* 81: 814-829.
- Naturale VF, Pickett MA et Feldman JL (2023) Context matters: lessons in epithelial polarity from the *Caenorhabditis elegans* intestine and other tissues. *Current Topics in Developmental Biology* 154: 37-71.
- Nawrocka WI, Cheng S, Hao B, Rosen MC, Cortés E, Baltrusaitis EE, Aziz Z, Kovács IA et Özkan E (2024) *Nematode extracellular protein interactome expands connections between signaling pathways*. Cold Spring Harbor Laboratory, bioRxiv.

- Nelson FK, Albert PS et Riddle DL (1983) Fine structure of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system. *Journal of Ultrastructure Research* 82: 156-171.
- Nelson FK et Riddle DL (1984) Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system using laser microsurgery. *Journal of Experimental Zoology* 231: 45-56.
- Neukomm LJ, Frei AP, Cabello J, Kinchen JM, Zaidel-Bar R, Ma Z, Haney LB, Hardin J, Ravichandran KS, Moreno S, et al. (2011) Loss of the RhoGAP SRGP-1 promotes the clearance of dead and injured cells in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Cell Biology* 13: 79-86.
- Ng J, Nardine T, Harms M, Tzu J, Goldstein A, Sun Y, Dietzl G, Dickson BJ et Luo L (2002) Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature* 416: 442-447.
- Nguyen H, Dayan P et Goodhill GJ (2014) The influence of receptor positioning on chemotactic information. *Journal of Theoretical Biology* 360: 95-101.
- Nguyen H, Dayan P et Goodhill GJ (2015) How receptor diffusion influences gradient sensing. *Journal of the Royal Society Interface* 12: 20141097.
- Niftullayev S et Lamarche-Vane N (2019) Regulators of Rho GTPases in the nervous system: molecular implication in axon guidance and neurological disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 1497.
- Niimi T (2021) Roles of Slit ligands and their roundabout (Robo) family of receptors in bone remodeling. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 21: 143-154.
- Nishimura T, Yamaguchi T, Kato K, Yoshizawa M, Nabeshima Y, Ohno S, Hoshino M et Kaibuchi K (2005) PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nature Cell Biology* 7: 270-277.
- Noborn F et Larson G (2021) Characterization of *C. elegans* Chondroitin Proteoglycans and their large functional and structural heterogeneity; Evolutionary aspects on structural differences between humans and the nematode. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 21: 155-170.
- Noma K et Jin Y (2018) Rapid integration of multi-copy transgenes using optogenetic mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *G3 Genes/Genomes/Genetics* 8: 2091-2097.

- Nonet ML (2023) Rapid generation of *Caenorhabditis elegans* single-copy transgenes combining recombination-mediated cassette exchange and drug selection. *Genetics* 224: iyad072.
- Nordquist SK, Smith SR et Pierce JT (2018) Systematic functional characterization of human 21st chromosome orthologs in *Caenorhabditis elegans*. *G3 Genes/Genomes/Genetics* 8: 967-979.
- Norgaard S, Deng S, Cao W et Pocock R (2018) Distinct CED-10/Rac1 domains confer context-specific functions in development. *PLoS Genetics* 14: e1007670.
- Norris AD, Dyer JO et Lundquist EA (2009) The Arp2/3 complex, UNC-115/abLIM, and UNC-34/Enabled regulate axon guidance and growth cone filopodia formation in *Caenorhabditis elegans*. *Neural Development* 4: 38.
- Norris AD et Lundquist EA (2011) UNC-6/Netrin and its receptors UNC-5 and UNC-40/DCC modulate growth cone protrusion in vivo in *C. elegans*. *Development* 138: 4433-4442.
- Norris AD, Sundararajan L, Morgan DE, Roberts ZJ et Lundquist EA (2014) The UNC-6/Netrin receptors UNC-40/DCC and UNC-5 inhibit growth cone filopodial protrusion via UNC-73/Trio, Rac-like GTPases and UNC-33/CRMP. *Development* 141: 4395-4405.
- Ofenbauer A (2018) *Characterization of the KASH domain gene unc-83 and the pseudogene F55A3.7.* Humboldt-Universität
- Ogura KI, Asakura T et Goshima Y (2012) Localization mechanisms of the axon guidance molecule UNC - 6/Netrin and its receptors, UNC-5 and UNC - 40, in *Caenorhabditis elegans*. *Development Growth & Differentiation* 54: 390-397.
- Okina E, Manon-Jensen T, Whiteford JR et Couchman JR (2009) Syndecan proteoglycan contributions to cytoskeletal organization and contractility. *Scandinavian Journal of Medicine & Science* 19: 479-489.
- Oosterveen T, Coudreuse DY, Yang PT, Fraser E, Bergsma J, Dale TC et Korswagen HC (2007) Two functionally distinct Axin-like proteins regulate canonical Wnt signaling in *C. elegans*. *Developmental Biology* 308: 438-448.

- Packer JS, Zhu Q, Huynh C, Sivaramakrishnan P, Preston E, Dueck H, Stefanik D, Tan K, Trapnell C, Kim J, et al. (2019) A lineage-resolved molecular atlas of *C. elegans* embryogenesis at single-cell resolution. *Science* 365: aax1971.
- Pan CL, Peng CY, Chen CH et McIntire S (2011) Genetic analysis of age-dependent defects of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *PNAS* 108: 9274-9279.
- Pedersen ME, Snieckute G, Kagias K, Nehammer C, Mulhaupt HA, Couchman JR et Pocock R (2013) An epidermal microRNA regulates neuronal migration through control of the cellular glycosylation state. *Science* 341: 1404-1408.
- Pellegrini L (2001) Role of Heparan Sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view. *Current Opinion in Structural Biology* 11: 629-634.
- Pellettieri J et Seydoux G (2002) Anterior-posterior polarity in *C. elegans* and *Drosophila*--PARallels and differences. *Science* 298: 1946-1950.
- Perez-Perez JM, Candela H, Robles P, Quesada V, Ponce MR et Micol JL (2009) Lessons from a search for leaf mutants in *Arabidopsis thaliana*. *The International Journal of Developmental Biology* 53: 1623-1634.
- Polanska UM, Edwards E, Fernig DG et Kinnunen TK (2011) The cooperation of FGF receptor and Klotho is involved in excretory canal development and regulation of metabolic homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* 286: 5657-5666.
- Priest JM, Nichols EL, Smock RG, Hopkins JB, Mendoza JL, Meijers R, Shen K et Özkan E (2024) Structural insights into the formation of repulsive Netrin guidance complexes. *Science Advances* 10: adj8083.
- Quinn CC, Pfeil DS et Wadsworth WG (2008) CED-10/Rac1 Mediates Axon Guidance by Regulating the Asymmetric Distribution of MIG-10/Lamellipodin. *Current Biology* 18: 808-813.
- Rajabloo Y, Saberi-Karimian M, Soflaei SS, Ferns GA et Ghayour-Mobarhan M (2024) Syndecans and diabetic complications: a narrative review. *American Journal of the Medical Sciences* 368: 99-111.

- Ramirez-Suarez NJ, Belalcazar HM, Salazar CJ, Beyaz B, Raja B, Nguyen KC, Celestrin K, Fredens J, Færgeman NJ et Hall DH (2019) Axon-dependent patterning and maintenance of somatosensory dendritic arbors. *Developmental cell* 48: 229-244. e224.
- Randi F, Sharma AK, Dvali S et Leifer AM (2023) Neural signal propagation atlas of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 623: 406-414.
- Rapraeger AC et Ott VL (1998) Molecular interactions of the syndecan core proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 10: 620-628.
- Rapti G, Li C, Shan A, Lu Y et Shaham S (2017) Glia initiate brain assembly through noncanonical Chimaerin-Furin axon guidance in *C. elegans*. *Nature Neuroscience* 20: 1350-1360.
- Reddien PW et Horvitz HR (2000) CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Cell Biology* 2: 131-136.
- Reiner DJ et Lundquist EA (2018) Small GTPases. *WormBook* 2018: 1-65.
- Reinstein J, Schlichting I, Frech M, Goody RS et Wittinghofer A (1991) p21 with a phenylalanine 28->leucine mutation reacts normally with the GTPase activating protein GAP but nevertheless has transforming properties. *Journal of Biological Chemistry* 266: 17700-17706.
- Rella L, Fernandes Póvoa EE, Mars J, Ebbing ALP, Schoppink L, Betist MC et Korswagen HC (2021) A switch from noncanonical to canonical Wnt signaling stops neuroblast migration through a Slit-Robo and RGA-9b/ARHGAP-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118: e2013239118.
- Rhiner C, Gysi S, Frohli E, Hengartner MO et Hajnal A (2005) Syndecan regulates cell migration and axon guidance in *C. elegans*. *Development* 132: 4621-4633.
- Rogalski TM, Gilchrist EJ, Mullen GP et Moerman DG (1995) Mutations in the *unc-52* gene responsible for body wall muscle defects in adult *Caenorhabditis elegans* are located in alternatively spliced exons. *Genetics* 139: 159-169.
- Ross TD, Coon BG, Yun S, Baeyens N, Tanaka K, Ouyang M et Schwartz MA (2013) Integrins in mechanotransduction. *Current Opinion in Cell Biology* 25: 613-618.

- Rothberg JM et Artavanis-Tsakonas S (1992) Modularity of the slit protein. Characterization of a conserved carboxy-terminal sequence in secreted proteins and a motif implicated in extracellular protein interactions. *Journal of Molecular Biology* 227: 367-370.
- Rothberg JM, Hartley DA, Walther Z et Artavanis-Tsakonas S (1988) Slit: an EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell* 55: 1047-1059.
- Saied-Santiago K et Bulow HE (2018) Diverse roles for glycosaminoglycans in neural patterning. *Developmental Dynamics* 247: 54-74.
- Saied-Santiago K, Townley RA, Attonito JD, da Cunha DS, Diaz-Balzac CA, Tecle E et Bulow HE (2017) Coordination of Heparan Sulfate Proteoglycans with Wnt signaling to control cellular migrations and positioning in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 206: 1951-1967.
- Sanderson RD, Turnbull JE, Gallagher JT et Lander AD (1994) Fine structure of Heparan Sulfate regulates syndecan-1 function and cell behavior. *Journal of Biological Chemistry* 269: 13100-13106.
- Sarrazin S, Lamanna WC et Esko JD (2011) Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a004952-a004952.
- Saunders S, Jalkanen M, O'Farrell S et Bernfield M (1989) Molecular cloning of syndecan, an integral membrane Proteoglycan. *Journal of Cell Biology* 108: 1547-1556.
- Schelski M et Bradke F (2017) Neuronal polarization: from spatiotemporal signaling to cytoskeletal dynamics. *Molecular and Cellular Neuroscience* 84: 11-28.
- Schonegg S et Hyman AA (2006) CDC-42 and RHO-1 coordinate acto-myosin contractility and PAR protein localization during polarity establishment in *C. elegans* embryos. *Development* 133: 3507-3516.
- Schwabiuk M, Coudiere L et Merz DC (2009) SDN-1/syndecan regulates growth factor signaling in distal tip cell migrations in *C. elegans*. *Developmental Biology* 334: 235-242.

- Schwamborn JC et Puschel AW (2004) The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nature Neuroscience* 7: 923-929.
- Schwartz AZA, Abdu Y et Nance J (2023) ZIF-1-mediated degradation of zinc finger proteins in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Genetics* 225: iyad160.
- Schwieterman AA, Steves AN, Yee V, Donelson CJ, Bentley MR, Santorella EM, Mehlenbacher TV, Pital A, Howard AM, Wilson MR, et al. (2016) The *Caenorhabditis elegans* Ephrin EFN-4 functions con-cell autonomously with Heparan Sulfate Proteoglycans to promote axon outgrowth and branching. *Genetics* 202: 639-660.
- Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D et Goodman CS (1993) Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10: 409-426.
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM et Tessier-Lavigne M (1994) The Netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78: 409-424.
- Shakir MA, Gill JS et Lundquist EA (2006) Interactions of UNC-34 Enabled with Rac GTPases and the NIK Kinase MIG-15 in *Caenorhabditis elegans* axon pathfinding and neuronal migration. *Genetics* 172: 893-913.
- Shakir MA, Jiang K, Struckhoff EC, Demarco RS, Patel FB, Soto MC et Lundquist EA (2008) The Arp2/3 activators WAVE and WASP have distinct genetic interactions with Rac GTPases in *Caenorhabditis elegans* axon guidance. *Genetics* 179: 1957-1971.
- Shaye DD et Greenwald I (2015) The disease-associated formin INF2/EXC-6 organizes lumen and cell outgrowth during tubulogenesis by regulating F-actin and microtubule cytoskeletons. *Developmental Cell* 32: 743-755.
- Shaye DD et Greenwald I (2016) A network of conserved formins, regulated by the guanine exchange factor EXC-5 and the GTPase CDC-42, modulates tubulogenesis *in vivo*. *Development* 143: 4173-4181.
- Shaye DD et Soto MC (2021) Epithelial morphogenesis, tubulogenesis and forces in organogenesis. *Current Topics in Developmental Biology* 144: 161-214.

- Shelly M, Cancedda L, Heilshorn S, Sumbre G et Poo M-M (2007) LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* 129: 565-577.
- Silver L, Michael JV, Goldfinger LE et Gallo G (2014) Activation of PI3K and R - ras signaling promotes the extension of sensory axons on inhibitory Chondroitin Sulfate Proteoglycans. *Developmental Neurobiology* 74: 918-933.
- Smith CJ, Watson JD, VanHoven MK, Colon-Ramos DA et Miller DM, 3rd (2012) Netrin (UNC-6) mediates dendritic self-avoidance. *Nature Neuroscience* 15: 731-737.
- Spencer AG, Orita S, Malone CJ et Han M (2001) A RHO GTPase-mediated pathway is required during P cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 13132-13137.
- Spring J, Paine-Saunders SE, Hynes RO et Bernfield M (1994) *Drosophila* syndecan: conservation of a cell-surface Heparan Sulfate Proteoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 3334-3338.
- Stavoe AK et Colon-Ramos DA (2012) Netrin instructs synaptic vesicle clustering through Rac GTPase, MIG-10, and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* 197: 75-88.
- Steigemann P, Molitor A, Fellert S, Jackle H et Vorbruggen G (2004) Heparan Sulfate Proteoglycan syndecan promotes axonal and myotube guidance by Slit/Robo signaling. *Current Biology* 14: 225-230.
- Steven R, Kubiseski TJ, Zheng H, Kulkarni S, Mancillas J, Ruiz Morales A, Hogue CW, Pawson T et Culotti J (1998) UNC-73 activates the Rac GTPase and is required for cell and growth cone migrations in *C. elegans*. *Cell* 92: 785-795.
- Stewart MD, Ramani VC et Sanderson RD (2015) Shed syndecan-1 translocates to the nucleus of cells delivering growth factors and inhibiting histone acetylation: a novel mechanism of tumor-host cross-talk. *Journal of Biological Chemistry* 290: 941-949.
- Stone CE, Hall DH et Sundaram MV (2009) Lipocalin signaling controls unicellular tube development in the *Caenorhabditis elegans* excretory system. *Developmental Biology* 329: 201-211.

- Struckhoff EC et Lundquist EA (2003) The actin-binding protein UNC-115 is an effector of Rac signaling during axon pathfinding in *C. elegans*. *Development* 130: 693-704.
- Su M-W, Merz DC, Killeen MT, Zhou Y, Zheng H, Kramer JM, Hedgecock EM et Culotti JG (2000) Regulation of the UNC-5 Netrin receptor initiates the first reorientation of migrating distal tip cells in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 127: 585-594.
- Su Z, Griffin B, Emmons S et Wu Y (2024) Prediction of interactions between cell surface proteins by machine learning. *Proteins* 92: 567-580.
- Sugahara K, Mikami T, Uyama T, Mizuguchi S, Nomura K et Kitagawa H (2003) Recent advances in the structural biology of Chondroitin Sulfate and Dermatan Sulfate. *Current Opinion in Structural Biology* 13: 612-620.
- Sulka B, Lortat-Jacob H, Terreux R, Letourneur F et Rousselle P (2009) Tyrosine dephosphorylation of the syndecan-1 PDZ binding domain regulates syntenin-1 recruitment. *Journal of Biological Chemistry* 284: 10659-10671.
- Sulston JE et Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 56: 110-156.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG et Thomson JN (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 100: 64-119.
- Sun L, Liu O, Desai J, Karbassi F, Sylvain MA, Shi A, Zhou Z, Rocheleau CE et Grant BD (2012) CED-10/Rac1 regulates endocytic recycling through the RAB-5 GAP TBC-2. *PLoS Genetics* 8: e1002785.
- Sundaram MV et Buechner M (2016) The *Caenorhabditis elegans* excretory system: a model for tubulogenesis, cell fate specification, and plasticity. *Genetics* 203: 35-63.
- Sundararajan L, Norris ML et Lundquist EA (2015) SDN-1/syndecan acts in parallel to the transmembrane molecule MIG-13 to promote anterior neuroblast migration. *G3 Genes/Genomes/Genetics* 5: 1567-1574.
- Suzuki N, Toyoda H, Sano M et Nishiwaki K (2006) Chondroitin acts in the guidance of gonadal distal tip cells in *C. elegans*. *Developmental Biology* 300: 635-646.

- Szabo K, Varga D, Vegh AG, Liu N, Xiao X, Xu L, Dux L, Erdelyi M, Rovo L et Keller-Pinter A (2022) Syndecan-4 affects myogenesis via Rac1-mediated actin remodeling and exhibits copy-number amplification and increased expression in human rhabdomyosarcoma tumors. *Cellular and Molecular Life Sciences* 79: s00018-00021-04121-00010.
- Takano T, Funahashi Y et Kaibuchi K (2019) Neuronal polarity: positive and negative feedback signals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7: 00069.
- Takano T, Xu C, Funahashi Y, Namba T et Kaibuchi K (2015) Neuronal polarization. *Development* 142: 2088-2093.
- Tang X et Wadsworth WG (2014) SAX-3 (Robo) and UNC-40 (DCC) regulate a directional bias for axon guidance in response to multiple extracellular cues. *PLoS ONE* 9: e110031.
- Tank EM, Rodgers KE et Kenyon C (2011) Spontaneous age-related neurite branching in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience* 31: 9279-9288.
- Teclé E, Diaz-Balzac CA et Bülow HE (2013) Distinct 3-*O*-Sulfated Heparan Sulfate modification patterns are required for *kal-1*-dependent neurite branching in a context-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. *G3 Genes/Genomes/Genetics* 3: 541-552.
- Teng YH-F, Aquino RS et Park PW (2012) Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biology* 31: 3-16.
- Thompson O, Edgley M, Strasbourger P, Flibotte S, Ewing B, Adair R, Au V, Chaudhry I, Fernando L, Hutter H, et al. (2013) The million mutation project: A new approach to genetics in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research* 23: 1749-1762.
- Timmons L et Fire A (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395: 854.
- Tong M, Jun T, Nie Y, Hao J et Fan D (2019) The role of the Slit/Robo signaling pathway. *Journal of Cancer* 10: 2694-2705.
- Toth ML, Melentijevic I, Shah L, Bhatia A, Lu K, Talwar A, Naji H, Ibanez-Ventoso C, Ghose P, Jevince A, et al. (2012) Neurite sprouting and synapse deterioration in the aging *Caenorhabditis elegans* nervous system. *J Neurosci* 32: 8778-8790.

- Touroutine D et Tanis JE (2020) A rapid, SuperSelective method for detection of single nucleotide variants in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 216: 343-352.
- Tumova S, Woods A et Couchman JR (2000) Heparan Sulfate chains from glypican and syndecans bind the Hep II domain of fibronectin similarly despite minor structural differences. *Journal of Biological Chemistry* 275: 9410-9417.
- Ueno M, Yamada S, Zako M, Bernfield M et Sugahara K (2001) Structural characterization of Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 276: 29134-29140.
- Wadsworth WG (2002) Moving around in a worm: Netrin UNC-6 and circumferential axon guidance in *C. elegans*. *Trends in Neurosciences* 25: 423-429.
- Wadsworth WG, Bhatt H et Hedgecock EM (1996) Neuroglia and pioneer neurons express UNC-6 to provide global and local Netrin cues for guiding migrations in *C. elegans*. *Neuron* 16: 35-46.
- Wang H, Julenius K, Hryhorenko J et Hagen FK (2007) Systematic analysis of Proteoglycan modification sites in *Caenorhabditis elegans* by scanning mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 282: 14586-14597.
- Wang YL, Grooms NWF et Chung SH (2022) Transverse and axial resolution of femtosecond laser ablation. *Journal of Biophotonics* 15: 202200042.
- Wang Z, Gotte M, Bernfield M et Reizes O (2005) Constitutive and accelerated shedding of murine syndecan-1 is mediated by cleavage of its core protein at a specific juxtamembrane site. *Biochemistry* 44: 12355-12361.
- Wang Z, Linden LM, Naegeli KM, Ziel JW, Chi Q, Hagedorn EJ, Savage NS et Sherwood DR (2014) UNC-6 (Netrin) stabilizes oscillatory clustering of the UNC-40 (DCC) receptor to orient polarity. *Journal of Cell Biology* 206: 619-633.
- Watari-Goshima N, Ogura K, Wolf FW, Goshima Y et Garriga G (2007) *C. elegans* VAB-8 and UNC-73 regulate the SAX-3 receptor to direct cell and growth-cone migrations. *Nature Neuroscience* 10: 169-176.

- White JG, Southgate E, Thomson JN et Brenner S (1986) The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 314: 1-340.
- Whiteford JR, Behrends V, Kirby H, Kusche-Gullberg M, Muramatsu T et Couchman JR (2007) Syndecans promote integrin-mediated adhesion of mesenchymal cells in two distinct pathways. *Experimental Cell Research* 313: 3902-3913.
- Whiteford JR et Couchman JR (2006) A conserved NXIP motif is required for cell adhesion properties of the syndecan-4 ectodomain. *Journal of Biological Chemistry* 281: 32156-32163.
- Wilson C, Moyano AL et Cáceres A (2022) Perspectives on mechanisms supporting neuronal polarity from small animals to humans. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10: 878142.
- Wilson NH et Key B (2006) Neogenin interacts with RGMa and Netrin-1 to guide axons within the embryonic vertebrate forebrain. *Developmental Biology* 296: 485-498.
- Winter JF, Hopfner S, Korn K, Farnung BO, Bradshaw CR, Marsico G, Volkmer M, Habermann B et Zerial M (2012) *Caenorhabditis elegans* screen reveals role of PAR-5 in RAB-11-recycling endosome positioning and apicobasal cell polarity. *Nature Cell Biology* 14: 666-676.
- Winzen U, Cole GJ et Halfter W (2003) Agrin is a chimeric Proteoglycan with the attachment sites for Heparan Sulfate/Chondroitin Sulfate located in two multiple serine-glycine clusters. *Journal of Biological Chemistry* 278: 30106-30114.
- Wishart TFL et Lovicu FJ (2021) An atlas of Heparan Sulfate Proteoglycans in the postnatal rat lens. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 62: 5.
- Wishart TFL et Lovicu FJ (2023) Spatiotemporal localisation of Heparan Sulphate Proteoglycans throughout mouse lens morphogenesis. *Cells* 12: 12101364.
- Wissmann A, Ingles J, McGhee JD et Mains PE (1997) *Caenorhabditis elegans* LET-502 is related to Rho-binding kinases and human myotonic dystrophy kinase and interacts genetically with a homolog of the regulatory subunit of smooth muscle myosin phosphatase to affect cell shape. *Genes and Development* 11: 409-422.

- Witte H et Bradke F (2008) The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Current Opinion in Neurobiology* 18: 479-487.
- Witten G, DeMott E, Huang G, Zelasko F, de Jesus B, Mulchand C, Schuck L, Pullman S, Perez A, Mahableshwarkar P, et al. (2023) mScarlet and split fluorophore mScarlet resources for plasmid-based CRISPR/Cas9 knock-in in *C. elegans*. *microPublication Biology* 2023: 000871.
- Woods A, Couchman JR, Johansson S et Hook M (1986) Adhesion and cytoskeletal organisation of fibroblasts in response to fibronectin fragments. *EMBO Journal* 5: 665-670.
- Wu YC, Cheng TW, Lee MC et Weng NY (2002) Distinct rac activation pathways control *Caenorhabditis elegans* cell migration and axon outgrowth. *Developmental Biology* 250: 145-155.
- Xian X, Gopal S et Couchman JR (2010) Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell and Tissue Research* 339: 31-46.
- Xu D et Esko JD (2014) Demystifying Heparan Sulfate–protein interactions. *Annual Review of Biochemistry* 83: 129-157.
- Xu K, Wu Z, Renier N, Antipenko A, Tzvetkova-Robev D, Xu Y, Minchenko M, Nardi-Dei V, Rajashankar KR, Himanen J, et al. (2014) Structures of Netrin-1 bound to two receptors provide insight into its axon guidance mechanism. *Science* 344: 1275-1279.
- Xu Y, Taru H, Jin Y et Quinn CC (2015) SYD-1C, UNC-40 (DCC) and SAX-3 (Robo) function interdependently to promote axon guidance by regulating the MIG-2 GTPase. *PLoS Genetics* 11: e1005185.
- Xu Z, Li H et Wadsworth WG (2009) The roles of multiple UNC-40 (DCC) receptor-mediated signals in determining neuronal asymmetry induced by the UNC-6 (Netrin) ligand. *Genetics* 183: 941-949.
- Yamazaki D, Itoh T, Miki H et Takenawa T (2013) srGAP1 regulates lamellipodial dynamics and cell migratory behavior by modulating Rac1 activity. *Molecular Biology of the Cell* 24: 3393-3405.
- Yang Y, Lee WS, Tang X et Wadsworth WG (2014) Extracellular matrix regulates UNC-6 (Netrin) axon guidance by controlling the direction of intracellular UNC-40 (DCC) outgrowth activity. *PLoS ONE* 9: e97258.

- Yang Y et Lundquist EA (2005) The actin-binding protein UNC-115/abLIM controls formation of lamellipodia and filopodia and neuronal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and Cellular Biology* 25: 5158-5170.
- Yanowitz JL, Shakir MA, Hedgecock E, Hutter H, Fire AZ et Lundquist EA (2004) UNC-39, the *C. elegans* homolog of the human myotonic dystrophy-associated homeodomain protein Six5, regulates cell motility and differentiation. *Developmental Biology* 272: 389-402.
- Ye S (2001) An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research* 29: 88e-88.
- Yemini E, Lin A, Nejatbakhsh A, Varol E, Sun R, Mena GE, Samuel ADT, Paninski L, Venkatachalam V et Hobert O (2021) NeuroPAL: A multicolor atlas for whole-brain neuronal identification in *C. elegans*. *Cell* 184: 272-288.e211.
- Yu TW, Hao JC, Lim W, Tessier-Lavigne M et Bargmann CI (2002) Shared receptors in axon guidance: SAX-3/Robo signals via UNC-34/Enabled and a Netrin-independent UNC-40/DCC function. *Nature Neuroscience* 5: 1147-1154.
- Zallen JA, Kirch SA et Bargmann CI (1999) Genes required for axon pathfinding and extension in the *C. elegans* nerve ring. *Development* 126: 3679-3692.
- Zallen JA, Peckol EL, Tobin DM et Bargmann CI (2000) Neuronal cell shape and neurite initiation are regulated by the Ndr Kinase SAX-1, a member of the Orb6/COT-1/Warts serine/threonine Kinase family. *Molecular Biology of the Cell* 11: 3177-3190.
- Zallen JA, Yi BA et Bargmann CI (1998) The conserved immunoglobulin superfamily member SAX-3/Robo directs multiple aspects of axon guidance in *C. elegans*. *Cell* 92: 217-227.
- Zhang L, Ward JD, Cheng Z et Dernburg AF (2015) The Auxin-Inducible Degradation (AID) system enables versatile conditional protein depletion in *C. elegans*. *Development* 142: 4374-4384.
- Zhang P, Lu H, Peixoto RT, Pines MK, Ge Y, Oku S, Siddiqui TJ, Xie Y, Wu W, Archer-Hartmann S, et al. (2018) Heparan Sulfate organizes neuronal synapses through neurexin partnerships. *Cell* 174: 1450-1464.e1423.

Zheng C, Diaz-Cuadros M et Chalfie M (2016) GEFs and Rac GTPases control directional specificity of neurite extension along the anterior–posterior axis. *PNAS* 113: 6973-6978.

Zhou X, Vachon C, Cizeron M, Romatif O, Bulow HE, Jospin M et Bessereau JL (2021) The HSPG syndecan is a core organizer of cholinergic synapses. *Journal of Cell Biology* 220: 202011144.

Zhu Y, Tesone Z, Tan M et Hardin J (2024) TIAM-1 regulates polarized protrusions during dorsal intercalation in the *Caenorhabditis elegans* embryo through both its GEF and N-terminal domains. *Journal of Cell Science* 137: 261509.

Zipkin ID, Kindt RM et Kenyon CJ (1997) Role of a new Rho family member in cell migration and axon guidance in *C. elegans*. *Cell* 90: 883-894.

Zong F, Fthenou E, Wolmer N, Hollosi P, Kovalszky I, Szilak L, Mogler C, Nilsson G, Tzanakakis G et Dobra K (2009) Syndecan-1 and FGF-2, but not FGF receptor-1, share a common transport route and co-localize with heparanase in the nuclei of mesenchymal tumor cells. *PLoS One* 4: e7346.