

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE LA MAINTENANCE DU SYSTÈME NERVEUX : RÔLE DE LA
PAPILINE

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

AU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR

MALIKA NADOUR

AOÛT 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 souhaite exprimer avant tout ma plus profonde gratitude à ma directrice de thèse, la professeure Claire Bénard, pour son accompagnement exceptionnel. Je la remercie de m'avoir confié ce projet de recherche, et pour sa grande disponibilité, son écoute et son soutien tout au long de ces années de thèse. Merci pour ton ouverture aux nouvelles idées et pour nos échanges scientifiques, ce qui a largement contribué à mon épanouissement lors de cette aventure de recherche. Merci pour la rigueur et l'excellence que tu inspires au sein du laboratoire. Ta bienveillance et ta flexibilité m'ont permis d'évoluer sereinement, en conciliant mes rôles de doctorante et de maman, alors merci infiniment Claire. Merci pour ta grande humanité au quotidien avec nous tous. Merci infiniment, pour tout cela, et bien plus encore.

Un remerciement tout particulier à Lise Rivollet, notre assistante de recherche au laboratoire. Merci Lise pour ton engagement sincère au sein du laboratoire. Toujours disponible pour répondre à mes questions et besoins, même lorsque j'arrive à l'improviste, tu as toujours su m'accueillir avec bienveillance. Un énorme merci pour ton aide précieuse dans la réflexion autour de nos projets et pour la formation que tu nous as offerte, notamment en biologie moléculaire et microscopie. Merci pour ta grande aide, support et contribution aux travaux de cette thèse. Ta belle attitude, ton souci de notre réussite, et même ton stress bienveillant avant nos présentations orales montrent à quel point tu es investie à nos côtés. Merci aussi pour tous les moments d'échange et de convivialité que nous avons partagés ensemble. Merci Lise pour toutes les choses que j'ai sûrement oubliées de mentionner, mais qui ont été tout aussi importantes.

Le plaisir pour moi de faire de la recherche réside dans le partage, la collaboration et le travail d'équipe. J'ai eu la chance de former et de collaborer avec de nombreux stagiaires, étudiants de maîtrise, et certains devenus doctorants par la suite. Chacun d'eux a fait preuve d'un grand engagement, d'une belle énergie, et d'une patience admirable face à mes longues listes d'expériences et mes plannings parfois très anticipés ! Je vous remercie d'avoir participé à cette aventure au fil du temps. Je remercie d'abord Marie Biard, que j'ai eu la chance de former et intégrer à mon projet en tant que stagiaire à ses tout débuts au laboratoire et pendant les premières années de ce projet. Merci Marie, pour ton attitude positive, tes réflexions pertinentes, et ta passion envers la complexité des neurosciences. Ton aide a été très précieuse, entre autres, merci pour avoir réfléchi avec nous à mettre au point des méthodes de quantification ainsi que ton initiative d'introduire de nombreuses notions de statistique au sein de notre laboratoire. Merci aussi pour ton investissement, même lorsque tu travaillais sur un autre projet durant ta maîtrise — tu as toujours

gardé une main tendue pour m'aider et continuer à contribuer à ce projet. Merci aussi pour tous les bons moments partagés ensemble. Je remercie aussi chaleureusement et tout particulièrement Ivan Valette, l'étudiant avec qui j'ai travaillé pendant plus de trois ans, principalement sur la deuxième partie de ce projet, durant sa maîtrise. Merci à toi, Ivan, pour ton investissement total dans ce projet. Merci pour tes grands efforts et ta persévérance. Merci pour ta gentillesse et le respect avec lequel tu as toujours collaboré. Un grand merci aussi à Noémie Frébault pour son aide et sa contribution, même si tu es arrivée vers la fin du projet, tu as su t'intégrer, rejoindre notre équipe et travailler avec détermination. Je remercie aussi Valérie Fontaine, qui a travaillé dans un cadre plus large de ce projet, pour sa contribution et toute son aide. Je remercie également Philippe St-Louis d'avoir travaillé avec moi au tout début de ma thèse en tant que stagiaire puis pour toute sa belle contribution à la génération de souches transgéniques pour mon projet. Je tiens à remercier aussi tous les étudiants stagiaires que j'ai encadré et/ou travaillé dans le cadre de ce projet : je remercie William White, Clara Bianchi, Nassim Bouhacida et Elise Cheynet.

Je remercie tous les étudiants du laboratoire avec qui j'ai eu la chance de partager toutes ces années : Virginie, Marianne, Raphaël, Vicky, Yann, Marin et Samar. Merci pour les beaux moments passés ensemble et pour la belle ambiance que vous avez su créer au sein du laboratoire. Raphaël, merci pour ta sérénité et ton humour. Yann, merci pour ta générosité et le temps que tu prends toujours pour aider les autres. Marin, merci pour ta gentillesse et ta positivité. Merci à tous pour votre aide, pour m'avoir libéré le microscope lors de mes longues expériences et pour avoir mis tout à ma disposition, en particulier après mes maternités.

Je remercie également tout le personnel du Centre CERMO-FC surtout Hermance Beaud, et Denis Flipo et Grégoire Bonnamour du département des Sciences biologiques.

Je tiens ensuite à remercier toute ma famille, mes parents, mes frères, mes sœurs, mes beaux-parents et ma belle-sœur Cirta pour tout leur soutien. Merci maman et papa d'être toujours là pour moi, pour votre amour et bienveillance. Un grand merci à mes sœurs Zahia et Hayat : vos petits messages, vos encouragements sont souvent arrivés au bon moment, me redonnant ainsi l'élan nécessaire. Et à mon frère Kamel, merci pour tes conseils, toujours empreints de sagesse et de justesse — tu as souvent su m'éclairer quand j'en avais le plus besoin.

Pour terminer, mes remerciements les plus sincères et profonds vont à mon mari, Mahdi, celui sur qui j'ai toujours pu compter tout au long de ces années. Merci pour ton soutien indéfectible, pour tes

encouragements constants, et pour ta présence réconfortante dans les moments les plus difficiles. Merci d'avoir cru en moi, d'avoir supporté mes silences et mes inquiétudes. Merci pour ta patience inépuisable, pour tous ces week-ends et jours fériés que tu as acceptés de sacrifier afin que je puisse avancer. Rien de tout cela n'aurait été possible sans toi. Merci aussi à nos trésors à tous les deux, nos filles : Sara, Elouise et Nelya. Sara, ma chérie, merci pour ta douceur et ton sourire, qui ont illuminé mes journées les plus épuisantes. Elouise, mon trésor, ta bienveillance et tes petits gestes de soutien, même à ton jeune âge, ont été un véritable rayon de réconfort. Nelya, ma petite fleur, ton sourire innocent et ta présence tout près de moi pendant que je rédigeais m'ont constamment redonné courage. Merci d'avoir été là, et merci de m'avoir permis de réaliser ce projet.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xii
RÉSUMÉ	xiv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 La maintenance de l'architecture du système nerveux	3
1.1.1 Concept de la maintenance à long terme du système nerveux	3
1.1.2 Importance de la maintenance de l'architecture du système nerveux face à des stress.....	5
1.1.2.1 La maturation du système nerveux et la croissance corporelle	5
1.1.2.2 Les autres facteurs agissant sur la morphologie du système nerveux	7
1.1.3 <i>Caenorhabditis elegans</i> , un modèle d'étude de la maintenance neuronale.....	8
1.1.3.1 Description, avantages et cycle de vie.....	8
1.1.3.1.1 Description et avantages	8
1.1.3.1.2 Cycle de vie	10
1.1.3.2 Un modèle pour l'étude du système nerveux	10
1.1.4 La maintenance de l'architecture des différentes structures du système nerveux chez <i>C. elegans</i>	12
1.1.4.1 Maintenance de l'organisation des ganglions de la tête	13
1.1.4.2 Maintenance de la position des axones	15
1.1.4.3 Maintenance de la position des synapses	16
1.1.5 Les molécules de la maintenance de l'architecture du système nerveux chez <i>C. elegans</i>	17
1.1.5.1 La famille des immunoglobulines	17
1.1.5.1.1 Les protéines de la famille des ZIG	17
1.1.5.1.2 La protéine DIG-1.....	18
1.1.5.1.3 La protéine EGL-15(5A).....	19
1.1.5.1.4 La molécule d'adhésion SAX-7/L1CAM.....	19
1.1.5.2 Autres molécules impliquées dans la maintenance neuronale	22
1.1.5.2.1 Les protéines du cytosquelette	22
1.1.5.2.2 Les protéines de la matrice extracellulaire.....	23
1.2 La matrice extracellulaire.....	24
1.2.1 La matrice extracellulaire chez les vertébrés.....	24
1.2.1.1 Composition et structure.....	24
1.2.1.1.1 La matrice interstitielle.....	24
1.2.1.1.2 La membrane basale.....	27
1.2.1.2 La matrice extracellulaire : une structure dynamique.....	27
1.2.1.2.1 Remodelage aberrant de la MEC.....	28

1.2.1.3	Le rôle de la signalisation de la superfamille TGF- β dans la fibrose	31
1.2.1.4	Fonctions de la matrice extracellulaire.....	34
1.2.2	La membrane basale chez <i>C. elegans</i>	37
1.2.2.1	<i>C. elegans</i> : un modèle d'étude de la membrane basale	37
1.2.2.2	Les propriétés de la membrane basale étudiées chez <i>C. elegans</i>	38
1.2.2.3	Les composants de la membrane basale chez <i>C. elegans</i>	39
1.2.2.3.1	Les composants majeurs : la laminine et le collagène IV	42
1.2.2.3.2	Autres composants	45
1.3	La protéine extracellulaire MIG-6/papiline	48
1.3.1	Structure et distribution de MIG-6/papiline.....	48
1.3.2	Fonctions connues de MIG-6/papiline.....	50
1.3.2.1	Rôles de MIG-6/papiline dans la morphogenèse et l'organogenèse	50
1.3.2.2	Régulation de la localisation et de l'activité des enzymes ADAMTS	51
1.3.2.3	Développement des arborisations dendritiques chez <i>C. elegans</i>	51
1.3.2.4	Association de la papiline à certaines pathologies	52
1.4	La matrice extracellulaire dans le système nerveux	53
1.4.1	Distribution, composition et organisation	53
1.4.2	Fonctions de la MEC dans le système nerveux	55
CHAPITRE 2 ARTICLE 1 - Remodeling of extracellular matrix collagen IV by MIG-6/papilin regulates neuronal architecture.....		58
2.1	Résumé.....	61
2.2	Abstract	62
2.3	Introduction	63
2.4	Materials and Methods.....	67
2.5	Results	76
2.5.1	Loss of function of <i>mig-6</i> , which encodes the conserved extracellular matrix protein papilin, suppresses neuronal maintenance defects of <i>sax-7</i> mutants	76
2.5.2	The short isoform MIG-6S is key in neuronal maintenance, acting through its papilin cassette and lagrin repeats	79
2.5.3	<i>mig-6/papilin</i> modulates neuronal maintenance post-embryonically and in specific neuronal contexts.....	82
2.5.4	<i>mig-6/papilin</i> functions non-autonomously, together with <i>mig-17/ADAMTS</i> to impact neuronal maintenance.....	85
2.5.5	Loss of <i>mig-6S/papilin</i> results in increased EMB-9/collagen IV levels that accumulates as extracellular fibrotic-like structures.....	89
2.5.6	<i>mig-6/papilin</i> affects the biomechanical properties of the animal's tissues.....	94
2.5.7	<i>mig-6/papilin</i> and <i>mig-17/ADAMTS</i> function together to regulate extracellular collagen IV.....	95
2.5.8	Suppression of <i>sax-7</i> neuronal maintenance defects upon loss of <i>mig-6/papilin</i> and <i>mig-17/ADAMTS</i> depends on collagen IV levels and cross-linking	101
2.5.9	Loss of <i>mig-6/papilin</i> counteracts neuronal disorganization induced by increased mechanical stress 105	
2.6	Discussion.....	106

CHAPITRE 3 ARTICLE 2 - Interplay between MIG-6/papilin and TGF- β signaling promotes extracellular matrix remodeling and modulates the maintenance of neuronal architecture	118
3.1 Résumé.....	120
3.2 Abstract	121
3.3 Introduction	122
3.4 Materials and Methods.....	126
3.5 Results	130
3.5.1 The TGF- β pathway interacts with the ECM modulator <i>mig-6/papilin</i> in neuronal maintenance 130	
3.5.2 <i>mig-6</i> -dependent collagen IV remodeling is affected by the TGF- β pathway	134
3.5.3 Loss of <i>mig-6/papilin</i> function and alteration of the TGF- β pathway affect ECM proteins laminin and fibulin.....	135
3.5.4 Laminin and fibulin are required for neuronal maintenance roles of MIG-6/papilin and TGF- β pathway.....	141
3.5.5 Disruption of TGF- β signaling pathway alters expression levels of MIG-6S/papilin	142
3.5.6 Loss of <i>mig-6/papilin</i> leads to lowered TGF- β signaling	146
3.6 Discussion.....	151
3.6.1 The TGF- β pathway functions with <i>mig-6</i> to regulate the extracellular matrix	151
3.6.2 MIG-6/papilin regulates ECM remodeling through modulation of the TGF- β pathway	154
3.6.3 A <i>mig-6</i> -dependent role for the TGF- β signaling pathway in neuronal maintenance	156
CHAPITRE 4 DISCUSSION GÉNÉRALE	158
4.1 Explorer le rôle de MIG-6/papiline sur d'autres structures neuronales	160
4.1.1 Rôle de MIG-6/papiline sur d'autres groupes de neurones	160
4.1.2 Rôle de MIG-6/papiline sur la morphologie synaptique.....	161
4.1.3 Rôle de la glie dans la maintenance neuronale dans le contexte des mutants <i>mig-6</i>	161
4.2 Mieux comprendre et caractériser le remodelage de la MEC dans le contexte des mutants <i>mig-6</i> 162	
4.2.1 Examiner plus précisément l'état, la localisation et l'origine du collagène IV chez les mutants <i>mig-6</i> 162	
4.3 Mieux comprendre l'interaction de MIG-6/papiline avec les métalloprotéinases MIG-17 et GON-1 165	
4.4 Le remodelage de la MEC chez les mutants <i>mig-6</i> affecterait-il les voies de transduction du signal mécanique ?	166
4.5 Rôle de la papiline chez l'humain et dans le contexte de la fibrose	170
CONCLUSION	173
ANNEXE A Figures et tableaux supplémentaires pour chapitre 2.....	175
ANNEXE B Tableaux supplémentaires pour chapitre 3	194
BIBLIOGRAPHIE.....	198

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Représentation du concept de la maintenance neuronale.....	4
Figure 1.2 Le cerveau en développement maintient sa topologie.....	6
Figure 1.3 Anatomie d'une hermaphrodite adulte.	9
Figure 1.4 Le cycle de vie de <i>C. elegans</i>	11
Figure 1.5 Aperçu des valeurs numériques du nombre de neurones et de synapses dans le système nerveux des organismes modèles utilisés en neuroscience.....	12
Figure 1.6 Organisation des structures neuronales (ganglions et axones) dans la tête et la corde ventrale.	14
Figure 1.7 Analyse des défauts neuronaux de maintenance des ganglions neuronaux et des axones.	15
Figure 1.8 Exemple de défauts de maintenance dans les ganglions de la tête.....	16
Figure 1.9 Les molécules de la maintenance neuronale de la famille des immunoglobulines.	18
Figure 1.10 La composition générale de la MEC chez les vertébrés.	25
Figure 1.11 Les grandes familles de collagènes.	26
Figure 1.12 : Le remodelage de la matrice extracellulaire.	30
Figure 1.13 Schéma des voies de signalisation TGF- β et BMP dans la fibrose.....	32
Figure 1.14 Les fonctions de la matrice extracellulaire.....	36
Figure 1.15 Distribution de la membrane basale chez <i>C. elegans</i>	38
Figure 1.16 L'implication de la MB dans le mécanisme de formation de la connexion vulve-utérus chez <i>C. elegans</i>	40
Figure 1.17 La composition de la membrane basale chez <i>C. elegans</i>	41
Figure 1.18 La structure de la laminine.....	42
Figure 1.19 Schéma des domaines protéiques du collagène IV.....	43
Figure 1.20 Mécanisme de formation du réseau collagène IV.....	44
Figure 1.21 Schéma des domaines protéiques de deux ADAMTS les plus étudiées chez <i>C. elegans</i>	47
Figure 1.22 Mécanisme d'action de MIG-17 dans le remodelage de la MB des gonades.	48

Figure 1.23 Schéma des domaines protéiques des principales isoformes de la protéine MIG-6/papiline.	49
Figure 1.24 Le rôle de MIG-6/papiline dans le développement des dendrites chez <i>C. elegans</i> .	52
Figure 1.25 La matrice extracellulaire dans le système nerveux.	54
Figure 1.26: Coupes de microscopie électronique montrant le contexte tissulaire des neurones de la tête chez <i>C. elegans</i> .	55
Figure 2.1 Loss of function of <i>mig-6</i> , which encodes the conserved ECM protein papilin, suppresses neuronal maintenance defects of <i>sax-7</i> mutants: Rescue and post developmental role.	77
Figure 2.2 Structure and molecular lesions in the conserved gene <i>mig-6</i> /papilin protein.	79
Figure 2.3 Structure-function relationship for the gene <i>mig-6</i> .	80
Figure 2.4 <i>mig-6</i> /papilin impacts the maintenance of axon and soma position in specific neuroanatomical and genetic contexts.	84
Figure 2.5 The ECM genes <i>mig-6</i> /papilin and <i>mig-17</i> /ADAMTS function together in neuronal maintenance.	86
Figure 2.6 <i>mig-6</i> /papilin functions from muscles and depends on <i>mig-17</i> /ADAMTS in neuronal maintenance.	88
Figure 2.7 Loss of <i>mig-6</i> /papilin function disrupts proper extracellular collagen IV remodeling and causes fibrotic structures: Timeline analysis.	90
Figure 2.8 Loss of <i>mig-6</i> /papilin function disrupts proper extracellular collagen IV remodeling and causes fibrotic structures: Characterization of the position, length and stability of fibrotic-like structures.	91
Figure 2.9 Loss of <i>mig-6</i> /papilin function disrupts proper extracellular collagen IV remodeling and causes fibrotic structures.	94
Figure 2.10 Anatomical context of neurons and surrounding basement membranes.	96
Figure 2.11 Loss of <i>mig-6</i> /papilin alters tissue biomechanical properties as measured by Brillouin microscopy.	97
Figure 2.12 <i>mig-6</i> /papilin and <i>mig-17</i> /ADAMTS both regulate extracellular collagen IV remodeling.	100
Figure 2.13 The level of MIG-17/ADAMTS is affected by the loss of <i>mig-6</i> .	100
Figure 2.14 The collagen IV fibrotic phenotype of <i>mig-6</i> or <i>mig-17</i> mutants is still observed in the <i>sax-7</i> mutant background.	102
Figure 2.15 Collagen IV levels are key for <i>mig-6</i> /papilin's role in neuronal maintenance.	103
Figure 2.16 The crosslinking of extracellular collagen IV is also key for <i>mig-6</i> /papilin's role in neuronal maintenance.	105

Figure 2.17 Loss of papilin is protective of neuronal organization under conditions of increased stress.	108
Figure 2.18 A model for the role of MIG-6S/papilin in collagen IV remodeling and neuronal maintenance.	109
Figure 3.1 Disruption of the TGF- β pathway enhances the neuronal stabilization resulting from the loss of <i>mig-6/papilin</i>	131
Figure 3.2 Quantification of the effect of TGF- β pathway disruption on the neuronal stabilization in <i>mig-6/papilin</i> mutants.	134
Figure 3.3 Altering TGF- β pathway function enhances the collagen IV fibrotic state of <i>mig-6/papilin</i> mutants.....	137
Figure 3.4 Altering TGF- β pathway function affects peroxidasin levels in <i>mig-6/papilin</i> mutants.....	138
Figure 3.5 MIG-6/papilin and the TGF- β pathway regulate ECM protein laminin.	139
Figure 3.6 MIG-6/papilin and the TGF- β pathway regulate ECM protein fibulin.....	141
Figure 3.7 Neuronal stabilization by <i>mig-6</i> mutation, and its enhancement through TGF- β signaling inactivation, requires laminin and fibulin.....	144
Figure 3.8 Summary of the impact of the interaction between <i>mig-6</i> and TGF- β signaling pathway. If, loss of function; OE, overexpression of wild-type copies.....	144
Figure 3.9 TGF- β pathway loss or overexpression both increase MIG-6S/papilin levels.	146
Figure 3.10 TGF- β signaling is attenuated in <i>mig-6</i> mutants.	147
Figure 3.11 Overexpression of TGF- β ligand or receptor counteracts the effects of <i>mig-6</i> mutation on neuronal maintenance.	150
Figure 3.12 Proposed model : MIG-6/papilin regulates ECM remodeling and positively modulates TGF- β pathway.	150

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i>
ADAMTS	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs</i>
ADAMTSL	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs-Like</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	Interférence par acide ribonucléique
ASI	<i><u>A</u>mphid neurons, <u>s</u>ingle ciliated endings</i> (neurones ciliés amphidiaux)
ASH	<i><u>A</u>mphid neurons, <u>s</u>ingle ciliated endings</i> (neurones ciliés amphidiaux)
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
F1s	Progéniture de la première génération
F2s	Progéniture de la deuxième génération
F3	Progéniture de la troisième génération
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
gRNA	<i>Guide RNA</i>
IgCAM	<i>Immunoglobulin cell adhesion molecule</i>
Ig	Domaine semblable aux immunoglobulines

L1	Premier stade larvaire
L2	Second stade larvaire
L4	Quatrième stade larvaire
L1CAM	<i>L1 cell adhesion molecule</i>
MB	Membrane basale (en anglais <i>Basement membrane</i> BM)
MEC	Matrice extracellulaire (en anglais <i>Extracellular matrix</i> : ECM)
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
mNG	<i>mNeonGreen</i>
NGM	<i>Nematode Growth Medium</i>
P ₀	Génération parentale
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (réaction en chaîne par polymérase)
PNN	Perineuronal nets
PVQ	<i>Posterior Ventral process Q neuron</i> (neurone postérieur ventral à processus Q)
TSP1	<i>Thrombospondin type 1</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>

RÉSUMÉ

L'architecture neuronale établie durant l'embryogenèse doit persister tout au long de la vie pour assurer le bon fonctionnement du cerveau. Pourtant, les mécanismes responsables du maintien à long terme de l'organisation neuronale restent mal compris. Chez les mutants de la molécule d'adhésion cellulaire *sax-7/L1CAM*, certaines structures neuronales se développent normalement mais deviennent désorganisées avec l'âge. Afin d'identifier des mécanismes de la maintenance neuronale, nous avons réalisé un crible génétique de suppresseurs des mutants *sax-7*. Nous avons identifié la protéine conservée de la matrice extracellulaire, MIG-6/papiline, qui agit de façon post-développementale comme régulateur de la maintenance neuronale. MIG-6/papiline possède une cassette papiline dans sa structure protéique, qui est clef pour le rôle de MIG-6/papiline dans la maintenance de l'architecture neuronale. Cette cassette papiline est également présente dans chez les métalloprotéinases ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs). L'isoforme courte de *mig-6* agit à partir des muscles pour assurer la maintenance neuronale, et ce de façon dépendante de la fonction de la métalloprotéinase MIG-17/ADAMTS. De façon intéressante, la perte de *mig-6* conduit à une accumulation de collagène IV sous forme de structures fibrotiques extracellulaires. Les niveaux et la réticulation du collagène IV sont requis pour que la mutation *mig-6* supprime les défauts neuronaux de *sax-7*, puisque la déplétion post-développementale du collagène IV, ou de l'enzyme de réticulation, la peroxydase, mène à la réapparition des défauts de la maintenance neuronale chez les doubles mutants *sax-7; mig-6*. L'état remodelé de la matrice extracellulaire chez les mutants *mig-6* affecte les propriétés biomécaniques des tissus et stabilise l'organisation neuronale chez les mutants *sax-7*, mais aussi chez des animaux de type sauvage sous l'effet de contraintes mécaniques accrues. Pour comprendre comment ce phénotype fibrotique des mutants *mig-6* est induit, nous avons exploré la voie TGF- β , bien connue pour réguler le processus de la fibrose chez les mammifères. Nous montrons que la voie TGF- β influence le remodelage du collagène IV chez le ver et participe à la maintenance neuronale. En effet, chez les mutants *mig-6*, la perte de la signalisation TGF- β entraîne une accumulation accrue de structures fibrotiques de collagène IV et renforce la suppression des défauts neuronaux des mutants *sax-7* par la mutation de *mig-6*. La dérégulation de la voie TGF- β par suractivation, via la surexpression du récepteur, contrecarre la suppression des défauts neuronaux de *sax-7* induite par la perte de fonction de *mig-6*. De plus, nous avons montré que *mig-6/papiline* agit comme un modulateur positif de la voie TGF- β , ce qui suggère que le rôle de MIG-6 dans le remodelage de la matrice extracellulaire implique en partie cette voie de signalisation. Enfin, d'autres composants de la matrice extracellulaire, tels que la laminine et la fibuline, sont également importants

pour la suppression des défauts neuronaux des mutants *sax-7* par la mutation de *mig-6*. Nos résultats révèlent un mécanisme extracellulaire par lequel MIG-6/papiline régule le maintien à long terme de l'intégrité de l'architecture neuronale. Cette étude souligne l'importance de la matrice extracellulaire et de sa régulation par MIG-6/papiline dans les fondements moléculaires de la maintenance de l'organisation neuronale à long terme.

Mots clés : Maintenance neuronale, papiline, MIG-6, collagène IV, matrice extracellulaire, TGF- β .

ABSTRACT

Neuronal architecture established embryonically must persist lifelong to ensure normal brain function. However, little is understood about the mechanisms behind the long-term maintenance of neuronal organization. In cell-adhesion molecule mutants *sax-7/L1CAM*, distinct neuronal structures that develop normally later become disorganized. To uncover maintenance mechanisms, we performed a suppressor screen in *sax-7* mutants, which exhibit progressive disorganization with age. We identified the conserved extracellular matrix protein MIG-6/papilin as a key regulator of neuronal maintenance, which functions post-developmentally. MIG-6/Papilin harbors a papilin cassette, present also in ADAMTS metalloproteinases, which we show is required for neuronal maintenance. *mig-6* short isoform functions from muscles in neuronal maintenance, in a *mig-17*/ADAMTS-dependent manner. Interestingly, loss of *mig-6* leads to the accumulation of extracellular collagen IV fibrotic structures. Collagen IV levels and crosslinking are required for the suppression of *sax-7* neuronal defects by *mig-6* mutation, as the post-developmental depletion of collagen IV, or of its crosslinking enzyme peroxidasin, reinstates neuronal maintenance defects in *sax-7; mig-6* mutants. The extracellular matrix remodeling of *mig-6* mutants impacts tissue biomechanics and promotes neuronal stability, even under increased mechanical stress. To determine how the *mig-6*-dependent fibrotic phenotype might come about, we investigated the TGF- β pathway, which is well known to regulate fibrosis in mammals. We find that the TGF- β pathway impacts collagen IV remodeling in *C. elegans* and participates in neuronal maintenance. Indeed, in *mig-6* mutants, loss of TGF- β signaling exacerbates collagen IV fibrotic structures accumulation and enhances the suppression of *sax-7* neuronal defects. Dysregulated TGF- β signaling by receptor overexpression also counteracts the suppression of *sax-7* neuronal defects by *mig-6*. Furthermore, we show that *mig-6/papilin* acts as a positive modulator of the TGF- β pathway, suggesting that MIG-6's role in extracellular matrix remodeling is at least partially mediated through this signaling pathway. Finally, other extracellular matrix components, such as laminin and fibulin, are also important for the *mig-6*-mediated suppression of *sax-7* neuronal defects. Altogether, our findings highlight an extracellular mechanism by which MIG-6/papilin regulates the maintenance of neuronal architecture on the long term. This study emphasizes the importance of the extracellular matrix and its regulation by MIG-6/papilin in the molecular basis of lifelong maintenance of neuronal organization.

Keywords : Neuronal maintenance, Papilin, MIG-6, Collagen IV, Extracellular matrix, TGF- β .

INTRODUCTION

Le fonctionnement du système nerveux repose non seulement sur l'assemblage précis des circuits neuronaux durant le développement, mais également sur la préservation à long terme de leur intégrité structurelle. L'architecture neuronale, en grande partie établie dès l'embryogenèse, doit être maintenue tout au long de la vie pour assurer la stabilité des fonctions cérébrales. Toutefois, cette organisation est continuellement mise à l'épreuve par les contraintes mécaniques liées aux mouvements du corps, à la croissance, à la maturation, au remodelage tissulaire, ou aux blessures. Des défauts dans le maintien des structures neuronales peuvent altérer les connexions neuronales et contribuer à l'apparition de troubles neurologiques et neurodégénératifs, comme la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie, et bien d'autres, caractérisées notamment par une déstabilisation des dendrites et une perte synaptique.

Bien qu'essentielles, les bases moléculaires qui assurent l'organisation neuronale à long terme demeurent mal comprises. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle central de la matrice extracellulaire (MEC) dans le maintien et la préservation de l'architecture tissulaire, y compris au sein du système nerveux. La MEC joue un rôle dans la régulation de processus tels que l'adhésion cellulaire, des voies de signalisation et de la réponse aux stress mécaniques. Chez les mammifères, la MEC représente jusqu'à 20 % du volume total du cerveau et se retrouve sous forme diffuse ou condensée—telles que les membranes basales (MB) ou les réseaux périneuronaux—jouant des rôles clés dans la plasticité synaptique, la régénération axonale et la stabilité neuronale. Toutefois, le rôle de la MEC dans le maintien des structures neuronales du système nerveux mature reste peu exploré, en particulier en contexte de stress mécanique chronique.

Le nématode *Caenorhabditis elegans* constitue un modèle *in vivo* puissant pour étudier la maintenance de l'architecture du système nerveux. Malgré une augmentation de taille d'environ 100 fois entre l'éclosion et l'âge adulte, son système nerveux conserve son organisation architecturale établie durant l'embryogenèse. Des études dans ce modèle ont révélé que plusieurs molécules de la famille des immunoglobulines (Ig), telles que SAX-7/L1CAM, agissent pour stabiliser les assemblages neuronaux. Les mutants de maintenance *sax-7* se développent initialement normalement puis montrent une désorganisation neuronale progressive avec l'âge. De façon intéressante, les défauts observés chez les mutants *sax-7* sont supprimés par la paralysie, suggérant que le stress mécanique interne généré par les mouvements corporels contribue à la désorganisation neuronale.

Afin d'identifier d'autres molécules impliquées dans les mécanismes qui assurent la maintenance neuronale, le laboratoire Bénard a réalisé un criblage génétique pour isoler des supprimeurs des mutants *sax-7*. Ceci nous a permis d'identifier la protéine conservée de la MEC, MIG-6/papiline, comme un régulateur de la maintenance neuronale. Les travaux de cette thèse visent à élucider les mécanismes moléculaires sous-jacents au rôle de MIG-6/papiline impactant le maintien de l'architecture neuronale.

Cette thèse est structurée en quatre chapitres. Le chapitre 1 est consacré à une revue de la littérature portant sur la maintenance de l'architecture neuronale et sur la MEC. La première section aborde les mécanismes actuellement connus de la maintenance de l'organisation neuronale, ainsi que les principales molécules impliquées. Je développe ensuite la composition et les fonctions de la MEC chez les vertébrés et chez *C. elegans*. Le chapitre 1 se termine par une présentation de la MEC neuronale.

Les travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de cette thèse sont présentés dans les chapitres 2 et 3, chacun correspondant à un article scientifique (la contribution des auteurs est détaillée en annexe). Le chapitre 2 est dédié à la mise en évidence du rôle de MIG-6/papiline dans le maintien de l'architecture neuronale. Nous y explorons le mécanisme par lequel cette protéine coopère avec d'autres composants extracellulaires pour réguler l'état de la MEC permettant ainsi de préserver l'organisation neuronale, tant dans des conditions physiologiques que dans les conditions de stress mécanique. Ce travail met également en lumière la contribution de la protéine MIG-6 aux propriétés biomécaniques de la MEC. Le chapitre 3 constitue la continuité de l'histoire du chapitre 2. Dans ce chapitre, nous explorons l'implication de la voie de signalisation TGF- β dans le mécanisme par lequel MIG-6/papiline participe au maintien de l'architecture du système nerveux.

Enfin, dans le chapitre 4, une discussion générale des résultats obtenus dans la présente thèse est présentée, ainsi que plusieurs perspectives de recherche pouvant être envisagées pour aider à approfondir notre compréhension des mécanismes impliquant la MEC et l'impact de MIG-6/papiline sur la maintenance de l'architecture du système nerveux.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 La maintenance de l'architecture du système nerveux

1.1.1 Concept de la maintenance à long terme du système nerveux

L'étude du développement du système nerveux et de son vieillissement a considérablement progressé, mais un domaine d'étude en plein essor en neurobiologie concerne la maintenance à long terme de l'architecture neuronale (Bénard et Hobert, 2009).

La maintenance neuronale englobe deux aspects : 1) le maintien des caractéristiques structurelles et fonctionnelles intrinsèques des neurones telles que leurs programmes d'expression génique, qui définissent leur identité, leurs propriétés fonctionnelles, ainsi que leur survie cellulaire; et 2) la maintenance de l'organisation globale et de la position correcte des neurones (soma, axone, dendrites) les uns par rapport aux autres et par rapport aux autres composants du système nerveux comme les cellules gliales. Un tel entretien est essentiel pour que les neurones conservent leur capacité à communiquer entre eux de manière appropriée tout au long des phases de croissance postnatale, de maturation, de remodelage et en condition de contraintes mécaniques (Bénard et Hobert, 2009) (Figure 1.1).

Chez les organismes adultes, de nombreux tissus, tels que la peau, le sang, l'intestin et les os, possèdent des capacités de régénération et de renouvellement importantes (Clevers, Loh et Nusse, 2014). En revanche, le système nerveux présente des capacités de renouvellement limitées, même après un traumatisme ou une maladie (Tam *et al.*, 2014), d'où l'importance de maintenir ses structures sur le long terme pour assurer son bon fonctionnement. De plus, les cellules neuronales, étant hautement polarisées et ayant une morphologie particulièrement complexe, sont en contact avec divers types d'environnements cellulaires ce qui les expose davantage à divers stress et contraintes. Ceci souligne l'importance des mécanismes moléculaires dédiés à la maintenance de l'architecture du système nerveux.

L'identification de mutants de maintenance neuronale a permis de démontrer que la perte de fonction de certains gènes spécifiques altère la maintenance de l'organisation des neurones ou de leurs sous-structures (axones dendrites, soma, synapses) sur long terme, sans affecter leur développement initial.

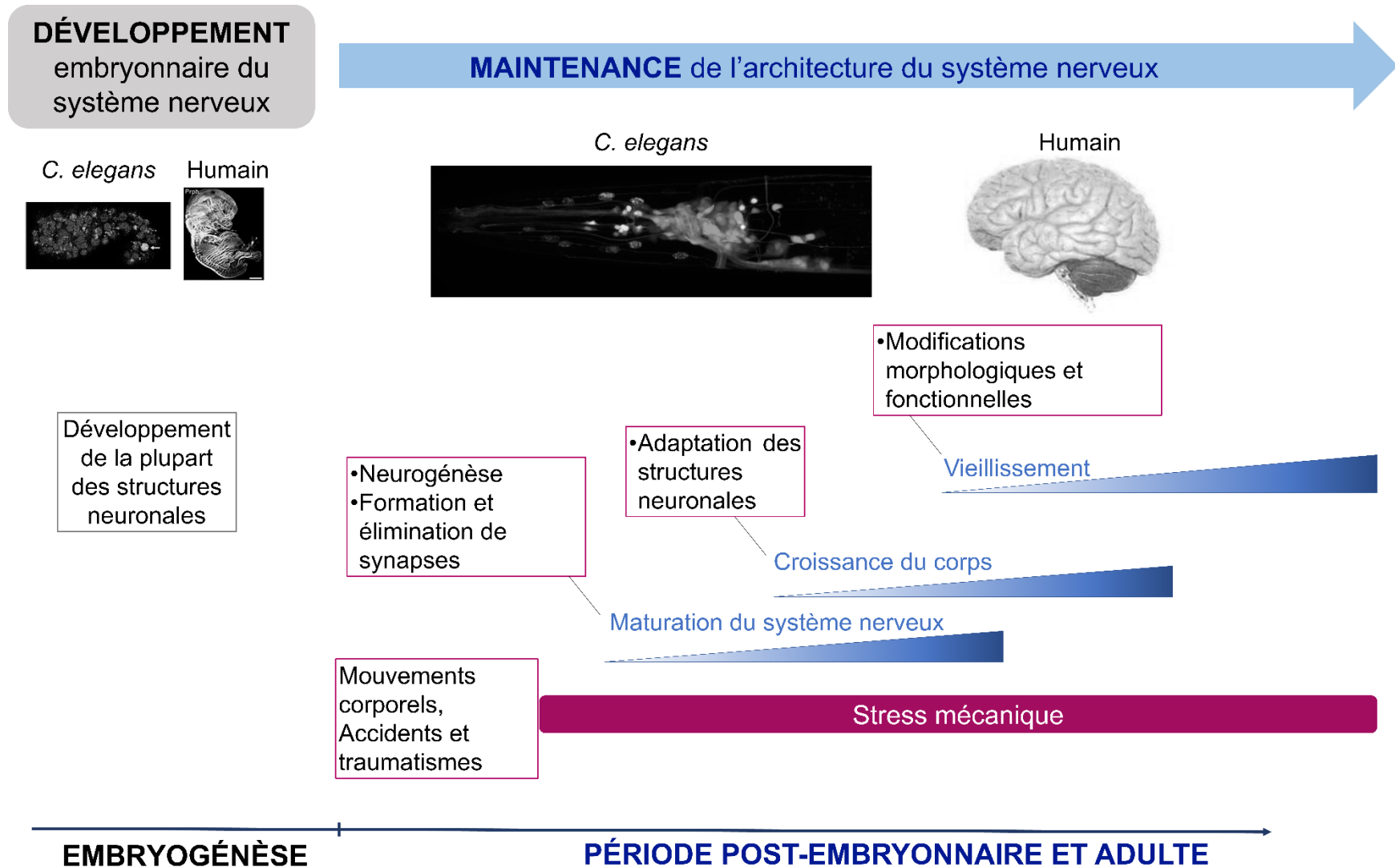


Figure 1.1 Représentation du concept de la maintenance neuronale.

Photos tirées de (Belle *et al.*, 2017; Bénard et Hobert, 2009) et de WormAtlas.org.

Mes travaux de recherche de thèse doctorale portent précisément sur les mécanismes assurant le maintien de l'organisation de regroupements neuronaux, tel que le positionnement de neurones dans des ganglions ou dans des faisceaux neuronaux du ver. Dans ma thèse, le terme de "maintenance neuronale" se réfère à la maintenance de l'architecture neuronale (et non pas au processus de survie neuronale ou de maintenance de l'identité cellulaire de neurones).

1.1.2 Importance de la maintenance de l'architecture du système nerveux face à des stress

L'organisation du cerveau, établie pendant l'embryogénèse et présente à la naissance, doit être maintenue malgré les changements morphologiques qui se produisent au cours de la croissance et de la maturation postnatales, ainsi que les effets des fluctuations de l'environnement sur le système nerveux (Bénard et Hobert, 2009). De plus, de nouveaux circuits neuronaux sont formés en phase postnatale afin d'assurer de nouvelles fonctions telles que la reproduction (Pujala et Koyama, 2019; Witvliet *et al.*, 2021), tandis que les circuits existants subissent des modifications sous l'influence de signaux externes (Van Horn et Ruthazer, 2019) permettant ainsi l'adaptation et l'apprentissage (Witvliet *et al.*, 2021). Ainsi, plusieurs défis et des sources de stress impactent le système nerveux tout au long de la vie postnatale. Les mécanismes de la maintenance neuronale agissent pour contrer ces stress, assurant ainsi la protection de l'organisation des structures neuronales et le bon fonctionnement des circuits neuronaux tout au long de la vie d'un organisme.

1.1.2.1 La maturation du système nerveux et la croissance corporelle

L'ensemble des structures du système nerveux se forme pendant l'embryogénèse, mais les neurones continuent de se développer et de se remodeler pendant la période postnatale en s'adaptant à la croissance du corps et à la complexité des comportements adultes (Mulcahy *et al.*, 2022; Witvliet *et al.*, 2021). La maturation neuronale est un processus clé du développement du système nerveux, au cours duquel les neurones acquièrent leurs caractéristiques morphologiques, moléculaires et électrophysiologiques nécessaires à leurs fonctions (He et Yu, 2018). De plus, au cours du développement postnatal, de nouveaux neurones sont ajoutés tandis que d'autres sont éliminés, modifiant ainsi des circuits fonctionnels tout en préservant certains circuits essentiels tels que ceux assurant la coordination sensorimotrice nécessaire pour la survie (Bénard et Hobert, 2009; Mulcahy *et al.*, 2022). Ainsi, chez l'humain, la maturation entraîne une augmentation significative du nombre de ramifications dendritiques et de connexions synaptiques, suivie d'une phase d'élagage dendritique et d'élimination des synapses, ne maintenant que celles qui sont actives (Bénard et Hobert, 2009).

Les recherches menées sur *C. elegans* ont montré que l'organisation globale du système nerveux est maintenue durant la maturation. En effet, la reconstruction volumétrique par microscopie électronique d'individus isogéniques de *C. elegans* a révélé des similitudes frappantes dans la topologie du cerveau à différents stades de développement (Witvliet *et al.*, 2021) (Figure 1.2). L'étude a démontré que le cerveau croît uniformément en taille sans modifier de manière significative la forme ou la position relative des neurites, maintenant ainsi sa topologie globale de la naissance à l'âge adulte. Par ailleurs, le nombre de synapses augmente proportionnellement à la longueur des neurites, ce qui permet de maintenir une densité synaptique stable. La comparaison des connectomes au cours de la maturation révèle des changements dans les circuits mais ceux-ci sont cohérents entre différents neurones. Ces modifications influencent la force des connexions existantes et génèrent de nouvelles connexions.

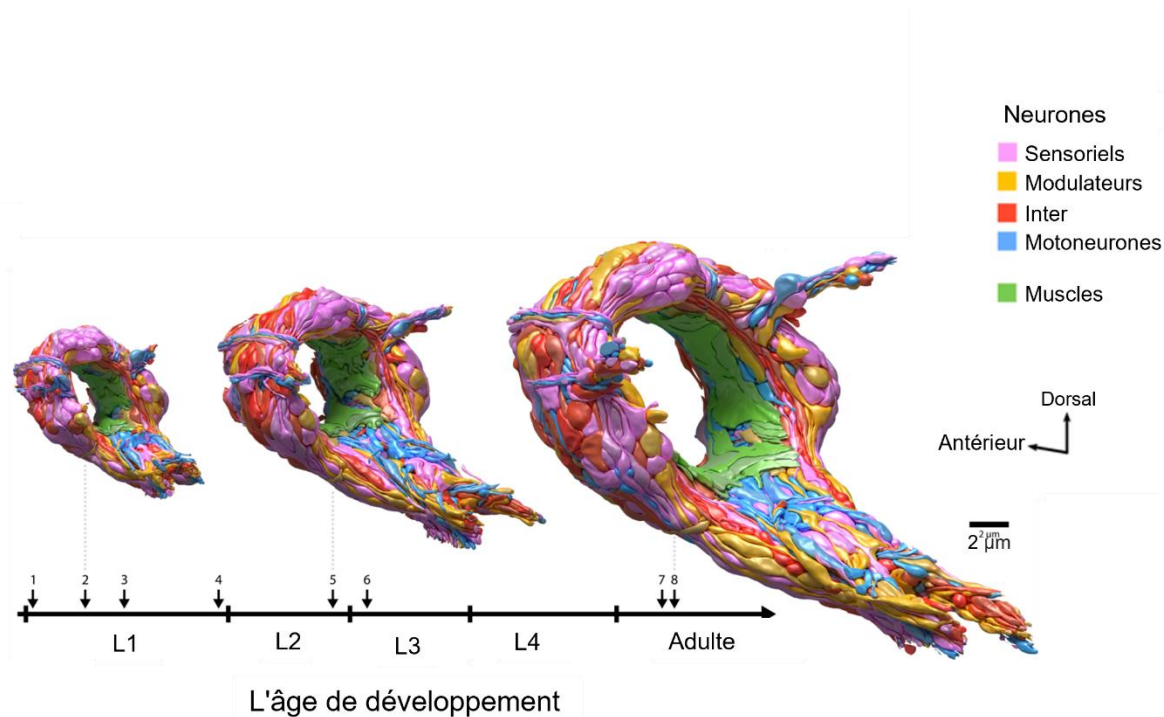


Figure 1.2 Le cerveau en développement maintient sa topologie.

Le cerveau en développement maintient sa topologie. Chronologie du développement de huit cerveaux de *C. elegans* reconstruits par microscopie électronique avec des modèles topologiques présentés en trois étapes. Les modèles comprennent toutes les cellules contenues dans le neuropile (anneau nerveux), colorées par types de cellules (Witvliet *et al.*, 2021).

1.1.2.2 Les autres facteurs agissant sur la morphologie du système nerveux

En plus de la maturation et de la croissance corporelle, des facteurs environnementaux tels que la teneur en oxygène et le stress mécanique, ainsi que des facteurs liés au processus du vieillissement, affectent le système nerveux.

Il a été rapporté par exemple que l'hypoxie cause des dommages aux neurones, appelés lésions hypoxiques, tandis qu'une forte teneur en oxygène entraîne une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène, causant des lésions oxydatives des neurones (Kim et Jin, 2015; Stevenson *et al.*, 2012). Chez *C. elegans*, l'hypoxie affecte le guidage axonal et la migration de certains neurones (Pocock et Hobert, 2008). Les faibles teneurs en oxygène peuvent entraîner des défauts tels que des axones en collier de perle, des axones courbés ou des lacunes axonales (Kim et Jin, 2015).

Les contraintes physiques auxquelles le système nerveux fait face tout au long de la vie constituent un autre facteur pouvant affecter la morphologie neuronale. L'ajout de nouveaux neurones aux circuits existants chez l'adulte pourrait déstabiliser ces circuits et imposer des adaptations et ajustements au système nerveux (Meltzer, Yabaluri et Deisseroth, 2005). Les neurones peuvent également être sollicités par les mouvements corporels, les contractions musculaires des organes et les blessures. Pour protéger le système nerveux contre ces contraintes mécaniques, les neurones utilisent, par exemple, des molécules d'adhésion cellulaire et des protéines du cytosquelette pour maintenir l'intégrité de l'architecture neuronale (Bénard et Hobert, 2009). Le stress mécanique constitue un facteur important déclenchant des défauts de maintenance neuronale (Bénard et Hobert, 2009; Bénard *et al.*, 2006; Pocock *et al.*, 2008).

Le vieillissement est également un facteur qui impacte la structure du système nerveux. De nombreuses études menées sur des modèles vertébrés et invertébrés ont mis en évidence des changements liés à l'âge concernant la structure et la fonction du cerveau (Koch, Nelson et Hartenstein, 2021). Bien que le vieillissement neuronal ne soit généralement pas associé à la mort cellulaire, les changements morphologiques liés à l'âge affectent souvent uniquement certains neurones de manière spécifique (Herndon *et al.*, 2002; Loerch *et al.*, 2008; Richard, Taylor et Greer, 2010). Le vieillissement neuronal se caractérise par une détérioration progressive de la structure et de la fonction du système nerveux. Des études chez *C. elegans* ont révélé des changements morphologiques liées à l'âge, touchant par exemple les neurones mécanosensoriels et les motoneurones GABAergiques (Chen *et al.*, 2013; Khandekar, 2015; Pan *et al.*, 2011; Tank, Rodgers et Kenyon, 2011; Toth *et al.*, 2012). Ces changements incluent des

altérations dans les ramifications des neurites et des dendrites (Cohn *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020b; Kravtsov, Oren-Suissa et Podbilewicz, 2017; Toth *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2019), des formes anormales des axones (axones en perle, varicosités axonales : gonflements axonaux et excroissances), ainsi que des altérations des somas (excroissances et réduction de taille) (Hess *et al.*, 2019; Khandekar, 2015; Melentijevic *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2011; Tank, Rodgers et Kenyon, 2011; Toth *et al.*, 2012), ainsi que des défauts de fasciculation des faisceaux axonaux (Khandekar, 2015; Pan *et al.*, 2011).

Des changements dans l'ultrastructure synaptique font aussi partie des changements neuronaux liés à l'âge (Herndon *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2016). Par exemple, chez *C. elegans*, les synapses de l'anneau nerveux montrent une diminution de la densité des vésicules synaptiques ainsi qu'une diminution du nombre et de la taille des contacts synaptiques avec l'âge (Chen *et al.*, 2013; Toth *et al.*, 2012). Le déclin de l'organisation synaptique avec l'âge a été également observé chez d'autres organismes, comme la drosophile et certains mammifères (Beramendi *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2003; Hof et Morrison, 2004; Morrison et Baxter, 2012; Page *et al.*, 2002; Stein et Murphy, 2012; Valdez *et al.*, 2010). Ces changements morphologiques neuronaux liés à l'âge, même subtils, pourraient affecter l'intégrité des circuits neuronaux et sont souvent associés à un déclin de l'activité neuronale (Cohn *et al.*, 2020; Kravtsov, Oren-Suissa et Podbilewicz, 2017; Pan *et al.*, 2011; Tank, Rodgers et Kenyon, 2011; Toth *et al.*, 2012). Des mécanismes actifs de maintenance pourraient donc prévenir ou retarder l'apparition des altérations neuronales liées l'âge.

1.1.3 *Caenorhabditis elegans*, un modèle d'étude de la maintenance neuronale

1.1.3.1 Description, avantages et cycle de vie

1.1.3.1.1 Description et avantages

Le ver *C. elegans* est un nématode non parasitaire, largement utilisé comme organisme modèle dans divers domaines de la biologie. Brenner et ses collaborateurs ont mis au point les fondements de la recherche sur *C. elegans* en étudiant sa génétique et en décrivant son lignage cellulaire complet et invariable de 959 cellules somatiques chez l'hermaphrodite (Sulston et Horvitz, 1977; Sulston *et al.*, 1983). Ils ont aussi notamment reconstitué en entier son système nerveux à partir de coupes sériées et d'observations en microscopie électronique (White *et al.*, 1986). Sa facilité de manipulation, de culture et de conservation (par congélation à -80°C) en fait un modèle de choix pour la recherche. Dans son milieu naturel, *C. elegans*

se nourrit de bactéries, alors qu'en laboratoire, il est cultivé sur des plaques d'agarose contenant *Escherichia coli*, des sels et du cholestérol.

Les avantages d'utiliser *C. elegans* incluent sa transparence, ce qui permet des études microscopiques *in vivo* et avec une résolution unicellulaire, sa capacité à produire un grand nombre de progéniture par cycle, et sa simplicité anatomique, avec un nombre constant de cellules somatiques formant les principaux tissus (muscles, épiderme, neurones, pharynx, intestin, et gonade; Figure 1.3) (Corsi, Wightman et Chalfie, 2015). Par ailleurs, le cycle de vie bien caractérisé de *C. elegans* ainsi que le séquençage complet de son génome (Consortium, 1998) ont offert une première vision globale du paysage génomique d'un métazoaire, ce qui représente d'autres atouts majeurs de cet organisme modèle.

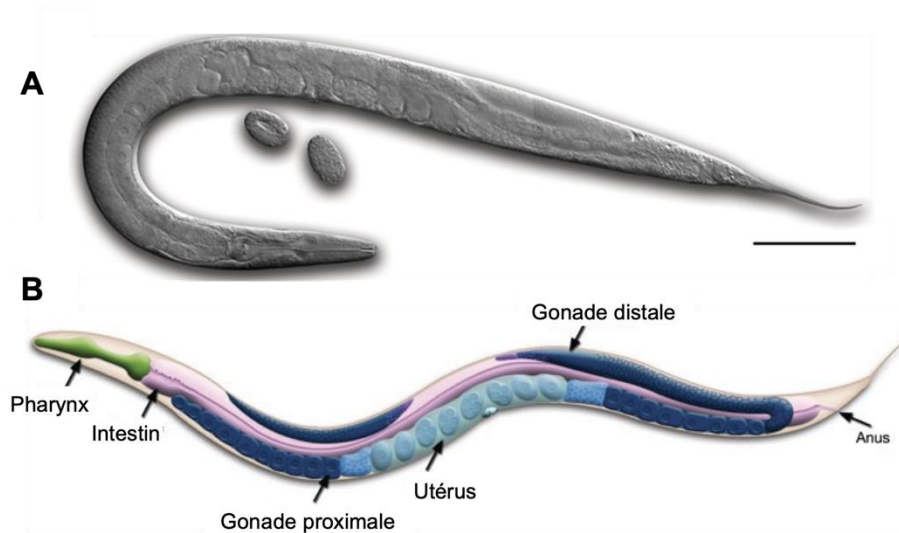


Figure 1.3 Anatomie d'une hermaphrodite adulte.

(A) Image à contraste interférentiel différentiel (CID ou Nomarski) d'une hermaphrodite adulte, côté latéral gauche. Barre d'échelle, 0,1 mm. (B) Dessin schématique des structures anatomiques, côté latéral gauche. Image tirée de WormAtlas.org.

Au fil des années, de nombreuses découvertes ont renforcé l'utilisation de *C. elegans* en tant qu'organisme modèle. Une avancée importante a été la génération d'animaux transgéniques, développée en 1991 (Mello *et al.*, 1991). En 1994, la technologie de rapporteurs GFP, introduite par Martin Chalfie, a permis la visualisation des patrons d'expression génique ainsi que la localisation des protéines *in vivo* (Chalfie *et al.*, 1994). En 1998, la découverte de l'interférence par l'ARN double brin (ARNi) (Fire *et al.*, 1998) a ouvert la voie à la déplétion de gènes spécifiques et au niveau de tissus précis (Qadota *et al.*, 2007), ce qui a facilité

les criblages génétiques à grande échelle. D'autres techniques, permettant un contrôle temporel et spatial de l'expression des gènes, ont été développées chez *C. elegans* telles que le système de choc thermique (Bacaj et Shaham, 2007), le système CRISPR/Cas9 somatique (Cheng *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2014), le système de dégradation protéique induite par l'auxine (Zhang *et al.*, 2015), et bien d'autres (Cho *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2012).

Environ 40 % des gènes de *C. elegans* sont des orthologues de gènes humains, avec plus de 80 % d'orthologues pour les gènes impliqués dans les voies de signalisation (Shaye et Greenwald, 2011). Cela ouvre des perspectives énormes et pertinentes pour utiliser *C. elegans* dans l'étude de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Markaki et Tavernarakis, 2020; Roussos *et al.*, 2023).

1.1.3.1.2 Cycle de vie

C. elegans existe sous deux formes sexuées: hermaphrodite et mâle. L'hermaphrodite peut s'autoféconder et produire environ 300 descendants dans un cycle de reproduction, ce qui lui permet de générer une descendance même s'ils sont incapables de se déplacer et de s'accoupler sous l'effet de certaines mutations. Des mâles peuvent apparaître spontanément par la perte d'un chromosome X, puis sont produits lors de croisements, et se distinguent des hermaphrodites par la forme de leur queue et par leur comportement. Le cycle de vie de *C. elegans*, allant d'un œuf à un œuf, prend environ 3,5 jours à température ambiante en laboratoire. La ponte aura lieu à environ 2 heures après fertilisation. Le ver éclot de l'œuf en larve L1 (environ 12 heures après la ponte de l'œuf), qui se développe ensuite et muera en une larve L2, puis en une larve L3, puis L4 (Figure 1.4A). La dernière mue permet le passage du stade L4 à une hermaphrodite adulte de 1 mm de long, capable à pondre ses propres œufs après environ 12 heures de vie adulte. En cas de conditions défavorables, telles que le surpeuplement et le manque de nourriture, les vers L2 peuvent muer en un stade distinct appelé larve "dauer" capable de survivre pendant des mois (Cassada et Russell, 1975) (Figure 1.4B). En conditions favorables, les dauers récupèrent rapidement et passent aux stades post-dauer L3/L4 pour devenir des adultes reproducteurs avec une durée de vie normale.

1.1.3.2 Un modèle pour l'étude du système nerveux

Le séquençage du génome de *C. elegans* en 1998 a mis en évidence le haut degré de conservation moléculaire entre le système nerveux d'un nématode et celui des vertébrés (Bargmann, 1998; Consortium*, 1998). Le système nerveux de *C. elegans* est constitué de seulement 302 neurones et 56

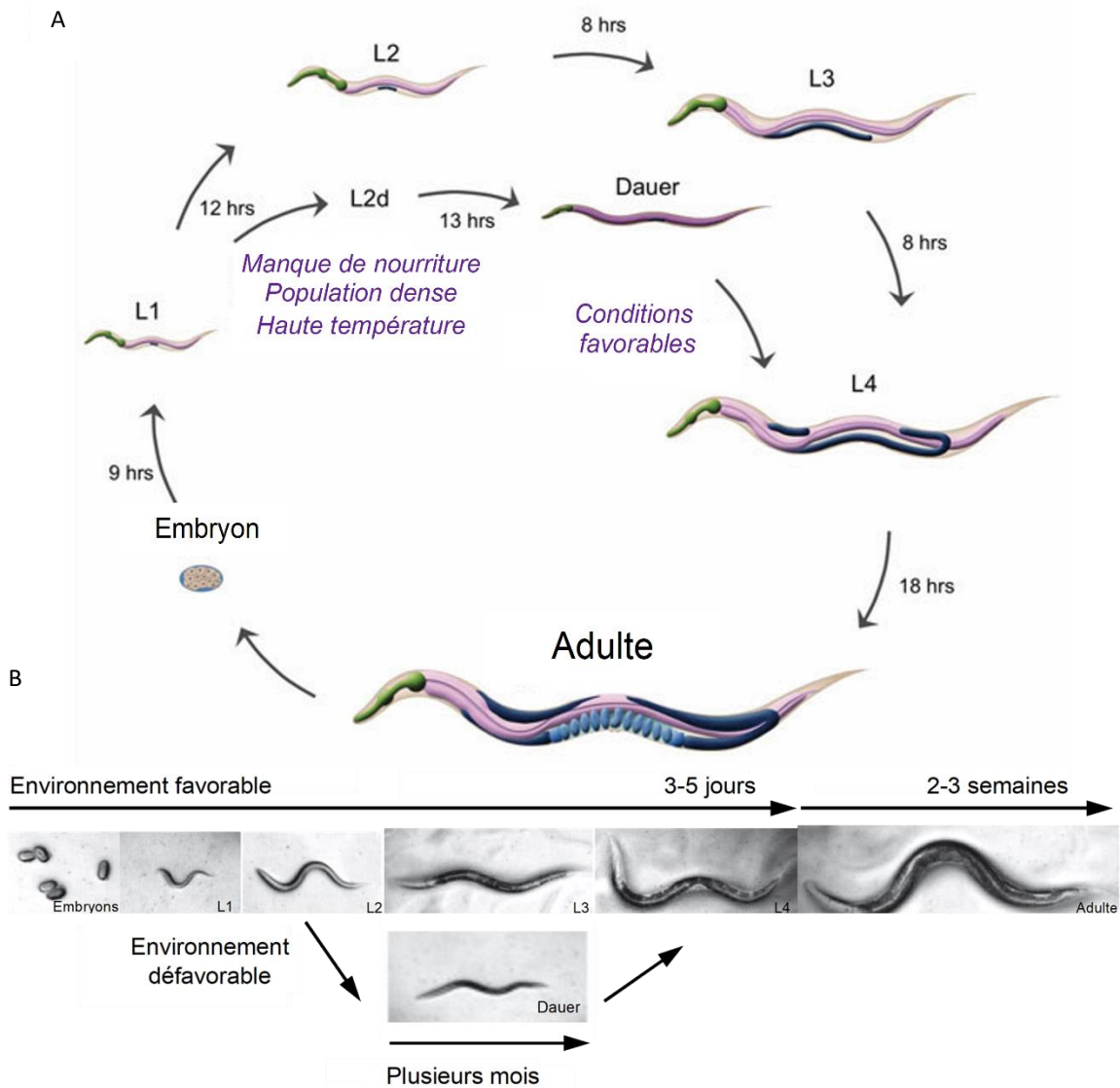
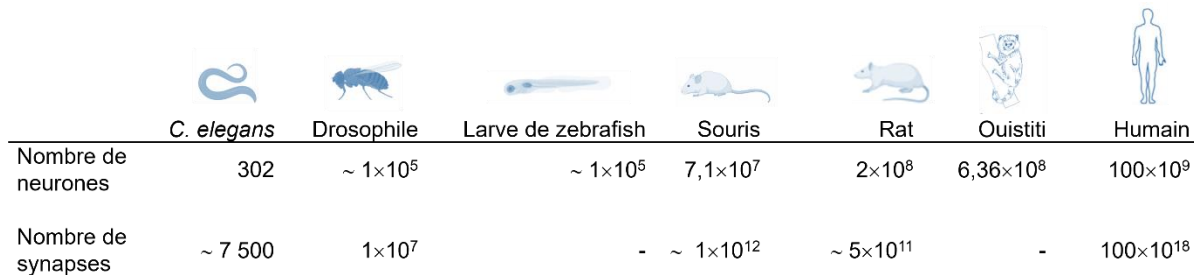


Figure 1.4 Le cycle de vie de *C. elegans*.

(A) Cycle de vie. (B) Images à contraste interférentiel différentiel des différents stades de développement de *C. elegans*. Adapté de (Fielenbach et Antebi, 2008; Herndon *et al.*, 2017).

cellules gliales chez l'hermaphrodite, ce qui le rend bien plus simple que ceux d'autres organismes modèles (Figure 1.5).

La structure et la connectivité neuronales de *C. elegans* demeurent remarquablement stables d'un individu à l'autre, et font de ce ver un modèle particulièrement adapté à l'étude de la neurobiologie. Son réseau connectif présente une grande reproductibilité, bien que certaines variations individuelles puissent exister dans le nombre de connexions formées entre les partenaires neuronaux. De plus, de profondes altérations



	 <i>C. elegans</i>	 Drosophile	 Larve de zebrafish	 Souris	 Rat	 Ouistiti	 Humain
Nombre de neurones	302	$\sim 1 \times 10^5$	$\sim 1 \times 10^5$	$7,1 \times 10^7$	2×10^8	$6,36 \times 10^8$	100×10^9
Nombre de synapses	$\sim 7\,500$	1×10^7	-	$\sim 1 \times 10^{12}$	$\sim 5 \times 10^{11}$	-	100×10^{18}

Figure 1.5 Aperçu des valeurs numériques du nombre de neurones et de synapses dans le système nerveux des organismes modèles utilisés en neuroscience.

Adapté de (Bénard et Hobert, 2009; Weisenburger et Vaziri, 2018).

du système nerveux ne sont généralement pas incompatibles avec le développement de *C. elegans* en conditions de laboratoire.

Des recherches ont permis d'identifier des neurones spécifiques qui sont impliqués dans plusieurs comportements du ver, ce qui a conduit à l'élaboration de son connectome fonctionnel. Ce schéma de circuits neuronaux est décrit dans *The Mind of the Worm* (White JG, 1986), et constitue une ressource précieuse pour l'analyse des circuits comportementaux. Grâce à une cartographie détaillée de son système nerveux, *C. elegans* représente un modèle solide pour les études actuelles sur la spécification, le développement, la fonction et l'analyse de son connectome (Meneely, Dahlberg et Rose, 2019).

Les neurones de *C. elegans* sont organisés en ganglions, cordes nerveuses et fascicules bien distincts. La majorité des ganglions neuronaux sont regroupés dans la tête, où se trouve également l'anneau nerveux, l'équivalent du cerveau du ver. La corde nerveuse ventrale, qui s'étend sur le côté ventral, contient des neurones moteurs et des interneurones (Figure 1.6). La majorité des 302 neurones du ver sont organisés en ganglions dans la tête et la queue, ainsi que dans la corde nerveuse ventrale (Figure 1.6).

1.1.4 La maintenance de l'architecture des différentes structures du système nerveux chez *C. elegans*

La notion de maintenance de l'architecture neuronale se réfère à la préservation de l'organisation globale et des positions relatives des différents composants du système nerveux. Des analyses génétiques ont montré que des mécanismes actifs assurent cette organisation et peuvent être distincts de ceux qui régulent le développement initial de ces structures (Aurelio, Hall et Hobert, 2002; Bénard *et al.*, 2009; Bénard *et al.*, 2006; Bülow, Boulin et Hobert, 2004; Desse *et al.*, 2021; Johnson et Kramer, 2012; Pocock *et al.*, 2008; Sasakura *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Zallen, Kirch et Bargmann, 1999; Zhou et Chen, 2011).

Ces mécanismes assurent que les axones contenus dans les fascicules ainsi que les somas ou corps neuronaux localisés dans les ganglions conservent leur position initialement établie lors du développement.

Les structures neuronales, telles que les ganglions et les faisceaux d'axones, sont entourées par une membrane basale (MB) et sont localisées à proximité d'autres types cellulaires ou tissus tels que l'épiderme et les muscles (Figure 1.7) (Bénard et Hobert, 2009; White *et al.*, 1986).

1.1.4.1 Maintenance de l'organisation des ganglions de la tête

Certains mutants de maintenance de l'architecture neuronale présentent des défauts dans l'organisation de certains neurones situés dans les ganglions de la tête à partir du stade larvaire L3/L4. Par exemple, les corps cellulaires des neurones chimiosensoriels ASH et ASI, formés entièrement pendant l'embryogenèse, se positionnent postérieurement à l'anneau nerveux chez le type sauvage (Figure 1.8). Chez les mutants de maintenance, l'organisation de ces neurones est initialement normale mais, à partir du stade larvaire L3/L4, ces neurones deviennent désorganisés (Figures 1.8 et 1.9).

Les défauts de maintenance se traduisent par un déplacement postérieur de l'anneau nerveux ainsi que par un positionnement anormal d'un ou plusieurs corps cellulaires qui atteignent des positions antérieures à l'anneau nerveux ou le chevauchant (Figure 1.8 et 1.9). Ces défauts s'aggravent progressivement avec l'âge. De plus, ils sont dépendants de la locomotion puisque la paralysie, induite par manipulation génétique ou par traitement pharmacologique, permet la suppression des défauts de maintenance (Aurelio, Hall et Hobert, 2002; Bénard *et al.*, 2009). Ainsi, les stress mécaniques générées par le mouvement du corps, des organes (pompage du pharynx, mouvement de la tête) et par certains processus biologiques (contractions du corps en lien avec la ponte d'œufs et la défécation) impactent le système nerveux du ver et ces gènes de maintenance agissent en protégeant le système nerveux, entre autres, du stress mécanique.

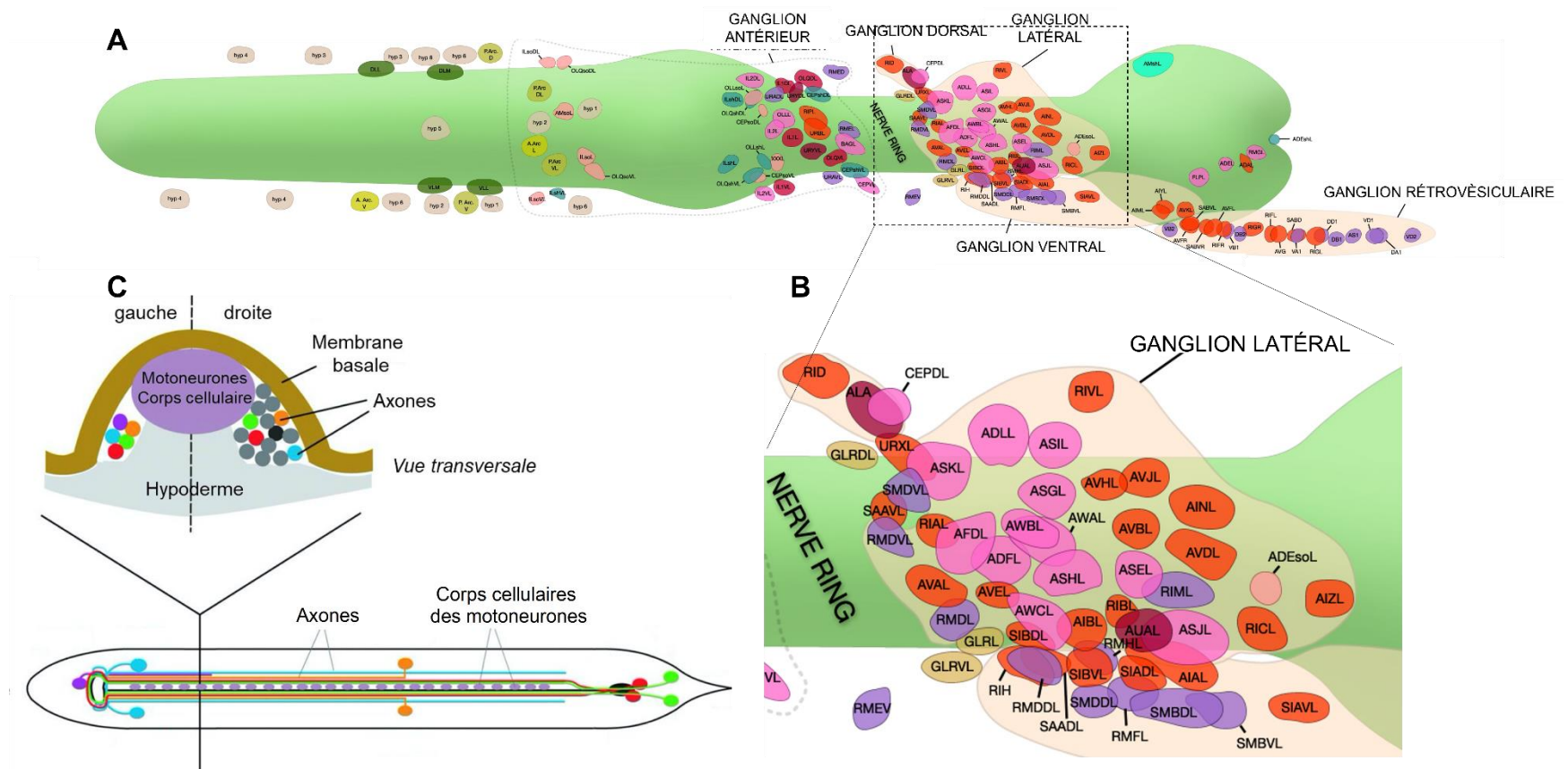


Figure 1.6 Organisation des structures neuronales (ganglions et axones) dans la tête et la corde ventrale.

(A) Organisation en ganglions des neurones dans la tête. (B) Agrandissement du ganglion latéral où se situent les deux paires de neurones chimiosensoriels ASH et ASI. (C) Vue d'ensemble de la corde nerveuse ventrale chez *C. elegans* chez le type sauvage. Tiré et adapté de de WormAtlas.org (A, B) et de (Bénard *et al.*, 2009) (C).

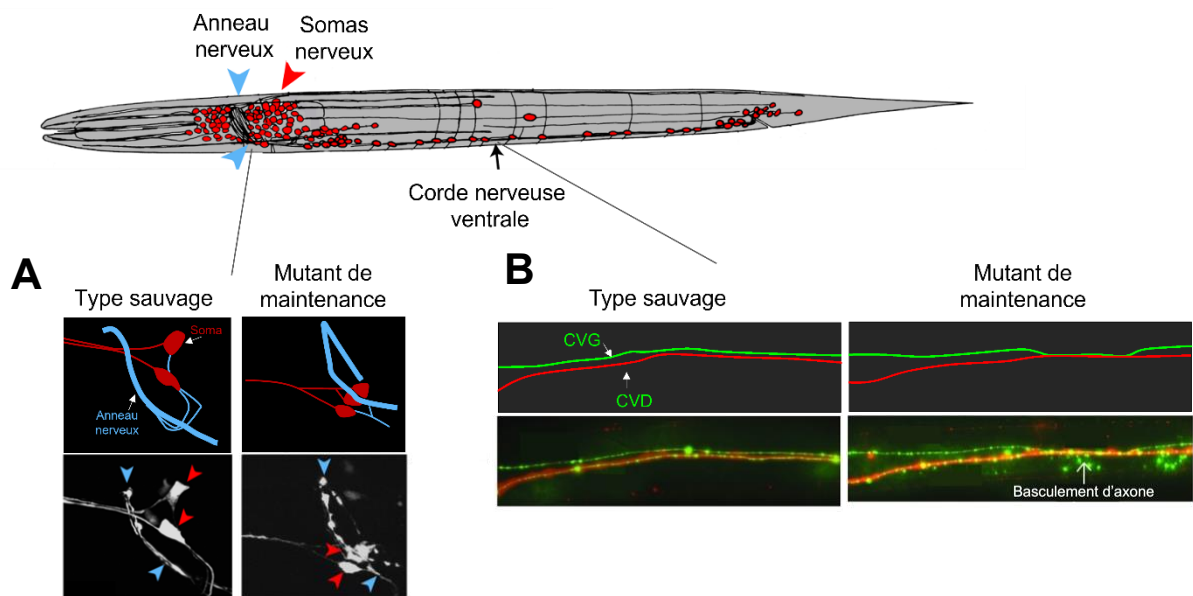


Figure 1.7 Analyse des défauts neuronaux de maintenance des ganglions neuronaux et des axones.

(A) Déplacements des corps cellulaires de neurones ASI et ASH observés chez les mutants adultes. Les pointes de flèches bleues indiquent la position de l'anneau nerveux, alors que les pointes de flèches rouges indiquent la position du soma neuronal, qui est examiné par rapport à la position de l'anneau nerveux (type sauvage : postérieur par rapport à l'anneau nerveux ; mutant : chevauchant l'anneau nerveux ou antérieur à celui-ci). (B) Les basculements axonaux au niveau de la corde ventrale sont des défauts tout ou rien, évalués en co-marquant l'ensemble du fascicule de la corde nerveuse ventrale gauche (CVG) et droite (CVD) avec un marqueur pan neuronal RFP (*otIs173*) et les neurones PVQ avec un marqueur GFP (*oyIs14*). Les animaux jeunes adultes sont montrés dans ces images. Adapté de (Bénard *et al.*, 2009; Bénard *et al.*, 2012).

1.1.4.2 Maintenance de la position des axones

Chez *C. elegans*, des gènes de maintenance neuronale sont nécessaires également pour préserver la position post-embryonnaire des axones dans la corde nerveuse ventrale (Bénard et Hobert, 2009). À l'éclosion, la larve L1 ne contient que quelques axones dans la corde ventrale gauche et de nombreux axones dans la corde ventrale droite, et ces deux cordes sont séparées par une ligne médiane composée de corps cellulaires de neurones moteurs et par une invagination épidermique, qui sera par la suite appelée crête épidermique (aux stades larvaires suivants et à l'âge adulte) (Figures 1.7C et 1.8). Chez les mutants de maintenance neuronale, des axones qui se développent normalement chez l'embryon et ont une position normale au début du stade L1, seront déplacés peu de temps après sous l'effet des mouvements de l'animal (Bénard et Hobert, 2009). Les gènes *zig-3*, *zig-4*, *dig-1* et *sax-7* jouent un rôle dans la maintenance de la position des axones dans la corde ventrale de *C. elegans* (Aurelio, Hall et Hobert, 2002; Bénard *et al.*, 2009; Bénard *et al.*, 2006).

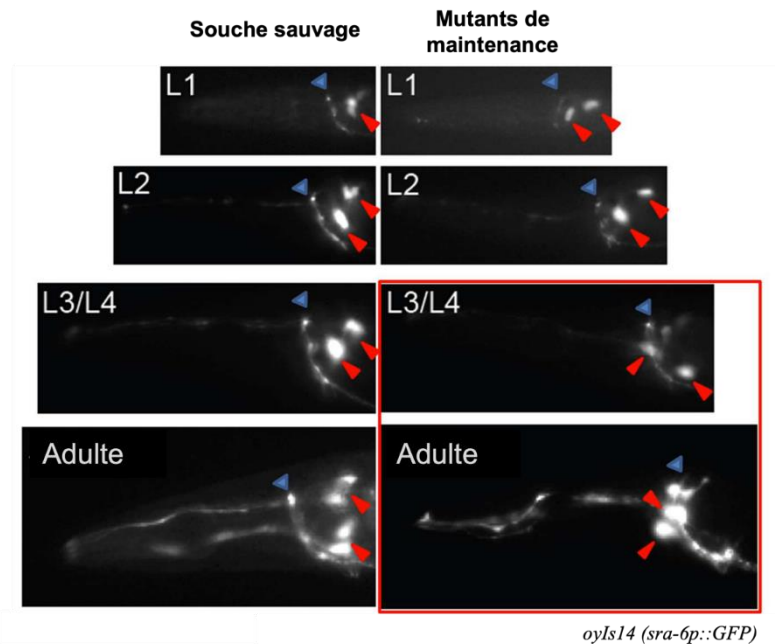


Figure 1.8 Exemple de défauts de maintenance dans les ganglions de la tête.

Chez les vers de type sauvage, les somas de deux classes de neurones chimiosensoriels de la tête (ASH et ASI, indiqués par les flèches rouges) sont situés postérieurement à l'anneau nerveux (indiqué par une pointe de flèche bleue). L'architecture des neurones chimiosensoriels se développe pendant l'embryogenèse et persiste tout au long de la vie. Chez les mutants de maintenance tels que *sax-7*, ces neurones se développent initialement normalement puis des défauts de positionnement de somas commencent à apparaître tardivement aux stades larvaires L3/L4 et progressent chez les adultes. Image tirée de (Bénard *et al.*, 2012).

1.1.4.3 Maintenance de la position des synapses

L'architecture des circuits neuronaux nécessite également le maintien des contacts synaptiques. L'étude de la maintenance synaptique porte sur la stabilité, la distribution et la densité synaptique (Cherra et Jin, 2016; Heckman et Doe, 2021; Shao *et al.*, 2013). La distribution synaptique, qui est essentielle pour le maintien de l'architecture du circuit dérivé de l'embryon, nécessite à la fois le maintien des contacts synaptiques et la prévention de la formation de contacts inappropriés. Les défauts retrouvés chez des mutants de maintenance incluent le changement dans la distribution synaptique qui se traduit par l'apparition de contacts synaptiques inappropriés, la surcroissance des synapses et l'apparition de protrusions (synapses ectopiques) (Kurshan *et al.*, 2014; Qin, Liang et Ding, 2014). Ainsi, il a été démontré que des molécules comme CIMA-1, un transporteur de soluté de la famille SLC17, en modulant l'interaction épiderme-glie, via le FGFR, inhibe la formation de synapses ectopiques et maintenant ainsi la distribution présynaptique des neurones AIY (Shao *et al.*, 2013).

1.1.5 Les molécules de la maintenance de l'architecture du système nerveux chez *C. elegans*

Une combinaison de cribles pour des mutants présentant des défauts de morphologie neuronale lors de stades larvaires tardifs ou adultes (mais pas immédiatement après l'embryogenèse), ainsi que les approches par gènes candidats, ont permis l'isolement d'un certain nombre de gènes qui maintiennent l'architecture du système nerveux (Bénard et Hobert, 2009). Les phénotypes mutants des gènes de maintenance neuronale concernent la position post-développementale des axones dans les fascicules, la position des somas dans les ganglions et de l'anneau nerveux, ou la morphologie synaptique. Un mutant de maintenance pourrait manifester un ou plusieurs de ces phénotypes post-développementaux. Certaines des molécules de maintenance ont également des rôles dans le développement dans d'autres contextes cellulaires (Diaz-Balzac *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2013; Tavakoli *et al.*, 2023; Yip et Heiman, 2018).

1.1.5.1 La famille des immunoglobulines

Les génomes des vertébrés et des invertébrés contiennent des gènes codant pour des protéines sécrétées ou transmembranaires de la famille des Ig, dont la majorité est exprimée dans le système nerveux (Bénard et Hobert, 2009; Rougon et Hobert, 2003; Walmod *et al.*, 2007).

Les molécules d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines (IgCAM) s'engagent dans une variété d'interactions pour affecter le développement et l'intégrité des tissus (Pocock *et al.*, 2008). La plupart des IgCAM sont exprimées dans les neurones et forment une grande famille diversifiée de molécules d'adhésion dans le système nerveux (Schwarz *et al.*, 2009). La superfamille des IgCAM est impliquée dans le développement et le fonctionnement du système nerveux en jouant un rôle dans le guidage et la fasciculation des axones, la synaptogénèse et la régulation de l'activité synaptique (Moseley-Alldredge *et al.*, 2022). Certaines molécules avec des domaines Ig, isolées chez *C. elegans*, sont également impliquées dans les mécanismes de la maintenance neuronale telles que les molécules SAX-7/L1CAM, DIG-1 et des protéines de la famille des ZIG.

1.1.5.1.1 Les protéines de la famille des ZIG

Chez *C. elegans*, 13 gènes codent pour de petites protéines ZIG (Zwei IG domain protein) contenant deux domaines Ig (Figure 1.10). La plupart de ces molécules ne contiennent pas des domaines transmembranaires et sont prédites d'être des molécules sécrétées possiblement à partir du neurone unilatéral dans la corde nerveuse qui s'appelle PVT (Aurelio, Hall et Hobert, 2002). Certains mutants *zig*

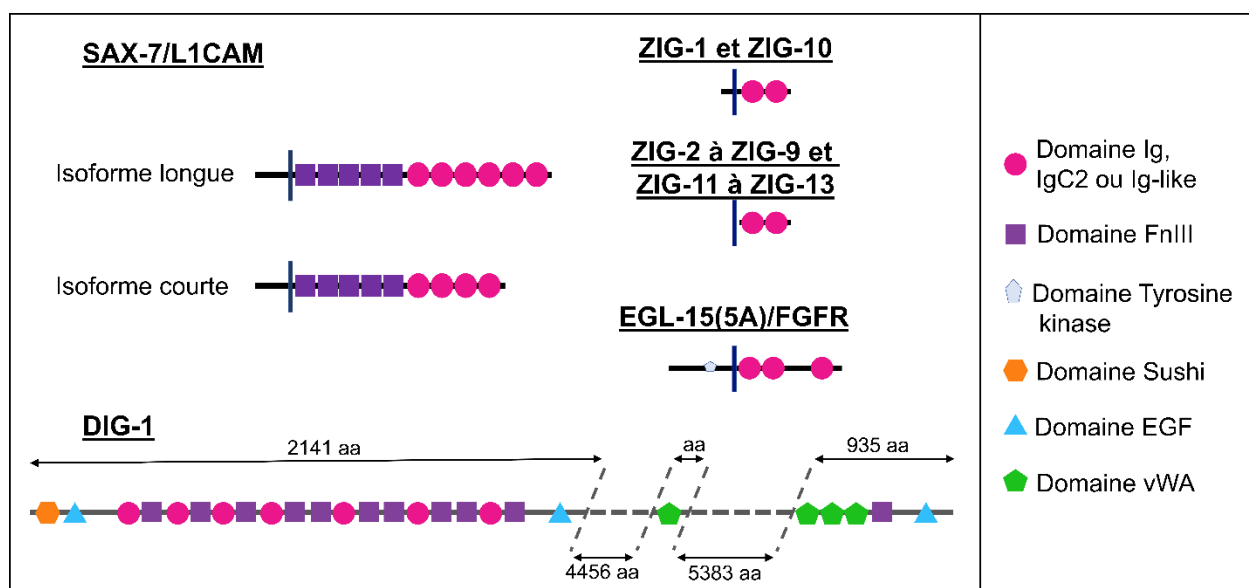


Figure 1.9 Les molécules de la maintenance neuronale de la famille des immunoglobulines.

Adapté de (Bénard et Hobert, 2009).

tels que *zig-3* et *zig-4* développent des défauts de maintenance des axones de la corde nerveuse ventrale (Aurelio, Hall et Hobert, 2002; Bénard *et al.*, 2009).

Une autre molécule à deux domaines Ig, ZIG-10, intervient dans la maintenance synaptique de façon très spécifique en régulant la densité des synapses cholinergiques (Cherra et Jin, 2016). La perte de *zig-10* entraîne une augmentation du nombre de synapses à la jonction neuromusculaire. ZIG-10 médie une interaction entre l'épiderme et les neurones cholinergiques pour permettre la phagocytose du matériel synaptique cholinergique par l'épiderme (Cherra III *et al.*, 2020; Cherra et Jin, 2016). Ainsi, il a été proposé que ZIG-10, se localisant à la surface cellulaire et aux régions entourant les synapses, agirait en obstruant les interactions entre les neurones pré-synaptiques et le muscle post-synaptique (Cherra et Jin, 2016).

1.1.5.1.2 La protéine DIG-1

DIG-1 est une énorme protéine sécrétée spécifique au vers (Figure 1.10). Les mutants *dig-1* présentent des défauts de maintenance de la position des axones dans les fascicules et de la position relative des corps cellulaires dans les ganglions de la tête (Bénard *et al.*, 2006). Il a été suggéré que la grande taille de la protéine DIG-1 serait suffisante pour servir de pont entre les neurones et les cellules musculaires en agissant comme pont intercellulaire au sein de la MEC (Bénard *et al.*, 2006). La protéine contient des domaines impliqués dans l'adhésion cellulaire et l'interaction cellule-cellule suggérant que DIG-1 pourrait

faire un pont entre la MEC et les neurones à une extrémité de la protéine, puis avec les surfaces des cellules musculaires et/ou épidermiques à l'autre extrémité. DIG-1 peut de ce fait être considérée comme une protéine d'échafaudage qui maintient l'organisation neuronale (Bénard *et al.*, 2006; Chong *et al.*, 2021).

1.1.5.1.3 La protéine EGL-15(5A)

Le gène *egl-15* est l'orthologue du récepteur FGF (Fibroblast Growth Factor) chez *C. elegans* et appartient à une famille de récepteurs à activité tyrosine kinase (Bülow, Boulin et Hobert, 2004). EGL-15 porte trois domaines Ig sur sa partie extracellulaire (Figure 1.10). Une forme d'épissage spécifique du récepteur appelée EGL-15(5A) est requise dans l'épiderme pour le maintien de la position des axones chez le ver (Bülow, Boulin et Hobert, 2004). Les mutants *egl-15(5A)* n'affectent qu'un nombre restreint d'axones dans la corde nerveuse ventrale. La fonction de EGL-15 dans la maintenance de la position axonale est indépendante de sa fonction dans la signalisation, puisque ses ligands FGF apparentés et son domaine kinase intracellulaire ne sont pas nécessaires pour son rôle dans la maintenance neuronale (Bénard et Hobert, 2009; Bülow, Boulin et Hobert, 2004). Récemment, EGL-15(5A), exprimée dans les cellules épidermiques, est impliquée dans le positionnement de la glie et des synapses pendant la croissance (Fan *et al.*, 2020; Shao *et al.*, 2013). Il a été proposé que l'adhésion entre l'épiderme et les cellules gliales est modulée positivement par EGL-15/FGFR (Fan *et al.*, 2020).

1.1.5.1.4 La molécule d'adhésion SAX-7/L1CAM

1.1.5.1.4.1 Généralités sur les L1CAM des vertébrés

Les membres de la famille L1CAM sont des protéines transmembranaires de la famille d'IgCAM neuronales hautement conservées chez les métazoaires, tels que les vertébrés, la drosophile et *C. elegans* (Moseley-Alldredge *et al.*, 2022). Plusieurs membres de la famille L1 ont été caractérisés chez les vertébrés incluant L1, CHL1, NrCAM et neurofascine qui sont fortement exprimés dans le système nerveux périphérique et central (Chen et Zhou, 2010; Hortsch, 2000; Pocock *et al.*, 2008). Les membres de la famille L1CAM des vertébrés et des invertébrés sont impliqués dans de nombreux aspects du développement, de la maintenance, et du fonctionnement du système nerveux (Brümmendorf, Kenwrick et Rathjen, 1998; Brümmendorf et Rathjen, 1996; Chen, Ong et Bennett, 2001; Godenschwege *et al.*, 2006; Hortsch, 2000; Pocock *et al.*, 2008; Rougon et Hobert, 2003; Sasakura *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005).

Plusieurs rôles conservés ont été établis entre les membres de la famille L1CAM des vertébrés et des invertébrés incluant le guidage axonal, la morphogenèse des dendrites, la myélinisation, la fasciculation

ainsi que la synaptogenèse (Chen et Zhou, 2010; Cohen *et al.*, 1998; Hortsch, Nagaraj et Mualla, 2014; Montag-Sallaz, Schachner et Montag, 2002; Rolf *et al.*, 2002; Sundararajan, Stern et Miller III, 2019). De plus, la molécule L1CAM améliore la survie neuronale, stimule la régénération axonale et améliore le comportement (Schäfer et Frotscher, 2012). Par conséquent, des mutations dans les gènes humains codant pour les IgCAM sont fortement impliquées dans une variété de troubles neurologiques de développement. Par exemple, chez l'humain, les mutations de L1 entraînent un large éventail d'anomalies neurologiques telles que un trouble caractérisé par un retard mental (syndrome Masa), une hydrocéphalie, une agénésie du corps calleux et atrophie du nerf optique, l'hydrocéphalie liée à l'X, la paraplégie spastique compliquée liée à l'X de type I et les pouces en adduction (Camp *et al.*, 1993; Fransen *et al.*, 1997; Hortsch, Nagaraj et Mualla, 2014; Jouet *et al.*, 1994; Kenwrick et Doherty, 1998; Kenwrick, Watkins et Angelis, 2000; Nagaraj, Mualla et Hortsch, 2013; Rosenthal, Jouet et Kenwrick, 1992; Uyemura *et al.*, 1994). De plus, un dysfonctionnement de L1 est associé à des troubles du spectre de l'autisme, à la schizophrénie et à des troubles de comportement (Fransen *et al.*, 1998; Moy *et al.*, 2009; Sakurai *et al.*, 2002; Sakurai *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2015).

La fonction de maintenance neuronale semble être conservée en allant des invertébrés aux vertébrés. En effet, la perte conditionnelle de L1CAM spécifiquement dans le cerveau de la souris adulte est associée à des déficits dans les comportements exploratoires et anxieux, ainsi qu'à une altération de l'apprentissage (Law *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent que L1CAM impacte des mécanismes impliqués dans l'apprentissage et dans certains comportements du cerveau adulte.

1.1.5.1.4.2 SAX-7/L1CAM de *C. elegans*

C. elegans code pour deux orthologues de L1CAM : LAD-2 et SAX-7. Chaque gène présente un profil d'expression distinct : l'expression de *lad-2* est restreinte à un sous-ensemble de neurones, tandis que *sax-7* est largement exprimé dans presque toutes les cellules dès le stade embryonnaire à deux cellules jusqu'à l'adulte (Aurelio, Hall et Hobert, 2002; Chen, Ong et Bennett, 2001; Sasakura *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). *lad-2* joue un rôle dans le guidage axonal et la migration axonale des neurones SMD pendant le développement (Wang *et al.*, 2008b). *sax-7* est le gène qui a été le plus étudié et dont les études ont révélé plusieurs rôles dans le développement de certains neurones, ainsi que des rôles distincts dans la maintenance de l'architecture d'autres neurones à long terme.

La molécule SAX-7 existe sous deux isoformes principales (Pocock *et al.*, 2008; Sasakura *et al.*, 2005): l'isoforme longue (SAX-7L) et l'isoforme courte (SAX-7S) (Figure 1.10). Les deux isoformes partagent la même région intracellulaire, le domaine transmembranaire, et la majeure partie de la région extracellulaire, comprenant cinq domaines de fibronectine de type III (FnIII) et quatre domaines de type Ig (Figure 1.10). Toutefois, elles diffèrent par la région extracellulaire N-terminale, où SAX-7S ne contient que quatre domaines Ig (Ig 3–6), tandis que SAX-7L en possède six (Ig 1–6).

SAX-7 joue un rôle important dans plusieurs aspects de développement du système nerveux tels que la morphogenèse et l'organisation des dendrites, la ramification dendritique, et la fasciculation axone-dendrite (Cebul, McLachlan et Heiman, 2020; Chen *et al.*, 2019; Diaz-Balzac *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2013; Heiman et Bulow, 2024; Moseley-Alldredge *et al.*, 2022; Ramirez-Suarez *et al.*, 2019; Sundararajan, Stern et Miller III, 2019; Yip et Heiman, 2018; Zou *et al.*, 2016).

Dans la maintenance de l'architecture neuronale, SAX-7 est impliquée dans le maintien du positionnement post-embryonnaire des ganglions neuronaux dans la tête et des axones dans la corde ventrale après que leur développement ait été bien établi (Desse *et al.*, 2021; Pocock *et al.*, 2008; Sasakura *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Zallen, Kirch et Bargmann, 1999). Il a été démontré que c'est l'isoforme courte de SAX-7 qui joue un rôle crucial dans la maintenance neuronale puisque l'expression de SAX-7S dans les neurones, mais pas de SAX-7L, permet de sauver les défauts de la mutation nulle, *qv30*, de *sax-7*. De plus, des mutations spécifiques de *sax-7S* donnent un phénotype largement identique au phénotype des mutants *sax-7(qv30)* (Desse *et al.*, 2021; Sasakura *et al.*, 2005). Grâce à un rapporteur sfGFP::SAX-7S généré dans le locus du gène par notre laboratoire par CRISPR pour visualiser les niveaux endogènes de SAX-7S, on a observé que cette isoforme est exprimée dans l'ensemble du système nerveux, de l'embryogenèse à l'âge adulte (Desse *et al.*, 2021). De plus, une majorité de la protéine SAX-7 semble être clivée, et notre équipe a montré que ces fragments clivés, lorsqu'ils sont combinés, peuvent assurer la maintenance neuronale (Desse *et al.*, 2021).

Il a également été démontré que le déplacement des neurones chez les mutants *sax-7* est induit par le stress mécanique causé par les mouvements corporels. Le déplacement des neurones et de leurs axones peut être partiellement supprimé en paralysant les animaux *sax-7*, suggérant que la fonction normale de SAX-7 chez le type sauvage antagonise les effets de la force mécanique et que le stress généré par les

mouvements du corps contribue à la désorganisation de l'architecture neuronale chez ces mutants (Pocock *et al.*, 2008; Sasakura *et al.*, 2005).

Les molécules de la famille de L1CAM agissent via des interactions homophiles et hétérophiles via leur domaine extracellulaire pour médier l'adhésion cellule-cellule et cellule-MEC (Haspel et Grumet, 2003). De manière similaire à ses homologues vertébrés, SAX-7 peut s'engager dans des interactions homophiles et hétérophiles (Sasakura *et al.*, 2005). L'adhésion homophile peut être induite par l'expression de SAX-7 dans des cellules en culture ainsi qu'*in vivo* dans des neurones AIY et AVK adjacents qui n'interagissent pas normalement (Pocock *et al.*, 2008; Sasakura *et al.*, 2005) ou dans le neurone sensoriel AFD où SAX-7 peut sauver, de manière autonome, le défaut de position de ce neurone (Sasakura *et al.*, 2005). Les interactions hétérophiles possibles avec SAX-7 impliquent d'autres protéines IgSF sécrétées qui participent également à la même voie génétique que *sax-7* pour maintenir la position des axones dans la corde ventrale (Bénard *et al.*, 2009) tels que DIG-1, ZIG-3, ZIG-4, et EGL-15/Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) (Aurelio, Hall et Hobert, 2002; Bénard *et al.*, 2009; Bénard *et al.*, 2006; Bülow, Boulin et Hobert, 2004).

1.1.5.2 Autres molécules impliquées dans la maintenance neuronale

1.1.5.2.1 Les protéines du cytosquelette

La nature hautement polarisée des neurones les rend particulièrement vulnérables au stress mécanique associé aux mouvements normaux de l'animal. Le cytosquelette joue un rôle crucial également dans la capacité des neurones à résister à ces stress (Fletcher et Mullins, 2010), et certains de ses éléments ont été étudiés pour leur rôle dans la maintenance neuronale. Par exemple, la protéine Zyxine, l'homologue de la protéine focale associée à l'adhésion cellulaire (focal adhesion-associated protein), est un régulateur de la maintenance des synapses des neurones mechanosensoriels PLM chez *C. elegans*. Zyxine est impliquée dans la régulation des réponses du cytosquelette aux forces mécaniques et aux contraintes exercées sur les sites d'adhérence dans les cellules de mammifères. Elle joue un rôle dans l'adhésion cellulaire, la migration et la mécano-transduction (Luo *et al.*, 2014). Zyxine est enrichie au niveau des tissus épithéliaux et musculaires, et se localise aux plaques d'adhérence focale ainsi qu'aux jonctions adhérentes. Zyxine s'exprime aussi dans le système nerveux mais à des niveaux relativement faibles (Macalma *et al.*, 1996). Chez les vers mutants *zyx-1*, au stade tardif L4, la branche synaptique du neurones PLM est absente ou s'arrête prématurément avant d'atteindre la corde nerveuse ventrale et sont ainsi incapables d'assurer la maintenance des synapses. Zyxine a été suggérée d'agir en permettant la transmission des signaux de

la tension d'adhésion cellulaire lors de la synaptogenèse, et de stabiliser et maintenir les terminaisons synaptiques dans les neurones mécanosensoriels.

Par ailleurs, les microtubules, éléments essentiels de la structure et de la fonction neuronale, sont également impliqués dans la maintenance neuronale. Ces structures dynamiques, formées à partir de chaînes de protofilaments d'hétérodimères α - et β -tubuline, sont protégées des contraintes mécaniques par l'acétylation de l' α -tubuline, qui leur confère une élasticité structurelle. Cette modification post-traductionnelle des microtubules affecte également la maintenance synaptique (Teoh *et al.*, 2022), (Borgen *et al.*, 2019). Chez *C. elegans*, les enzymes responsables de l'acétylation des microtubules sont les tubuline-acétyltransférases MEC-17/ α TAT1 et ATAT-2 (Borgen *et al.*, 2019; Teoh *et al.*, 2022). En plus de leur rôle dans la structure des microtubules, dans la sensation tactile, la polarité axonale et la dégénérescence des axones dans les neurones mécanosensoriels (Akella *et al.*, 2010; Neumann et Hilliard, 2014; Shida T, 2010; Topalidou *et al.*, 2012), MEC-17 et ATAT-2, via leur activité acétyltransférase, ont un rôle dans la maintenance des synapses mécanosensorielles (Borgen *et al.*, 2019; Teoh *et al.*, 2022). La perte de fonction ainsi que la surexpression de ces enzymes conduit à la perte progressive des branches synaptiques, atteignant la plus grande pénétrance à l'âge adulte (Teoh *et al.*, 2022). Les mêmes études ont révélé que *mec-17* interagit entre autres avec *zyx-1* pour médier ce mécanisme de protection des branches synaptiques.

D'autres molécules, comme la dystrophine, interviennent dans la maintenance de la position de corps cellulaires des ganglions lombaires et des neurones GABAergiques et cholinergiques chez *C. elegans* (Johnson et Kramer, 2012; Zhou et Chen, 2011). Cette fonction neuronale de la dystrophine est distincte de son rôle dans le maintien de l'intégrité musculaire et la régulation de la locomotion. La dystrophine agit en s'associant à SAX-7, permettant son ancrage au cytosquelette d'actine et régulant ainsi les adhérences cellulaires médiées par SAX-7 (Zhou et Chen, 2011).

1.1.5.2.2 Les protéines de la matrice extracellulaire

Des composants de la MEC font partie des molécules jouant un rôle dans la maintenance neuronale. Par exemple, la spondine, l'homologue de F-spondine chez les vertébrés, codée par le gène *spon-1* est un composant de la MEC dans les parois musculaires du ver et dans son pharynx. La spondine est requise pour la maintenance de la position des axones dans la corde ventrale (Woo *et al.*, 2008). *spon-1* interagit

génétiqnement avec les gènes *zig-4* et *egl-15*, bien que le mécanisme de cette interaction reste à élucider (Woo *et al.*, 2008).

La papiline, une autre protéine de la MEC, a été récemment identifiée comme étant impliquée dans la fasciculation de l'axone du neurone PVD chez *C. elegans*, bien que son mécanisme d'action demeure incompris. Son rôle développemental a été étudié plus en détail (Ramirez-Suarez *et al.*, 2019). D'autres composants de la MEC, comme les métalloprotéinases ADAMTS à domaines thrombospondines, telles que MIG-17 et GON-1, jouent également un rôle dans la maintenance de la morphologie synaptique à la jonction neuro-musculaire et dans la régulation du positionnement synaptique (Fan *et al.*, 2020; Kurshan *et al.*, 2014; Qin, Liang et Ding, 2014).

1.2 La matrice extracellulaire

1.2.1 La matrice extracellulaire chez les vertébrés

1.2.1.1 Composition et structure

La MEC constitue un réseau tridimensionnel structuré, jouant un rôle clé à la fois dans le soutien et le maintien de l'architecture des tissus ainsi que dans la régulation des fonctions cellulaires (Bandzerewicz et Gadowska-Gajadhur, 2022; Karamanos NK, 2021). Chez les mammifères, la MEC est constituée d'environ 300 protéines, regroupées sous le terme de matrisome (Bonnans, Chou et Werb, 2014). En fonction de sa position et de sa composition, la MEC se divise en deux entités: (i) la matrice interstitielle, qui forme un réseau tridimensionnel poreux entourant les cellules, particulièrement les tissus conjonctifs, qui enferme, sépare et soutient les tissus et leur fournit une structure de soutien; et (ii) la MB, une forme spécialisée de MEC séparant l'épithélium du milieu interstitiel environnant, est plus compacte et forme une couche à côté des cellules (matrice péri-cellulaire) notamment sous les cellules épithéliales et endothéliales (Bonnans, Chou et Werb, 2014; Pompili *et al.*, 2021; Theocharis, Manou et Karamanos, 2019; Theocharis *et al.*, 2016). La matrice interstitielle et la MB sont étroitement interconnectées et assurent ensemble l'intégrité d'un tissu (Theocharis, Manou et Karamanos, 2019) (Figure 1.11).

1.2.1.1.1 La matrice interstitielle

La composition de la matrice interstitielles peut varier, créant ainsi des environnements spécifiques pour différentes fonctions tissulaires (Karamanos NK, 2021). Les composants principaux de la matrice interstitielle incluent les collagènes fibrillaires, les protéoglycanes, la fibronectine et l'élastine (Bonnans,

Chou et Werb, 2014; Schuler *et al.*, 2022; Tavakoli *et al.*, 2023). Une courte présentation des principaux composants de la MEC est donnée ci-après.

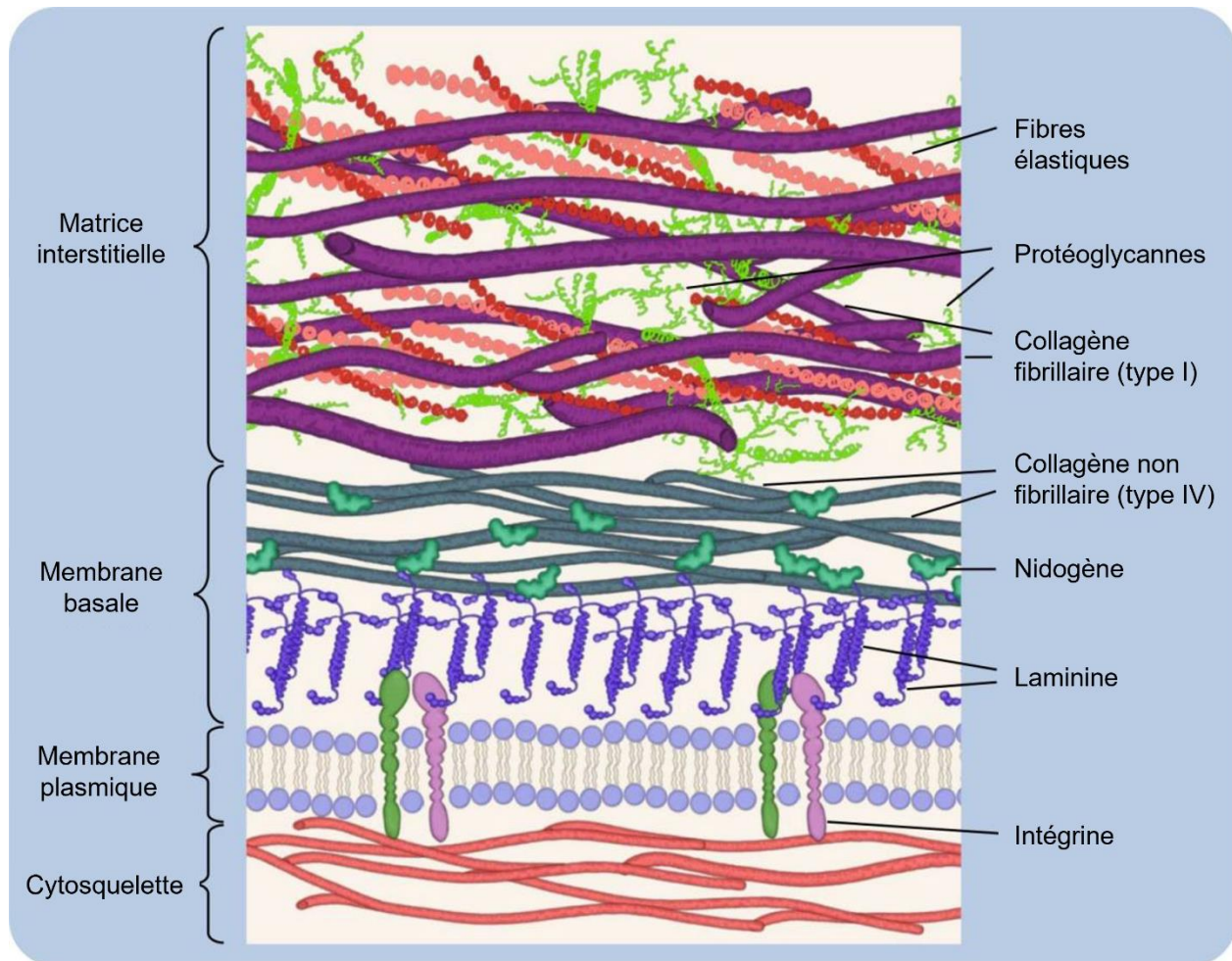


Figure 1.10 La composition générale de la MEC chez les vertébrés.
Adapté de (Bandzerewicz et Gadomska-Gajadur, 2022).

Les collagènes sont des composants structuraux majeurs de la MEC (Khoshnoodi *et al.*, 2006) qui contribuent à sa stabilité mécanique ainsi qu'à l'organisation et à la forme de plusieurs tissus (Al-Shaer *et al.*, 2021). Ils constituent un groupe de 28 types de protéines aux structures variées (Al-Shaer *et al.*, 2021; Khoshnoodi *et al.*, 2006; Ricard-Blum, 2011). Les molécules de collagènes partagent toutes une structure commune caractéristique, sous forme de triple hélice homotrimérique ou hétérotrimérique, formée par une séquence répétitive (Gly-X-Y)_n dans chacune de ses trois chaînes, où X représente généralement la proline et Y 4-hydroxyproline (Bandzerewicz et Gadomska-Gajadur, 2022; Karamanos NK, 2021). Sur la base de leur organisation supramoléculaire, on distingue les formes fibrillaires et les formes non fibrillaires

(Figure 1.12). Des interruptions naturelles dans la région triple hélice sont présentes dans le cas des collagènes non fibrillaires rencontrés dans la MB (Al-Shaer *et al.*, 2021; Myllyharju et Kivirikko, 2001; Ricard-Blum, 2011)

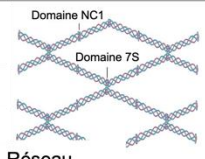
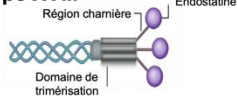
Classe	Types	Exemple de structure
Fibrillaire	I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII	Collagène type I  hélice α  Fibrilles de collagène
Non Fibrillaire		
Formant un réseau	IV, VI, VII, VIII, X	Collagène type IV  Protomère  Réseau
FACIT	IX, XII, XIV, XIX, XX, XXI, XXII	Collagène type IX  Protomère  Fibrilles de collagène
Transmembranaire	XXV, XIII, XVII, XXIII	Collagène type XXV  Protomère
Multiplexine	XV, XVI, XVIII	Collagène type XVIII  Protomère

Figure 1.11 Les grandes familles de collagènes.

Adapté de (Karsdal *et al.*, 2020).

Les collagènes de la matrice interstitielle, sécrétés principalement par les fibroblastes, englobent notamment le collagène I, avec de petites quantités de collagènes III et V dans des proportions variables (Bandzerewicz et Gadomska-Gajadur, 2022). La plupart de ces collagènes sont retrouvés dans les tissus conjonctifs tels que les tendons et le cartilage, mais aussi dans d'autres tissus tels que le tissu épithélial (Karamanos NK, 2021).

D'autres composants de la matrice interstitielle incluent la fibronectine et l'élastine (Kular, Basu et Sharma, 2014) (Bonnans, Chou et Werb, 2014). L'élastine est une protéine hydrophobe et fibrillaire, responsable des propriétés élastiques des tissus (Cocciolone *et al.*, 2018). Les fibres élastiques sont composées d'élastine à 90% et sont recouvertes de microfibrilles riches en glycoprotéines appelées fibrillines. Elles confèrent aux tissus leur capacité à s'étirer et sont présentes dans les parois des vaisseaux sanguins, la peau, les poumons, le cœur, les tendons, les ligaments, la vessie et le cartilage élastique (Baldwin *et al.*,

2013; Bandzerewicz et Gadomska-Gajadur, 2022; Ritty, Ditsios et Starcher, 2002). La fibronectine, quant à elle, est une glycoprotéine insoluble de la matrice interstitielle et interagit avec plusieurs autres molécules de la MEC telles que les collagènes, la ténascine-C et les intégrines (Pompili *et al.*, 2021).

Les protéoglycanes, des macromolécules composées d'un noyau protéique lié à des chaînes de glycosaminoglycanes, sont également présents dans la matrice interstitielle, tels que les syndécanes, les hyaluronanes et la décorine (Bandzerewicz et Gadomska-Gajadur, 2022; Karamanos *et al.*, 2018; Mortensen *et al.*, 2019).

1.2.1.1.2 La membrane basale

La MB sépare l'épithélium des couches profondes des tissus connectifs. Elle enveloppe plusieurs structures telles que les fibres musculaires lisses, squelettiques et cardiaques, les cellules de Schwann et les adipocytes (Bandzerewicz et Gadomska-Gajadur, 2022; LeBleu, Macdonald et Kalluri, 2007). La MB est principalement composée de collagène IV, de laminines, de nidogène et de protéoglycanes (tels que l'aggrécane, le versicane et le perlécane) (Ambade, Hassoun et Damico, 2021; McCarthy, 2015; Pozzi, Yurchenco et Iozzo, 2017). D'autres types de collagènes non fibrillaires sont également des constituants de la MB (Pompili *et al.*, 2021; Sorushanova *et al.*, 2019).

La MB contient aussi des protéines matricielles ayant des fonctions de régulation, telles que SPARC (protéine sécrétée acide et riche en cystéine), la thrombospondine-1, la fibuline, la ténascine, la rééline, ainsi que des enzymes matricielles comme les métalloprotéinases (Bandzerewicz et Gadomska-Gajadur, 2022; Bornstein, 2009; Bornstein et Sage, 2002; Di Donato *et al.*, 2018; Karamanos NK, 2021). Des récepteurs, assurant l'interaction MEC-cellules, font partie également de la MB tels que les intégrines et les dystroglycanes (Bonnans, Chou et Werb, 2014; Li *et al.*, 2017). La composition de la MB sera décrite plus en détails dans la section MB chez *C. elegans*.

1.2.1.2 La matrice extracellulaire : une structure dynamique

La MEC est une structure dynamique qui subit un remodelage constant, englobant la synthèse, la dégradation et les modifications de ces composants, ce qui entraîne des changements dans sa composition et son architecture (Pompili *et al.*, 2021). Les MMP (Matrix MetalloProteinases), les ADAM (A Disintegrin and Metalloproteinase) et les ADAMTS sont les enzymes impliquées principalement dans ce remodelage (Cawston et Young, 2010; Karamanos NK, 2021) (Apte et Parks, 2015). Les ADAMTS et la plupart des MMP

sont des enzymes secrétées, alors que les ADAM contiennent un domaine transmembranaire et agissent à la membrane plasmique. Contrairement aux ADAM, les ADAMTS ont des répétitions de type thrombospondine de type I dans leurs séquences carboxy-terminales, leur permettant de lier les protéines de la MEC (Kuno et Matsushima, 1998).

Lors du remodelage de la MEC, le clivage de ses composants est un processus clé, modulant à la fois sa structure, sa composition, et libérant des molécules actives comme des facteurs de croissance (Bonnans, Chou et Werb, 2014; Schultz et Wysocki, 2009). La MEC peut être dégradée par différentes familles de protéases, notamment les MMP, capables de dégrader le collagène, la gélatine, l'élastine, la laminine, la fibronectine et d'autres protéines (Bandzerewicz et Gadowska-Gajadhur, 2022; Miekus *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2022b). D'autres enzymes telles que les cathepsines, les héparanases et l'élastase peuvent également jouer un rôle dans la dégradation et le remodelage de la MEC (Bonnefoy et Legrand, 2000; Masola *et al.*, 2018).

La dégradation de la MEC doit être régulée pour éviter une dégradation excessive et nuisible des tissus. L'activité des enzymes responsables de cette dégradation est contrôlée par des inhibiteurs spécifiques, appelés inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP). Les TIMP inhibent de manière réversible l'activité des MMP, des ADAM et des ADAMTS (Laronha H, 2020; Nagase, Visse et Murphy, 2006). L'activité des MMP est également régulée à plusieurs niveaux : transcriptionnel, traductionnel, au niveau de la sécrétion et de l'activation via le clivage du pro-domaine (Kelwick *et al.*, 2015; Pompili *et al.*, 2021). De plus, l'activité des MMP est modulée par des mécanismes tels que leur localisation (Karamanos NK, 2021; Van Doren *et al.*, 2017) et leur élimination par endocytose (Karamanos NK, 2021; Yamamoto, Murphy et Troeberg, 2015). Des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation peuvent également moduler leur activité, leur localisation et leur interaction avec des substrats et d'autres protéines (Madzharova *et al.*, 2019). Enfin, en conditions physiologiques normales, les métalloprotéinases jouent un rôle essentiel dans le remodelage et le renouvellement de la MEC, notamment lors du développement embryonnaire, de l'angiogenèse et de la cicatrisation (Blelloch et Kimble, 1999; Skeath *et al.*, 2017; Stetler-Stevenson, 1999; Xue et Jackson, 2015).

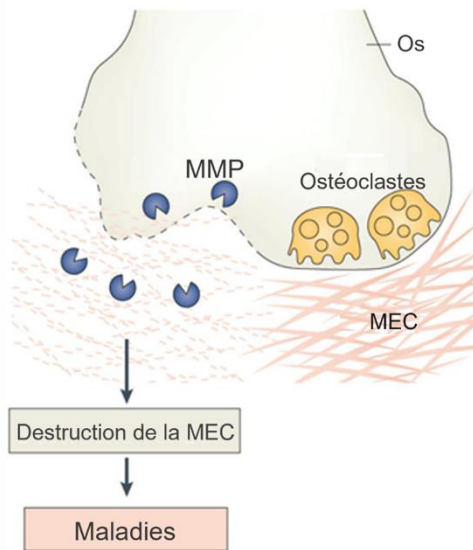
1.2.1.2.1 Remodelage aberrant de la MEC

Une dégradation excessive de la MEC peut entraîner la destruction des tissus (Figure 1.13). Plusieurs études ont mis en évidence le lien entre certaines pathologies et une dégradation excessive de la MEC (Lu

et al., 2011; Theocharis, Manou et Karamanos, 2019). De nombreux travaux suggèrent l'implication de l'activation des MMP et des ADAMTS dans ces conditions pathologiques. Par exemple, l'activation des MMP dans l'interstitium cardiaque, entraîne une dégradation des protéines de la MEC (Spinale, Janicki et Zile, 2013), incluant la dégradation excessive du collagène endomysial qui est impliqué dans le dysfonctionnement systolique chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque hypertensive (López *et al.*, 2006). D'autres travaux ont démontré que l'expression des métalloprotéinases telles que la MMP-3 augmente la dégradation du tissu intestinal dans le côlon des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, par rapport aux témoins (Pedersen *et al.*, 2009). De manière similaire, dans les maladies comme l'arthrose et l'ostéoarthrite, la surexpression des ADAMTS-1, -4 et -5, ainsi que des MMP-1 et MMP-13 dans les chondrocytes, contribue en partie à la destruction pathologique de la matrice cartilagineuse (Bonnans, Chou et Werb, 2014; Maldonado et Nam, 2013).

L'accumulation excessive des composants de la MEC peut entraîner une forme de réparation anormale lors de blessures ou en réponse à une inflammation chronique (Figure 1.13), appelée la fibrose (El Ayadi, Jay et Prasai, 2020; Xue et Jackson, 2015). Les dépôts excessifs de certains composants de la MEC, notamment de collagènes, sont les principales causes de la fibrose (Booth *et al.*, 2012; Bulow et Boor, 2019; Crest *et al.*, 2017; Frangogiannis, 2020; Isabella et Horne-Badovinac, 2016; Lausecker, Lennon et Randles, 2022; Mak et Mei, 2017; Morales-Nebreda *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2021; Yun, Kim et Kim, 2019). Cette fibrose entraîne une altération de la fonction des organes et est associée à diverses pathologies, telles que la cirrhose hépatique et la fibrose pulmonaire (Zhao *et al.*, 2022a). La voie TGF- β est une des voies majeures impliquées dans la fibrose et joue un rôle crucial dans la pathogenèse des réponses fibrogènes dans plusieurs organes, tels que la peau, les reins, le côlon, les poumons, le foie et l'intestin (Biernacka, Dobaczewski et Frangogiannis, 2011; Frangogiannis, 2020; Meng, Nikolic-Paterson et Lan, 2016; Ong *et al.*, 2021). L'activation de la voie TGF- β favorise l'expression de gènes codant pour les composants de la MEC, tels que ceux du collagène et des TIMPs (Frangogiannis, 2020; Leivonen SK, 2013). De plus, il a été démontré que les cellules immunitaires, par la sécrétion de cytokines, sont des acteurs importants dans la génération de fibrose dans divers tissus et organes (Huang *et al.*, 2020a).

A. Dégradation excessive de la MEC



B. Accumulation de la MEC

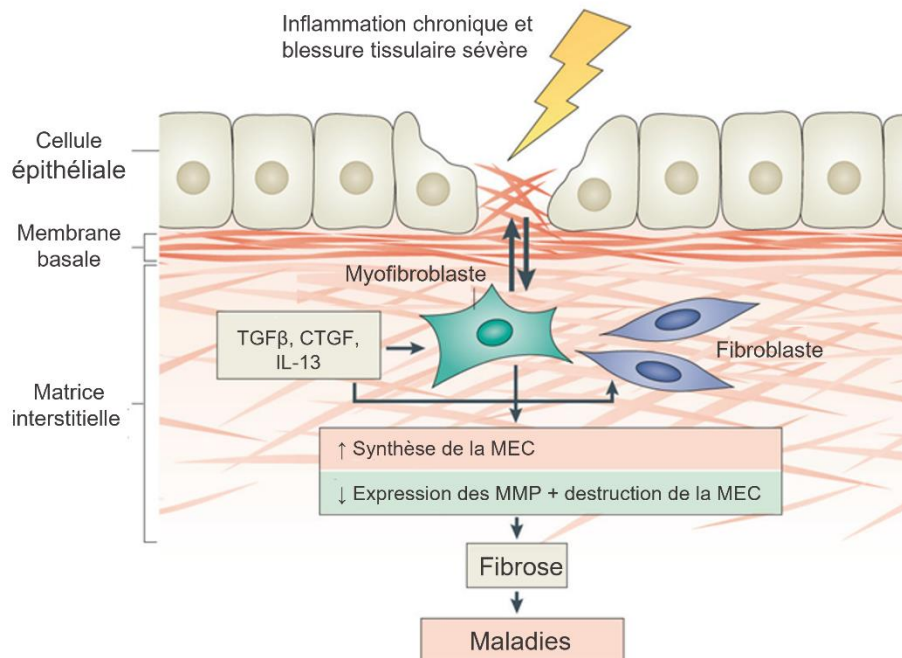


Figure 1.12 : Le remodelage de la matrice extracellulaire.

Adapté de (Bonnans, Chou et Werb, 2014).

Au-delà des modifications de l'expression des composants de la MEC, des modifications des propriétés mécaniques de la MEC jouent un rôle crucial dans l'apparition et le développement de diverses maladies fibrotiques. Par exemple, la rigidité de la MEC est considérée comme un marqueur de maladies fibrotiques (Hinz, 2009). Une rigidité altérée de la MEC peut être détectée par des récepteurs cellulaires et traduite en signaux intracellulaires, déclenchant des cascades de signalisation qui affectent la transcription de certains gènes spécifiques, modifiant ainsi le métabolisme et le comportement cellulaire, tels que la fibrose (Guo *et al.*, 2023; Hinz, 2012; Wells, 2013).

1.2.1.3 Le rôle de la signalisation de la superfamille TGF- β dans la fibrose

TGF- β est largement reconnu comme l'un des médiateurs clés de l'inflammation, jouant un rôle central dans l'initiation et la progression de la fibrose (Border *et al.*, 1992; Border *et al.*, 1990; Ortiz *et al.*, 2021; Roberts *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 2020). Les voies de signalisation du TGF- β et des Bone Morphogenic Proteins (BMP) reposent sur des mécanismes moléculaires distincts mais interconnectés. Elles sont toutes deux activées à la surface cellulaire par des récepteurs transmembranaires à activité sérine/thréonine kinase.

La signalisation du TGF- β repose sur l'activation des récepteurs TGF- β de type I et II, entraînant la phosphorylation des SMAD2/3, qui se lie également à SMAD4, pour induire l'expression de gènes pro-fibrotiques, tels que l' α -SMA (actine musculaire lisse alpha) et de composants de la MEC (Saito, Horie et Nagase, 2018) (Figure 1.13). Les BMP, quant à eux, se lient à des récepteurs de type I (ALK1/ACVRL1, BMPRI1A/ALK3, BMPRI1B/ALK6, ALK2/ACVR1) et de type II (BMPRI2, ACVR2A/ActRIIA, ACVR2B/ActRIIB) pour déclencher leur cascade de signalisation (Koenig *et al.*, 1994; Rahman *et al.*, 2015; Rosenzweig *et al.*, 1995; Yamashita *et al.*, 1995). Une fois activée, cette voie conduit à la phosphorylation des SMAD1/5/8, qui s'associent à SMAD4 et régulent l'expression de gènes à effet antifibrotique (Miyazono, Maeda & Imamura, 2005 ; Saito, Horie & Nagase, 2018 ; Wu, Chen & Li, 2016) (Figure 1.13).

Les ligands, TGF- β 1 et TGF- β 2 ont des propriétés pro-fibrotiques et peuvent même agir en synergie et fonctionnent via l'activation des protéines SMAD2/3 induisent la transformation des fibroblastes en myofibroblastes et stimulent la production de la MEC (Abd El-Meguid *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2023; Kamath *et al.*, 2015; Koch *et al.*, 2022; Saito, Horie et Nagase, 2018; Shah, Foreman et Ferguson, 1995; Talior - Volodarsky *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011; Wordinger, Sharma et Clark, 2014; Yue, Shan et Lasky, 2010; Zhang *et al.*, 2020). Contrairement à TGF- β 1 et TGF- β 2, TGF- β 3 a été suggéré comme ayant un effet anti-

fibrotique et supprime la transcription de gènes pro-fibrotiques, la différenciation des myofibroblastes ainsi que la synthèse et le remodelage de la MEC (Chang *et al.*, 2014; Hosokawa *et al.*, 2003; Shah, Foreman et Ferguson, 1995).

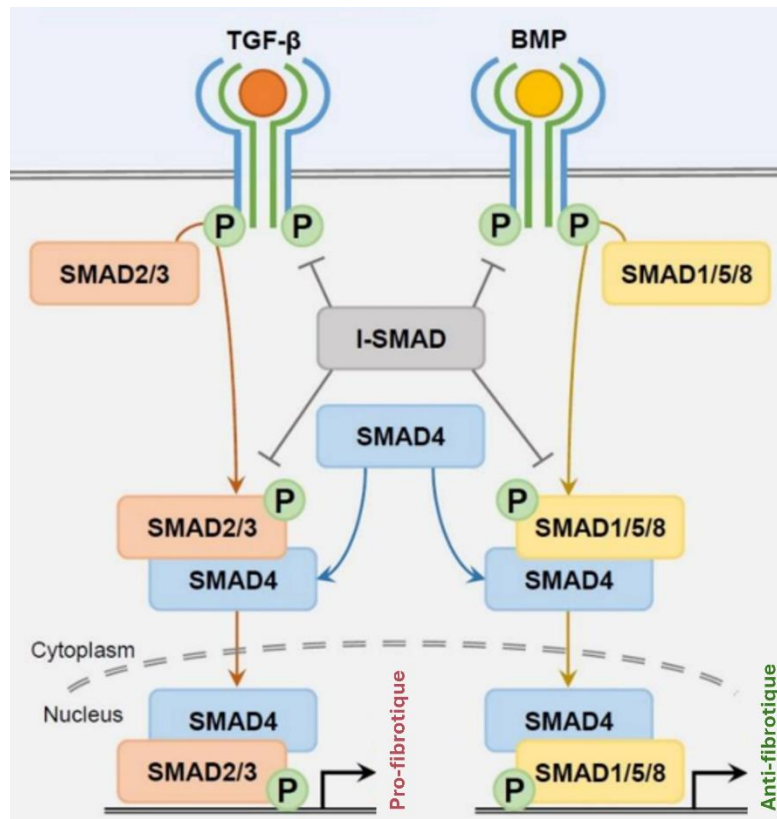


Figure 1.13 Schéma des voies de signalisation TGF-β et BMP dans la fibrose.

Adapté de (Zhang *et al.*, 2020).

Un nombre croissant de recherches met en lumière des propriétés anti-fibrotiques de certains ligands BMP. Les BMP peuvent diminuer la fibrose en rentrant en compétition pour SMAD4 dans la voie médiée par le ligand TGF-β pro-fibrotique, afin de réduire par exemple la différenciation des myofibroblastes et la synthèse ainsi que le remodelage de la MEC (Dituri *et al.*, 2019; Pegorier *et al.*, 2010; Wang et Hirschberg, 2003; Yang *et al.*, 2011; Zeisberg *et al.*, 2003). Certains ligands BMP peuvent également agir en contrôlant l'activité de SMAD7 connu pour ses rôles inhibiteurs de la signalisation TGF-β, de la différenciation de myofibroblastes et la production de la MEC (Humeres *et al.*, 2024; Yan, Liu et Chen, 2009).

BMP-2, 4, 6 et 7 sont les ligands les plus étudiés dans le contexte anti-fibrotique de la voie de signalisation impliquant les membres de la superfamille TGF-β (Arndt *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2018; Dendooven *et al.*,

2011; Jenkins et Fraser, 2011; Kamath *et al.*, 2015; Pegorier *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Zeisberg *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2013). Par exemple, BMP-2 présente des effets anti-fibrotiques. Son expression est diminuée dans les foies atteints de fibrose humaine ou expérimentale, et son administration par vecteur adénoviral réduit la fibrose hépatique ainsi que les lésions biliaires chez la souris (Chung *et al.*, 2018). BMP-2 permet aussi de réduire les niveaux de fibronectine, et des collagènes I et IV dans des conditions d'hyperglycémie. Dans les cardiomyocytes, il exerce son effet anti-fibrotique en inversant les effets des ligands TGF- β 1 via la dégradation de leurs récepteurs et en inhibant l'activation de TGF- β de via SMAD3 et ROCK (Wang *et al.*, 2012). En outre, l'activation du récepteur BMPR2 par les BMP inhibe la signalisation TGF- β , en réduisant l'activité des SMAD2/3 (Hemnes et Humbert, 2017). Cependant, BMP-2 peut également avoir des effets pro-fibrotiques, notamment en contexte tumoral, où il pourrait renforcer la signalisation TGF- β via l'activation de PRMT1, favorisant ainsi la transition épithélio-mésenchymateuse et la progression de la fibrose (Katsuno *et al.*, 2018).

Par ailleurs, BMP-4 et BMP-7 sont les ligands BMP les plus étudiés dans le contexte de la fibrose pulmonaire. Chez la souris, BMP-4 améliore la régénération pulmonaire, inhibe la phosphorylation de SMAD2/3 induite par le TGF- β 1, supprime l'expression de l' α -SMA et réduit la production de protéines de la MEC dans les fibroblastes pulmonaires (Cassandras *et al.*, 2020; Guan *et al.*, 2022; Hinz *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2020). Toutefois, certaines études antérieures ont aussi suggéré que BMP-4 pourrait favoriser la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, soulignant l'importance du contexte cellulaire et tissulaire dans la détermination de ses effets (Jeffery *et al.*, 2005). BMP-7 montre un effet antifibrotique chez des modèles de fibrose rénale, cardiaque et hépatique. Il agit principalement en inhibant la transition épithélio-mésenchymateuse et la signalisation SMAD2/3 tout en activant les voies SMAD1/5 (Gonzalez *et al.*, 2002; Zeisberg *et al.*, 2003).

Le BMP-3 agit comme un antagoniste à la fois du TGF- β et de certaines voies BMP. Sa perte est associée à plusieurs maladies fibrotiques, tandis que son administration pourrait rétablir l'équilibre de la signalisation et freiner la progression de la fibrose (Dorris *et al.*, 2024).

La conservation des voies de signalisation de la superfamille TGF- β à travers l'évolution témoigne de leur rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie tissulaire. Par exemple, dans le génome de *C. elegans*, il existe cinq gènes codant pour des ligands de la famille du TGF- β : DBL-1, DAF-7, TIG-2, TIG-3 et UNC-129 (Gumienny et Savage-Dunn, 2013) contre 30 membres de cette famille chez l'humain (Yamamoto et

Savage-Dunn, 2023). DBL-1 et TIG-2 appartiennent à la famille des BMP, DAF-7 et TIG-3 sont apparentés au TGF- β /Activine, tandis que UNC-129 est plus divergent (Savage-Dunn et Padgett, 2017). DBL-1 et DAF-7 possèdent des voies de signalisation bien définies chez *C. elegans* (Yamamoto et Savage-Dunn, 2023). La voie de signalisation DBL-1 par exemple est une voie canonique dans laquelle le ligand DBL-1 active un complexe de récepteurs composé de DAF-4 (type II) et SMA-6 (type I), entraînant la phosphorylation des SMAD SMA-2 et SMA-3. Ces derniers s'associent au co-SMAD SMA-4 et migrent dans le noyau pour réguler des gènes cibles, notamment ceux codant pour les collagènes cuticulaires et des enzymes de modification de la MEC (Gleason *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2010; Madaan *et al.*, 2020; Roberts *et al.*, 2010). La voie DBL-1 chez *C. elegans* régule de nombreux processus tels que la taille corporelle, la morphogenèse de la queue mâle, le vieillissement reproductif, l'immunité innée, l'apprentissage de l'aversion olfactive et potentiellement le guidage neuronal (Baltaci *et al.*, 2022; Foehr *et al.*, 2006; Savage *et al.*, 1996; Schultz *et al.*, 2014; Zhang et Zhang, 2012).

1.2.1.4 Fonctions de la matrice extracellulaire

De nombreuses études ont mis en évidence divers rôles de la MEC (Figure 1.14). Elle assure l'intégrité structurelle et le soutien mécanique des tissus, agissant comme un échafaudage pour maintenir la morphologie cellulaire et l'architecture des tissus et des organes (Karamanos NK, 2021; Mendibil *et al.*, 2020; Naba, 2024; Pompili *et al.*, 2021; Rozario et DeSimone, 2010; Yurchenco, 2011). Elle sert également de réservoir pour plusieurs molécules, telles que les facteurs de croissance (par exemple : EGF, FGF, TGF- β) et les cytokines (Pompili *et al.*, 2021). Le remodelage de la MEC permet de libérer ces molécules par dégradation protéolytique, facilitant ainsi leur action spécifique et régulant localement leur fonction (Bandzerewicz et Gadowska-Gajadur, 2022). De plus, certains composants de la MEC, tels que la laminine et le collagène IV, servent de ligands pour les récepteurs de surface cellulaire activant ainsi une multitude de voies de signalisation. Ces interactions cellule-MEC jouent un rôle régulateur essentiel des voies de signalisation cellulaire (Rozario et DeSimone, 2010). Ainsi, la MEC, en tant qu'environnement dans lequel les cellules se lient et interagissent, régule plusieurs processus cellulaires tels que la différenciation, la prolifération, la survie cellulaire, l'adhésion, la migration, la régénération et l'immunité (Mendibil *et al.*, 2020; Pompili *et al.*, 2021; Rozario et DeSimone, 2010; Sutherland, Dyer et Allen, 2023).

Ces multiples fonctions de la MEC expliquent les effets délétères que peuvent avoir des mutations dans les gènes matriciels. Les mutations dans les protéines de la MEC affectent leurs interactions avec d'autres composants et peuvent entraîner un large éventail de maladies génétiques. Par exemple, des mutations

affectant la synthèse et la modification des collagènes fibrillaires peuvent causer des troubles tels que le syndrome d'Ehlers-Danlos, l'épidermolyse bulleuse (Iozzo et Gubbiotti, 2018) ou l'ostéogenèse imparfaite (Bandzerewicz et Gadowska-Gajadur, 2022). Les fibrillinopathies telles que le syndrome de Marfan, causé par des mutations dans le gène de la fibrilline-1 (Sakai et Keene, 1994; Sakai *et al.*, 2016) est un autre exemple de maladie liée à la MEC. Les mutations dans les gènes codant pour d'autres composants de la MEC, comme la laminine et le perlécane conduisent également à d'autres maladies héréditaires telles que la dystrophie musculaire et le syndrome de Schwartz-Jampel respectivement (Arikawa-Hirasawa *et al.*, 2002).

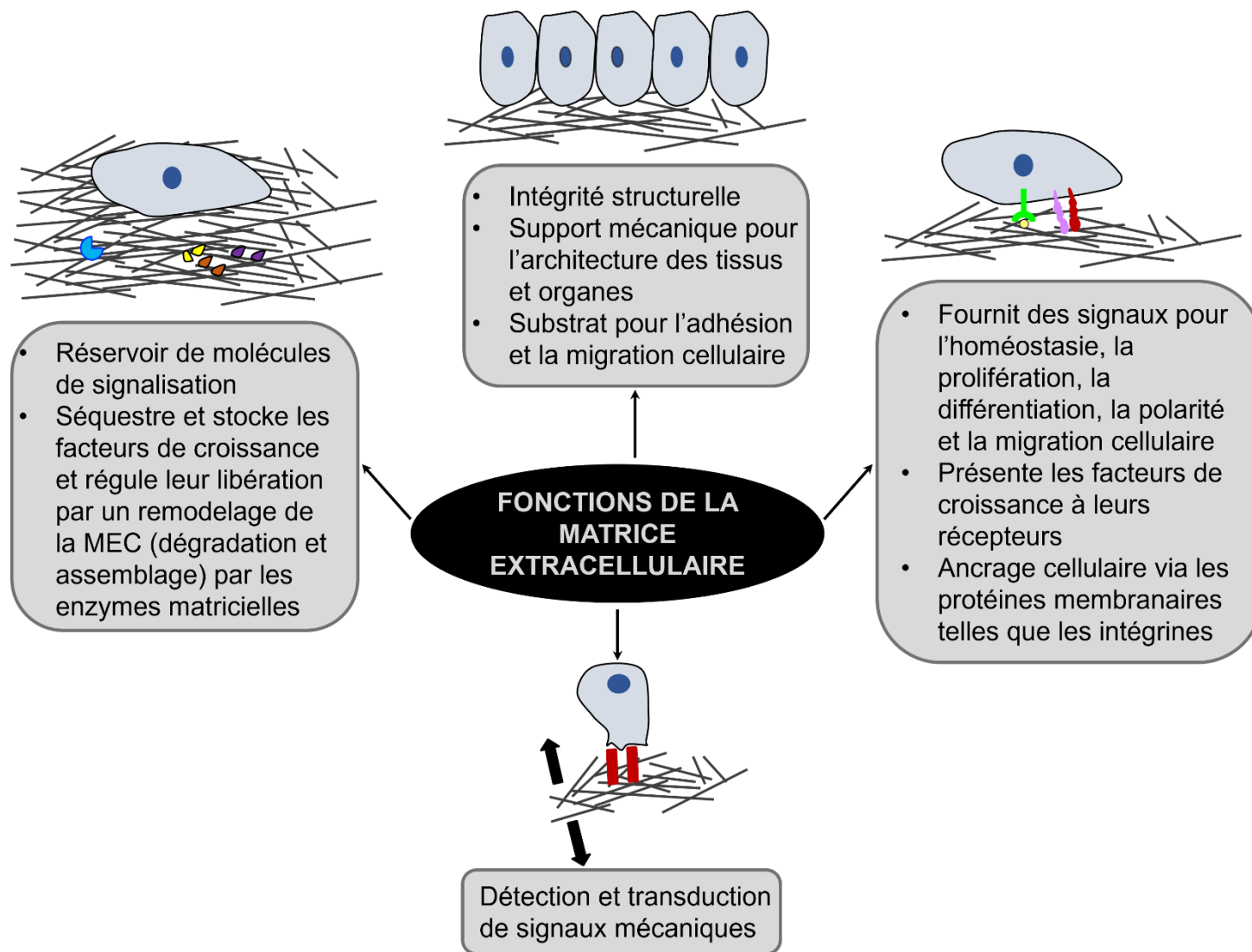


Figure 1.14 Les fonctions de la matrice extracellulaire.

Adapté de (Kim, Turnbull et Guimond, 2011; Mendibil *et al.*, 2020; Rozario et DeSimone, 2010).

1.2.2 La membrane basale chez *C. elegans*

1.2.2.1 *C. elegans* : un modèle d'étude de la membrane basale

Chez les vertébrés, l'étude *in vivo* des fonctions de la MEC et des interactions entre les cellules et la MEC est complexe en raison de la localisation profonde de la MEC difficilement accessible aux techniques de microscopie. De plus, la plupart des composants de la MEC ne sont pas étiquetés avec des marqueurs fluorescents, ce qui limite la possibilité de suivre leur dynamique *in situ* (Sherwood, 2015). Les recherches sur la MEC de *C. elegans* ont permis d'approfondir la compréhension des mécanismes d'assemblage, de dynamique et du rôle de la MEC dans le développement et le maintien des tissus. Cela est facilité par la génétique puissante de *C. elegans* (classique et inverse), sa transparence, sa structure tissulaire simple, et la possibilité d'étiqueter fonctionnellement la plupart des composants de la MEC avec des protéines fluorescentes, permettant leur observation *in vivo*, combiné à la rapidité de son cycle de vie et le faible coût des expérimentations.

Chez *C. elegans*, deux formes principales de MEC spécialisées existent : la cuticule (exosquelette) et les MB (Kramer, 2005). Nous allons nous focaliser sur la description de la MB chez *C. elegans* (Figure 1.15). Comme chez d'autres métazoaires, les tissus épithéliaux et mésodermiques de *C. elegans* sont recouverts d'une MB. Sa composition, est similaire à celle des vertébrés, à l'exception notable de l'absence de fibronectine (Kramer, 2005; Labouesse, 2012) et elle présente généralement un nombre réduit de gènes codant pour chaque composant.

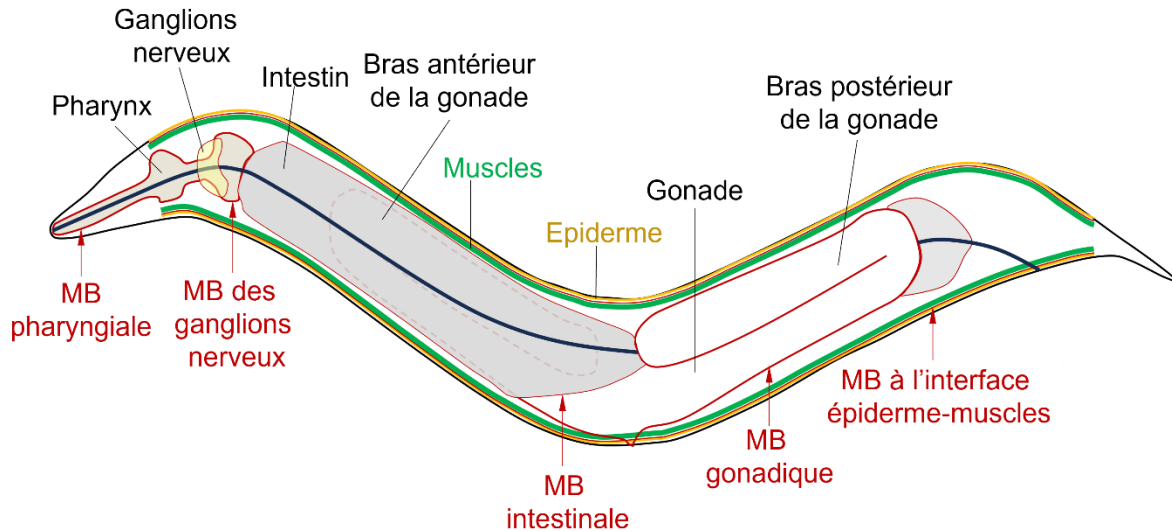


Figure 1.15 Distribution de la membrane basale chez *C. elegans*.

1.2.2.2 Les propriétés de la membrane basale étudiées chez *C. elegans*

De nombreuses études menées sur *C. elegans* ont permis de mieux comprendre la régulation de la MB lors de la croissance des organes, de la polarité tissulaire, de la migration cellulaire, de l'invasion cellulaire et de l'attachement des tissus. Ces études réalisées principalement par le laboratoire de David Sherwood ont démontré la nature dynamique des MB, soulignant leur rôle crucial dans l'organisation et la morphogenèse des tissus (Clay et Sherwood, 2015). L'observation de la laminine et du collagène IV par photoconversion a révélé que la MB se déplace pour faciliter l'attachement des tissus lors de la croissance des organes (Harunaga, Doyle et Yamada, 2014; Ihara *et al.*, 2011; Matus *et al.*, 2010). En outre, la MB subit une croissance tout au long des différents stades de développement, comme l'ont révélé les études faites sur les MB de la gonade et du pharynx (Keeley *et al.*, 2020).

L'invasion cellulaire *in vivo* a été largement étudié chez *C. elegans*, dans le contexte de formation de la vulve, et a permis de comprendre comment le remodelage de la MB pendant cet évènement permet aux cellules de passer à travers la MB (Caceres *et al.*, 2018) (Figure 1.16). Au cours du développement larvaire, une cellule spécialisée de la gonade, appelée cellule ancre (Anchor Cell), perce la MB gonadique pour entrer en contact des cellules précurseurs vulvaires, initiant ainsi la connexion entre l'utérus et la vulve (figure 1.16A). Des évènements impliquant la nétrine et l'intégrine dans la cellule ancre et l'interface cellule ancre-MB conduisent à la formation d'une membrane cellulaire invasive riche en F-actine (protrusion) et ses régulateurs (Matus *et al.*, 2010). Ces protrusions peuvent exercer une force et remodeler la MEC (Caceres *et al.*, 2018). Ces processus d'invasion cellulaire jouent un rôle dans le

développement des organes et l'immunité, mais aussi dans des situations pathologiques telles que les cancers et les métastases impliquant la MB (Matus *et al.*, 2010; Rowe et Weiss, 2008).

D'autres études ont été réalisées pour mieux comprendre la connexion entre l'utérus et la vulve, cet événement de fusion tissulaire nécessaire à l'accouplement et à la ponte (Sherwood et Sternberg, 2003), impliquant la MB de la vulve et celle de l'utérus. Lorsque les MB des tissus voisins entrent en contact, ils glissent les uns sur les autres pour séparer les tissus et les organes (Keeley et Sherwood, 2019). Cependant, dans certaines régions spécialisées, les MB des tissus voisins se lient rapprochant ainsi les tissus en formant des connexions, transitoires ou durables, de type MB-MB. Chez *C. elegans*, un système d'adhésion MB-MB appelé B-LINK (liaison MB) a été découvert pour la première fois sur le site d'invasion de la cellule ancre (Figure 1.16B) (Morrissey *et al.*, 2016). Les études du B-LINK chez *C. elegans* ont permis de mieux comprendre les adhésions MB-MB et ont identifié des composants cellulaires et extracellulaires importants dans la formation et le maintien de ces jonctions tissulaires (Keeley et Sherwood, 2019; Morrissey *et al.*, 2014). Un mécanisme a été suggéré concernant l'importance du B-LINK dans le phénomène d'invasion et qui implique l'hémicentine, une protéine de la MB reliant les MB utérine et vulvaire, ainsi que l'intégrine et la plakine (Figure 1.16C).

1.2.2.3 Les composants de la membrane basale chez *C. elegans*

Le génome de *C. elegans* code pour les orthologues des composants structuraux de la MB incluant la laminine, le collagène IV, le nidogène, le perlécane et l'agrane (Clay et Sherwood, 2015; Hrus *et al.*, 2007; Keeley *et al.*, 2020; Kramer, 2005; Woo *et al.*, 2008). Des récepteurs tels que l'intégrine et le dystroglycane font également partie de la MB et assurent l'interaction entre la MB et les cellules (Hutter *et al.*, 2000) (Figure 1.17). De plus, les MB contiennent des protéines matricielles telles que SPARC, la papiline, la fibuline, en plus des enzymes telles que les ADAMTS, les MMP et la peroxydase. L'ensemble de ces composants s'assemble pour créer une MB qui soutient les cellules, tissus et organes, et leur confère une résistance contre les contraintes mécaniques (Candiello *et al.*, 2007; Timpl et Brown, 1996; Yurchenco, 2011).

La laminine et le collagène IV, ainsi que d'autres composants de la MB, peuvent être produits par le tissu lui-même ou par d'autres tissus, puis incorporés à partir de l'espace extracellulaire (Huang CC, 2003) (Graham *et al.*, 1997; Rasmussen, Reddy et Priess, 2012). Bien que les mécanismes régulant leur

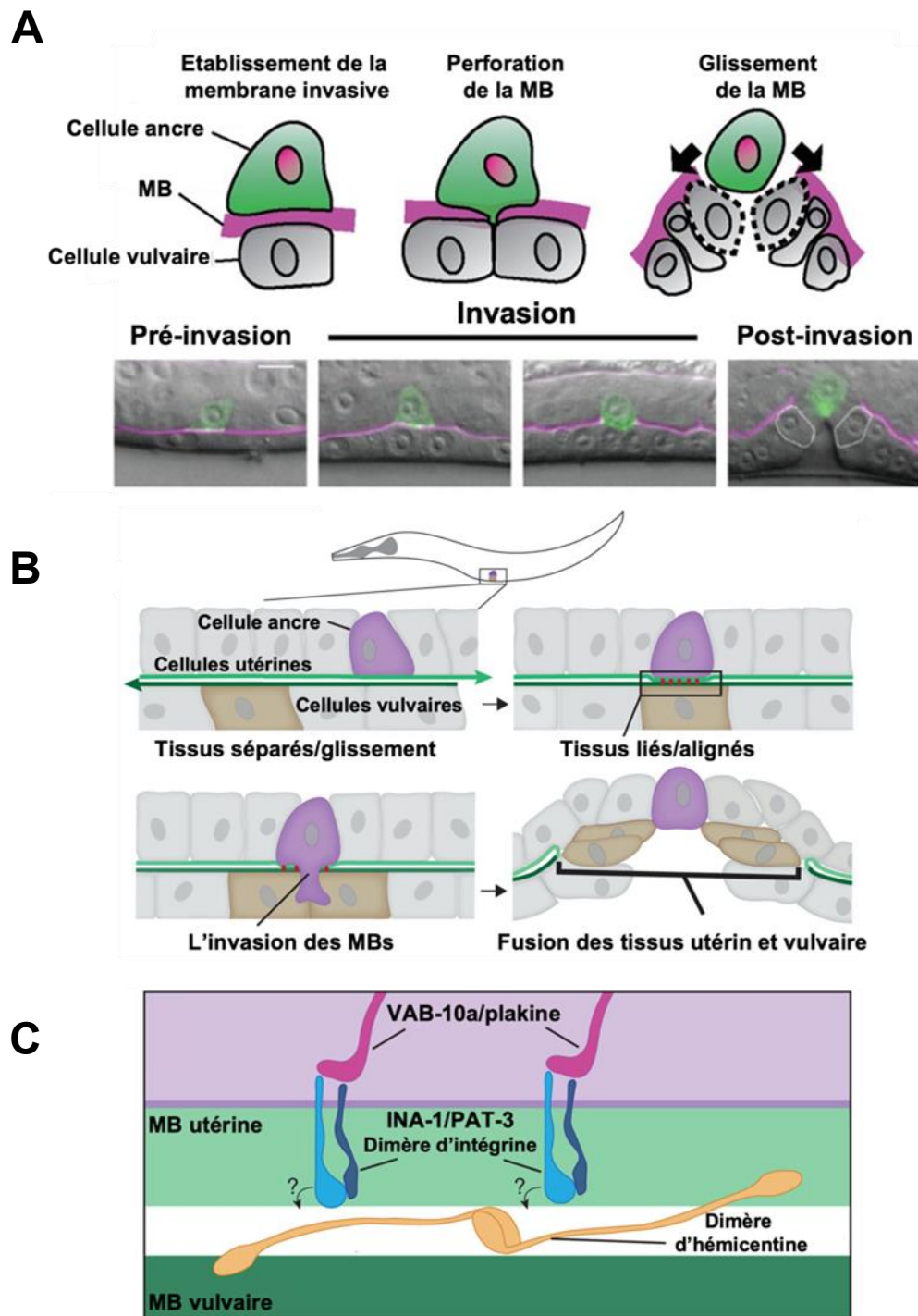


Figure 1.16 L'implication de la MB dans le mécanisme de formation de la connexion vulve-utérus chez *C. elegans*.

Adaptée de (Keeley et Sherwood, 2019; Rowe et Weiss, 2008).

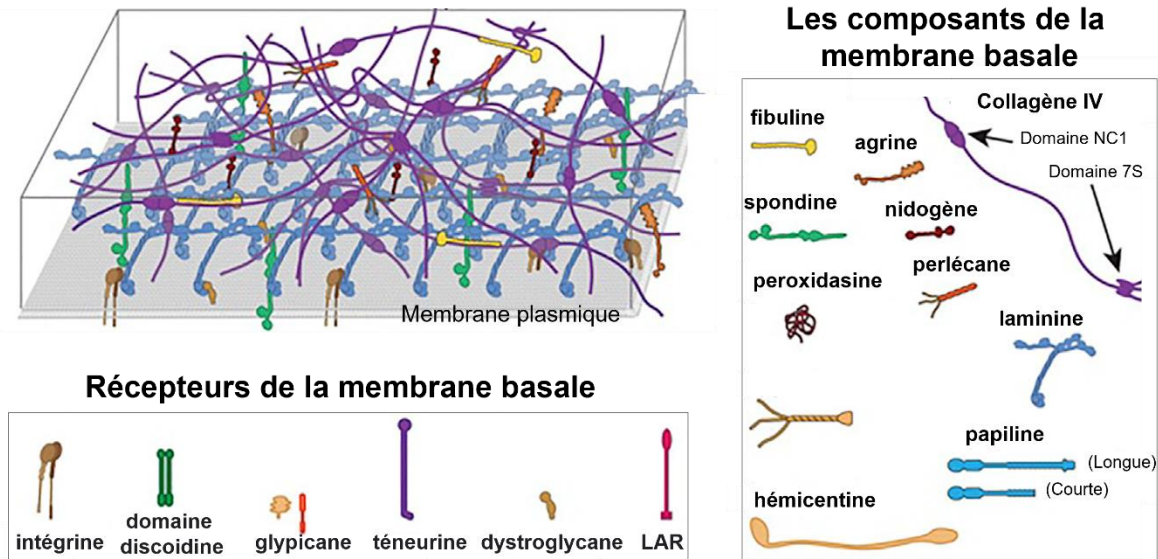


Figure 1.17 La composition de la membrane basale chez *C. elegans*.

LAR : LAR-like receptor tyrosine phosphatase PTP-3. Tiré de (Keeley *et al.*, 2020).

distribution spécifique ne soient pas totalement élucidés, plusieurs études suggèrent que des interactions entre certains composants de la MB conduisent à leur distribution spécifique. Par exemple, la laminine est recrutée à la surface cellulaire grâce à des interactions avec des récepteurs comme l'intégrine et le dystroglycane (Li *et al.*, 2017; Yurchenco, 2011).

En général, la liaison de la laminine à la surface cellulaire induit son auto-assemblage et sa polymérisation, une étape cruciale dans la formation de la MB (Bandzerewicz et Gadomska-Gajadur, 2022; Hohenester et Yurchenco, 2013; Yurchenco, 2011). Une fois formée, la laminine se lie aux nidogènes et aux protéoglycanes tels que le perlécane. L'ensemble du réseau est stabilisé par la polymérisation du collagène IV (Bandzerewicz et Gadomska-Gajadur, 2022). Le collagène IV s'auto-associe à son tour pour former un réseau de polymères distinct de celui de la laminine. Des études ont montré que le recrutement du collagène IV à la MB nécessite la présence de la laminine (Matsubayashi *et al.*, 2017; Poschl *et al.*, 2004; Urbano *et al.*, 2009). Un travail récent chez *C. elegans* montre que l'intégrine facilite la déposition du collagène IV dans la MB du pharynx (Jayadev *et al.*, 2019). Les réseaux de laminine et de collagène IV interagissent par l'intermédiaire de perlécane, nidogène et agrine (Jayadev et Sherwood, 2017; Pozzi, Yurchenco et Iozzo, 2017; Sarrazin, Lamanna et Esko, 2011; Yurchenco, 2011).

1.2.2.3.1 Les composants majeurs : la laminine et le collagène IV

Les deux principaux composants structurels des MB, la laminine et le collagène IV, sont assemblés dans toutes les MB du ver (Kramer, 2005). La laminine est une grande glycoprotéine hétérotrimérique composée de chaînes α , β et γ . *C. elegans* possède deux sous-unités α de laminine (LAM-3 et EPI-1), une sous-unité β (LAM-1) et une sous-unité γ (LAM-2), résultant en deux isoformes de laminine (Figure 1.18). Ces deux formes de laminine chez *C. elegans* ont des patrons de localisation qui se chevauchent mais distincts. Chez l'embryon, la laminine apparait sur les couches germinales, les précurseurs pharyngés et intestinaux, les myoblastes et l'épiderme (Huang CC, 2003). Chez les larves et les adultes, la laminine se trouve sur le pharynx, l'intestin et les cellules excrétrices, la spermathèque, l'anneau nerveux, les cordes nerveuses, les muscles, la gonade, et les cœlomocytes (Huang CC, 2003; Kao *et al.*, 2006; Keeley *et al.*, 2020).

Les mutants nuls de la laminine génèrent des animaux stériles avec une forte mortalité embryonnaire et larvaire. Plusieurs études ont révélé le rôle dans plusieurs autres aspects de développement chez *C. elegans* vu qu'elle joue un rôle essentiel dans l'assemblage des MB (Kao *et al.*, 2006; Rasmussen, Reddy et Priess, 2012).

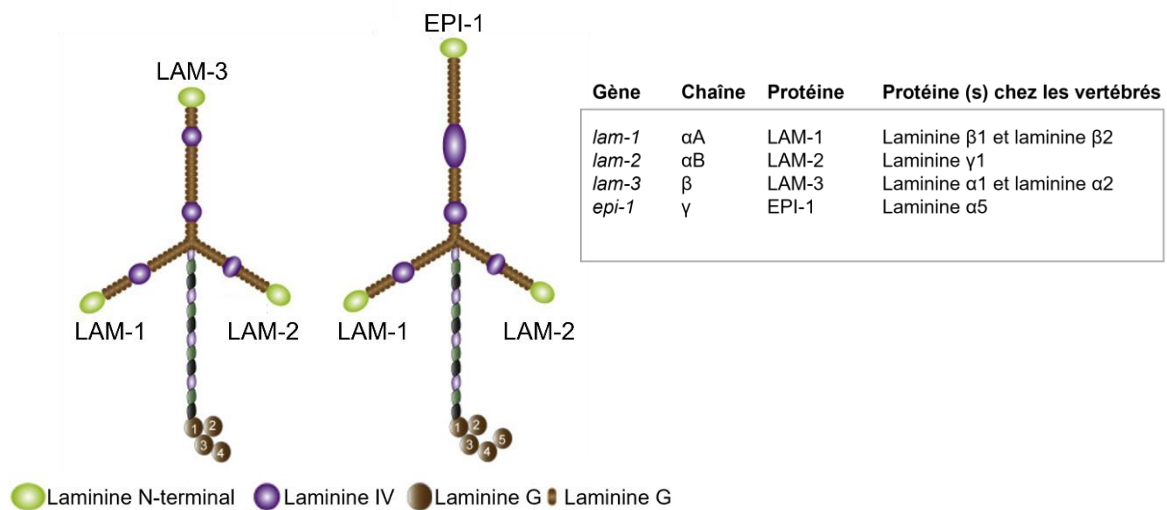


Figure 1.18 La structure de la laminine.

Adapté de (Amran *et al.*, 2021).

Le collagène IV est un composant majeur des MB. Le génome de *C. elegans* code pour une chaîne de collagène de type $\alpha 1$ (EMB-9/ αA) et une chaîne de type $\alpha 2$ (LET-2/ αB), qui s'assemblent pour former une molécule de collagène IV hétérotrimérique composée de deux chaînes EMB-9 et une chaîne LET-2 (Figure 1.19). Le collagène IV présente un court domaine amino-terminal non hélicoïdal, un long domaine de répétition Gly-X-Y et un domaine NC1 carboxy-terminal globulaire hautement conservé.

Des interruptions naturelles dans la région triple hélice sont présentes dans le cas des collagènes non fibrillaires, tels que le collagène IV, ce qui leur confère une plus grande flexibilité (Al-Shaer *et al.*, 2021; Karsdal *et al.*, 2017; Ricard-Blum, 2011). Ces imperfections dans la séquence répétitive conduisent à des distorsions légères de la triple hélice et à des séquences plus longues séparant des régions (Gly-X-Y)_n en domaines repliés indépendants (Hwang *et al.*, 2010).

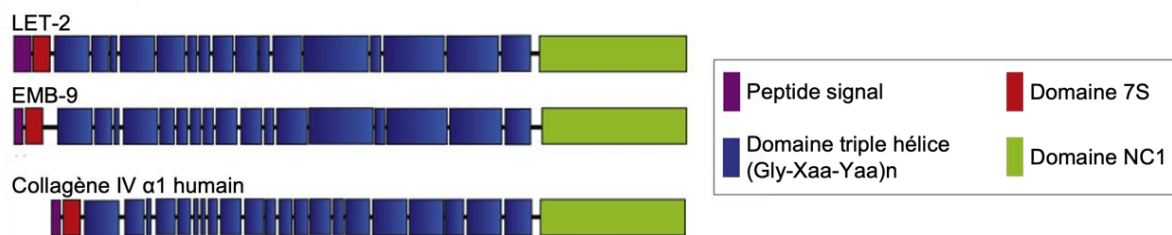


Figure 1.19 Schéma des domaines protéiques du collagène IV.

Adapté de (Amran *et al.*, 2021).

Lors de la sécrétion dans l'espace extracellulaire, deux protomères de collagène IV s'associent via leurs domaines NC1 pour former un hexamère. Puis quatre hexamères s'associent via les extrémités N-terminales 7S. Ces associations sont stabilisées par des liaisons sulfilimines spécifiques entre les domaines NC1, ainsi que par des réticulations disulfure et aldéhyde dans les domaines 7S, renforçant ainsi la structure en réseaux du collagène IV (Anazco *et al.*, 2016; Vanacore *et al.*, 2009) (Figure 1.20A). La peroxydasine est l'enzyme responsable de la formation des liaisons sulfilimines dans le réseau de collagène IV (Cummings *et al.*, 2016; Sundaramoorthy *et al.*, 2002; Vanacore *et al.*, 2009) (Figure 1.20B). Les liaisons sulfilimines jouent un rôle crucial dans la stabilité de la MB au cours du développement de *C. elegans*, ainsi que lors du développement d'autres organismes tels que la drosophile et le poisson zèbre (Bhave *et al.*, 2012; Fidler *et al.*, 2014; Gotenstein *et al.*, 2010).

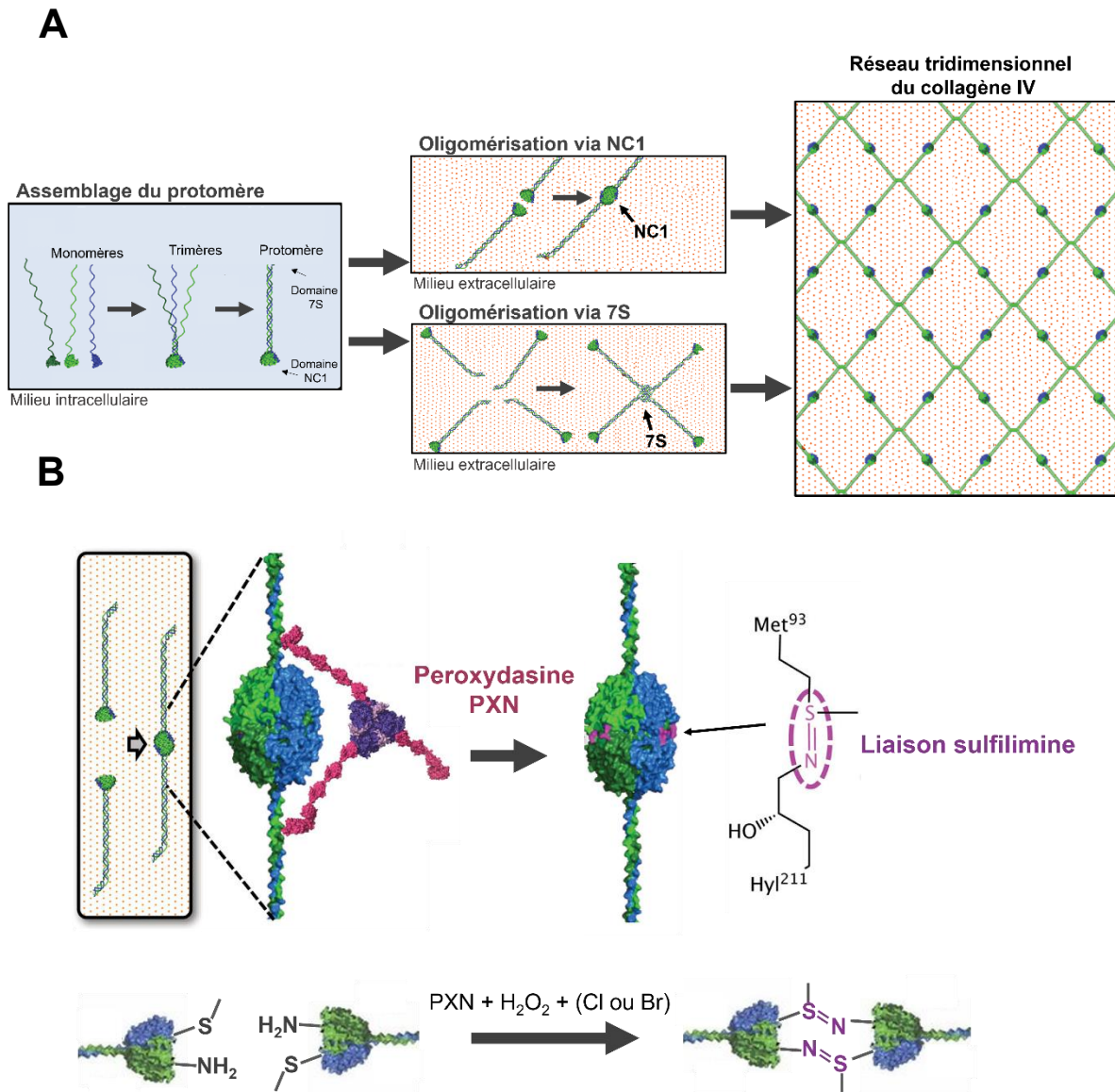


Figure 1.20 Mécanisme de formation du réseau collagène IV.

(A) Les monomères de collagène IV sont traduits et assemblés en protomères à l'intérieur de la cellule. Les domaines NC1 et 7S interviennent dans l'assemblage des protomères en réseau à l'extérieur de la cellule. (B) Mécanisme de formation des liaisons sulfilimines par la peroxydase (PXN) dans la MEC nécessaires pour l'oligomérisation dirigée par NC1. Adapté de (Brown *et al.*, 2017; McCall *et al.*, 2014).

Le collagène IV confère une résistance à la traction aux tissus sous-jacents et se lie à diverses macromolécules, incluant les laminines, les protéoglycanes et les facteurs de croissance, ainsi qu'avec des récepteurs cellulaires, notamment les intégrines. Le collagène IV joue un rôle important dans l'interaction cellule-MB. De nombreuses études ont montré que le collagène IV favorise l'adhésion, active la migration et stimule la prolifération de différents types cellulaires (Khoshnoodi, Pedchenko et Hudson, 2008; Leitinger et Hohenester, 2007). En plus de fournir une intégrité structurelle, les réseaux de collagène IV fonctionnent comme des échafaudages moléculaires, liant d'autres composants de la MB, des facteurs de croissance et des enzymes extracellulaires (Brown *et al.*, 2017; Parkin *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008a). Des défauts dans le réseau de collagène IV entraînent une déstabilisation des MB et une altération de la fonction tissulaire (Fidler *et al.*, 2014; Graham *et al.*, 1997; Gupta, Graham et Kramer, 1997; Poschl *et al.*, 2004).

1.2.2.3.2 Autres composants

1.2.2.3.2.1 Les glycoprotéines

Des glycoprotéines font également partie de la MB chez *C. elegans*, telles que le nidogène, la fibuline, l'hémicentine, la F-spondine, le SPARC ostéonectine/SPARC et la papiline (Fitzgerald et Schwarzbauer, 1998; Kawano *et al.*, 2009; Kim et Wadsworth, 2000; Muriel *et al.*, 2005; Vogel et Hedgecock, 2001; Woo *et al.*, 2008).

Le nidogène est localisé dans toutes les MB et se lie à la fois à la laminine et au collagène de type IV *in vitro* (Aumailley *et al.*, 1989; Fox *et al.*, 1991; Kang et Kramer, 2000). Chez *C. elegans*, cependant, les mutants nuls du nidogène présentent une embryogenèse normale, sont viables et forment des MB contenant à la fois de la laminine et du collagène IV (Kim et Wadsworth, 2000). Le nidogène est impliqué par exemple dans le développement de la gonade et l'organisation des synapses du ver (Ackley *et al.*, 2003; Kubota *et al.*, 2008). Un gène unique chez *C. elegans*, *fbl-1*, code pour la fibuline et ressemble le plus à la fibuline-1 des vertébrés (Barth *et al.*, 1998). Chez *C. elegans*, la fibuline joue un rôle dans le développement de la gonade (Hesselson *et al.*, 2004; Kubota *et al.*, 2012).

1.2.2.3.2.2 Les protéoglycanes

Le perlécane et l'agrine sont deux protéoglycanes à chaînes d'héparane sulfate présents dans les MB de *C. elegans*. Le perlécane, codé par le gène *unc-52*, régule divers comportements cellulaires, comme le guidage axonal et la migration des cellules des extrémités distales de la gonade (Merz *et al.*, 2003; Tang et

Wadsworth, 2014; Yang *et al.*, 2014). Le perlécane est essentiel pour la viabilité embryonnaire, notamment en organisant l'attachement des cellules musculaires à l'épiderme. Il se concentre sous les corps denses musculaires et les lignes M, permettant la transmission de la force musculaire vers l'épiderme pour le mouvement de l'animal (Francis et Waterston, 1991; Mullen *et al.*, 1999; Rogalski *et al.*, 1993). L'absence du perlécane empêche la formation des attaches musculaires, entraînant un arrêt embryonnaire paralysé et mortel (Hresko, Williams et Waterston, 1994; Rogalski *et al.*, 1995; Williams et Waterston, 1994). L'agrine est exprimée dans les neurones de la tête, la gonade et le pharynx (Hrus *et al.*, 2007), mais son rôle chez *C. elegans* n'a pas encore été défini.

1.2.2.3.2.3 Les récepteurs cellulaires

Les récepteurs cellulaires des composants de la MB sont principalement les intégrines, le dystroglycane et la teneurine.

Les intégrines sont des complexes transmembranaires hétérodimériques composés d'une sous-unité α et β . *C. elegans* code pour deux sous-unités α -intégrine (INA-1 et PAT-2) et une sous-unité β -intégrine (PAT-3) qui ne forment que deux récepteurs d'intégrine hétérodimériques proposés comme étant capables de se lier à des constituants de la MB, tels que la laminine (Kramer, 2005; Yurchenco, 2011). Ces deux complexes d'intégrines sont exprimés dans de nombreuses cellules, dont par exemple dans les cellules de l'extrémité distale de la gonade, et régulent divers aspects de la migration cellulaire, comme est le cas de plusieurs neurones (Baum et Garriga, 1997; Meighan et Schwarzbauer, 2007).

Chez *C. elegans*, le dystroglycane/DGN-1 est exprimé dans l'épithélium et les neurones. Les mutants nuls de *dgn-1* présentent des défauts dans la morphogenèse épithéliale, le guidage des axones des motoneurones et la maintenance neuroanatomique (Johnson et Kramer, 2012).

Une autre molécule d'adhésion cellulaire qui pourrait jouer le rôle de récepteur pour les composants de la MB est la teneurine (Topf et Chiquet-Ehrismann, 2011). Le gène codant pour la teneurine chez *C. elegans* est *ten-1*. La teneurine est importante pour la migration des cellules épidermales, la migration et le guidage neuronal, la fasciculation, ainsi que le développement des gonades (Topf et Chiquet-Ehrismann, 2011). La réduction de la fonction de *ten-1* chez *C. elegans* entraîne une grande létalité embryonnaire, avec des défauts développementaux chez les embryons survivants, notamment des défauts dans le guidage des axones moteurs (Drabikowski, Trzebiatowska et Chiquet-Ehrismann, 2005).

1.2.2.3.2.4 Les enzymes régulatrices de la MEC

Chez *C. elegans*, les ADAMTS jouent également un rôle régulateur de la MB. Le génome de *C. elegans* code pour cinq ADAMTS : GON-1, ADT-2, ADT-1, MIG-17 et ADT-3 (Jarriault et Greenwald, 2005; Kelwick *et al.*, 2015). Ces ADAMTS sont impliquées dans l'organogenèse en remodelant la MEC (Ihara et Nishiwaki, 2007; Jafari *et al.*, 2010; Kawano *et al.*, 2009; Kubota *et al.*, 2019; Kubota *et al.*, 2008). Par exemple, GON-1 et MIG-17 (Figure 1.21) sont essentielles pour la migration des cellules de l'extrémité distale de la gonade durant leur développement (Blelloch *et al.*, 1999; Hesselson *et al.*, 2004; Jarriault et Greenwald, 2005; Kubota *et al.*, 2012). Une autre protéase, ADT-1, joue un rôle dans la morphogenèse des organes copulateurs masculins en remodelant la MEC (Kuno *et al.*, 2002). ADT-2, une autre ADAMTS, est impliquée dans la maintenance de la structure normale de la cuticule pour réguler la taille du corps (Fernando *et al.*, 2011).

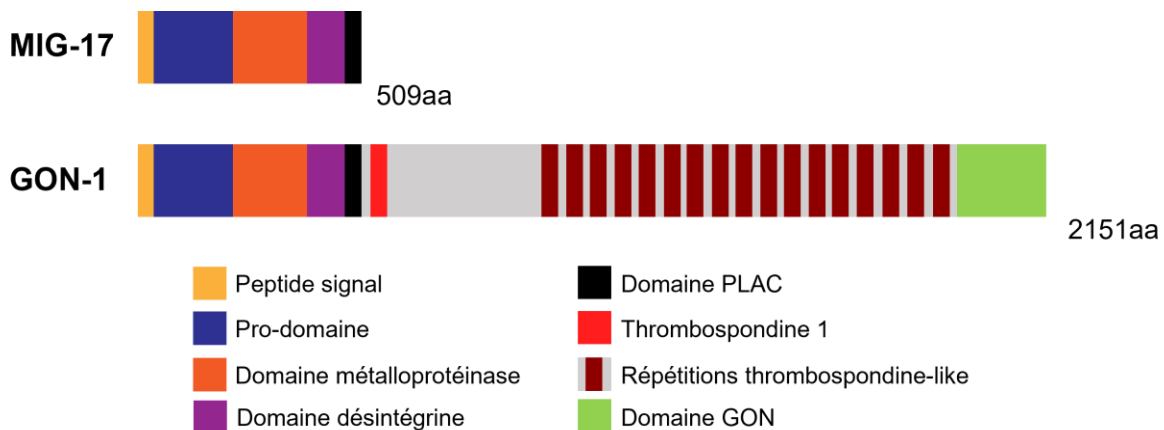


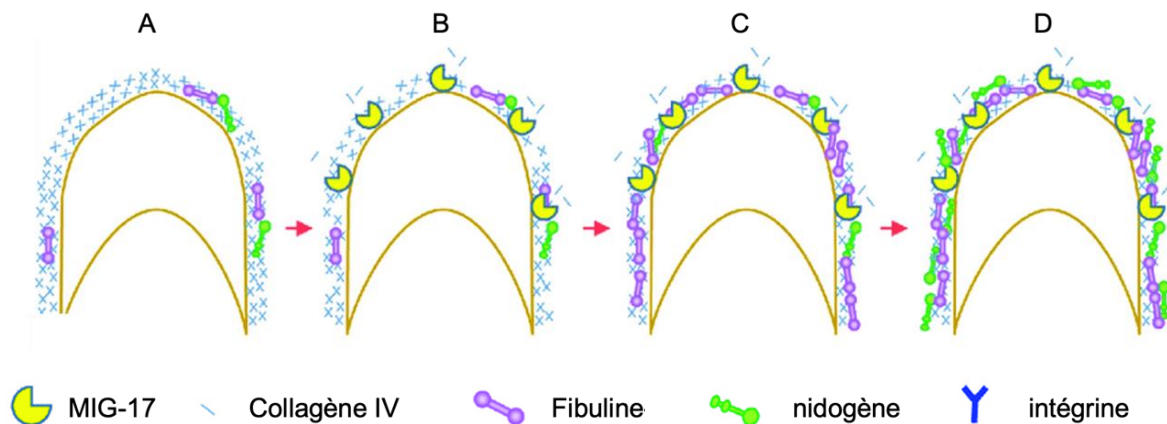
Figure 1.21 Schéma des domaines protéiques de deux ADAMTS les plus étudiées chez *C. elegans*.

Basée sur les séquences de (Fan *et al.*, 2020; Kim et Nishiwaki, 2015).

GON-1 et MIG-17 sont toutes deux impliquées dans la migration cellulaire au cours de l'organogenèse et agissent probablement en dégradant localement la MB. Par exemple, pour l'ADAMTS MIG-17, plusieurs études ont suggéré qu'elle fonctionne comme une collagénase dans le contexte de la migration des cellules de l'extrémité distale de la gonade (Figure 1.22), une fonction également attribuée à GON-1 (Kubota *et al.*, 2019). MIG-17 est sécrétée par les muscles, se localise et fonctionne dans la MB comme celle entourant la cellule de l'extrémité distale de la gonade (Nishiwaki, Hisamoto et Matsumoto, 2000). Il a été rapporté que MIG-17 est sécrétée par les muscles sous une forme d'une proenzyme inactive, qui est ensuite incorporée dans la MB des gonades. L'activation de la proenzyme MIG-17 résulte du clivage de son pro-domaine, qui se produit dans la MB gonadique au stade L3 (Ihara et Nishiwaki, 2007; Ihara et Nishiwaki,

2008). Il a été suggéré que MIG-17, une fois activée, recrute la fibuline à la MB (Kubota *et al.*, 2008). De plus, la dégradation du collagène IV par MIG-17 favoriserait cette accumulation de la FBL-1 dans la MB (Imanishi *et al.*, 2020). La FBL-1 recrutée à la MB recrute par la suite le nidogène, ce qui faciliterait la migration directionnelle de la cellule de l'extrémité distale de la gonade (Figure 1.22) (Kubota *et al.*, 2008). Les ADAMTS GON-1 et MIG-17 ont été également étudiées pour leur rôle dans la formation et la maintenance des synapses (Kubota *et al.*, 2019; Qin, Liang et Ding, 2014).

Figure 1.22 Mécanisme d'action de MIG-17 dans le remodelage de la MB des gonades.



Adapté de (Imanishi *et al.*, 2020).

1.3 La protéine extracellulaire MIG-6/papiline

1.3.1 Structure et distribution de MIG-6/papiline

La papiline est une glycoprotéine sulfatée conservée présente dans la MB de plusieurs espèces incluant *C. elegans*, la drosophile, la souris et l'humain (Fessler *et al.*, 2004; Kramerova *et al.*, 2000; Laje *et al.*, 2009; Saunders *et al.*, 2014; Souslova *et al.*, 2013; Tola *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021). La papiline chez *C. elegans*, désignée sous le nom de MIG-6, est une protéine matricielle essentielle à la survie (Kramerova *et al.*, 2000). MIG-6/papiline existe sous deux isoformes principales : l'isoforme longue MIG-6L et l'isoforme courte MIG-6S (Figure 1.23).

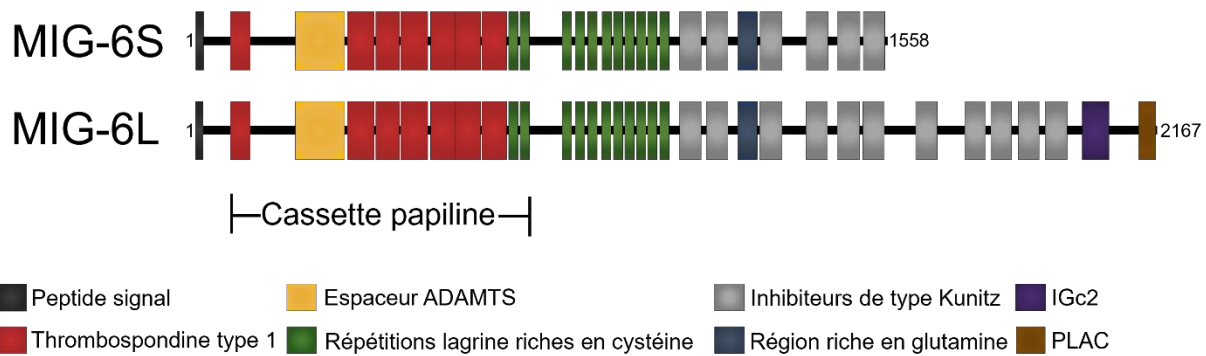


Figure 1.23 Schéma des domaines protéiques des principales isoformes de la protéine MIG-6/papiline.

Les structures sont basées sur les séquences de WormBase et (Kawano *et al.*, 2009).

La protéine MIG-6 de *C. elegans* est constituée de plusieurs domaines structuraux (Kawano *et al.*, 2009). Elle contient un peptide signal à son extrémité N-terminale, sans domaine transmembranaire prédit. Ce peptide signal est suivi de plusieurs domaines répétitifs de thrombospondine de type 1 (TSP1), puis d'une série de domaines riches en cystéine de type lagrine, et enfin de domaines inhibiteurs de protéinase à sérine de type Kunitz. Contrairement à MIG-6S, l'isoforme longue MIG-6L comporte cinq domaines supplémentaires de Kunitz à son extrémité C-terminale, ainsi qu'un domaine de type Ig-C2 et un domaine PLAC ou lacunine (Nardi *et al.*, 1999). Le nombre de copies de chacun de ces domaines varie entre les différentes papilines d'espèces différentes; par exemple la papiline des mammifères ne possède qu'un seul domaine de Kunitz (Kawano *et al.*, 2009). Au sein d'une même espèce, le nombre de répétitions peut également varier, générant des isoformes présentant des localisations différentes (Fessler *et al.*, 2004; Kramerova, Kramerov et Fessler, 2003). De plus, des domaines supplémentaires peuvent exister tels que la région Ser/Thr de la papiline de la drosophile (Kawano *et al.*, 2009).

L'organisation globale des domaines MIG-6 chez *C. elegans* est similaire à celle de la papiline retrouvée chez la drosophile et chez l'humain (Kramerova *et al.*, 2000). De plus, d'autres protéines chez les mammifères, similaires à la papiline des invertébrés, ont récemment été identifiées sous les noms de punctine 1 ou ADAMTS-Like-1 (ADAMTSL-1) et punctine 2 (ou ADAMTSL-3) (Hall *et al.*, 2003; Hirohata *et al.*, 2002).

MIG-6/papiline fait partie de la famille des ADAMTSL (Kelwick *et al.*, 2015; Rypdal *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2021). Les protéines ADAMTS and ADAMTSL présentent en commun un domaine conservé, appelé "cassette papiline", et constitué de domaines TSP1 (Figure 1.23) (Fessler *et al.*, 2004; Kramerova *et al.*,

2000; Nardi *et al.*, 1999). Les ADAMTS-like ne présentent pas de domaine catalytique (Apte et Parks, 2015; Kelwick *et al.*, 2015).

Le gène *mig-6* possède un promoteur pour les différentes isoformes, et dont l'épissage alternatif et autres formes de régulation semblent dicter l'expression des isoformes. MIG-6S est exprimée par les muscles, la cellule mésodermique de la tête (HMC), les cellules gliales GLR, les neurones CAN et les cœlomocytes (Kawano *et al.*, 2009; Keeley *et al.*, 2020). MIG-6L est exprimée de façon plus restreinte, par les cellules de l'extrémité distale de la gonade (Kawano *et al.*, 2009; Keeley *et al.*, 2020). Pendant l'embryogenèse, les isoformes de la papiline ont des localisations différentes. MIG-6L est présente dans toutes les MB alors que la MIG-6S est retrouvée dans la MB entourant les muscles de la paroi corporelle (Keeley *et al.*, 2020). Plus tard dans le développement, MIG-6S est détectée dans les MB de la gonade, du pharynx, de l'intestin, des muscles de la paroi corporelle, ainsi que le long du tractus nerveux latéral (Kawano *et al.*, 2009; Keeley *et al.*, 2020; Ramirez-Suarez *et al.*, 2019).

1.3.2 Fonctions connues de MIG-6/papiline

La papiline, la laminine et le nidogène, sont les premiers composants détectés dans la MB qui entoure tous les tissus au cours de l'embryogenèse (Campbell *et al.*, 1987; Keeley *et al.*, 2020). MIG-6S, tout comme le collagène IV et la laminine, a été récemment caractérisée parmi les composants les plus stables de la MB. Elle semble contribuer à la stabilité de l'échafaudage structurel dans lequel les autres molécules dynamiques de la MB peuvent se déplacer (Keeley *et al.*, 2020; Yurchenco, 2011). Cependant, MIG-6 n'est pas essentielle à la formation ou à l'assemblage de la MB (Kramerova *et al.*, 2000), ce qui suggère qu'elle joue plutôt un rôle régulateur.

Des recherches menées chez la drosophile et *C. elegans* ont permis d'étudier le rôle de la papiline dans divers contextes développementaux, mais son rôle mécanistique exact dans ces fonctions n'est pas encore compris. Ci-après, sont présentés les rôles de la papiline identifiés jusqu'à présent.

1.3.2.1 Rôles de MIG-6/papiline dans la morphogenèse et l'organogenèse

La papiline est essentielle au développement embryonnaire de la drosophile et de *C. elegans* (Fessler *et al.*, 2004). Chez la drosophile, la déplétion de la papiline entraîne des défauts de développement musculaire ainsi qu'une réduction de la survie des larves. De plus, l'expression ectopique de la papiline conduit à des anomalies dans la formation des tubes de Malpighi et de la trachée, pouvant même entraîner

la mort (Fessler *et al.*, 2004; Kramerova *et al.*, 2000). Il a été également suggéré que la papiline influence les réarrangements cellulaires.

La papiline est également impliquée pour l'organogenèse en affectant la migration cellulaire chez *C. elegans* lors de la formation de la gonade, où les deux isoformes de MIG-6 sont importantes dans la migration des cellules de l'extrémité distale (Kawano *et al.*, 2009). MIG-6L intervient au début de la migration, tandis que MIG-6S joue un rôle dans la direction de cette migration. Il a été suggéré que MIG-6 contribue à ces aspects de la migration des cellules de l'extrémité distale en régulant les capacités de protéinases spécifiques telles que les ADAMTS à remodeler la MB (Kawano *et al.*, 2009). MIG-6 est également importante pour la croissance de la gonade (Keeley *et al.*, 2020). Par ailleurs, MIG-6 semble jouer un rôle dans le développement du pharynx et la régulation de sa taille, bien que les mécanismes sous-jacents restent encore à élucider (Jafari *et al.*, 2010).

1.3.2.2 Régulation de la localisation et de l'activité des enzymes ADAMTS

Dans le contexte du développement chez *C. elegans*, la papiline affecte les niveaux, la distribution et la localisation de certaines ADAMTS dans la MB. Par exemple, les niveaux de l'ADAMTS GON-1 dans la MB des gonades augmente après la déplétion de *mig-6* (Keeley *et al.*, 2020). MIG-6 régule également la localisation de MIG-17/ADAMTS dans la MB des gonades (Kawano *et al.*, 2009). Dans ce contexte du développement de la gonade, il a été suggéré que ces ADAMTS favorisent l'élimination du collagène IV de la MB, contribuant ainsi à la formation d'une MEC suffisamment flexible pour permettre la croissance normale de cet organe (Horne-Badovinac, 2020; Kawano *et al.*, 2009).

En outre, il a été démontré *in vitro* que la papiline chez la drosophile interagit avec la procollagène N-protéase ADAMTS2, jouant un rôle dans la formation des fibrilles de collagène, et l'inhibe de manière non compétitive (Kramerova *et al.*, 2000).

1.3.2.3 Développement des arborisations dendritiques chez *C. elegans*

Le gène *mig-6* est impliquée dans le développement d'un neurone chez *C. elegans* en régulant la fasciculation au niveau du tract nerveux latéral. L'analyse de mutants démontre que *mig-6* fonctionne à partir des neurones dans la même voie génétique que la nétrine, pour assurer la fasciculation de l'axone de PVD avec le fascicule latéral (Ramirez-Suarez *et al.*, 2019) (Figure 1.24).

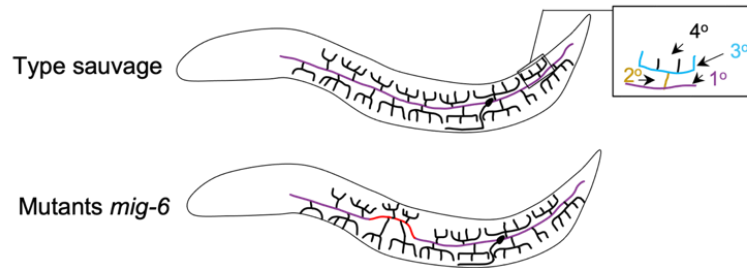


Figure 1.24 Le rôle de MIG-6/papiline dans le développement des dendrites chez *C. elegans*.

Schémas réalisés en se basant sur les résultats de (Ramirez-Suarez *et al.*, 2019).

1.3.2.4 Association de la papiline à certaines pathologies

Chez l'humain, bien que la fonction précise de la papiline n'ait pas encore été étudiée, des recherches en génétique (études d'association pangénomique), en protéomique, ainsi que des études sur les niveaux d'expression, montrent une association de la papiline à diverses pathologies et dysfonctionnements. Par exemple, la papiline est associée à la dépression et aux idées suicidaires. Par étude d'association pangénomique, la papiline est identifiée comme marqueur génétique potentiellement liés à l'apparition d'idées suicidaires chez certains patients traités par un antidépresseur (Laje *et al.*, 2009; Souslova *et al.*, 2013). La papiline est également associée au glaucome à travers une étude qui a examiné les protéines de l'iris chez des patients atteints de glaucome, où plusieurs protéines montraient des niveaux d'expression différents, notamment celles liées à la MEC telles que la papiline (Semba *et al.*, 2021). Une autre étude a impliqué la papiline dans un processus de régénération neuronale. L'étude compare la régénération de la moelle épinière chez *Monodelphis domestica* à 7 et 28 jours après la naissance (Saunders *et al.*, 2014). À 7 jours, les axones se régénèrent, mais pas à 28 jours. À cet âge, des gènes liés à l'inflammation et à la matrice extracellulaire, dont la papiline, sont fortement exprimés. Cela suggère que la papiline pourrait freiner la régénération nerveuse avec l'âge (Saunders *et al.*, 2014). D'autres études suggèrent également un rôle dans le syndrome de Weill-Marchesani causé par une mutation dans le gène de la fibrilline (Sengle *et al.*, 2012). Ce syndrome perturbe la liaison entre la fibrilline-1 et plusieurs protéines de la MEC, dont la papiline. La perte d'interaction avec la papiline et les protéines ADAMTSL modifie le microenvironnement cutané, affectant la production de collagène et l'homéostasie tissulaire (Sengle *et al.*, 2012). De plus la papiline est associée au prolapsus (Tola *et al.*, 2018), au cancer (Zhang *et al.*, 2021) et aux maladies cardiovasculaires (Rypdal, Apte et Lunde, 2024; Rypdal *et al.*, 2022).

1.4 La matrice extracellulaire dans le système nerveux

1.4.1 Distribution, composition et organisation

La MEC représente de 10 à 20 % du volume du cerveau (Nicholson et Syková, 1998). Chez l'humain, il existe trois principaux types de MEC dans le système nerveux: la MB, la matrice diffuse ou interstitielle, et la matrice condensée ou réseaux périneuronaux (Sorg *et al.*, 2016). La MB délimite la frontière entre les tissus endothéliaux et parenchymateux, tandis que la matrice interstitielle est présente dans les espaces interstitiels neuronaux du parenchyme cérébral. Les réseaux périneuronaux (PNN), quant à eux, se forment autour de neurones spécifiques dans le cerveau et la moelle épinière (Celio *et al.*, 1998; Deepa *et al.*, 2006). La composition de chacune de ces MEC est présentée dans la figure 1.25.

Ci-après, je me focaliserai à décrire les PNN, étant donné qu'ils représentent la MEC la plus étudiée dans le système nerveux chez les mammifères, y compris chez l'humain (Lupori *et al.*, 2023). Les PNN sont des assemblages spécialisés de protéines de la MEC qui forment des structures hautement condensées en forme de réseaux autour des corps cellulaires et des dendrites proximales de neurones spécifiques dans diverses régions du cerveau et de la moelle épinière (Brauer, Werner et Leibnitz, 1982; Celio *et al.*, 1998; Hartig, Brauer et Bruckner, 1992; Kwok *et al.*, 2011; Shen, 2018). En général, les PNN se trouvent principalement autour d'interneurones GABAergiques producteurs de la parvalbumine dans des régions du cerveau telles que le cortex et le striatum (Baker, Gray et Richardson, 2017; Cowan *et al.*, 1990; Dityatev *et al.*, 2007; Hartig, Brauer et Bruckner, 1992; Schuppel *et al.*, 2002). Cependant, les PNN entourent également les neurones glutamatergiques (Horii-Hayashi *et al.*, 2015; Wegner *et al.*, 2003; Yamada, Ohgomori et Jinno, 2015).

Les PNN se forment au cours du développement et leur composition ainsi que leur abondance sont hétérogènes et variables dans les différentes parties du système nerveux (Bruckner et Grosche, 2001; Bruckner *et al.*, 2000; Matthews *et al.*, 2002; Seeger *et al.*, 1994; Vitellaro-Zuccarello *et al.*, 2007). Le marquage des PNN montre des structures lâches dans certaines régions et plus denses dans d'autres, comme la moelle épinière (Vitellaro-Zuccarello *et al.*, 2007).

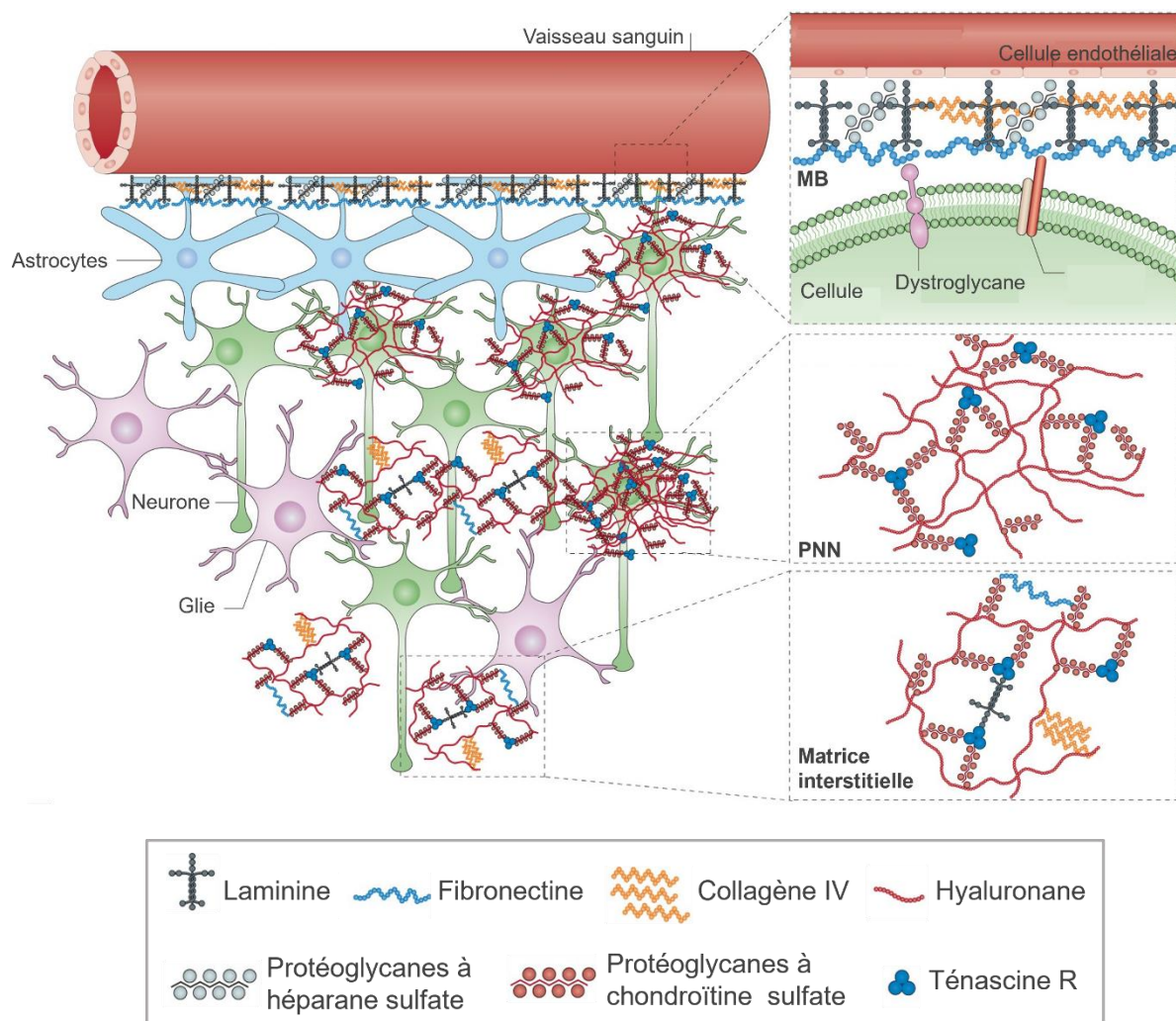


Figure 1.25 La matrice extracellulaire dans le système nerveux.

MB : Membrane basale, PNN : Réseau périneuronal. Adapté de (De Luca et Papa, 2017).

Les PNN sont constitués d'un squelette formé de chaînes d'acide hyaluronique auxquelles sont associées des protéines de liaisons qui se lient à la fois aux chaînes d'acide hyaluronique et aux protéoglycannes de type chondroïtine sulfate, principalement les lecticanes tels que l'aggrécane, le brévicane, le neurocane et le versicane (Carulli *et al.*, 2020; Jakovljević *et al.*, 2021; Sorg *et al.*, 2016; Testa, Prochiantz et Di Nardo, 2019; Wen *et al.*, 2018). En outre, les protéoglycannes sont liés par des protéines de la famille des ténascines (Jakovljević *et al.*, 2021; Testa, Prochiantz et Di Nardo, 2019). Les constituants des PNN sont produits par les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes environnants (Testa, Prochiantz et Di Nardo, 2019). Tout comme d'autres types de MEC, les PNN subissent un remodelage sous l'action des MMP ou des

ADAMTS dans divers contextes physiologiques tels que la plasticité neuronale, et pathologiques comme dans le cas de certaines maladies telles que l'épilepsie (Auer *et al.*, 2025; Jakovljević *et al.*, 2021; Levy *et al.*, 2015).

Les structures neuronales chez d'autres organismes tels que *C. elegans* sont également entourées par une MEC, généralement une MB (Kramer, 2005; White *et al.*, 1986). Par exemple, une MB entoure les ganglions nerveux situés dans la tête du ver, ainsi que les faisceaux d'axones formant les cordons nerveux dorsal et ventral, ainsi que dans les environnements synaptiques (Figure 1.26). Bien que les différentes MB ne soient pas encore entièrement caractérisées, il est reconnu que certains constituants de la MEC jouent un rôle important dans les synapses et d'autres structures neuronales (Ackley *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2020; Kurshan *et al.*, 2014; Qin, Liang et Ding, 2014).

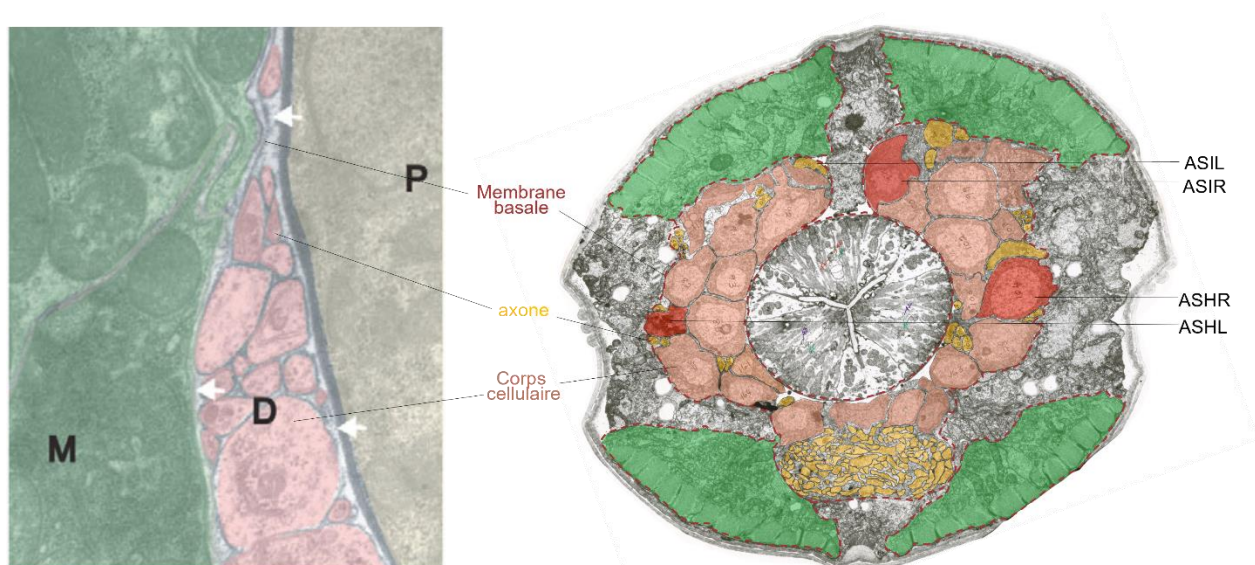


Figure 1.26: Coupes de microscopie électronique montrant le contexte tissulaire des neurones de la tête chez *C. elegans*.

À gauche, un détail de la coupe transversale complète montrée à droite. P, Pharynx (colorié en brun); D, Dendrites (en rose à gauche, et en jaune à droite) de neurones sensoriels (coloriés en couleur pêche ou rouge à droite); M, Muscles (coloriés en vert). Adapté de (Bénard *et al.*, 2006; White *et al.*, 1986).

1.4.2 Fonctions de la MEC dans le système nerveux

Plusieurs travaux se sont concentrés à l'étude du rôle de la MEC, notamment des PNN, dans la régulation de la fonction du système nerveux chez les mammifères. Les PNN, agissant comme barrière physique, repoussent certaines molécules anioniques, telles que l'oxygène actif lutant ainsi contre le stress oxydatif notamment au niveau des synapses (Balogh *et al.*, 2003; Cabungcal *et al.*, 2013; Morawski *et al.*, 2004).

Les charges négatives de surface contribuent également au potentiel membranaire au repos en générant un gradient de concentration ionique (Testa, Prochiantz et Di Nardo, 2019). Grâce à ces charges négatives, les PNN jouent aussi un rôle de réservoir pour les ions positifs, influençant ainsi le potentiel membranaire (Morawski *et al.*, 2015).

En outre, le PNN est un composant important au fonctionnement des synapses (Dityatev et Rusakov, 2011; Geissler *et al.*, 2013; Korotchenko *et al.*, 2014). Grâce à ce rôle de barrière, les PNN influencent la diffusion latérale de plusieurs récepteurs tels que le récepteur AMPA au glutamate (Frischknecht *et al.*, 2009; McRae et Porter, 2012) affectant ainsi la fonction synaptique. Les PNN participent également au contrôle de la synaptogenèse et à la stabilisation des circuits neuronaux régulant ainsi l'activité neuronale (Bosiacki *et al.*, 2019; Carceller *et al.*, 2020; Wang et Fawcett, 2012).

Les PNN sont importants dans la régulation de la plasticité du système nerveux au cours du développement postnatal, la régénération après des traumatismes ainsi que dans les processus liés à l'apprentissage et à la mémoire (Kwok *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2024; Lipachev *et al.*, 2019; Sanchez *et al.*, 2024; Shen, 2018). Il est bien décrit que les PNN apparaissent au cours des périodes de développement (Balmer *et al.*, 2009; Bruckner *et al.*, 1993; Carulli *et al.*, 2010; Dityatev *et al.*, 2007) et limitent la plasticité à l'âge adulte (Pizzorusso *et al.*, 2002; Wang et Fawcett, 2012). Des expériences de dégradation des PNN ont permis de restaurer des états juvéniles de plasticité, facilitant ainsi la croissance des axones ("axonal sprouting") et permettant aux neurones endommagés de fonctionner à nouveau (Sorg *et al.*, 2016). Le dysfonctionnement des PNN et des neurones à parvalbumine a été associé à plusieurs troubles neurologiques tels que la schizophrénie, les désordres bipolaires, l'épilepsie, l'autisme, et la toxicomanie (Bitanirwe et Woo, 2014; Slaker, 2016 #1042; Brandenburg et Blatt, 2022; Jakovljević *et al.*, 2021; McRae et Porter, 2012).

Malgré toutes ces avancées remarquables dans la compréhension de la composition et de la dynamique de la MEC et de son influence sur la biologie cellulaire et la physiologie des tissus, le rôle de la régulation de la MEC sur le système nerveux, notamment le maintien de son architecture à long terme, reste largement inexploré. L'objectif de recherche de cette thèse doctorale était justement de comprendre les bases moléculaires de la maintenance de l'architecture neuronale, en hypothétisant que divers facteurs interagissent pour réguler l'état de la matrice extracellulaire environnant les structures neuronales, et ainsi impactant le maintien de leur organisation sur le long terme.

Ainsi, le travail de cette thèse a révélé l'importance de la MEC dans ce mécanisme et phénomène. Ci-dessous le chapitre 2 démontre l'implication d'une molécule conservée, nommée MIG-6/papiline, qui régule l'état de la MEC dans la maintenance neuronale. Par la suite le chapitre 3 explore l'interaction entre le gène *mig-6/papiline* et la voie TGF- β , bien connue d'être impliquée dans les états fibrotiques.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1 - Remodeling of extracellular matrix collage IV by MIG-6/papilin regulates neuronal architecture

Malika NADOUR^{1,2}, Robert I. VALETTE REVENO LEATIS^{1,2}, Marie BIARD^{1,2}, Noémie FRÉBAULT^{1,2},
Lise RIVOLLET^{1,2}, Philippe ST-LOUIS^{1,2}, Cassandra R. BLANCHETTE³, Andrea THACKERAY³,
Paola PERRAT³, Carlo BEVILACQUA⁴, Robert PREVEDEL⁴⁻⁷, Laurent CAPPADOCIA^{2,8,9},
Georgia RAPTI^{5-7,10}, Maria DOITSIDOU¹¹, Claire Y. BÉNARD^{1,2,3,*}

¹ Université du Québec à Montréal, Department of Biological Sciences, Montreal, QC, Canada

² Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC Research Center), Université du Québec à Montréal, Montreal, QC, Canada

³ University of Massachusetts Chan Medical School, Department of Neurobiology, MA, USA

⁴ Cell Biology and Biophysics Unit, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany

⁵ Developmental Biology Unit, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany

⁶ Epigenetics and Neurobiology Unit, European Molecular Biology Laboratory, Rome, Italy

⁷ Interdisciplinary Center of Neurosciences, Heidelberg University, Heidelberg, Germany

⁸ Université du Québec à Montréal, Department of Chemistry, Montreal, QC, Canada

⁹ Quebec Network for Research on Protein Function, Engineering and Applications (PROTEO), QC, Canada

¹⁰ FENS-KAVLI Network of Excellence, Brussels, Belgium

¹¹ University of Edinburgh, Centre for Discovery Brain Sciences, Edinburgh, Scotland

Manuscrit soumis pour publication à Nature Communications le 05 février 2025.

Implication des différents auteurs aux travaux de l'article 1 (l'ordre de citation des auteurs reflètent l'importance de leur contribution)

Figure	Design expérimental	Construction de outils moléculaires ou génétiques	Acquisition des données et Élaboration de la figure
1A	Lise Rivolet, Malika Nadour,	Paola Perrat, Cassandra R. Blanchette	Lise Rivollet, Malika Nadour
1B-C	Andrea Thackeray, Paola Perrat, Cassandra R. Blanchette	Andrea Thackeray, Paola Perrat, Cassandra R. Blanchette	Andrea Thackeray, Malika Nadour
1D-D`	-	-	Malika Nadour , Marie Biard, Lise Rivolet
1 D``- D````	Laurent Cappadocia	-	Laurent Cappadocia
1E	Malika Nadour , Lise Rivollet	Malika Nadour , Ivan Valette	Malika Nadour , Ivan Valette
1F	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
2A	Lise Rivollet, Malika Nadour	-	Lise Rivolet, Malika Nadour
2B	Malika Nadour	-	Malika Nadour , Lise Rivolet
2C	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
2D-E	Ivan Valette	Ivan Valette	Ivan Valette, Malika Nadour
2F	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
3A	Lise Rivollet, Malika Nadour	Malika Nadour	Lise Rivollet, Malika Nadour
3B	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
3C	Malika Nadour	Malika Nadour , Marie Biard, Paola Perrat	Malika Nadour
3D	Lise Rivollet, Malika Nadour	Malika Nadour , Lise Rivollet, Marie Biard, Philippe St-Louis	Malika Nadour
3E	Malika Nadour	Philippe St-louis	Malika Nadour
4A	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
4B	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour , Ivan Valette
4C	Lise Rivollet, Malika Nadour	Malika Nadour	Lise Rivollet, Malika Nadour
4D	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
4E	Lise Rivollet,	-	Lise Rivollet
4F	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
4G-H	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour , Marie Biard
4I	Lise Rivollet, Malika Nadour	Malika Nadour	Lise Rivollet
4J	Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour
5A	-	-	Malika Nadour
5B	-	-	Malika Nadour

5C-D	Georgia Rapti, Robert Prevedel Carlo Bevilacqua,	-	Georgia Rapti, Noémie Frébault, Ivan Valette, Malika Nadour
6A	Malika Nadour	Malika Nadour , Marie Biard, Ivan Valette	Malika Nadour
6B	Malika Nadour , Lise Rivollet, Marie Biard	Malika Nadour , Marie Biard, Ivan Valette	Malika Nadour , Marie Biard, Lise Rivollet, Ivan Valette
6C-F	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
6G	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour , Marie Biard, Lise Rivollet
7A	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour , Marie Biard
7B	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
7C	Malika Nadour	Ivan Valette	Malika Nadour , Ivan Valette
7D	Malika Nadour	Marie Biard, Malika Nadour	Malika Nadour
7E-H	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
7F	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
7G	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
7H	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
7I	-	-	Malika Nadour
7J	Marie Biard	-	Marie Biard, Malika Nadour
7K	Marie Biard, Malika Nadour	Malika Nadour	Marie Biard, Malika Nadour
7L	Marie Biard, Malika Nadour	-	Marie Biard, Malika Nadour
8	-	-	Malika Nadour
S1	Andrea Thackeray	Andrea Thackeray, Cassandra R. Blanchette	Andrea Thackeray, Cassandra R. Blanchette
S2	Noémie Frébault	Noémie Frébault	Noémie Frébault
S3	Laurent Cappadocia	Laurent Cappadocia	Laurent Cappadocia
S4	Malika Nadour , Lise Rivollet	Malika Nadour , Ivan Valette	Malika Nadour , Ivan Valette
S5	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
S6	Lise Rivollet, Marie Biard, Malika Nadour	-	Malika Nadour , Marie Biard
S7	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
S8	Lise Rivollet	Lise Rivollet	Lise Rivollet, Malika Nadour
S9	Georgia Rapti, Robert Prevedel, Carlo Bevilacqua	-	Georgia Rapti, Noémie Frébault, Ivan Valette, Malika Nadour
S10	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour , Marie Biard
S11	Malika Nadour	Marie Biard, Malika Nadour	Malika Nadour
S12	Malika Nadour	Marie Biard, Malika Nadour	Malika Nadour

2.1 Résumé

L'architecture neuronale établie durant l'embryogenèse doit persister tout au long de la vie pour assurer une fonction cérébrale normale. Cependant, les mécanismes derrière le maintien à long terme de l'organisation neuronale sont mal compris. Pour identifier ces mécanismes, nous avons réalisé un criblage de suppression chez des mutants *sax-7/L1CAM*, qui présentent une désorganisation neuronale progressive avec l'âge. Nous avons identifié la protéine de la MEC conservée MIG-6/papilin comme un régulateur de la maintenance neuronale. En combinant des approches de génétique moléculaire, de prédictions structurales, d'imagerie quantitative *in vivo* et de la microscopie Brillouin de pointe, nous avons démontré que MIG-6/papilin remodèle le collagène IV de la MEC, en coopération avec les enzymes sécrétées MIG-17/ADAMTS et PXN-2/péroxydasine. Ce remodelage impacte la biomécanique des tissus et la stabilité structurale des neurones, même sous un stress mécanique accru. Nos résultats mettent en évidence un mécanisme extracellulaire par lequel MIG-6/papilin contribue à l'équilibre assurant l'intégrité de l'architecture neuronale sur le long terme. Ce travail apporte un éclairage sur les bases moléculaires du maintien de l'architecture neuronale et ouvre des perspectives prometteuses pour la compréhension des troubles liés à l'âge et les maladies neurodégénératives.

Mots-clés : Papiline, MIG-6, collagène IV, matrice extracellulaire, maintenance neuronale

2.2 Abstract

Neuronal architecture established embryonically must persist lifelong to ensure normal brain function. However, little is understood about the mechanisms behind the long-term maintenance of neuronal organization. To uncover maintenance mechanisms, we performed a suppressor screen in *sax-7/L1CAM* mutants, which exhibit progressive disorganization with age. We identified the conserved extracellular matrix protein MIG-6/papilin as a key regulator of neuronal maintenance. Combining incisive molecular genetics, structural predictions, *in vivo* quantitative imaging, and cutting-edge Brillouin microscopy, we show that MIG-6/papilin remodels extracellular matrix collagen IV, working in concert with the secreted enzymes MIG-17/ADAMTS and PXN-2/peroxidasin. This remodeling impacts tissue biomechanics and ensures neuronal stability, even under increased mechanical stress. Our findings highlight an extracellular mechanism by which MIG-6/papilin contributes to promoting the maintained integrity of neuronal architecture over time. This work provides critical insights into the molecular basis of sustaining neuronal architecture and offers a foundation for understanding age-related and neurodegenerative disorders.

Keywords: Papilin, MIG-6, Collagen IV, Extracellular matrix, Neuronal maintenance

2.3 Introduction

Proper nervous system function depends on both developing and maintaining the intricate architecture of its neural circuits. The dynamic processes of development and maturation of the nervous system begin *in utero* and extend well into adulthood (van Dyck et Morrow, 2017). Key neuronal features, established earlier in development, must be preserved throughout life to ensure continuity in neuronal architecture and function (Heckman et Doe, 2021). The structural organization of the nervous system faces numerous challenges, including physical stresses induced by the organism's postnatal growth, anatomical remodeling, and the integration of new neurons, body movements, and injury (Bénard et Hobert, 2009). Failure to stably maintain neuronal architecture over the long-term can impair and compromise neuronal function and contribute to the manifestation of neurological conditions (Hemphill *et al.*, 2015; Sultana *et al.*, 2024). Notably, a defining feature of many neurodegenerative diseases is the destabilization of axons and dendrites, and accompanying loss of synapses (Lin et Koleske, 2010; Mariano *et al.*, 2018; Sauerbeck *et al.*, 2020). Gaining insights into the mechanisms that preserve nervous system architecture could inform the development of therapeutics aimed at preventing or reversing such neurological conditions. Despite their importance, the mechanisms that sustain neuronal organization throughout life remain poorly understood.

A key contribution to the preservation of the structural integrity of multicellular assemblies, including those in the nervous system, comes the extracellular matrix (ECM) (Alberts *et al.*, 2022). Cells interact with the ECM and neighboring cells via cell adhesion molecules, and the coordinated actions of these molecules and the ECM are key for cellular behavior, enabling, for instance, neuronal structures to withstand physical stresses (Hemphill *et al.*, 2015). However, how cellular regulation implicating ECM interactions evolve through time, or when subjected to physical challenges, remains elusive.

The ECM is of crucial importance in the nervous system, playing critical roles during development (Long et Huttner, 2019), but also in the adult mammalian brain, where the ECM constitutes approximately 20% of its volume. Diffuse ECM is found near and between synapses across the brain, and condensed ECM is organized as basement membranes associated with blood vessels, or as lattice-like structures called perineuronal nets, surrounding the soma and dendrites of several neuron types in multiple brain regions (Benarroch, 2015). These organized forms of ECM influence neuronal biology in the adult brain, including dendritic spine stability, synapse plasticity, and axon regeneration (Benarroch, 2015; Fawcett, Oohashi et Pizzorusso, 2019). Also, changes in ECM composition and structure have been linked to various neurological diseases (e.g., Alzheimer's disease and schizophrenia), as well as to brain injury and aging

(Harkness *et al.*, 2021; Suttikus *et al.*, 2016). This underscores the critical role of the neurons' extracellular environment in maintaining normal neuronal physiology and its involvement in pathological conditions (Hemphill *et al.*, 2015). However, our understanding of the long-term regulation of the ECM in the mature nervous system is limited and remains a daunting problem for neuropathology (Lu *et al.*, 2011). For instance, how the intricate interactions between ECM proteases and their substrates, regulate ECM dynamics for sustaining neuronal structure and function is poorly understood.

The nematode *C. elegans* provides a powerful *in vivo* genetic model to study the lifelong maintenance of nervous system architecture, and particularly the role of the ECM in this process. A significant number of *C. elegans* neurons are organized into ganglia, with most neuronal processes running along major fascicles, such as the neuropil and the ventral nerve cord (White *et al.*, 1986). The multicellular assemblies of ganglia and nerve cords are ensheathed by a specialized ECM, namely basement membranes (Altun *et al.*, 2024). After hatching into a larva, *C. elegans* undergoes a nearly 100-fold increase in size until it reaches adulthood (Knight *et al.*, 2002). Yet, the overall architecture of its nervous system is established during embryogenesis and remains largely intact throughout post-embryonic growth (Altun *et al.*, 2024; Witvliet *et al.*, 2021). Indeed, serial-section electron microscopy and connectome reconstruction of multiple *C. elegans* brains at successive stages of development revealed that the shape and positioning of most neurons and neurites established at birth remains consistent through adulthood, including approximately 70% of adult brain synapses being part of stable connections that are proportionally maintained from birth to adulthood (Witvliet *et al.*, 2021). Individual neurons and ECM components can be readily visualized in living animals throughout their lifespan, using fluorescent reporters thanks to *C. elegans* transparency and small size (Boulin, Etchberger et Hobert, 2006; Keeley *et al.*, 2020). Combined with its genetic tractability, including using cell-specific promoters and conditional knockdowns, these features enable the investigation of the mechanisms sustaining nervous system architecture across its lifetime.

Thus, *in vivo* genetic studies using *C. elegans* has yielded critical insights into the mechanisms of the long-term maintenance of neuronal assemblies. These investigations have revealed post-natal molecular mechanisms that actively preserve neuronal organization, particularly within ganglia and nerve cords. Notably, several immunoglobulin superfamily molecules play crucial roles in maintaining the architecture of these multi-neuronal assemblies over time. These include the cell adhesion molecule SAX-7/L1CAM (Desse *et al.*, 2021; Pocock *et al.*, 2008; Sasakura *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Zallen, Kirch et Bargmann, 1999; Zhou et Chen, 2011), the large ECM protein DIG-1 (Bénard *et al.*, 2006; Johnson et Kramer, 2012),

the secreted two-immunoglobulin domain containing proteins ZIG-3 and ZIG-4 (Aurelio, Hall et Hobert, 2002; Bénard *et al.*, 2009), and the ectodomain of the FGF receptor EGL-15 (Bülow, Boulin et Hobert, 2004). Mutations in the genes encoding these molecules lead to neuronal defects that arise later in development, well after the normal initial establishment of neuronal morphology of the affected neurons. Strikingly, neuronal maintenance defects are suppressed by paralysis, highlighting that neuronal structures experience internal mechanical stress generated by body or organ movements, and that the identified neuronal maintenance molecules counteract these stresses, which otherwise would lead to neuronal disorganization (Aurelio, Boulin et Hobert, 2003; Bénard *et al.*, 2009; Bénard *et al.*, 2006). Orthologues of some of these molecules have been found to sustain neural circuits in other systems as well; for instance, in mice, knockout of L1CAM specifically in the adult brain results in behavioral deficits and synaptic transmission changes (Law *et al.*, 2003), and L1CAM maintains neocortical axo-axonic innervation into adulthood (Tai *et al.*, 2019). While we have evidence that cell adhesion molecule SAX-7/L1CAM and ECM molecule DIG-1 play important roles in maintaining nervous system architecture, how the underlying ECM landscape and molecular interactions contribute to sustaining nervous system architecture throughout life is not understood. Given the extensive evolutionary conservation of ECM and neuronal cell surface molecules from worms to mammals, the maintenance mechanisms unravelled in *C. elegans* will provide insights on general principles by which the nervous system architecture is preserved lifelong.

To expand our understanding of the molecular mechanisms governing the preservation of neuronal architecture throughout life, we conducted a forward genetic suppressor screen in the *sax-7* mutant background, and identified *mig-6*, which encodes papilin, an extracellular matrix protein with structural similarities with ADAMTS metalloproteases (Kramerova *et al.*, 2000). Papilin is conserved across metazoans, but its function remains elusive. Our findings reveal that MIG-6S/papilin is required post-developmentally for neuronal maintenance, by modulating the major extracellular matrix component collagen IV. Using Brillouin microscopy, we find that loss of *mig-6* changes the biomechanical properties of tissues in the region comprising the neurons. We demonstrate that MIG-6S/papilin cooperates with the ECM remodeling metalloproteinase MIG-17/ADAMTS in regulating the collagen IV network, and that both collagen IV levels and crosslinking are critical to sustain neuronal organization lifelong. Our study underscores the critical role of ECM regulation by the extracellular matrix protein papilin in preserving neuronal architecture throughout an organism's lifetime, including under conditions of significant mechanical stress. We propose a model in which a balance between flexibility and adhesion, mediated by

ECM remodeling and cell adhesion, ensures the structural stability of the embryonically established nervous system over time and improve its ability to withstand mechanical stress.

2.4 Materials and Methods

C. elegans strains and genetics

Strains were cultured at 20°C on nematode growth medium (NGM) agar plates seeded with OP50 bacteria as described (Brenner, 1974), unless otherwise specified. N2 is the reference wild-type strain. Mutant alleles and reporter strains were outcrossed at least three times prior to strain generation or analysis (listed in Supplemental Table S1). Strains were constructed using standard genetic procedures and are listed in Supplemental Table S1 and Supplemental Table S2. Genotypes were confirmed by visible phenotypes when possible, and by PCR or sequencing (primers listed in Supplemental Table S3).

EMS forward genetic screen

We carried out a forward F2 clonal genetic screen for modifiers of neuronal maintenance defects using VQ90 *sax-7(qv24); zig-5(ok1065) zig-8(ok561); glp-4(bn2ts); oyls14* as our screening strain, which was maintained at 15°C. *glp-4(bn2ts)* was used for efficient examination of adult worms, as it is a temperature-sensitive sterile mutation when shifted to 25°C (Beanan et Strome, 1992). Allele *qv24* of *sax-7* will be described elsewhere (C.R.B and C.Y.B., unpub. results). For each mutagenesis round, VQ90 L4 worms were mutagenized with 25 µM ethyl methanesulfonate and allowed to recover at 15°C. Following recovery, five P₀ mutagenized worms were plated onto five plates (25 P₀s in total) and put at 15°C to lay their broods. 50 F1s from each P₀ plate were picked singly as L4 or young adults. From each of the 250 F1s, seven F2s were picked clonally (1750 F2s per round of mutagenesis) and grown at 15°C for two days (plates containing singled F1s were kept at 15°C for future use). After two days, the plates where single F2 animals had been picked were shifted to 25°C. When the F3 animals were 5-day-old adults or older, they were examined under a Zeiss V8 Discovery fluorescence stereoscope to identify rare broods exhibiting a modified phenotype compared to VQ90 control. Upon identification of a candidate modifier mutation, single animals were picked clonally from the corresponding F1 plate (kept at 15°C) to re-isolate the modifier, and their progeny were mounted on slides to examine and quantify the phenotype using an upright Zeiss Axioskop 2 Plus fluorescence microscope. If the modifier mutation was re-isolated and exhibited a robust phenotype, we outcrossed it. For outcrosses, we used males from the non-mutagenized strain VQ47 *sax-7(qv24); zig-5(ok1065) zig-8(ok561); hdl529*, which is similar to the one used in the screen, but carries a red fluorescent marker to readily identify cross progeny. We thus could determine if the new modifier mutation was heritable, and at the same time remove *glp-4(bn2ts)*, and outcross other irrelevant EMS-

induced mutations from the genetic background. Subsequent outcrosses with wild-type N2 males ensured that all strains used are wild type for *zig-5*, *zig-8*, and *glp-4*.

Isolation and molecular identification of *qv18*

qv18 was isolated as a suppressor of the *sax7(qv24)* neuronal maintenance defects in the genetic screen described above. Outcrosses of the new strain bearing the suppressor mutation *qv18* (as described above) showed that the suppressor was heritable, penetrant, and likely monogenic. We also noticed abnormal segregation ratios, consistent with a possible chromosomal rearrangement resulting from mutagenesis; we therefore later engineered the *qv18* causal suppressor mutation in a clean genetic background. To identify the causal mutation in *qv18*, we performed whole genome sequencing on the pooled DNA of 18 independent suppressor lines (each line derived from one of 18 independent F2s from the outcross, with careful re-homozygosing of the suppression of the neuronal maintenance defect confirmed over 3 generations (Doitsidou, Jarriault et Poole, 2016). The sequencing data were uploaded to the public server at usegalaxy.org and we used the Cloudmap pipeline to analyze the data (Minevich *et al.*, 2012), which pointed to a *qv18* linkage region on chromosome V. A candidate variant therein was a mutation in the gene *mig-6*, which we pursued further by (i) performing rescue experiments, (ii) introducing the candidate mutation by genome editing in *sax-7* mutants with an otherwise wild-type *mig-6* gene (which yielded *qv33*), (iii) analyzing the effect of loss of *mig-6* function by *mig-6*(RNAi) experiments, and (iv) examining other *mig-6* mutant alleles.

Generation of *qv33* by CRISPR-Cas9

To confirm the molecular identity of the causal mutation suppressing *sax-7* defects in the *qv18* suppressor strain, the candidate *mig-6* mutation was reintroduced in a clean *sax-7(qv30); oyls14* genetic background using CRISPR-Cas9 genome editing. A target sequence against *mig-6* was selected (ggtaccgctgaatgtggtgg) and cloned to generate a gRNA plasmid (pPP30). A 100 nt oligo carrying the candidate *qv18* missense mutation, at nucleotide 3409 of cosmid C37C3, served as the repair template (oCB1599 acatggtacacatcttcatggtccgagtgaccgctgaatgtggtggtgAatcccaagatcgtgtcgtgtttgcttgaactacgataagaagccagttc, IDT synthesized). A DNA mix containing the Cas9 plasmid (pDD162), the gRNA plasmid pJA58 (*dpy-10* target) and *dpy-10(cn64)* ssDNA repair template for CRISPR co-conversion, as well as the *qv18* gRNA plasmid pPP30 and repair template oCB1599 was injected as described (Arribere *et al.*, 2014; Dickinson *et al.*, 2013).

Rol or Dpy F1 animals were picked clonally and their F2 progeny were screened by PCR (using primers listed in Supplemental Table S1), followed by restriction enzyme digestion, as a BamHI site present in the wild-type sequence is disrupted by the *qv18/qv33* single nucleotide substitution.

The same CRISPR-Cas9 strategy was used to generate the double mutant *mig-6(qv33) mig-17(k174)*, by introducing *qv33* into the *mig-17(k174)* background, as the loci are 2 cM apart on chromosome V.

Prediction and analysis of the three-dimensional structure of MIG-6S

The three-dimensional structure of MIG-6S (Uniprot accession O76840-2) was predicted using ColabFold 1.5.2 locally installed on the servers of the Digital Research Alliance of Canada. This version of ColabFold uses AlphaFold 2.3.1 and MMSeqs2 14-7e284. The depicted structure corresponds to the model presenting the highest pLDDT values that was obtained using a recycle count of 12. The images of the structure were made using PyMOL 2.5.4. Sequence logos were generated using Weblogo 3.7.12 and an alignment of 250 protein sequences from Ecdysozoa species, including nematodes and arthropods obtained using MMSeqs2.

Visualization and quantification of neuroanatomy and EMB-9/collagen IV structures

1st larval stage (L1), 2nd larval stage (L2), 4th larval stage animals (L4), or 2-day old adult (selected as late L4 and observed 48 hours later) nematodes were mounted on agarose pads, immobilized with 75 mM NaN₃. These animals were observed under Nomarski or fluorescence microscopy Axio Scope.A1 or Axio Imager.M2 (Zeiss), with a 40x objective or a 100x oil immersion objective (for ventral nerve cord examination). Images were acquired using an AxioCam camera (Zeiss) and processed using ZEN (Zeiss).

Analysis of ASH and ASI. The cell bodies of ASH/ASI and their axons located in the nerve ring were visualized in L2, L4, and 2-day old adults, using reporter *Psra-6::DsRed2 (hdlIs26)*. In the wild type, the ASHL/R and the ASIL/R soma are located posterior to the nerve ring. An animal was counted as mutant when along the antero-posterior axis of the animal, at least one of the ASH/ASI soma was not posterior to the nerve ring (but either anterior to or flanking the nerve ring).

Analysis of PVQ. The axons of neurons PVQL/R in the ventral nerve cord were visualized using *Psra-6::DsRed2 (hdlIs26)*, in freshly hatched L1 and in L4 larvae, as described (Bénard *et al.*, 2006). Briefly, in the

wildtype, the axon of PVQL is positioned along the left fascicle of the ventral nerve cord, whereas the axon of PVQR is in the right fascicle. Animals were counted as having an axon flip-over defect when an axon was flipped to the opposite fascicle at any point along the ventral nerve cord.

Analysis of collagen IV fibrotic-like structures. We consider as fibrotic collagen IV the elongated structures or enrichments of EMB-9::mCherry signal (also reporters EMB-9::Dendra or EMB-9::mNG) that are observed in the posterior head region of *mig-6* or *mig-17* mutants (see Figs. 2.7-2.9 and 2.12-2.14). These structures are very rarely observed in the wild type, and they are different from the wild-type pattern of collagen IV signal present along the body wall muscles basal lamina (collagen IV concentrates in the basal lamina underneath each dense body and M line of sarcomeric muscles, including in the head region). To unequivocally assess the presence of collagen IV fibrotic-like structures in each animal, z-stacks were captured, and all the z-planes images were examined (the experimenter was blinded for genotype). Collagen IV fibrotic structures vary in number, length, and position (see Fig. 2.7B, 2.8B, 2.8D); animals displaying at least one such structure were counted as having fibrotic collagen IV.

As a result of the *pxn-2*(RNAi) (Fig. 2.16C-D), a different collagen IV pattern occurred, where the fibrotic-like structures appeared 'fragmented'. We consider a fibrotic like-structure to be fragmented if accumulation of collagen IV appeared as a series of elongated puncta, which were connected to one another by a thin line of collagen IV.

Microscopy and fluorescence intensity quantification

Animals were observed at precise ages, namely "young adults" (just molted from the L4 stage, <3 hours post L4 molt) and "day 2 adults" (48 hours after the young adult stage), mounted on 5% agarose pads with 75 mM NaN₃. Images were acquired as a z-stack using a Plan Apo 40x/0.95 NA objective on a Zeiss Axio Imager.M2 (equipped with an AxioCam camera and ZEN software). AutoQuant X deconvolution software was used to remove blur and enhance contrast and resolution. A Nikon A1 laser scanning confocal microscope (equipped with an EMCCD camera and NIS elements software) was also used for image acquisition and analysis, using either a Plan Apo λ 40x/0.95 NA or Plan Apo λ 60x/1.4 NA oil immersion objective.

EMB-9::mCherry, MIG-17::GFP, and mNG::PXN-2 total fluorescence intensities in z-projections were quantified using ImageJ. All image acquisition parameters (including exposure time, excitation intensity,

and gain), for each imaging channel, were fixed across genotypes for a given fluorescent reporter. The region of interest (ROI) containing mCherry, GFP or mNG signals on the images was either outlined manually (the whole head) or defined as a rectangle. To correct for background fluorescence, four ROIs located outside but adjacent to the animal's head were used; the mean fluorescence of background ROIs was subtracted from the signal intensity for the same image, using the following formula: Corrected IntDen = IntDen of experimental ROI - (mean of background ROI X area of experimental ROI). 3D isosurface renderings of EMB-9::mCherry in *mig-6* mutants were constructed using Imaris 7.4 software (Bitplane).

Brillouin microscopy and imaging of mechanical properties

Brillouin microscopy measures tissue mechanical properties (elasticity, viscosity) in the GHz frequency range through the interaction of light with the sample's acoustic phonons (Coraggio *et al.*, 2024; Prevedel *et al.*, 2019). The shift and linewidth of the Brillouin scattered light spectrum gives information about the longitudinal modulus, which is directly related to the elastic and viscous modulus of the material, respectively. Brillouin imaging was performed using a Brillouin microscope previously described (Bevilacqua *et al.*, 2019), and animal preparation and imaging protocols previously described (Coraggio *et al.*, 2024). Briefly, a commercial Zeiss body (Axiovert 200 M) coupled with a home-built spectrometer based on a 2-VIPA configuration, provides a precision of 22 and 56 MHz for Brillouin shift and linewidth measurements, respectively, for our measurement parameters (100 ms exposure time, 4 mW optical power on the sample) and a measured spectral resolution of 520 MHz. To account for the finite spectral resolution, the latter (520 MHz) was subtracted from the measured linewidth values (subtraction corresponds to deconvolution, as detailed in Chan *et al.* 2021). The effective NA of the objective (0.85) leads to ~100–110 MHz downshift in the Brillouin shift. A 532 nm laser (Torus, Laser Quantum) was used for Brillouin imaging. Wild-type and *mig-6* mutant animals of the L2 and L4 stages were imaged. Animals were grown in the absence of food for 2 h before experiments, to minimize variability of Brillouin signal in the pharynx due to the presence of bacteria food. Animals were anesthetized using M9 buffer containing 10 mM NaN₃ and mounted on 2% agarose pads containing 10 mM NaN₃. Brillouin images were acquired with a 40x/1.0 NA Zeiss objective and an integration time for a single point of 100 ms. The optical power on the sample was kept below 4 mW and no apparent photodamage was observed after imaging.

For Brillouin image analysis, only images of healthy animals (with no vacuoles around the bulb) were used. Also, we only analyzed images of animals that had moved very little, specifically <1.5 µm for L2 and <2.2

μm for L4 animals (the brightfield imaging acquisition preceding and following Brillouin image acquisition enabled us to measure any animal movement during imaging). Regions of interest for analysis of Brillouin microscopy images were drawn flanking the 2nd pharyngeal bulb to the animal's body edge (cuticle). Spatial maps of elasticity and viscosity are plotted from the acquired data, using function “Measure” and Lookup table mpl-Inferno in Fiji and adjusting the “Brightfield and Contrast” at 7.5–8.2 or 1.02–2.05 respectively. From the raw Brillouin shift and linewidth values we compute the Brillouin elastic and viscous contrast, analogous to Antonacci et al. 2020. Mean Brillouin linewidth, shift, and loss tangent of the ROIs were measured for each animal, averaged for each genotype, and compared between genotypes. Graphs and statistical analyses were made on raw and relative values. Relative values consist of raw values divided by the mean value obtained for the wild-type genotype.

Refractive index of animals of each genotype was measured by performing label-free 3D Holo-Tomographic Live Cell Imaging, using the Nanolive 3D Cell Explorer Fluo, as previously described (Coraggio *et al.*, 2024). Briefly, L2 or L4 animals were mounted on slides using Pluronic F127 36% w/v + 1 mM tetramisole solution. Brightfield images were acquired using a 60x/0.8 NA objective using a FITC filter of the Nanolive Module LED DAPI-FITC-TRITC/Cy5 4X B 000.

Transgenes and rescue experiments

mig-6S minigene (pCB411). The *mig-6S* minigene includes exons 1-11, introns 1-4 of isoform a, and the endogenous *mig-6S* 3'UTR, which were amplified out of pZH125 (Kawano *et al.*, 2009) using primers oCBQc17 (CAAGCTCCCGGGATGAGGTTGCTGCTCTTCTCGG) and oCBQc18 (CATGATACTAGTGCGCAACAATGGGTGAAGAAAGC), adding XmaI and SpeI sites. This insert was cloned into vector PCR2.1 TOPO.

Prgef-1::mig-6S (pCB408). Vector backbone and promoter were obtained from plasmid pCB199 (*Prgef-1::rib-1*cDNA) by digesting with XmaI [3480] and SpeI [5422] to remove *rib-1*; the *mig-6S* insert [5625 nt] released from pCB411 by XmaI and SpeI digestion was ligated.

Pdpy-7::mig-6S (pCB409). Vector backbone and promoter were obtained from plasmid pCB249 (*Pdpy-7::lon-1a* cDNA) by digesting with XmaI [271] and SpeI [2003] to remove *lon-1*; the *mig-6S* insert [5625 nt] released from pCB411 by XmaI and SpeI digestion was ligated.

Pmyo-3::mig-6S (pCB416). Plasmid pPD95.86 (*Pmyo-3::unc-54* 3'UTR) was digested with XbaI [2414] and ApaI [3319] to remove the *unc-54* 3'UTR. The released vector was ligated with the *mig-6S* insert [5643 nt], which was amplified from pZH125 using primers oCBQc44 (TCGGAGTCTAGAATGAGGTTGCTGCTCTTCTCGG) and oCBQc20 (CAAGATGGGCCCGCGCAACAATGGGTGAAGAAAGC) to add on XbaI and ApaI sites, and digested.

Pmyo-3::mig-6SΔpapilin cassette/lagrin repeats (pCB483). Plasmid pCB416 (*Pmyo-3::mig-6S*) was digested using NcoI [2715] and ClaI [7527] to remove the sequences corresponding to the end of exon 2 (from the NcoI site) until exon 11 (up to ClaI site) of *mig-6S*. This fragment was ligated with a second one to generate a plasmid that lacks the sequences coding for the papilin cassette and the lagrin repeats, but included the rest of coding sequence of *mig-6* until the Stop codon and the 3'UTR as in pCB416. The second fragment consists of most of exon 8 and exons 9, 10 and 11, which was PCR amplified from plasmid pCB416 using primers oCB2266 (CATGATCCATGGccaacttgcttgactctg, to add an NcoI site) and oCBQc25 (GAACTTACTCGGGCATCTCG, taking advantage of an internal ClaI site) and digested, to reconstitute an in-frame *mig-6SΔpapilin cassette* version by ligation.

Pmyo-3::mig-6SΔKunitz domains (pCB492). A fragment of the *mig-6S* gene containing sequence from the initiator ATG in exon 1 all the way to exon 8, thus lacking sequence encoding the Kunitz inhibitor domains, was PCR amplified using primers oCBQc44 (tcggagtctagaatgaggttgctgctcttctcgg, containing an XbaI site) and oCB1810 (catgatAGCGCTTTAattacaggcgcgattttatg, to add an AfeI site) from plasmid pCB416 (*Pmyo-3::mig-6S*) and digested. This fragment was ligated with another one containing the vector backbone and promoter obtained from plasmid pCB423 (*Pmyo-3::sdn-1cDNA*) by digesting with XbaI and AfeI.

All inserts of finalized clones were verified by sequencing.

Transgenic animals were generated by standard microinjection techniques (Mello et Fire, 1995). Plasmid pZH125, which contains a *mig-6S* minigene expressed under the *mig-6* endogenous promoter (Kawano et al., 2009), was injected at a concentration of 5 ng/μL. For tissue-specific rescue assays, pCB416 [*Pmyo-3::mig-6S*] was injected at 1 ng/μL with *ceh-22::gfp* or *lgc-11::gfp* as a marker of transgenesis; pCB408 [*Prgef-1::mig-6S*] was injected at 7 ng/μL with *lgc-11::gfp* as co-injection marker; and pCB409 [*Pdpy-7::mig-6S*] was injected at 0.5 ng/μL and 0.1 ng/μL with *lgc-11::gfp* as co-injection marker. Co-injection markers were injected at 50 ng/μL and pBSK(+) was added to each mix to reach a final DNA concentration

of 200 ng/μL. DNA mixes were injected into a strain where the *mig-6* gene is balanced: *sax-7(qv30); mig-6(qv33)/dpy-11(e224) oyls14*. Transgenic strains are listed in Supplemental Table S4.

Liquid cultures

After hatching into L1 larvae, animals were grown in liquid culture for up to 5 days, kept under constant agitation on a nutator for them to swim continuously. Synchronized L1 larvae were obtained by treating gravid adults with a bleach solution (Stiernagle, 2006), resuspending the collected embryos in 2 mL S medium in 15 mL conical tubes, and incubating them overnight at 20°C on a nutator to allow their hatching into L1 larvae that are arrested in the absence of food. The L1 larvae culture was then supplemented with 200 μL of concentrated *E. coli* OP50 and kept under constant agitation on a nutator at 20°C for 5 days, with additional concentrated *E. coli* OP50 added at days 1 and 3 post hatching. Animals were examined by microscopy at 3 and/or 5 days after hatching (post-L1 days 3 or 5 is equivalent to the age of young or 2-day-old adults of animals grown on solid plates, respectively).

RNA interference assays

RNAi experiments were performed by the feeding method using RNAi bacterial clones from the Ahringer RNAi library (Kamath et Ahringer, 2003; Timmons et Fire, 1998). Single colonies for the L4440 empty vector negative control, and for clones containing *emb-9* and *pxn-2* sequences, were obtained on LB plates with ampicillin (75 μg/mL) and tetracycline (12.5 μg/mL). They were then grown in LB medium with ampicillin (75 μg/mL) for 16h at 37°C, to which 1 mM IPTG was then added and incubated for an additional hour to induce dsRNA expression. Concentrated cultures of these RNAi bacteria were seeded onto NGM plates (75 μg/mL Amp, 1 mM IPTG) and left to dry at room temperature for overnight induction. For *mig-6*(RNAi) experiments, *sax-7(qv30)* animals were placed on RNAi plates at the L2 stage and examined as day 2 adults (48 hours post L4). For *emb-9*(RNAi) and *pxn-2*(RNAi), synchronized L1 larvae (Stiernagle, 2006) were distributed onto RNAi plates, incubated at 20°C, and examined as day 2 adults (48 hours post L4).

For RNAi assays done with animals swimming in liquid (Fig. 2.17C), worms were synchronized as L1 larvae and then grown in liquid media as described above, except that they were fed with HT115 RNAi bacteria (carrying the control vector or the *emb-9*(RNAi) plasmid) in S medium supplemented with ampicillin (75 μg/mL) and IPTG (1 mM). 250 μL of concentrated bacteria was added to the liquid cultures initially (after hatching), and then at day 3 post L1. Optimal induction of dsRNA expression by the RNAi bacteria was

achieved by growing bacteria for 14 hours at 37°C, and then adding 5 mM IPTG for growth for another 4 hours. Animals were recovered from the liquid culture and examined at day 5 post L1.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using R (version 4.1.2) using the R Stats package ('stats' version 4.4.2). Data are presented as mean $\pm$ standard error of proportion, or as mean $\pm$ standard error of the mean. As indicated in each Figure Legend, statistical tests were performed using z-test, unpaired two-tailed Student's t-test, or one-way ANOVA when applicable (for parametric datasets). For non-parametric datasets, the Wilcoxon-Mann-Whitney test was used. Appropriate *post-hoc* tests were performed for multiple comparisons: Bonferroni correction was applied after z-tests and Wilcoxon-Mann-Whitney tests, while Tukey HSD correction was applied following ANOVA. All sample sizes and raw data are available in Supplementary Information.

2.5 Results

2.5.1 Loss of function of *mig-6*, which encodes the conserved extracellular matrix protein papilin, suppresses neuronal maintenance defects of *sax-7* mutants

To identify novel genes involved in the long-term maintenance of neuronal organization, we conducted a forward genetic screen. We refrained from searching directly for mutants with neuronal maintenance defects, as previous efforts using this approach invariably yielded numerous alleles of the large neuronal maintenance gene *dig-1* ((Bénard *et al.*, 2006); C.Y.B., unpub. results). Rather, we reasoned that screening for suppressors of the defects of previously known neuronal maintenance mutants (Supplemental Fig.1), *sax-7*, would identify genes that directly or indirectly counteract defective long-term maintenance of neuronal architecture, providing insights into the basis of this process. In wild-type animals, the soma of chemosensory neurons ASH and ASI are located posterior to the nerve ring, where their axons project (neurons visualized with reporter *Psra-6::DsRed2*, Fig. 2.1A)(Desse *et al.*, 2021). This stereotypical positioning acquired during embryogenesis is preserved throughout life, making it a reliable indicator of neuronal organization. In *sax-7* mutants, although the soma and axons of ASH/ASI initially exhibit normal positioning during earlier development, they later become displaced from the 4th larval stage onward (Fig. 2.1A, 2.1B, 2.3B) (Desse *et al.*, 2021; Pocock *et al.*, 2008; Zallen, Kirch et Bargmann, 1999), with the ASH/ASI soma ending up anteriorly displaced, and the nerve ring shifting posteriorly, resulting in the soma aligning with or even anterior to the nerve ring (Fig. 2.1A). In our F2 clonal genetic screen for suppressors of *sax-7* neuronal maintenance defects, we mutagenized *sax-7* mutants with ethyl methanesulfonate and screened F3 broods by fluorescence microscopy to find suppressors of the *sax-7* mutants ASH/ASI position defects. We isolated mutation *qv18*, which significantly suppressed the neuronal position defect in adult *sax-7(qv24)* animals, thus reducing the incidence of animals with mispositioned neurons (Supplemental Fig.1).

Through whole genome sequencing and bioinformatic analyses (Doitsidou, Jarriault et Poole, 2016; Doitsidou *et al.*, 2010; Minevich *et al.*, 2012), we identified as a candidate mutation a G-to-A transition at transcript nucleotide 1991 of the gene *mig-6*, which causes a glycine to glutamic acid substitution at residue 664 (Fig. 2.2B). To determine if this mutation was the causal suppressor, we used CRISPR-Cas9 technology to reintroduce the candidate *qv18* molecular lesion in the *sax-7(qv30)* null mutant background (Desse *et al.*, 2021). The resulting allele of *mig-6*, *qv33*, profoundly suppresses the

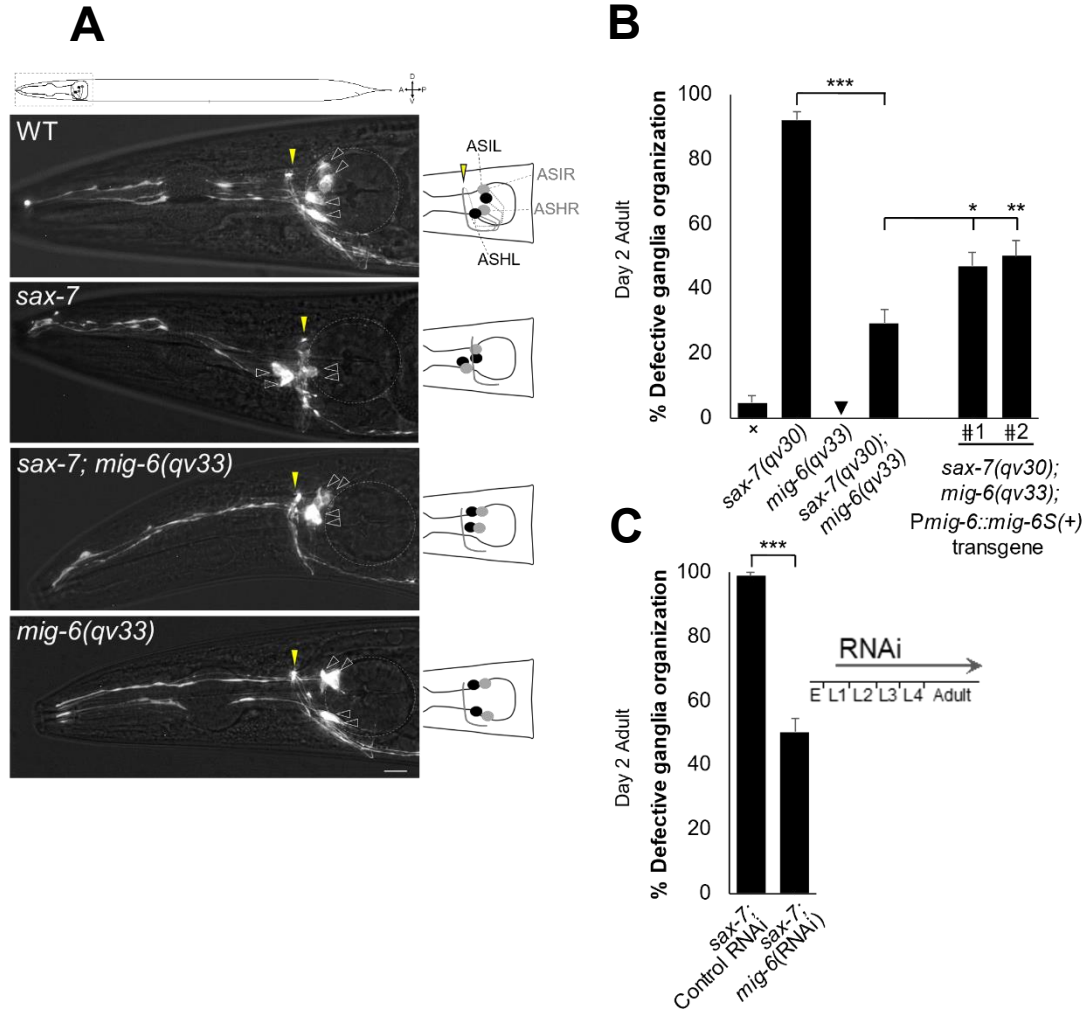


Figure 2.1 Loss of function of *mig-6*, which encodes the conserved ECM protein papilin, suppresses neuronal maintenance defects of *sax-7* mutants: Rescue and post developmental role.

(A) *qv33* is a newly identified allele of *mig-6* that suppresses the neuronal defects of *sax-7* mutants. Fluorescence images of the head region of 2-day-old adults (as indicated on worm schematics); chemosensory neurons ASH and ASI were visualized using reporter *Psra-6::DsRed2* (soma indicated by empty arrow heads; schematized on the right). In the wild type, the soma of the four neurons (each ASH and ASI pair has a soma in the left ganglion and in the right ganglion), are positioned posterior to the nerve ring (indicated by the yellow arrowhead) throughout life. In *sax-7* mutants, ASH and ASI soma are initially positioned normally but by the 4th larval stage or older they become progressively mispositioned relative to the nerve ring. Mutation *mig-6(qv33)* suppresses the neuronal disorganization of *sax-7(qv30)* mutants. Scale bar, 10 μ m. (B) Quantification of the neuronal disorganization of ASH and ASI neurons (depicted in A), including in double mutants *sax-7; mig-6*, expressing a transgene of *mig-6S(+)* under the gene's endogenous promoter which rescues the *mig-6*-mediated suppression of *sax-7*-neuronal disorganization defects. (C) Post-developmental depletion of *mig-6* by RNAi (from the 1st larval stage onwards) suppresses *sax-7* neuronal maintenance defects. Comparisons made with z-tests; *P*-values were corrected by multiplying by the number of comparisons, Bonferroni correction. Note: Throughout all figures of this work, asterisks denote significant difference (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$); n.s., not significant; appropriate *post hoc* tests were performed for multiple comparisons (see Materials and Methods); "+" indicates wild-type strain.

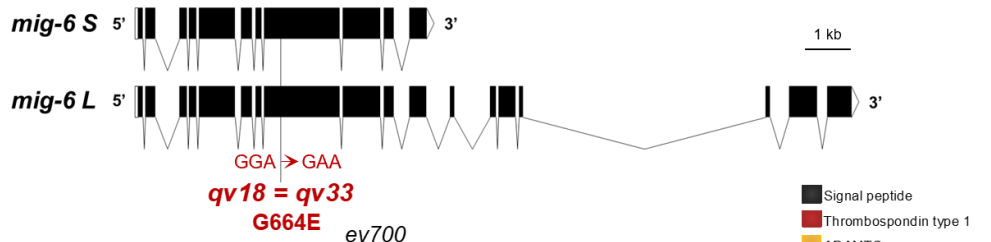
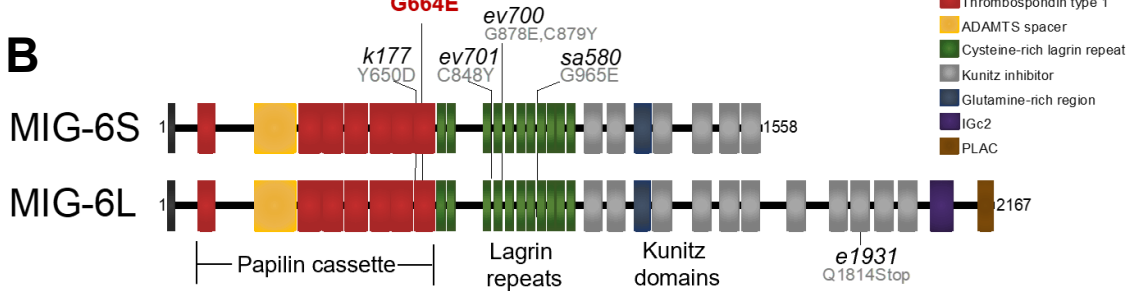
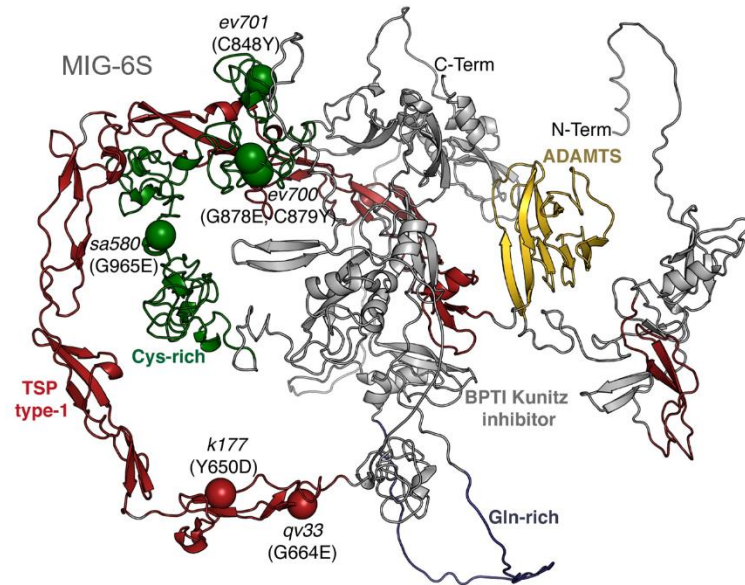
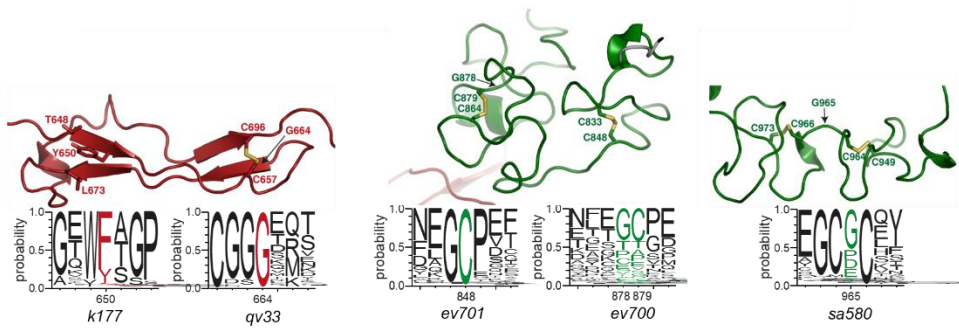
A**B****C****D**

Figure 2.2 Structure and molecular lesions in the conserved gene *mig-6*/papilin protein.

(A) Schematic structure of the two isoforms of the gene *mig-6*, which encode a short and a long isoform of MIG-6/papilin (B). The new allele *mig-6(qv33)* is a G664E amino acid substitution. Previously identified *mig-6* alleles are also indicated. (C) Overall structure of the MIG-6S protein predicted using AlphaFold version 2.3.1 implemented in ColabFold 1.5.2, where protein domains are colored as in B. *qv33* and other mutations used are indicated. (D) Structural environment of residues Y650, G664, C848, G878 and C879, and G965 in the structure of the MIG-6S protein predicted using ColabFold 1.5.2. These residues, and selected neighboring residues, are in stick representation. Residue conservation at each position is indicated through sequence logos generated using Weblogo 3.7.12 and an alignment of 250 protein sequences from Ecdysozoa species, including nematodes and arthropods, obtained using MMSeqs2 14-7e284.

sax-7(qv30) defects, reducing the percentage of affected animals from 90% to 30% (Fig. 2.1A, 2.1B), indicating that the suppressor mutation is indeed an allele of the gene *mig-6*. Except for gonad defects (similarly found in previously reported *mig-6* mutations) (Kawano *et al.*, 2009), single mutant *mig-6(qv33)* animals are fully viable and fertile, displaying a wild-type phenotype including for neurons ASH and ASI, overall nervous system morphology, body wall musculature, and pharynx (Figs. 2.1A, 2.1B, Supplemental Fig. 2,6). In contrast, null alleles of *mig-6* are sterile and embryonic and larval lethal (Kawano *et al.*, 2009). Knockdown of *mig-6* by RNA interference (RNAi) mimicked the effect of *mig-6(qv33)*, significantly suppressing *sax-7* neuronal defects (Fig. 2.1C). This result further confirms our molecular identification of the suppressor, and indicates that *qv33* is a loss-of-function mutation.

2.5.2 The short isoform MIG-6S is key in neuronal maintenance, acting through its papilin cassette and lagrin repeats

The gene *mig-6* encodes a short isoform, *mig-6S*, and a long isoform, *mig-6L* (Fig. 2.2A) (Kawano *et al.*, 2009). We used five other *mig-6* alleles previously studied in the context of distal tip cell migration (Kawano *et al.*, 2009) to analyze their effect on *sax-7*-mediated neuronal maintenance (Fig. 2.2B, 2.3B). An allele that specifically affects *mig-6L*, *e1931*, failed to suppress the neuronal maintenance defects in *sax-7(qv30); mig-6(e1931)* (Fig. 2.3B), indicating that *mig-6L* is not implicated in this context. In contrast, other *mig-6* alleles that like *qv33* affect both the short and the long isoforms (*k177*, *ev700* and *ev701*) profoundly suppressed the ASH/ASI neuronal maintenance defects in *sax-7(qv30); mig-6* double mutant animals (Fig. 2.3B). We further validated that *mig-6S* is the functional isoform in neuronal maintenance by performing rescue assays using a *mig-6S* transgene expressed under its endogenous promoter (minigene pZH125 (Kawano *et al.*, 2009)). Since the loss of *mig-6* suppresses *sax-7* neuronal maintenance defects, restoration of *mig-6* function in double mutant animals *sax-7; mig-6* is expected to result in the reappearance of *sax-7* defects. Transgenic *sax-7(qv30); mig-6(qv33)* animals carrying wild-type transgenic copies of *mig-6S(+)* showed partial but significant rescue (Fig. 2.1B). The semi-dominant behavior of *mig-6* mutations described in other contexts (Kawano *et al.*, 2009) and in our analyses (below, Figs. 2.5 et 2.6) could explain

the partial rescue. Collectively, these results firmly establish that *mig-6S* is central in neuronal maintenance.

mig-6 encodes the conserved extracellular matrix MIG-6/papilin, which is orthologous to *Drosophila* and vertebrate papilin (Campbell *et al.*, 1987; Fessler *et al.*, 2004; Kawano *et al.*, 2009; Kramerova *et al.*, 2000; Kramerova, Kramerov et Fessler, 2003).

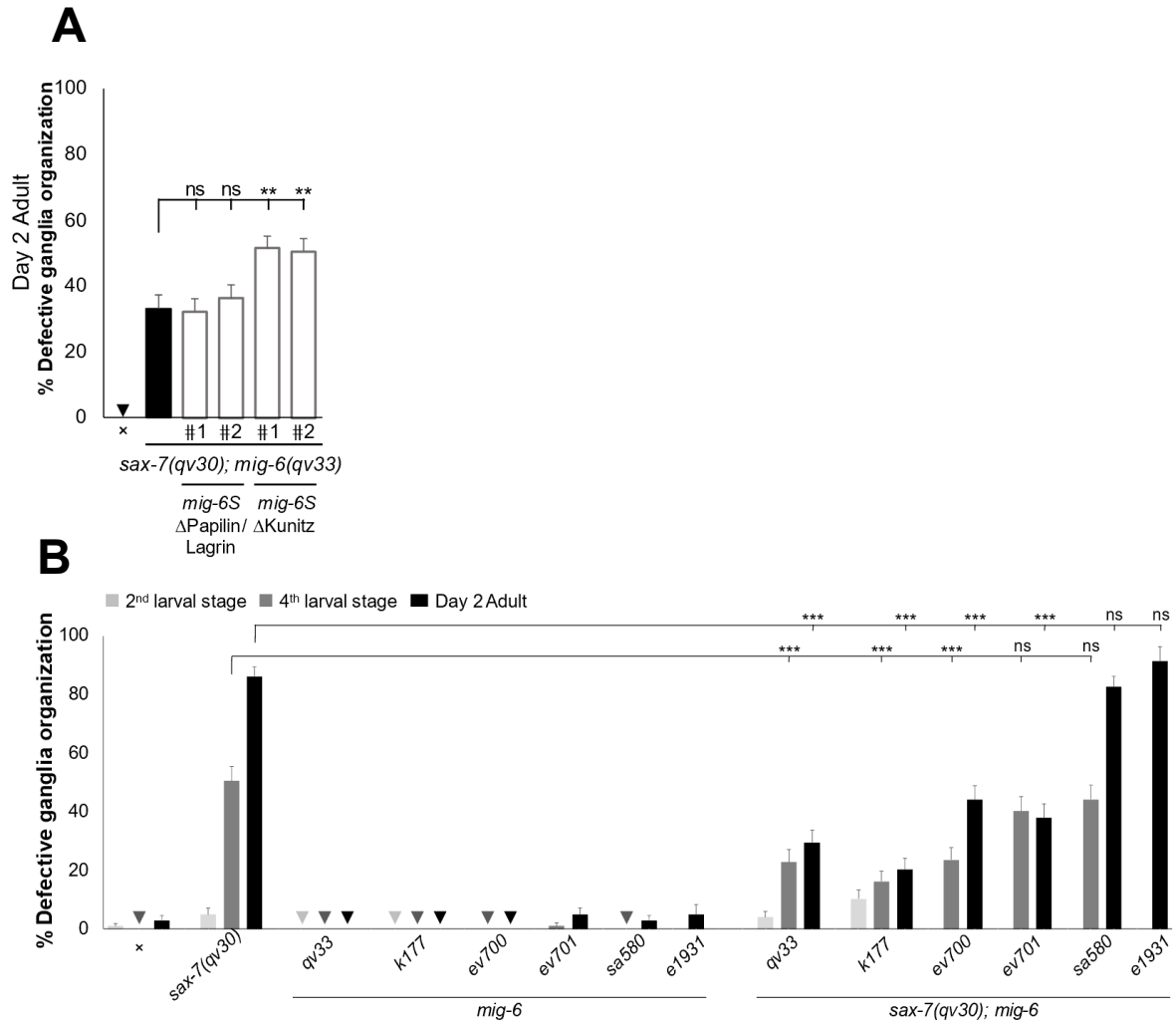


Figure 2.3 Structure-function relationship for the gene *mig-6*.

(A) Quantification of rescue assays with transgenes encoding recombinant versions of *mig-6S* (Δ indicates deleted domain). (B) Quantification of head ganglia organization phenotype in different *mig-6* alleles alone or in the *sax-7(qv30)* mutant background at the 2nd and 4th larval stages and 2-day-old adults. Age-progressive neuronal disorganization of *sax-7(qv30)* mutants is suppressed by some, but not all, *mig-6* alleles. Error bars are the standard error of the proportion. Comparisons made with z-tests; *P*-values were corrected by multiplying by the number of comparisons, Bonferroni correction.

Papilin is important for proper organogenesis in flies (Kramerova *et al.*, 2000) and for gonad and pharynx development in worms (Jafari *et al.*, 2010; Kawano *et al.*, 2009; Keeley *et al.*, 2020) but its role in the nervous system remains largely unknown. Recently *papilin* was isolated in a screen for brain morphogenesis mutants in *Drosophila*, but its function awaits study (Lacin *et al.*, 2024), and in *C. elegans*, loss of *mig-6* was shown to affect PVD neuron 1o dendrite development (Ramirez-Suarez *et al.*, 2019). Little is known about the molecular mechanism of papilin function. MIG-6/papilin is a multidomain glycoprotein harboring thrombospondin type 1 (TSP1) repeats, cysteine rich lagrin repeats, and Kunitz protease inhibitor domains, among other domains (Fig. 2.2B) (Fessler *et al.*, 2004; Kramerova *et al.*, 2000), and belongs to the ADAMTSL family of proteins (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs-Like). Papilins, as other ADAMTSL proteins, are structurally related to ADAMTS metalloproteinases but lack the catalytic domain characteristic of ADAMTS, and no catalytic activity has been reported (Apte, 2009; Kelwick *et al.*, 2015). Importantly, ADAMTSL proteins are characterized by the “papilin cassette” (Fig. 2.2B), a region containing TSP1 domains and an ADAMTS spacer (homologous to non-catalytic domains of ADAMTS metalloproteinases) (Fessler *et al.*, 2004; Kramerova *et al.*, 2000). Yet, the papilin cassette present in *Drosophila* papilin has been shown, *in vitro*, to bind and inhibit the activity of a procollagen N-proteinase, a vertebrate ADAMTS (Kramerova *et al.*, 2000). In the *C. elegans* gonad, *mig-6* function influences the localization and levels of ADAMTS proteins MIG-17 and GON-1 (Kawano *et al.*, 2009; Keeley *et al.*, 2020). This raises the possibility that MIG-6/papilin may play important roles in the extracellular matrix via its papilin cassette.

As a first step to identify the critical domains of MIG-6S in neuronal maintenance, we modeled the molecular consequences of these tested *mig-6* alleles on MIG-6S. The *mig-6(qv33)* mutation results in a substitution of a glycine to a glutamic acid at amino acid 664 (G664E), located in a TSP1 repeat in the papilin cassette. A sequence alignment as well as the predicted structure of MIG-6S, modeled using ColabFold (Fig. 2.2C, Supplemental Fig.3), shows that G664 is a highly conserved residue located at the entrance of a beta-strand (Fig. 2.2D). Replacement of a glycine with a larger residue in the *qv33* mutant is likely to cause a steric clash with the disulfide bond formed by residues C657 and C696 (Fig. 2.2D) and could alter a potential binding of MIG-6S to the ECM, or other interactions.

Similarly, other *mig-6* alleles that suppress *sax-7* defects (Fig. 2.3B) affect residues located in the papilin cassette or in the adjacent lagrin repeats (Fig. 2.2B, 2.2C). Indeed, *mig-6(k177)* (Y650D) missense allele impacts a residue in a TSP1 domain of the papilin cassette. In the ColabFold predicted structure of MIG-

6S, the aromatic portion of Y650 interacts with both L673 and T648 (Fig. 2.2D). Consistently, homologs of MIG-6S typically possess either a tyrosine or a phenylalanine at position Y650 (Fig. 2.2D). Missense allele *mig-6(ev701)* (C848) affects a residue in a lagrin repeat of MIG-6S, where it forms a disulfide bridge with C833 (Fig. 2.2D), perhaps explaining the strong conservation of a cysteine residue at this position. Finally, missense allele *ev700* (harboring substitutions G878E and C879Y) affects two residues located within the lagrin repeats cysteine-rich region of MIG-6S that are also well conserved, with C879 forming a disulfide bridge with C864 (Fig. 2.2D). Thus, mutation at G878 and C879 could perturb the pattern of disulfide bridges within this region. Finally, missense allele *mig-6(sa580)* (G965E) affects a glycine residue located in a lagrin domain, which could disrupt the adjacent cysteine residues involved in interactions with C949 and C973 (Fig. 2.2D). However, *mig-6(sa580)* does not suppress *sax-7* neuronal defects (Fig. 2.3B), highlighting the specific effects of distinct *mig-6* mutations. In sum, these analyses support the idea that the papilin cassette and neighboring lagrin repeats are crucial for the function of MIG-6S in neuronal maintenance.

To experimentally validate which are the most critical regions of the MIG-6S protein in the context of neuronal maintenance, we carried out rescue assays using recombinant versions (Fig. 2.3A, Supplemental Fig. 4). A recombinant *mig-6S* transgene lacking the sequence that encodes the C-terminal region of the protein, which contains the Kunitz domains, retained rescuing activity in *sax-7(qv30); mig-6(qv33)* double mutant animals with reappearance of neuronal disorganization, similar to the full length *mig-6S(+)* (compare to Fig. 2.1B). This supports that the Kunitz domains are not essential for MIG-6S function in neuronal maintenance. In contrast, a recombinant *mig-6S* transgene lacking the sequence that encodes the N-terminal region containing the papilin cassette and lagrin repeats failed to rescue the function of *mig-6* in *sax-7(qv30); mig-6(qv33)* double mutants. These results, together with our analyses of a series of mutant alleles (molecular impact in Fig. 2.2A and functional consequences in Fig. 2.3B), demonstrate that the papilin cassette and the nearby lagrin repeats are the key domains for MIG-6S functionality in neuronal maintenance.

2.5.3 *mig-6/papilin* modulates neuronal maintenance post-embryonically and in specific neuronal contexts

Since several *mig-6* mutations suppress the progressive head ganglia disorganization of *sax-7* mutants, we asked whether losing *mig-6* function after the development of ASH/ASI neurons would be sufficient to suppress *sax-7* neuronal maintenance defects. As ASH/ASI neurons complete their development in

embryogenesis, we depleted *mig-6* function post-embryonically by feeding *sax-7(qv30)* animals with *mig-6*(RNAi) bacteria starting from the mid/late-L1 larval stage onward. Our results showed that the post-embryonic depletion of *mig-6* function strongly suppressed *sax-7* ASH/ASI neuronal maintenance defects (Fig. 2.1C), highlighting its post-developmental role in maintaining ASH/ASI neuronal architecture.

We next explored if *mig-6*'s impact on neuronal maintenance is context-specific or generalized across the nervous system. *sax-7* mutants are known to exhibit defects in maintaining axon positioning along the ventral nerve cord: axons of bilateral neurons PVQL/R initially develop normally, projecting ipsilaterally during embryogenesis, but later get displaced to the opposite fascicle of the ventral nerve cord in *sax-7* animals (Pocock *et al.*, 2008), coinciding with remodeling of the underlying tissue during late first larval stage (Aurelio, Hall et Hobert, 2002; Hobert et Bülow, 2003). We found that *mig-6(qv33)* partially suppresses these *sax-7* axon “flip-over” defects (Fig. 2.4A, B), indicating that *mig-6* participates in the maintenance of nerve cord organization as well.

The small secreted two-immunoglobulin proteins ZIG-3 and ZIG-4 also function to maintain axon position in the *C. elegans* ventral nerve cord (Aurelio, Boulin et Hobert, 2003; Aurelio, Hall et Hobert, 2002; Bénard *et al.*, 2009), as does the giant basement membrane protein DIG-1, which is also required for ganglia maintenance (Bénard *et al.*, 2006; Johnson et Kramer, 2012). To determine if disrupted *mig-6* function could also suppress the defective maintenance of axon position in these other known neuronal maintenance mutants, we generated mutant combinations between *mig-6* and either *zig-3* and *zig-4*, or *dig-1*. We found that *mig-6(qv33)* did not suppress the axon flip-over defects in the double mutant of small secreted two-immunoglobulin proteins *zig-3(tm924) zig-4(gk34)* (Fig. 2.4C), highlighting the specificity of *mig-6* effects. However, *mig-6(qv33)* did suppress axon flip-over in *dig-1(ky188)* mutants (*ky188* is the *dig-1* allele with the most penetrant axonal defects; Fig. 2.4D). As *dig-1* mutants also exhibit defects in the maintenance of both tail and head neuronal ganglia organization, we examined the impact of *mig-6(qv33)* on *dig-1* ganglia organization maintenance. We found that loss of *mig-6* did not suppress defective soma positioning of PVQ neurons in the tail ganglia of *dig-1(ky188)* mutants (*ky188* display progressive and penetrant PVQ soma displacement; Fig. 2.4E), but did partially suppress head ganglia organization in *dig-1(n1321)* mutants (*n1321* is the most severe *dig-1* allele for head ganglia; Fig. 2.4F). These results indicate that the role of *mig-6* in neuronal maintenance is specific and context-dependent, varying with the type of neuronal maintenance molecule affected and neuronal structure.

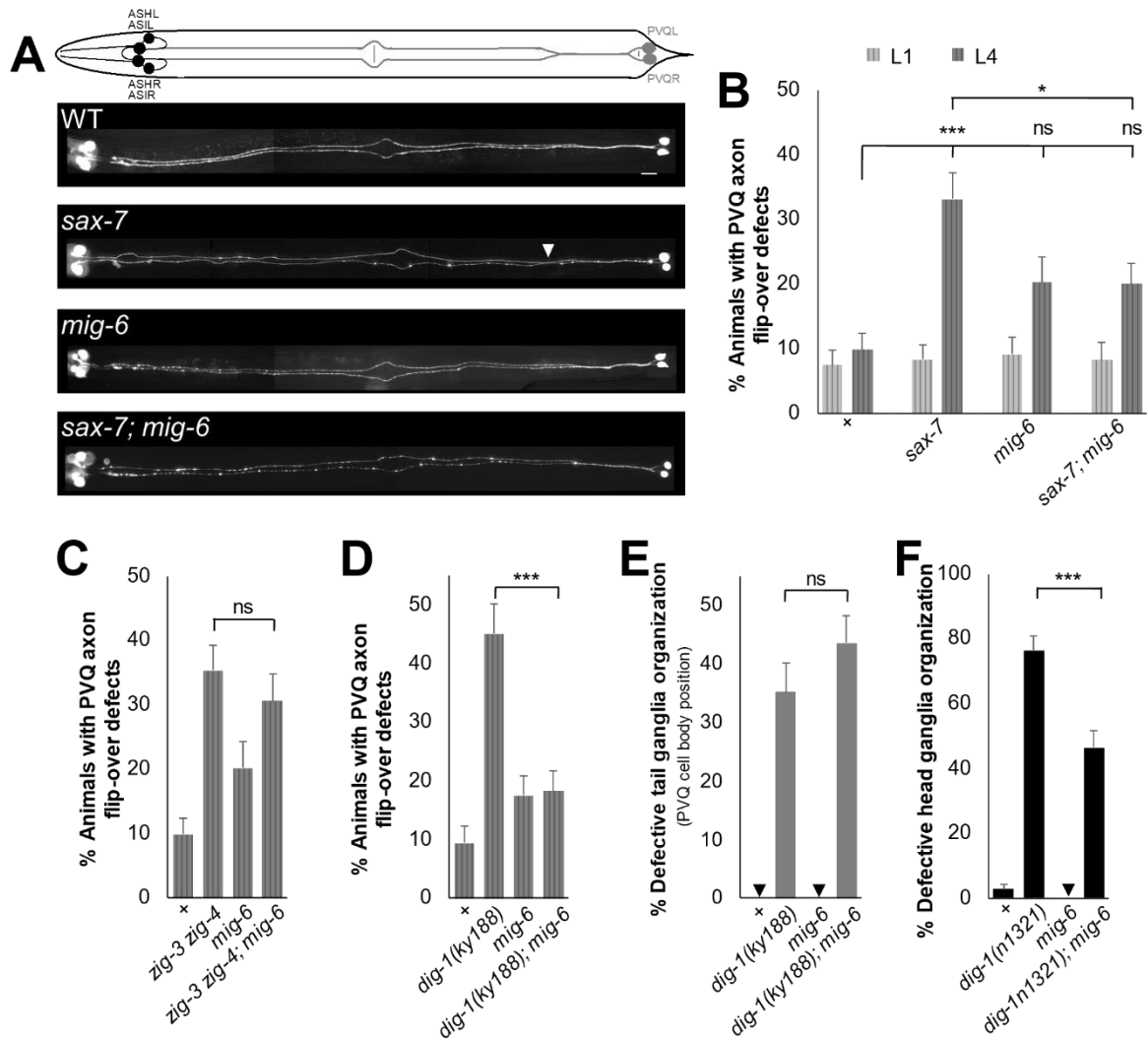


Figure 2.4 *mig-6/papilin* impacts the maintenance of axon and soma position in specific neuroanatomical and genetic contexts.

(A) Fluorescence images of 4th larval stage (L4) animals; PVQ neurons visualized using *Psra-6::DsRed2*. In the wild type, the axon of each of two PVQ neurons (L and R) extends ipsilaterally along the ventral nerve cord during embryogenesis and remains on the ipsilateral side throughout life. In *sax-7* mutants, whereas PVQ axons develop normally and are positioned like the wild type in early 1st larval stage (L1) animals (not shown), they later become displaced to the opposite side of the ventral nerve cord (L4 shown). Scale bar, 20 μ m. (B,C,D) Quantification of PVQ axons (L4 animals) shows that *mig-6(qv33)* suppresses the axonal defects of *sax-7(qv30)* and *dig-1(ky188)* mutants, but not of *zig-3(tm924) zig-4(gk34)*. (E, F) *mig-6(qv33)* does not suppress PVQ soma displacement in the lumbar ganglia in the tail of *dig-1(ky188)* L4 animals, but partially suppresses the ASH and ASI soma position relative to the nerve ring in head ganglia of *dig-1(n1321)* examined as 2-day-old adult age animals. Error bars are the standard error of the proportion; z-tests were performed.

2.5.4 *mig-6/papilin* functions non-autonomously, together with *mig-17/ADAMTS* to impact neuronal maintenance

Given that disrupting the function of the extracellular matrix protein MIG-6/papilin counteracts the progressive neuronal disorganization observed in head ganglia and the nerve cord of *sax-7* and *dig-1* mutants, we hypothesized that the absence of functional MIG-6/papilin protein would affect the ECM surrounding these neuronal structures. In the developing gonad, *mig-6* genetically interacts with *mig-17/ADAMTS*, which encodes a secreted metalloprotease of the ADAMTS family (Kawano *et al.*, 2009), thought to remodel the gonadal basement membrane (Fan *et al.*, 2020; Ihara et Nishiwaki, 2008; Keeley *et al.*, 2020; Kubota *et al.*, 2008; Shibata *et al.*, 2024). We therefore sought to investigate the functional relationship between *mig-6/papilin* and *mig-17* in neuronal maintenance. We first examined *mig-17(k174)* putative null mutant animals (Nishiwaki, Hisamoto et Matsumoto, 2000) (null allele used throughout this study) and found that ASH and ASI neurons are normally positioned with respect to the nerve ring (Fig. 2.5A, C). *mig-17* mutants exhibit an elongated pharynx (Shibata *et al.*, 2016) (Supplemental Fig.5), but this did not affect neuronal position with respect to body length. Indeed our data show that there is no difference in the relative positions of the nerve ring, or of ASH and ASI soma, between mutants with normal pharynx length (such as *mig-6(qv33)*) and *mig-17* mutants (Supplemental Fig.5), indicating that neuronal positioning is independent from pharynx length. To test if loss of the ECM remodeling molecule *mig-17/ADAMTS* would impact the *sax-7* head ganglia disorganization, we looked at double mutants lacking both *sax-7* and *mig-17*. In double mutants *sax-7; mig-17*, only 27% of animals display head ganglia disorganization, compared to ~90% in *sax-7* single mutants (Fig. 2.5A, C). This result shows that, similar to loss of *mig-6*, loss of *mig-17* significantly suppresses the neuronal maintenance defects in *sax-7* mutants. In contrast, loss of another secreted ADAMTS metalloprotease, ADT-2/ADAMTS, involved in *C. elegans* body size regulation and cuticle structure (Fernando *et al.*, 2011), did not suppress *sax-7* defects nor enhance their suppression by *mig-6* mutation (Fig. 2.5C). This highlights the specific role of *mig-17/ADAMTS* in neuronal maintenance.

To then determine whether *mig-6* and *mig-17* function in the same genetic pathway in this context, we constructed a triple *sax-7; mig-6(qv33) mig-17(k174)* mutant strain. We found that the simultaneous loss of *mig-6* and *mig-17* did not further enhance the suppression of neuronal maintenance defects in *sax-7* mutants (Fig. 2.5C), suggesting that *mig-6* and *mig-17* may function in the same pathway to maintain neuronal architecture. To further probe the notion that *mig-6* and *mig-17* function collaboratively to impact neuronal maintenance, we analyzed the effect of partially losing the function of

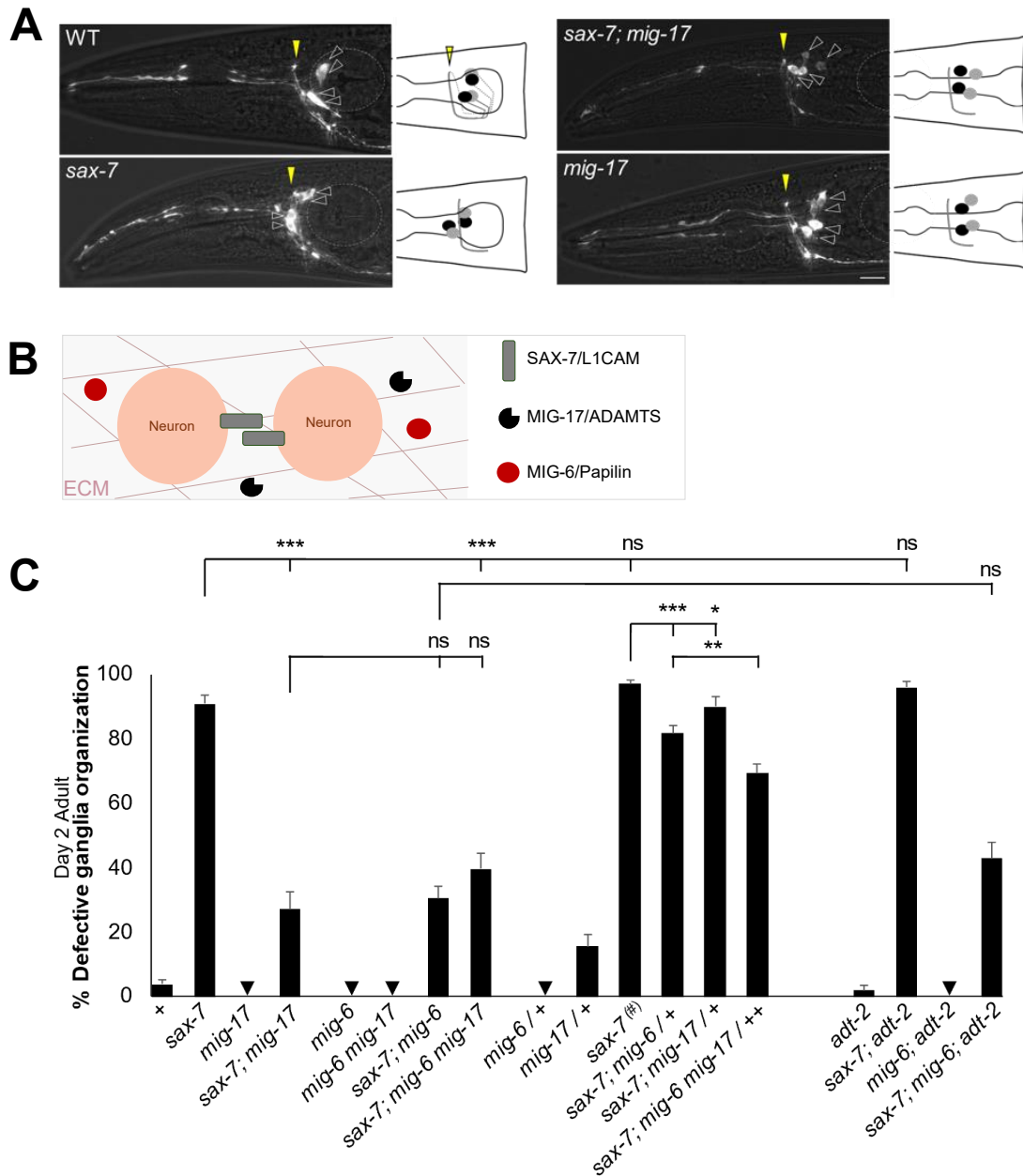


Figure 2.5 The ECM genes *mig-6/papilin* and *mig-17/ADAMTS* function together in neuronal maintenance.

(A) Fluorescence images of the head region of 2-day-old adults (schematized on the right), with soma and axons of neurons ASH and ASI visualized using *Psra-6::DsRed2* (as in Fig. 2.1). Scale bar, 10 μ m. (B) A model proposing functional cooperation between MIG-17/ADAMTS and MIG-6/papilin in the ECM to mediate neuronal maintenance. (C) Quantification of ASH and ASI displacement in 2-day adults of wild type, *sax-7*(*qv30*), *mig-6*(*qv33*), *mig-17*(*k174*), and *adt-2*(*wk156*) single mutants, and their combinations, as homozygous or heterozygous (written as "*mig-6*" or "*mig-6/+*", respectively). '#' indicates an additional control for *sax-7*, with *dpy-11* in the background, as *dpy-11* was used to distinguish heterozygous animals. Similar to the effect of some *mig-6* mutations, loss of *mig-17* also suppressed *sax-7* neuronal maintenance defects (but not loss of *adt-2*). Simultaneous loss of *mig-6* and *mig-17* did not enhance the suppression of *sax-7* defects. Error bars are the standard error of the proportion; z-tests.

both genes using double heterozygous animals *mig-6(qv33) mig-17(k174) / mig-6(+) mig-17(+)*, abbreviated as *mig-6 mig-17/++*. Single heterozygous animals *mig-17(k174)/+* only slightly suppressed *sax-7* neuronal defects (Fig. 2.5C). Meanwhile, single heterozygous *mig-6(qv33)/+* mildly suppressed *sax-7* defects; (Fig. 2.5C), consistent with observations that *mig-6* alleles (*ev700*, *ev701* and *k177*) behave in a semi-dominantly due to haploinsufficiency during gonad and PVD neuron development (Kawano *et al.*, 2009; Ramirez-Suarez *et al.*, 2019). Notably, in double heterozygous animals *sax-7; mig-6 mig-17/++*, the suppression of *sax-7* defects was significantly greater, with only 69% of animals showing defects, compared to 81% in *sax-7; mig-6/+* animals (Fig. 2.5C). This result indicates that the two extracellular matrix genes *mig-6/papilin* and *mig-17/ADAMTS* act within the same pathway to influence the long-term maintenance of neuronal organization.

Given that the neurons' environment controls their maintenance, *mig-6/papilin* may be expected not to function from the neurons themselves. Indeed, extracellular matrix components, including MIG-6, are produced by mesodermal cells, particularly body wall muscles, and the epidermis (Cao *et al.*, 2017; Jafari *et al.*, 2010; Kawano *et al.*, 2009; Keeley *et al.*, 2020; Roux *et al.*, 2023). We thus generated transgenic *sax-7; mig-6* double mutants animals expressing wild-type *mig-6S* under different tissue-specific promoters: *Prgef-1* for neurons, *Pdpy-7* for epidermis (*hyp7*), and *Pmyo-3* for mesodermal cells (body wall muscles). Since the loss of *mig-6* suppresses *sax-7* neuronal maintenance defects, restoring *mig-6* function is expected to lead to the reappearance of neuronal disorganization in *sax-7; mig-6* double mutants. We found that expression of *mig-6S(+)* in the neurons or the epidermis did not rescue *mig-6* function. In contrast, expression of *mig-6S(+)* in the body wall muscles in *sax-7; mig-6* double mutant animals robustly rescued the neuronal maintenance defects, with an increase of neuronal defects from 29% up to 72%, depending on the transgenic line (Fig. 2.6A). This indicates that *mig-6* functions cell non-autonomously from muscles to impact neuronal maintenance. As a control, we expressed these transgenes in wild-type animals and observed no neuronal defects (Fig. 2.6B), ruling out the possibility that *mig-6S(+)* overexpression by muscles induces artefactual neuronal disorganization. Overall, this confirms that the neuronal defects observed in transgenic animals expressing *mig-6S(+)* in body wall muscles represent *bona fide* rescue of *mig-6* function.

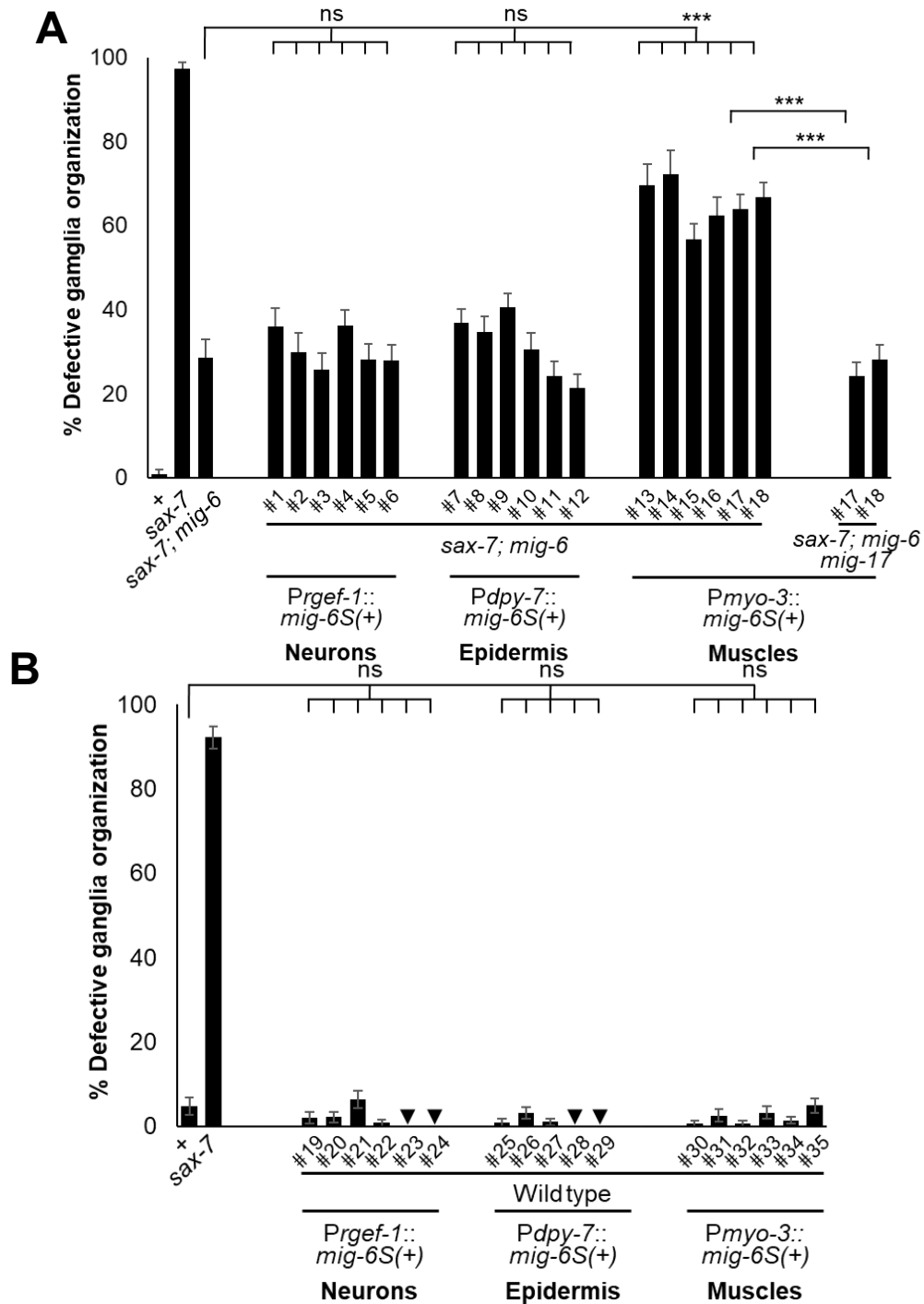


Figure 2.6 *mig-6/papilin* functions from muscles and depends on *mig-17/ADAMTS* in neuronal maintenance.

(A) Quantification of assays to rescue the function of *mig-6* with tissue-specific expression of *mig-6S(+)*. (B) Quantification of control assays showing that *mig-6S(+)* transgenic expression in wild-type animals, including from body wall muscles, does not affect neuronal organization. Error bars are the standard error of the proportion; z-tests.

We then investigated whether *mig-17* is necessary for *mig-6*'s function in neuronal maintenance. To test whether the loss of *mig-17* would affect the ability of *mig-6S(+)* transgene to rescue, we generated *sax-7; mig-6 mig-17* triple mutants carrying transgenic lines expressing wild-type *mig-6S(+)* from body wall muscles (lines #17 and 18 used above, Fig. 2.6A). Unlike the successful rescue of *mig-6* function observed in *sax-7; mig-6* transgenic animals, the loss of *mig-17* prevented the *mig-6S(+)* transgene from rescuing neuronal maintenance defects, as the transgenic triple mutant *sax-7; mig-6 mig-17* animals did not exhibit a reappearance of neuronal defects (Fig. 2.6A). This may indicate that the normal function of MIG-6/papilin depends on MIG-17/ADAMTS, or alternatively, an excess of MIG-6S cannot compensate for the loss of MIG-17. In conclusion, we find that *mig-6/papilin* acts non-autonomously from muscles to suppress *sax-7* neuronal maintenance defects in a manner that requires the function of *mig-17/ADAMTS*.

2.5.5 Loss of *mig-6S/papilin* results in increased EMB-9/collagen IV levels that accumulates as extracellular fibrotic-like structures

Given that MIG-6/papilin is an extracellular ADAMTS-like protein which interacts functionally with MIG-17/ADAMTS, we hypothesized that the *mig-6* mutation may suppress *sax-7* neuronal maintenance defects by modulating the extracellular environment, including nearby neurons. To directly test whether loss of *mig-6* leads to changes in the extracellular matrix, we analyzed the distribution of a key ECM component, EMB-9/collagen IV $\alpha 1$ (hereafter referred to as 'EMB-9/collagen IV'), known to genetically interact with *mig-6* during gonadal development (Kawano *et al.*, 2009) or to be altered in the gonadal basement membrane in *mig-6(RNAi)*-treated animals (Keeley *et al.*, 2020). In *C. elegans*, collagen IV, similar to its vertebrate counterparts, is a heterotrimeric molecule consisting of two EMB-9 ($\alpha 1$ -like) chains and one LET-2 ($\alpha 2$ -like) chain, previously shown to colocalize (Guo, Johnson et Kramer, 1991; Guo et Kramer, 1989; Kramer, 2005; Sibley *et al.*, 1993). We therefore used a *Pemb-9::EMB-9::mCherry* fluorescent reporter (Ihara *et al.*, 2011) (gift from David Sherwood) to examine the distribution of collagen IV, focusing particularly on the head region (Figs. 2.7, 2.8 and 2.9). In *mig-6(qv33)* mutants, like in the wild type, we observed collagen IV signal along the contour of the pharynx and the surface of body wall muscles (Fig. 2.7A), corresponding to the basement membranes of these structures (Keeley *et al.*, 2020), as well as in spherical accumulations within muscle cells where collagen IV is produced. However, in *mig-6* mutants, the overall abundance of EMB-9/collagen IV is higher compared to the wild type (Fig. 2.7A; see Supplemental Fig. 6 for quantification of collagen IV in entire head region including muscle cells), including inside muscle cells. Moreover, *mig-6* mutants display notable enrichments of collagen IV, often elongated, which we have termed "fibrotic-like structures" (Fig. 2.7A, B). These fibrotic-like structures are extremely

rare in the wild type and seen only in aging adults (5-day old adults), but are detected as early as the 1st larval stage in *mig-6(qv33)* mutants, and by the 4th larval stage and adulthood, 100% of the *mig-6* mutants present fibrotic collagen IV (Fig. 2.7A, B). These fibrotic-like structures in *mig-6* mutants are typically located in the posterior region of the head (Fig. 2.8A, B). Interestingly, our repeated observations of the same *mig-6(qv33)* animals in a longitudinal analysis over several days (Fig. 2.8C, n=8) show that the *mig-6* mutants' collagen IV fibrotic-like structures stably persist over time. Measuring the size of these structures at different developmental stages further confirmed that they lengthen in an age-progressive manner (Fig. 2.8D).

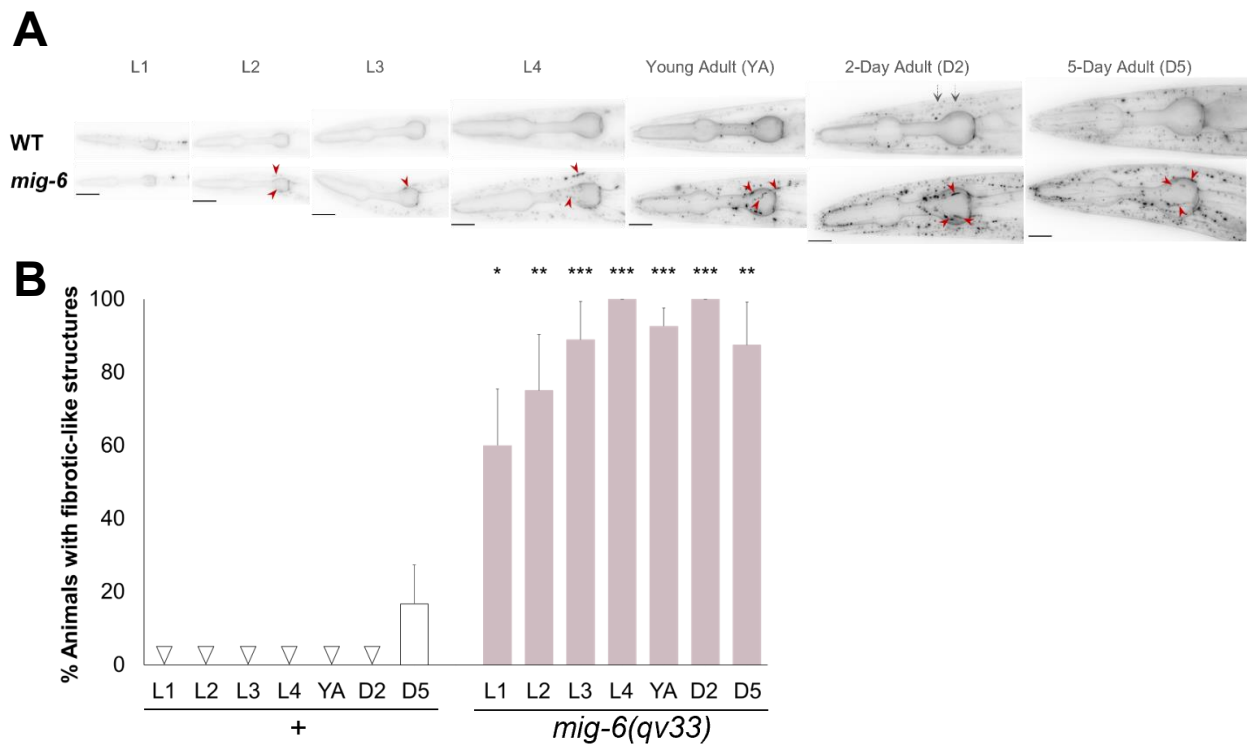


Figure 2.7 Loss of *mig-6/papilin* function disrupts proper extracellular collagen IV remodeling and causes fibrotic structures: Timeline analysis.

(A) Fluorescence images of animals expressing collagen IV reporter *Pemb-9::EMB-9::mCherry* at larval stages L1, L2, L3, and L4, and adult ages in control and *mig-6(qv33)* mutants. Thin lines of collagen IV located in the basement membrane of muscle cells are observed in wild-type and *mig-6* animals (indicated by two black arrows), and *mig-6* fibrotic-like structures are indicated by arrowheads. Scale bar, 20 μ m. (B) Percentage of animals displaying collagen IV fibrotic-like structures at different ages in the wild type and *mig-6(qv33)* mutants expressing *EMB-9::mCherry*. (C) 3D-isosurface renderings (made with Imaris) of collagen IV/*EMB-9::mCherry* in the head region of a 2-day-old adult *mig-6(qv33)* mutant animal. Scale bar, 20 μ m. Error bars are the standard error of the proportion. z-test.

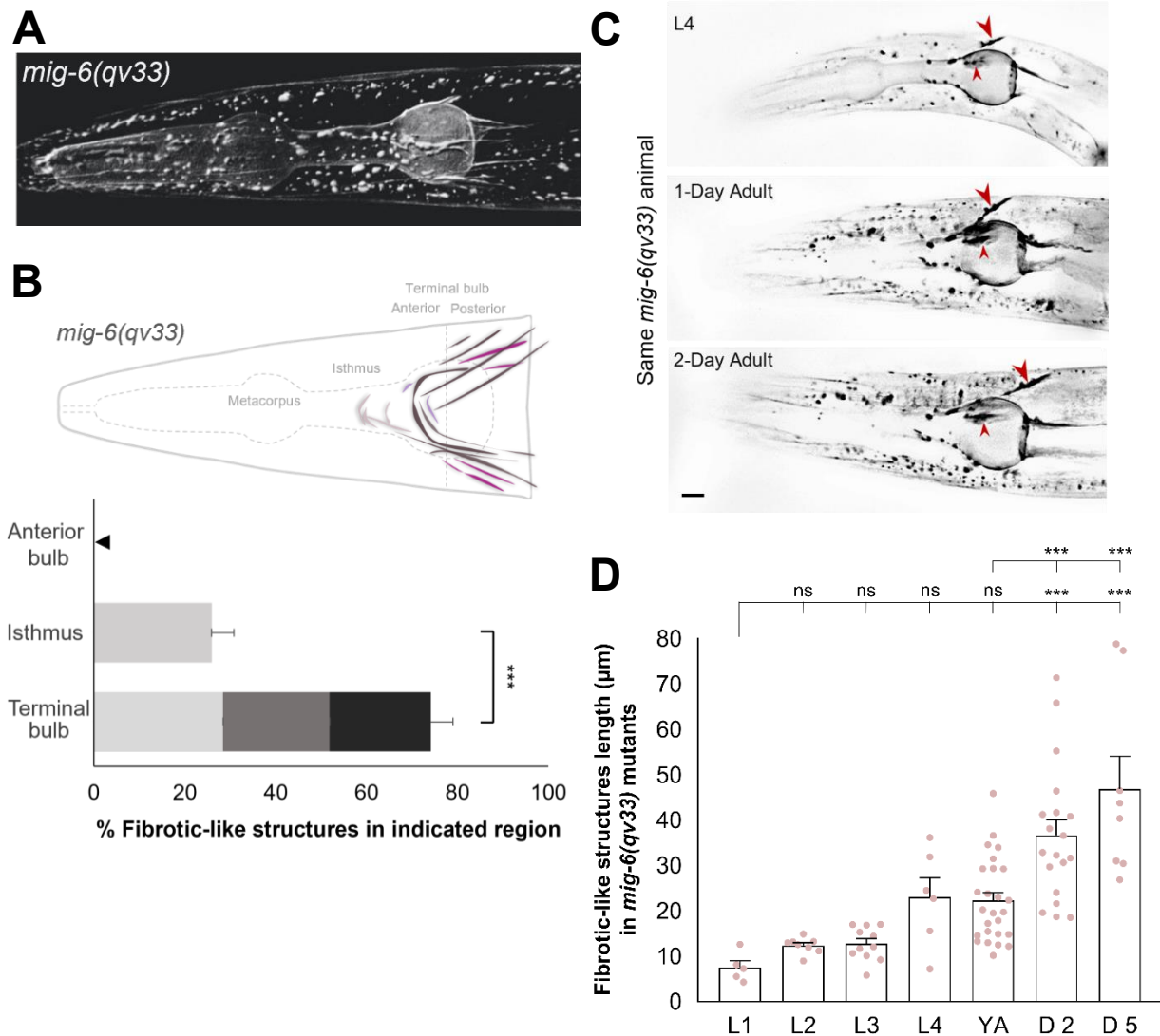


Figure 2.8 Loss of *mig-6*/papilin function disrupts proper extracellular collagen IV remodeling and causes fibrotic structures: Characterization of the position, length and stability of fibrotic-like structures.

(A) 3D-isosurface renderings (made with Imaris) of collagen IV/EMB-9::mCherry in the head region of a 2-day-old adult *mig-6(qv33)* mutant animal. Scale bar, 20 μm . (B) *mig-6* mutants' collagen IV fibrotic-like structures are typically located in the posterior region of the head, in the general area near the terminal bulb and the posterior of the isthmus of the pharynx. Schematic compilation of fibrotic-like structures' positions in *mig-6(qv33)* mutants ($n>100$), and percentage in indicated antero-posterior head regions. These "pharyngeal regions" serve as antero-posterior landmarks only, as these fibrotic-like structures localize in the extracellular space outside the pharynx; also, fibrotic-like structures only occasionally contact the basement membrane of the pharynx). (C) Longitudinal analysis of a *mig-6(qv33)* mutant animal expressing EMB-9::mCherry repeatedly examined as a L4, 1-, and 2-day-old adult shows that the collagen IV fibrotic-like structures (indicated by arrowheads) persist over time. Scale bar, 20 μm . (D) Average length of the fibrotic-like structures per *mig-6(qv33)* mutant animal expressing EMB-9::mCherry at different ages. Error bars are the standard error of the proportion (B) or of the mean (D). z-test in B and ANOVA in D.

We next studied the localization of the collagen IV fibrotic-like structures that occur in *mig-6* mutants. In *C. elegans*, collagen IV is produced by body wall muscles and other mesodermal cells, including the head mesodermal cell (hmc) and GLR glia (Graham *et al.*, 1997; Gupta, Graham et Kramer, 1997). We thus generated a strain of *mig-6(qv33)* mutants carrying both the EMB-9::mCherry reporter and *dnl-13 gly-18p::gfp* (Warren, Krizus et Dennis, 2001) to simultaneously label collagen IV and anterior head wall muscles, the hmc, and GLR glia, respectively. Confocal microscopy revealed that collagen IV fibrotic-like structures in *mig-6* mutants do not overlap with muscle cells, nor with hmc, nor the GLR glia, and are located extracellularly (Fig. 2.9C). In addition, spherical collagen IV deposits seen in body wall muscles, appear to be more intense in *mig-6* mutants than in wild type (Fig. 2.7A), and these are indeed intracellular (Fig. 2.9C).

To further support our findings, given that mCherry protein fusions can form aggregates (Katayama *et al.*, 2008), we employed an alternative multicopy reporter, EMB-9::Dendra2 (Ihara *et al.*, 2011) (gift of David Sherwood). With this reporter we also observed that EMB-9 accumulates as fibrotic-like structures in 33% of animals following *mig-6*(RNAi) knockdown (Fig. 2.9A). Importantly, using an endogenous CRISPR knock-in reporter for collagen IV (Keeley *et al.*, 2020), EMB-9::mNG, 90% of the *mig-6(qv33)* mutants show fibrotic-like structures (Fig. 2.9B). The collagen IV fibrotic defect displayed by *mig-6* mutants was rescued by wild-type *mig-6(+)* (Fig. 2.9D), further confirming that loss of *mig-6* is causal of this fibrotic phenotype.

Since collagen IV accumulates in *mig-6* mutants, we assessed the stability of EMB-9::mCherry by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), which we performed on muscle and pharyngeal basement membranes that contain collagen IV, present in both the wild type and *mig-6(qv33)* mutants (Supplemental Fig.7A). Our FRAP measurements revealed no significant difference between *mig-6* mutants and the wild type, with very limited collagen IV recovery across different time points (Supplemental Fig.7B), supporting the notion that loss of *mig-6* does not affect collagen IV short-term dynamics *per se*, which is consistent with its described stable association with the gonadal basement membrane (Keeley *et al.*, 2020).

We further strengthened our findings that loss of *mig-6* alters collagen IV levels and distribution by looking at collagen IV in other *mig-6* loss-of-function backgrounds. We generated animals with the *k177* allele of *mig-6* (Y650D mutation in the same domain as *qv33* G664E) carrying EMB-9::mCherry. Similar to *qv33* animals, *k177* mutants exhibit a significant accumulation of EMB-9/collagen IV, with approximately 80%

of adult animals displaying fibrotic-like structures (Fig. 2.12A, B). Similarly, RNAi-mediated knockdown of *mig-6* resulted in 72% of adult animals exhibiting EMB-9::mCherry fibrotic-like structures (Fig. 2.9A).

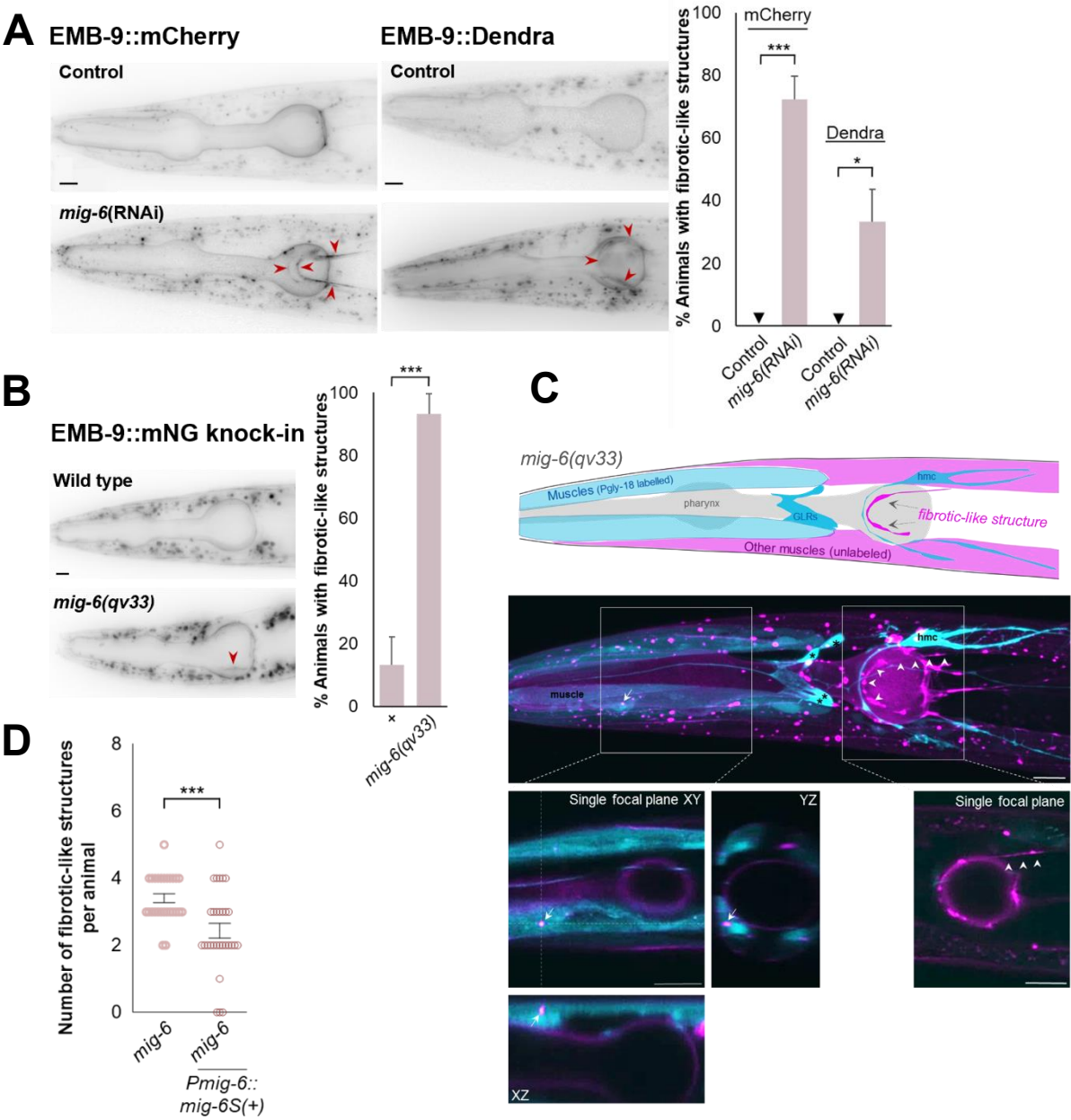


Figure 2.9 Loss of *mig-6*/papilin function disrupts proper extracellular collagen IV remodeling and causes fibrotic structures.

Fibrotic-like structures are also observed using other reporters, are extracellular, and can be rescued by expression of *mig-6S(+)*.

(A) Fluorescence images and quantification of animals displaying collagen IV fibrotic-like structures visualized by EMB-9::mCherry or EMB-9::Dendra in 2-day-old adult animals of wild-type animals treated with *mig-6*(RNAi) or empty vector control. Scale bar, 10 μ m. (B) Collagen IV fibrotic-like structures are also detected in 2-day-old-adult *mig-6* mutants using the endogenous collagen IV reporter *qy24* EMB-9::mNG knock-in. Scale bar, 10 μ m. (C) Fluorescence image of a young adult *mig-6* mutant, expressing EMB-9::mCherry (magenta), along with *dnls13* *Pgly-18::gfp* (cyan) that labels a subset of head wall muscles, the head mesodermal cell (hmc), and glial cells (GLR, indicated by asterisks); a schematic rendering is shown above. Collagen IV (EMB-9::mCherry reporter) is observed as intracellular dots or accumulations inside muscle cells (indicated by the arrow on single focal planes on XY, XZ and YZ); and long extracellular fibrotic-like structures (one such structure is pointed to by white arrowheads on main image and on the focal plane on the right panel, which does not coincide with the cytoplasmic extensions of the hmc, nor with other mesodermal cells such as muscles or GLR cells). Magenta circle on single planes is signal from the basement membrane of the pharynx, which also contains collagen IV. (D) Rescue of the collagen IV fibrotic-like structures phenotype of *mig-6(qv33)* mutants expressing EMB-9::mCherry. Expression of the *mig-6S(+)* minigene under its own promoter decreases the number of fibrotic-like structures. Error bars are the standard error of the proportion (A, B) or of the mean (D). z-tests (A, B), or non-parametric Wilcoxon test (in D).

In contrast, specific loss of *mig-6L*, using allele *e1931*, did not alter the collagen IV pattern nor led to fibrotic-like structures (Fig. 2.12A, B). These results suggest that *mig-6S*, but not *mig-6L*, is essential for proper extracellular collagen IV organization in the head region. Overall, consistent with the findings of papilin affecting collagen IV in the gonadal basement membrane (Keeley *et al.*, 2020), we found that the formation of extracellular collagen IV fibrotic-like structures in the head region is a robust phenotype linked to the loss of *mig-6S/papilin* function.

2.5.6 *mig-6*/papilin affects the biomechanical properties of the animal's tissues

Our findings demonstrate that disruption of MIG-6/papilin results in a dramatic collagen IV fibrotic phenotype (Figs 2.7, 2.8 and 2.9) and that the progressive neuronal disorganization in head ganglia and the nerve cord of *sax-7* and *dig-1* mutants is counteracted in *mig-6* mutants (Fig. 2.1, 2.3 and 2.4). We therefore hypothesized that the environment surrounding these neuronal structures may be modified in *mig-6(qv33)* mutants in such a way that results in enhanced maintenance of neuronal architecture. To start addressing this possibility, we characterized the biomechanical state of tissues in *mig-6(qv33)* mutants by measuring their viscoelasticity properties using Brillouin microscopy. This label-free imaging technique allows for the assessment of the viscoelastic properties of biological samples through photon-phonon scattering interactions (Scarcelli *et al.*, 2015). The key parameters measured are the Brillouin scattering induced frequency shift and linewidth, which provide information on the high-frequency longitudinal modulus and therefore the elastic and viscous properties of the sample, respectively

(Bevilacqua *et al.*, 2023; Coker *et al.*, 2024; Prevedel *et al.*, 2019). We first ensured that the refractive indexes of the head region were similar between *mig-6* and wild-type animals at the examined ages (Supplemental Fig. 8A), which is an important prerequisite to render the Brillouin microscopy results comparable to one another. Next, using a confocal Brillouin microscope (Bevilacqua *et al.*, 2019), we imaged a head region at the level of the studied neuronal cell bodies, which includes other cells such as other neurons, muscles, epidermis, glia, as well as the associated basement membranes/ECM (Fig. 2.10 A, B). Our findings show a significant decrease in Brillouin shift in *mig-6* mutants compared to the wild type at the L4 larval stage (Fig. 2.11A, B; Supplemental Fig. 8B), indicating a reduction in tissue elasticity. This change was not detected at the earlier L2 stage, suggesting that the loss of *mig-6* affects tissue elasticity more prominently at later developmental stages. The decreased elasticity was most pronounced in the posterior zone of the region of interest (ROI), which exhibited lower Brillouin elastic contrast (Supplemental Fig. 8C). Furthermore, Brillouin linewidth measurements revealed that tissue viscosity was also reduced in *mig-6* mutants at both L2 and L4 stages (Fig. 2.11A, B; Supplemental Fig. 8B). To assess tissue viscoelasticity in wild-type and *mig-6* mutants, we measured the Brillouin loss tangent parameter (Chan, Bevilacqua et Prevedel, 2021), which showed decreased tissue viscoelasticity in *mig-6* mutants compared to controls at both the L2 and L4 stages (Fig. 2.11A, B; Supplemental Fig. 8B). These results demonstrate that MIG-6/papilin is essential for maintaining proper tissue mechanical properties *in vivo* during age-progression. Furthermore, as the altered biomechanical properties of the tissues in the head of *mig-6* mutants are detected earlier than the appearance of ASH/ASI neuronal disorganization in *sax-7* mutants, this suggests that properties of the underlying head ganglia environment play an important role in maintaining neuronal architecture over time.

2.5.7 *mig-6/papilin* and *mig-17/ADAMTS* function together to regulate extracellular collagen IV

Building on the previous finding that *mig-6* genetically interacts with *mig-17/ADAMTS* to suppress *sax-7* neuronal defects (Figs. 2.5 and 2.6), we investigated whether *mig-6* and *mig-17* also functionally interact in regulating collagen IV distribution. *mig-17(k174)* single mutants exhibit fibrotic-like structures in 75% of young adults and 95% of 2-day old adults (Fig. 2.12A, B), similar to the phenotype observed in *mig-6(qv33)* and *mig-6(k177)* mutants. The simultaneous loss of *mig-6* and *mig-17* in double homozygous *mig-6 mig-17* mutants did not enhance the collagen IV fibrotic-like structures compared to single mutants, neither in

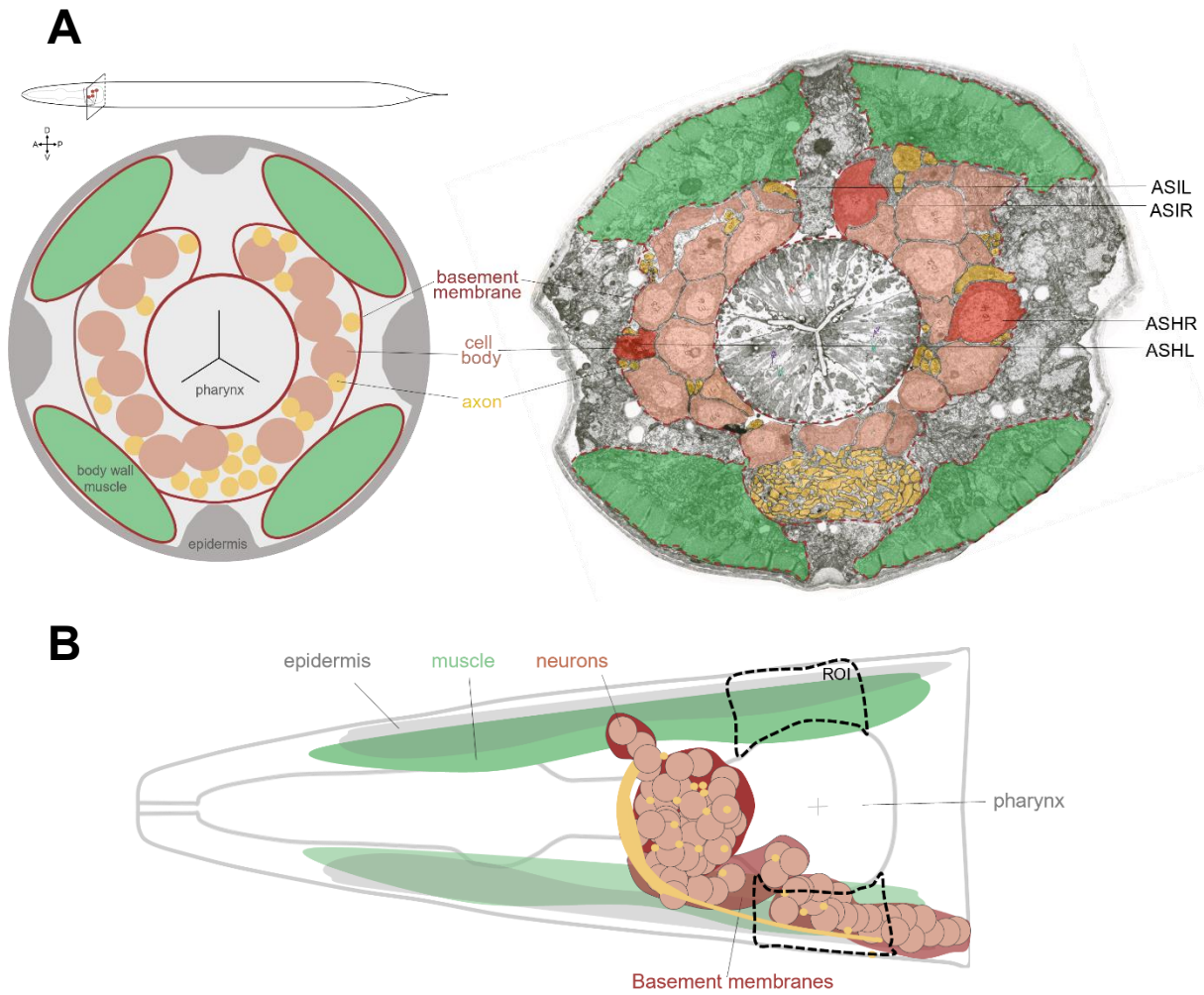


Figure 2.10 Anatomical context of neurons and surrounding basement membranes.

(A) Colored electron micrograph of a cross section of an adult wild-type animal in the head region near the location of the ASHL/R and ASIL/R somas (White *et al.*, 1986); modified from WormAtlas.org). A schematic of the cross section is provided on the left. Neuronal cell bodies are pseudo-colored in peach, with ASHL/R and ASIR in darker peach; axons in yellow; muscles in green; the location of the basement membranes surrounding body wall muscles, pharynx, and head ganglia have been drawn in to provide context (dark red dashed lines). (B) Schematics of the *C. elegans* head region, highlighting prominent cell types in the region imaged by Brillouin microscopy, including neurons of head ganglia, which are surrounded by basement membrane, as well as the ROIs.

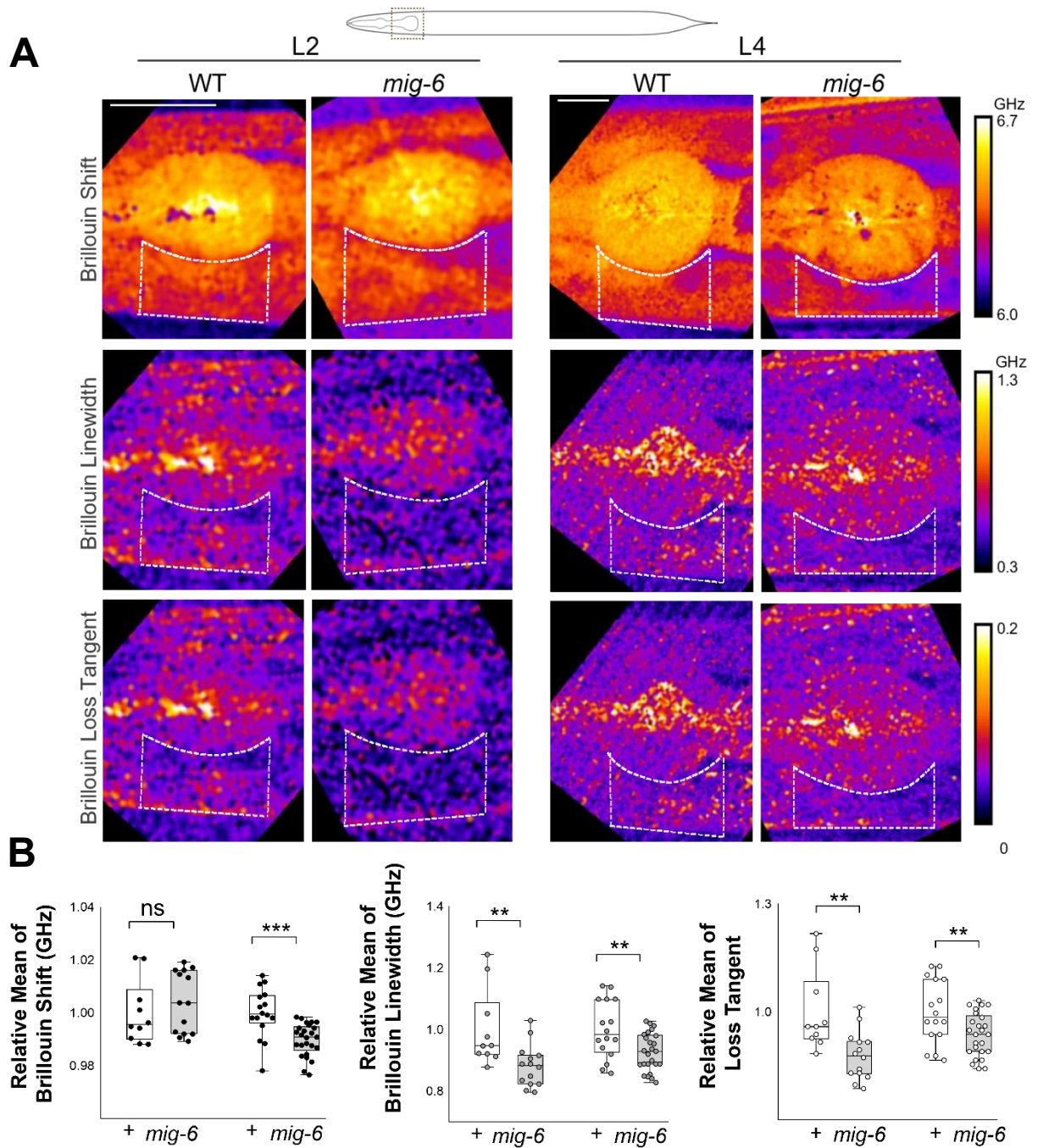


Figure 2.11 Loss of *mig-6/papilin* alters tissue biomechanical properties as measured by Brillouin microscopy.

(A) Brillouin microscopy shift, linewidth, and loss tangent images of the head region of L2 and L4 larval stages of wild-type and *mig-6(qv33)* animals. ROIs were drawn flanking the terminal pharyngeal bulb and include several tissues and cell types (muscle, epidermis, neurons, and glia), as well as basement membranes. Scale bar, 20 μ m. The color bars indicate absolute values of the shift, linewidth, and loss tangent. (B) Quantification of ROIs shows a decrease in elasticity (Brillouin shift), viscosity (Brillouin linewidth), and loss tangent (viscoelasticity) in *mig-6(qv33)* mutants compared to wild type. Mean values of the ROIs were normalized to the wild type (for absolute values, see Supplemental Fig.8). Error bars are the standard error of the mean; t-tests were performed.

penetrance (Fig. 2.12B), nor in expressivity (Fig. 2.12D), consistent with the notion that the extracellular matrix genes *mig-6* and *mig-17* function within the same pathway to regulate collagen IV distribution.

To reinforce this conclusion, we assessed the effect of simultaneously losing a single functional copy of each gene, which can provide insights into genetic interactions (avoiding the ceiling effect, as heterozygous animals are much less penetrant for this phenotype). In *mig-6(qv33)/+* single heterozygotes, we observed collagen IV fibrotic like-structures in approximately 10% of young adults, increasing to 75% of 2-day-old adults (Fig. 2.12A, B), indicating a semi-dominant effect of *mig-6* also for this phenotype. In *mig-17(k174)/+* single heterozygotes, only around 10% of animals displayed fibrotic like-structures at both ages. Remarkably, in young adult double heterozygotes *mig-6 mig-17/++*, as many as 80% exhibited collagen IV fibrotic-like structures (increasing to 85% in 2-day-old adults; Fig. 2.12A, B). Also, the number of fibrotic-like structures per animal strikingly increases in the double heterozygous *mig-6 mig-17/++* animals compared to single heterozygous (Fig. 2.12C). Together, these results firmly establish that *mig-6* and *mig-17* functionally interact to regulate extracellular collagen IV.

MIG-17/ADAMTS has been hypothesized to function as a metalloprotease that degrades collagen IV (Imanishi *et al.*, 2020; Kubota *et al.*, 2019). We thus asked whether overexpression of wild-type copies of *mig-17(+)* impacts the collagen IV phenotype of *mig-6* mutants. For this we used functional transgene *Pmig-17::mig-17(+):gfp* (Nishiwaki *et al.*, 2000; Jafari *et al.*, 2010) (Fig. 2.12A), combining the integrated transgene (*evls213*, gift of Joe Culotti) with *mig-6(qv33)*. We found that while the percentage of *mig-6* animals displaying fibrotic-like structures was unchanged (Fig. 2.12B), the number of fibrotic-like structures per young adult animal significantly decreases in *mig-6* mutants overexpressing the *mig-17(+)* transgene (Fig. 2.12D). This result indicates that the collagen IV defects of *mig-6* mutants can be partially offset by *mig-17/ADAMTS* overexpression.

As *mig-6* mutants display a fibrotic collagen IV phenotype, and the overexpression of *mig-17(+)* partially suppresses this defect (Fig. 2.12D), we wondered whether levels of MIG-17/ADAMTS may be lowered in *mig-6* mutants. To test this idea, we examined the distribution of MIG-17/ADAMTS in *mig-6(qv33)* mutants using *Pmig-17::MIG-17::GFP* (*evls213*). We found that instead of being decreased, MIG-17 is in fact upregulated in *mig-6* mutants (Fig. 2.13), with new enrichments in different head regions compared to wild type. Given that increased *mig-17(+)* levels can at least partially suppress *mig-6* mutants (Fig. 2.12D), and that MIG-17 levels are elevated in *mig-6* mutants (Fig. 2.13), together these results suggest that MIG-

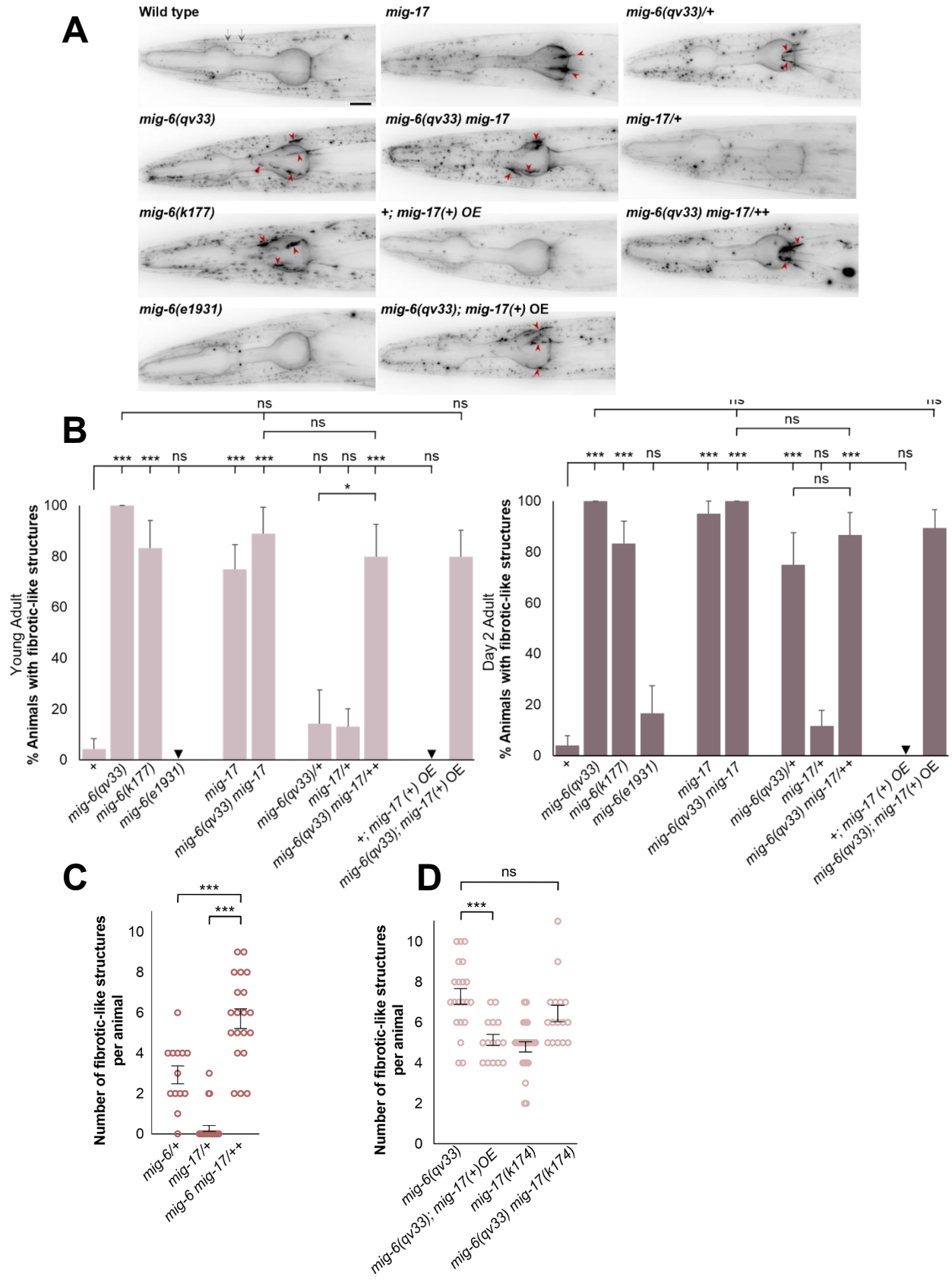


Figure 2.12 *mig-6/papilin* and *mig-17/ADAMTS* both regulate extracellular collagen IV remodeling.

(A) Fluorescence images of the head region of 2-day-old adult animals using EMB-9::mCherry. Thin lines of collagen IV located in the basement membrane of muscle cells are observed in all genotypes (indicated by two black arrows); red arrowheads indicate fibrotic-like structures in mutants. Mutant animals for *mig-6(qv33 or k177)* display collagen IV fibrotic-like structures and prominent intracellular accumulations (dots). *mig-17(k174)* mutants also exhibit fibrotic-like structures. In contrast, *mig-6L(e1931)* allele behaves like the wild type. Scale bar, 20 μ m. (B) Quantification of the percentage of animals displaying collagen IV fibrotic-like structures in young adult and 2-day-old adult animals expressing EMB-9::mCherry. (C) Quantification of the number of collagen IV fibrotic-like structures observed per 2-day-old adult heterozygous animal expressing EMB-9::mCherry. (D) Quantification of the number of collagen IV fibrotic-like structures observed per young adult animal expressing EMB-9::mCherry. Error bars are the standard error of the proportion (in B) or of the mean (in C, D). z-tests in B, Wilcoxon Mann-Whitney test in C, ANOVA in D. A.U., arbitrary units. OE, overexpression of wild-type copies. Mutant alleles are only indicated on images and graphs when several alleles of a given gene are used; thus, unless specified otherwise, "*mig-6*" is *mig-6(qv33)* and "*mig-17*" is *mig-17(k174)* throughout this work. Homozygous genotypes are written as "*mig-6*" and heterozygous as "*mig-6/+*".

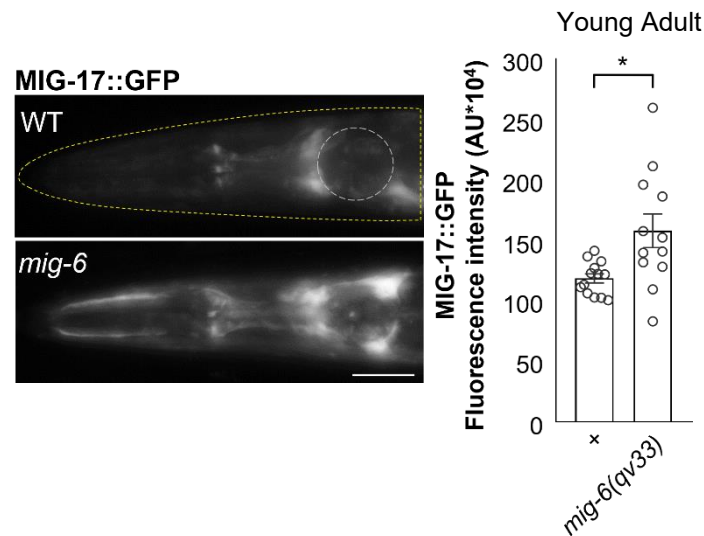


Figure 2.13 The level of MIG-17/ADAMTS is affected by the loss of *mig-6*.

Fluorescence images of MIG-17::GFP in the head region of young adults, quantified as fluorescence intensity in head region drawn in orange. Circle, terminal bulb of the pharynx for reference. A.U., arbitrary units. Scale bar, 24 μ m. Error bars are the standard error of the mean. t-test.

17/ADAMTS's function requires functional MIG-6/papilin to robustly ensure normal collagen IV distribution.

2.5.8 Suppression of *sax-7* neuronal maintenance defects upon loss of *mig-6/papilin* and *mig-17/ADAMTS* depends on collagen IV levels and cross-linking

Because *mig-6* and *mig-17* cooperate to regulate extracellular collagen IV (Fig. 2.12A-D) and maintain neuronal organization in *sax-7* mutants (Fig. 2.5A, B, C), we asked if the suppression of *sax-7* neuronal maintenance defects upon loss of *mig-6* or *mig-17* is linked to changes in collagen IV patterning in the ECM. We assessed the state of collagen IV distribution in the *sax-7* mutant background and found that *sax-7* single mutants behave like the wild type in this regard (Fig. 2.14). Also, double mutants *sax-7; mig-6(qv33)* and *sax-7; mig-6(k177)*, as well as *sax-7; mig-17(k174)* displayed a fibrotic-like structure phenotype like that of the respective *mig-6* or *mig-17* single mutants (Fig. 2.14). That *sax-7; mig-6* and *sax-7; mig-17* double mutants exhibit modified collagen IV pattern (Fig. 2.14) and maintain organized head ganglia (Fig. 2.5C) is consistent with the notion that the state of the ECM plays a role in maintaining neuronal architecture. In line with this, *mig-6L*-specific allele *e1931* does not affect the pattern of collagen IV (normal levels and no fibrotic structures; Fig. 2.12A, B) and does not suppress the neuronal maintenance defects of *sax-7* mutants (Fig. 2.3B).

We then investigated whether collagen IV levels and distribution contribute to the maintained neuronal organization of double mutants *sax-7; mig-6* and *sax-7; mig-17*. We depleted *emb-9/collagen IV* by RNAi treatment of animals from the 1st larval stage and examined head ganglia organization in adults. This *emb-9*(RNAi) knockdown effectively depleted EMB-9/collagen IV levels (Fig. 2.15A, Supplemental Fig.9A), and importantly, did not affect neuronal organization in wild-type animals, nor in single mutants. In contrast, depleting collagen IV reversed the suppression of *sax-7* neuronal defects by *mig-6* or *mig-17* mutation.

Indeed, double mutant animals *sax-7; mig-6* and *sax-7; mig-17* showed increased neuronal disorganization upon *emb-9*(RNAi) (Fig. 2.15B). This result indicates that collagen IV levels are key for the suppression of *sax-7* neuronal defects by the loss of *mig-6* or *mig-17*. We then tested whether a higher level of collagen IV could mimic the effect of *mig-6* loss of function in suppressing *sax-7* neuronal maintenance defects. We found that *sax-7* animals overexpressing transgene *emb-9(+)* (in *sax-7; qyls46* animals carrying the multicopy transgene *Pemb-9::EMB-9::mCherry*) did not show suppression of neuronal maintenance defects (Fig. 2.15C). Thus, while sustained levels of collagen IV are required to suppress *sax-7* neuronal defects, elevated collagen IV level *per se* is insufficient to ensure neuronal maintenance.

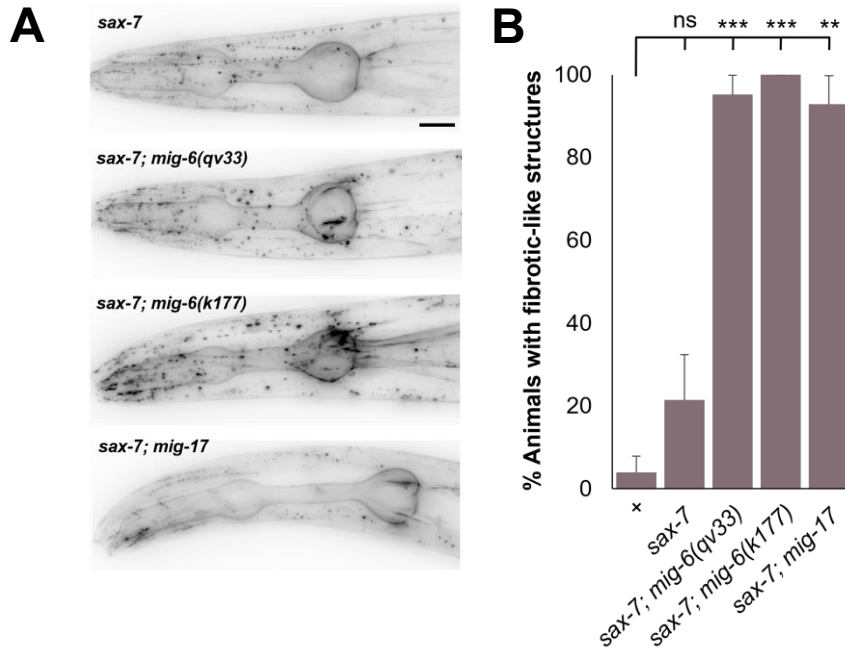


Figure 2.14 The collagen IV fibrotic phenotype of *mig-6* or *mig-17* mutants is still observed in the *sax-7* mutant background.

(A) Fluorescence images of the head region of 2-day-old adults in *sax-7(qv30)* null mutant background, using reporter EMB-9::mCherry. Scale bar, 20 μ m. (B) Quantification of the percentage of 2-day-old adult animals displaying collagen IV fibrotic-like structures. Error bars are the standard error of the proportion. z-tests in G.

We therefore investigated whether collagen IV organization plays a role in neuronal maintenance as well. Collagen IV molecules form complex crosslinked networks involving dimerization through their NC1 domain (Gupta, Graham et Kramer, 1997; Khoshnoodi *et al.*, 2006; Vanacore *et al.*, 2009). The extracellular enzyme peroxidase catalyzes sulfhydryl S-S bonds between collagen IV NC1 domains (Fidler *et al.*, 2014; Vanacore *et al.*, 2009), which are essential for collagen IV networks and basement membrane integrity (Bhave, Colon et Ferrell, 2017; Bhave *et al.*, 2012; He *et al.*, 2020; McCall *et al.*, 2014). The *C. elegans* genome encodes two peroxidases, of which PXN-2/peroxidase is known for its effects on the ECM and genetic interactions with collagen IV genes (Gotenstein *et al.*, 2018). We examined the pattern of PXN-2/peroxidase using a knock-in fluorescent reporter mNeonGreen::PXN-2 (driven under the *pxn-2* promoter (Keeley *et al.*, 2020), and found that the expression of PXN-2/peroxidase is upregulated in *mig-6(qv33)* mutants compared to wild type (Fig. 2.16A), suggesting that *mig-6* is implicated in the regulation of peroxidase 2 levels in the ECM. Knockdown of *pxn-2/peroxidase* by RNAi (from the 1st larval stage) did not significantly lower the penetrance of fibrotic-like structures (Supplemental Fig.9B), but significantly reduced the number of fibrotic-like structures (Fig. 2.16 B, C), and led to a striking increase of fragmented fibrotic collagen IV (Fig. 2.16B, D). Importantly, *pxn-2*(RNAi) knockdown reverses the suppression of *sax-7*

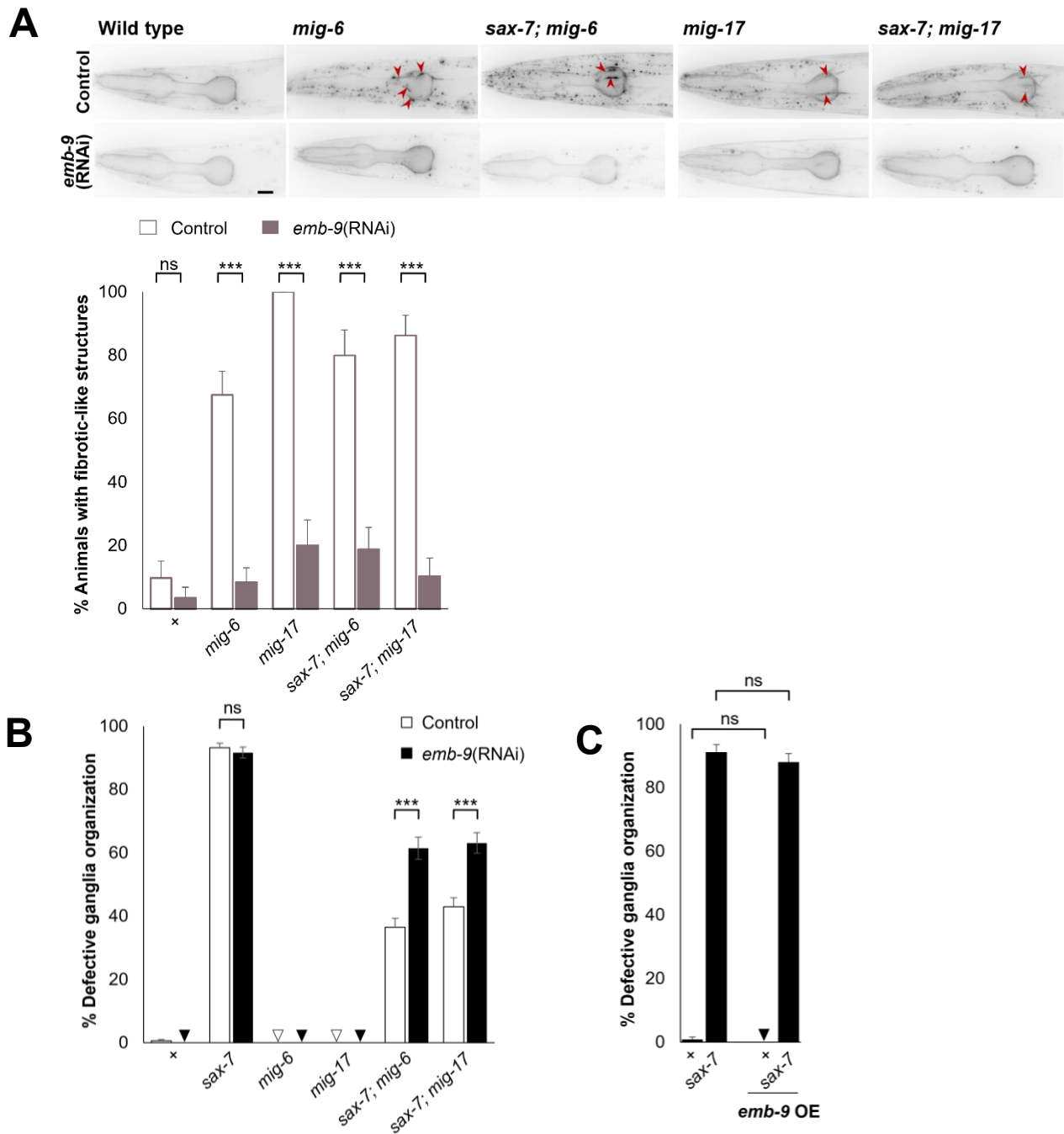


Figure 2.15 Collagen IV levels are key for *mig-6/papilin*'s role in neuronal maintenance.

(A) Fluorescence images of the head region of 2-day-old adults using alleles *mig-6(qv33)*, *sax-7(qv30)* and *mig-17(k174)*, expressing EMB-9::mCherry, subjected to control (empty vector) or *emb-9*(RNAi) from the L1 stage; fibrotic-like structures indicated by red arrowheads. Quantification of the percentage of animals with fibrotic-like structures (see Supplemental Fig.9A for quantification of collagen IV levels). (B) Knockdown of collagen IV by *emb-9*(RNAi) reverses the suppression of *sax-7(qv30)* neuronal defects by loss of *mig-6(qv33)* or *mig-17(k174)*. Quantification of neurons ASH and ASI displacement (as in Fig. 2.1) in 2-day-old adults subjected to control (empty vector) or *emb-9*(RNAi) since the L1 stage. (C) Increase of *emb-9*/collagen IV levels alone (overexpression using *qyls46* multicopy integrated transgene *Pemb-9::EMB-9::mCherry*) is not sufficient to suppress *sax-7(qv30)* neuronal defects. Error bars are the standard error of the proportion. z-tests.

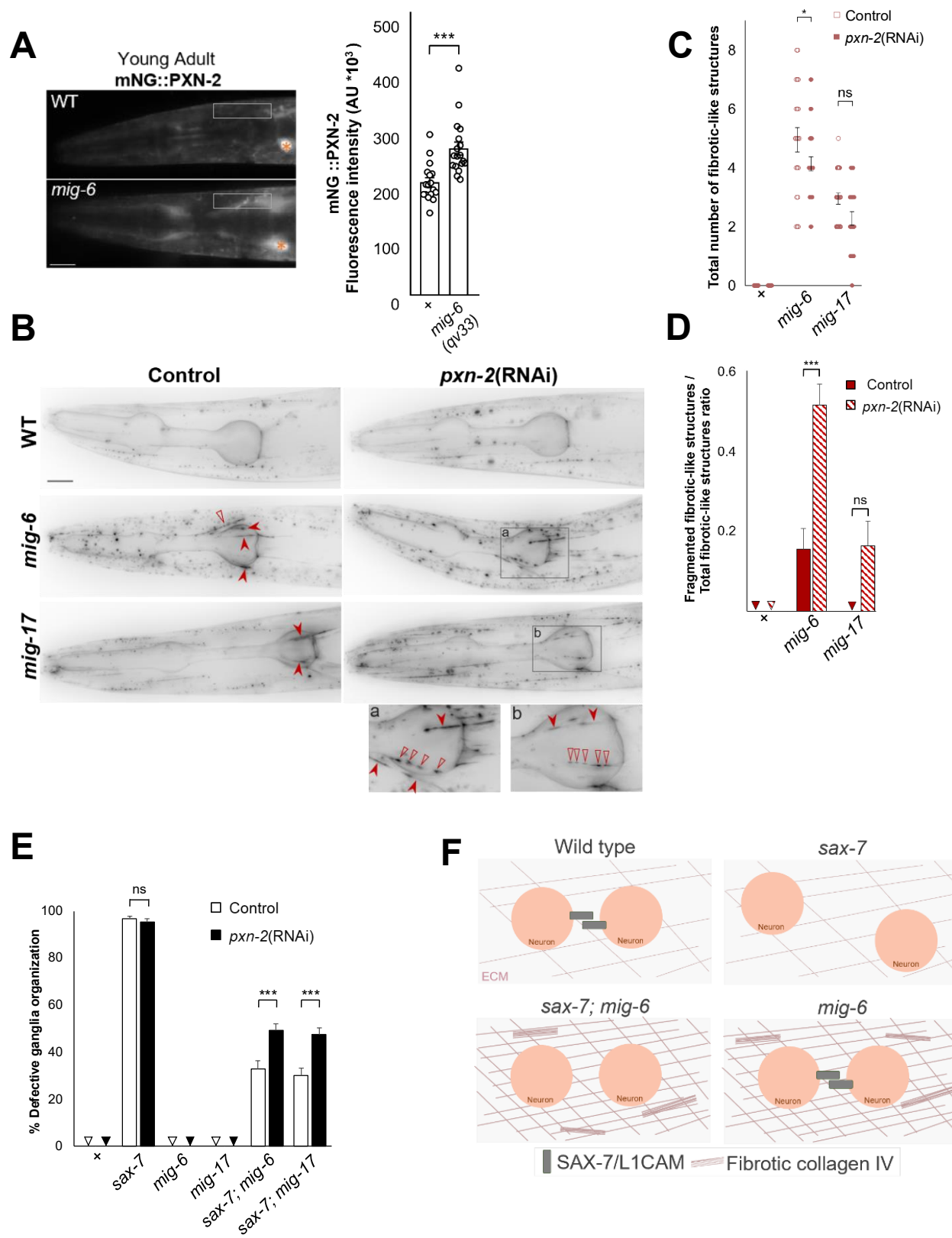


Figure 2.16 The crosslinking of extracellular collagen IV is also key for *mig-6*/papilin's role in neuronal maintenance.

(A) Fluorescence images of mNG::PXN-2 in wild-type and *mig-6(qv33)*, scale bar, 20 μ m; and quantification. A.U., arbitrary units. The rectangles indicate the ROI used to quantify fluorescence intensity. (B) Knockdown of collagen IV crosslinking enzyme PXN-2/peroxidase by *pxn-2*(RNAi) reduces the number of fibrotic-like structures and alters their state. Fluorescence images of collagen IV (qyls46 EMB-9::mCherry) in 2-day-old adults of wild type and mutants *mig-6(qv33)* and *mig-17(k174)*, subjected to control (empty vector) or *pxn-2*(RNAi) from the L1 stage. Insets (a and b) show detail of fibrotic-like structures that appear continuous (arrowheads) or fragmented (empty arrowheads). Scale bars, 20 μ m. (C) Quantification of the number of fibrotic-like structures per animal expressing EMB-9::mCherry in wild type, *mig-6(qv33)*, and *mig-17(k174)* mutant animals in control (empty vector) and *pxn-2*(RNAi) conditions. Both fragmented and non-fragmented fibrotic-like structures are included in this quantification of fibrotic like-structures number. (D) Quantification of the ratio of fragmented to total fibrotic-like structures per animal in wild type and mutants *mig-6(qv33)* or *mig-17(k174)* expressing EMB-9::mCherry in control (empty vector) and *pxn-2*(RNAi)-treated conditions. (E) The suppression of *sax-7(qv30)* neuronal defects by mutations *mig-6(qv33)* or *mig-17(k174)* is reversed by deficient collagen IV crosslinking in *pxn-2*(RNAi)-treated animals. Quantification of the displacement of neurons ASH and ASI in 2-day old adult animals subjected to control (empty vector) or *pxn-2*(RNAi). (F) Summary of the relationship between ECM remodeling and neuronal maintenance in the context of *sax-7* and *mig-6* mutants. Loss of *mig-6* compensates for loss of neural adhesion molecule SAX-7 through extracellular remodeling, ensuring the maintenance of neuronal organization. Error bars are the standard error of the proportion (z-tests in E) or of the mean (t test in A, Wilcoxon Mann-Whitney test in C and D).

mutants' neuronal defects by loss of *mig-6* or *mig-17* (Fig. 2.16E). Together, these results highlight that the function of MIG-6/papilin and MIG-17/ADAMTS in neuronal maintenance is dependent on collagen IV and its crosslinking by the peroxidase enzyme. Further, they support the notion that the elevated levels of crosslinked collagen IV in the ECM of *mig-6* mutants contribute to stabilizing neuronal position and maintaining neuronal architecture in *sax-7* mutants (Fig. 2.16F).

2.5.9 Loss of *mig-6*/papilin counteracts neuronal disorganization induced by increased mechanical stress

Since loss of *mig-6* function positively impacts the maintenance of neuronal organization in animals lacking the cell adhesion molecule SAX-7/L1CAM, we hypothesized that it may also support neuronal architecture in otherwise wild-type animals that experience increased internal mechanical stress. We used the distinct locomotion patterns of *C. elegans* to probe this question. In liquid media, *C. elegans* swims, whereas on solid media, it crawls. Swimming and crawling differ in neuromuscular activity and speed, with swimming being faster (Berri *et al.*, 2009; Pierce-Shimomura *et al.*, 2008). The associated exerted forces are also different: when the worm crawls on solid media, the forces exerted on the worm's cuticle are higher than when swimming in liquid (Coraggio *et al.*, 2024; Fang-Yen *et al.*, 2010; Sznitman *et al.*, 2010). By contrast, swimming worms perform many more body bends, with more numerous body wall muscles contractions, which is expected to result in higher mechanical stress on internally located neurons (e.g., in head ganglia) compared to the slower movements of worms crawling on solid media. We therefore subjected worms to continuous swimming in liquid culture from the time of hatching to adulthood, and assessed the position

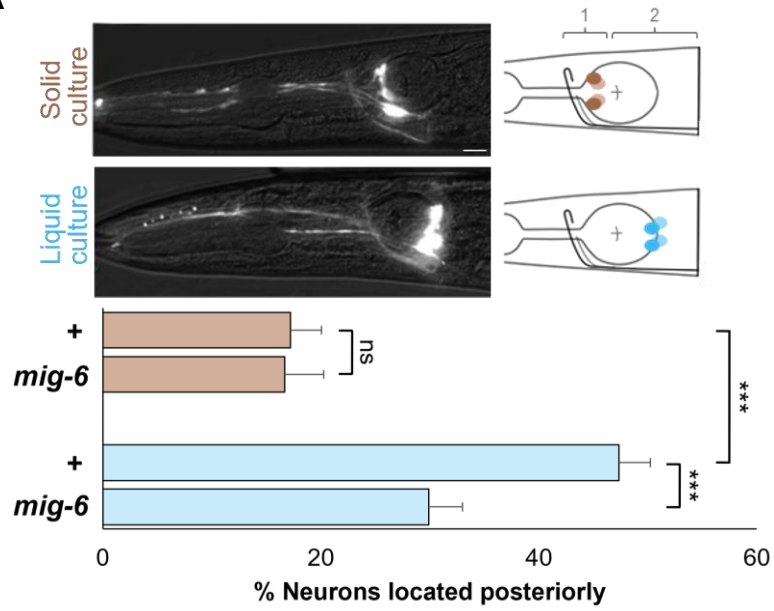
of sensory neurons ASH and ASI. Compared to the neurons in animals grown on solid medium, neuronal position in wild-type animals changed significantly when grown in liquid medium for 5 days, exhibiting a significant posterior displacement (Fig. 2.17A). However, *mig-6(qv33)* mutant animals raised in liquid medium showed a significant decrease in neuronal displacement (Fig. 2.17A), indicating that loss of *mig-6/papilin* function results in enhanced maintenance of neuronal organization upon high internal mechanical stress.

Because collagen IV is required for the stabilizing effect of *sax-7* mutants neuronal organization by loss of *mig-6* function, we examined the state of collagen IV in swimming animals. We observed that *mig-6* mutants display an altered collagen IV pattern (similar to that of *mig-6* mutants grown on solid medium), with the presence of fibrotic-like structures, increasing in penetrance from day 3 to day 5 post L1 hatching (Fig. 2.17B). We then asked if collagen IV was required for the neuronal protective effect conferred by the *mig-6* mutation in otherwise wild-type animals when grown in liquid. Depleting collagen IV by *emb-9*(RNAi) of swimming animals significantly weakened the *mig-6*-mediated stabilizing effect of neuronal organization of ASH and ASI neurons (Fig. 2.17C). This result indicates that collagen IV is critical in the neuronal protective mechanism involving *mig-6/papilin* in conditions of increased mechanical stress.

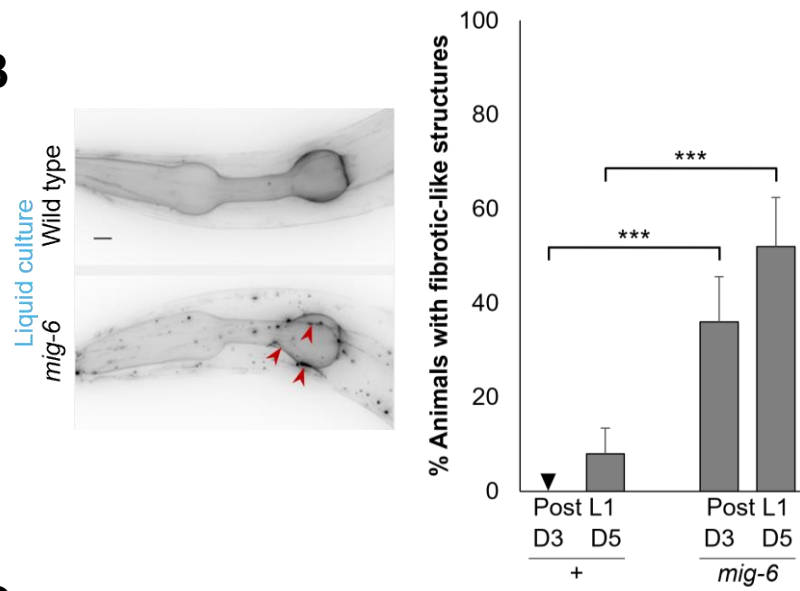
2.6 Discussion

Neuronal architecture established embryonically must persist throughout life to ensure nervous system function. However, the mechanisms sustaining neuronal organization over the long term remains poorly understood. This work uncovers a novel mechanism where ECM dynamics plays a critical role in maintaining neuronal architecture. Through a multidisciplinary approach, integrating forward genetic screening, incisive molecular genetic analysis, structural molecular predictions, quantitative live imaging, and measurement of biomechanical properties by Brillouin microscopy, we have identified the evolutionarily conserved extracellular matrix protein MIG-6/papilin as a key regulator of the long-term maintenance of the neuronal architecture. We show that MIG-6/papilin impacts neuronal maintenance by modulating the animal's tissues biomechanical properties and remodeling the extracellular network of collagen IV, which is a major component of the basement membranes, including those surrounding neuronal assemblies. We also find that ECM metalloproteinase MIG-17/ADAMTS is important for sustaining neuronal architecture, and functionally cooperates with MIG-6/papilin in ECM remodeling in

A



B



C

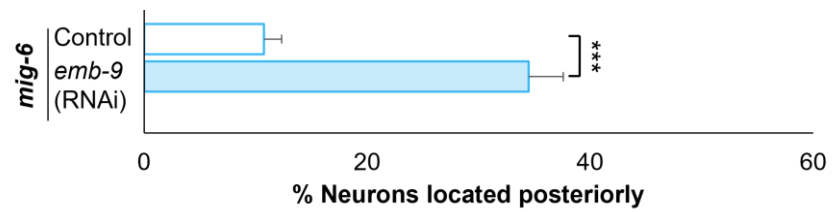


Figure 2.17 Loss of papilin is protective of neuronal organization under conditions of increased stress.

(A) Fluorescence images of the head region of wild-type adults fed regular *E. coli* OP50 and imaged in 2-day adults when grown on solid media, or at the equivalent age of 5 days-post L1 hatching when grown in liquid. Neurons ASH and ASI were visualized using reporter *Psra-6::DsRed2*; drawings illustrate their soma position in wild-type animals grown on solid (brown), or in liquid (blue, notice the posterior placement of neurons when worms swam in liquid conditions). Scale bar, 10 μ m. Quantification of neuronal placement in wild-type and *mig-6(qv33)* adults, when grown in solid (2-day adults) or liquid conditions (5 days-post L1 hatching). In each animal, neurons were considered posteriorly displaced when at least one of the four soma was in area 2 (posterior to the pharyngeal grinder, indicated by the cross). (B) Fluorescence images of collagen IV (EMB-9::mCherry) in wild type and *mig-6(qv33)* adults at 5 days-post L1 hatching, grown in liquid since L1 hatching. Scale bar, 10 μ m. Quantification of the percentage of animals displaying collagen IV fibrotic-like structures in wild-type and *mig-6(qv33)* adults grown in liquid conditions since hatching (examined at 5 days-post L1 hatching). (C) Animals were grown in liquid conditions since hatching while being subjected to RNAi treatment; animals were fed *E. coli* HT115 bacteria harboring the empty vector (control RNAi) or the *emb-9*(RNAi) vector to deplete collagen IV. Quantification of neuronal placement in wild-type and *mig-6(qv33)* adults, examined at 5 days-post L1 hatching. Collagen IV depletion prevents the stabilizing effect of *mig-6* mutation. Error bars are the standard error of the proportion (z-tests in J-L).

order to enable the long-term stability of neuronal architecture. Both the abundance and the cross-linking of collagen IV networks are essential for the MIG-6/papilin-remodeled ECM state that enables the maintenance of neuronal structures. Thus, this work reveals a previously unknown mechanism by which ECM remodeling enables the preservation of neuronal architecture (Fig. 2.18), in the face of age-progressive stresses, to preserve continuous neural function.

MIG-6/papilin is expressed throughout life, from embryogenesis to adulthood (Cao *et al.*, 2017; Kawano *et al.*, 2009; Keeley *et al.*, 2020; Kramerova *et al.*, 2000; Roux *et al.*, 2023), in dynamic patterns that may reflect its requirements at the different life stages. Papilin indeed plays key developmental roles: the lack of papilin results in embryonic lethality in null mutant worms and in RNAi-depleted flies (Kawano *et al.*, 2009; Kramerova *et al.*, 2000). Papilin is also required for organogenesis in flies (Kramerova *et al.*, 2000), distal tip cell migration of the developing *C. elegans* gonad (Kawano *et al.*, 2009), as well as for enlargement of the gonad and the pharynx during *C. elegans*' growth (Jafari *et al.*, 2010; Keeley *et al.*, 2020). A role for papilin in the nervous system has remained largely unexplored. There is one study in *C. elegans* showing that papilin participates axon guidance of the neuron ALA, which impacts primary dendrite development of the neuron PVD (Ramirez-Suarez *et al.*, 2019). In *Drosophila*, a recent report on a screen for regulators of central nervous system morphology mentions a papilin mutant found to have a misshapen central nervous system (Lacin *et al.*, 2024), which awaits further analysis. In our study, we isolated the mutation *mig-6(qv33)* in a screen for animals that suppress the age-progressive disorganization of *sax-7/L1CAM* mutants. Similar to other *mig-6* mutations, *mig-6(qv33)* mutant animals have gonad abnormalities, but otherwise display normal body morphology (i.e., normal musculature, pharynx, epidermis, and overall

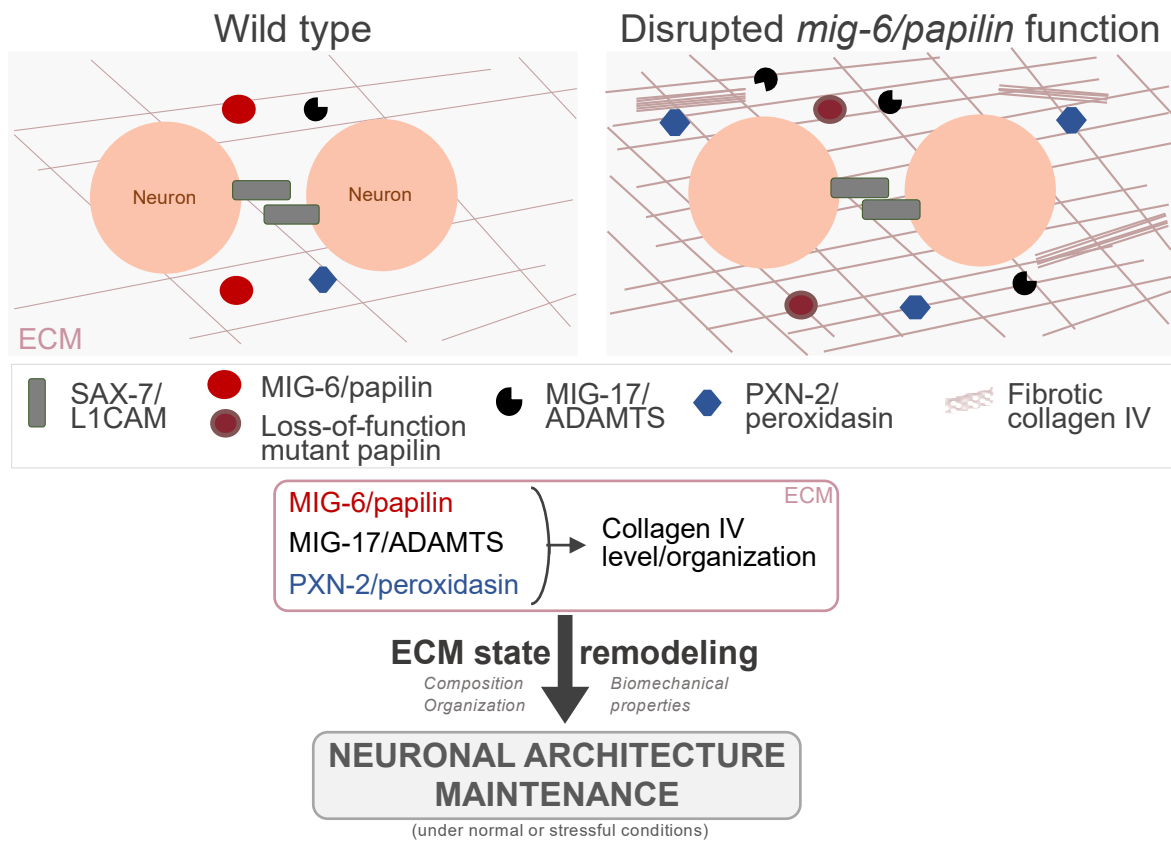


Figure 2.18 A model for the role of MIG-6S/papilin in collagen IV remodeling and neuronal maintenance.

Summary of the cooperative functions of conserved ECM regulators MIG-6S/papilin, MIG-17/ADAMTS, and PXN-2/peroxidasin in the modulation of collagen IV levels and organization, impacting the long-term maintenance of neuronal architecture.

neuronal architecture). We uncovered a post-developmental role of *mig-6* in maintaining the positioning of neurons ASH and ASI, since depletion of *mig-6* function by RNAi treatment initiated from the first larval stage onwards suppressed the ASH and ASI neurons' defects that progressively accumulate in *sax-7* null mutants, after having normally developed during embryogenesis.

mig-6/papilin encodes two isoforms, and our allelic series analysis and rescue assays demonstrate that the short isoform, MIG-6S, is active in neuronal maintenance, while MIG-6L is dispensable in this context. Isoform-specific roles of *mig-6* have been previously described in the gonad development (Kawano *et al.*, 2009) and ALA-PVD neuronal patterning (Ramirez-Suarez *et al.*, 2019). MIG-6S belongs to the ADAMTS-like ECM protein family, and consists of several domains, including the papilin cassette with its TSP1 repeats and the ADAMTS spacer, followed by numerous cysteine-rich lagrin repeats, and Kunitz domains. Our genetic and protein-domain analyses, combined with molecular predictions, point to the papilin

cassette and the closest lagrin repeats as being critical for MIG-6S function in neuronal maintenance. Indeed, disruption of *mig-6S* function by *mig-6(qv33)* or other mutations affecting the papilin cassette/adjacent lagrin repeats suppressed the age-progressive neuronal disorganization of *sax-7/L1CAM* mutants, but *mig-6(sa580)* that affects a different lagrin repeat did not impact the neuronal maintenance. Allele-specific effects of mutations affecting this region of the protein have also been described in the context of pharynx growth, where mutants *mig-6(sa580)* do display a twisted pharynx, but the mutations *mig-6(k177, ev700, or ev701)*, which like *mig-6(qv33)* affect residues in more N-terminally located TSP1 domains or lagrin repeats, do not affect pharynx development (Jafari *et al.*, 2010). These allele-specific defects likely reflect the complexity of interactions of this multidomain MIG-6/papilin. Interestingly, *mig-6(qv33)* is a semi-dominant allele in neuronal maintenance, indicating that a minimum level of MIG-6/Papilin is required for proper function in this context. The *mig-6* locus was similarly described as haploinsufficient in gonad and ALA-PVD neuron development (Kawano *et al.*, 2009; Ramirez-Suarez *et al.*, 2019).

In both *C. elegans* and *Drosophila*, papilin is expressed by cells in charge of producing the ECM/basement membrane components, such as body wall muscles and epidermis in the worm, and hemocytes in flies. Indeed, we found that expression of MIG-6S from body wall muscles rescued its function in neuronal maintenance. Interestingly, MIG-6S/papilin itself localizes to the basement membrane of several organs, including the gonad, the pharynx, the intestine (Kawano *et al.*, 2009; Keeley *et al.*, 2020), as well as nerve structures (e.g., nerve tracts (Ramirez-Suarez *et al.*, 2019)) in *C. elegans* larvae and adults. Similarly, in *Drosophila*, papilin localizes to the basement membranes, including those enveloping the central and peripheral nervous system of both larvae and adults (Kramerova *et al.*, 2000). Interestingly, publicly available data shows that papilin is also expressed in central nervous system of adult mice (Allen Atlas, <https://portal.brain-map.org/>), suggesting papilin may function in the adult mammalian brain as well.

How might the basement membrane protein MIG-6/papilin regulate neuronal maintenance? The extent to which ECM remodeling determines the long-term preservation of the neuronal architecture laid out earlier in development is only beginning to be probed. We report that the role of the extracellular papilin MIG-6 and the ADAMTS protease MIG-17 in maintaining neuronal organization in *C. elegans* is through their cooperative function in regulating collagen IV. Papilin is a component of basement membranes but appears to have essential roles in their assembly or maintenance, since all of the *mig-6* mutants analyzed and *mig-6(RNAi)* treated animals display continuous basement membranes surrounding the pharynx, body

wall muscles and the gonad, similar to wild type (this study, (Keeley *et al.*, 2020)). Rather, papilin appears to affect specifically the remodeling of basement membranes, as disruption of MIG-6/papilin results in a dramatic build-up of extracellular collagen IV, a major component of ECM/basement membranes, indicating that MIG-6/papilin regulates collagen IV removal and distribution in the ECM. In *mig-6S* mutants and *mig-6*(RNAi) depleted animals, collagen IV accumulation is visible during larval stages and increases with age (both in terms of penetrance and of the extent of collagen build-up per animal), including within given individual animals as shown by our longitudinal analysis. Moreover, we observed an increase in intracellular collagen IV levels in body wall muscles, which produce both ECM components and MIG-6/papilin, suggesting that MIG-6/papilin may also impact collagen IV synthesis or degradation. RNAi-depletion of *mig-6* also results in collagen IV accumulation in the gonadal basement membrane (Keeley *et al.*, 2020).

MIG-6/papilin is an ADAMTS-like protein, sharing structural similarities with ADAMTS secreted ECM metalloproteinases, but lacking a catalytic domain. Its biochemical function is unclear, but *Drosophila* papilin can bind a procollagen N-proteinase ADAMTS *in vitro*, inhibiting its activity non-competitively, without directly interfering with the enzyme's catalytic site (Kramerova *et al.*, 2000). The papilin cassette alone could also inhibit the procollagen N-proteinase (Kramerova *et al.*, 2000). The 'papilin cassette' in the papilin ADAMTS-like proteins is important for binding to ECM (Kuno et Matsushima, 1998), and papilin domains often interact with ADAMTS proteases also containing a papilin cassette (Kramerova *et al.*, 2000), further supporting a regulatory role of this key region in ECM remodeling. MIG-17 is an atypical ADAMTS enzyme as it lacks TSP1 domains and thus a papilin cassette; yet MIG-17 is classified as belonging to the ADAMTS family based on the other significant structural similarities to ADAMTS proteins (Ihara et Nishiwaki, 2007; Nishiwaki, Hisamoto et Matsumoto, 2000). Our genetic and molecular analyses revealed that ADAMTS-like protein MIG-6/papilin and ADAMTS metalloproteinase MIG-17 function within the same pathway to regulate ECM remodelling. Indeed, (i) the loss of *mig-17* mirrors the *mig-6S* loss-of-function phenotype of extracellular collagen IV build up; (ii) the simultaneous loss of both genes in double homozygous mutant animals does not enhance the collagen IV fibrotic phenotype, and (iii) losing half of the function of both genes in double heterozygous animals strongly enhances the defects. Although they function together to promote removal of extracellular collagen IV, *mig-17* and *mig-6S* mutants do have phenotypic differences, notably relating to pharynx development; also, *mig-6S* mutants display a higher level of intracellular collagen IV in muscle cells, while *mig-17* mutants do not. As a note, another genetic lesion of *mig-17*, *ola226*, was reported to have extracellular collagen IV accumulation in the head region

(Fan *et al.*, 2020). In sum, our data support the notion that MIG-6/papilin and MIG-17/ADAMTS functionally cooperate to regulate collagen IV remodeling. MIG-17/ADAMTS has been hypothesized to possess proteolytic activity toward collagen IV, based on studies both in *C. elegans* and *Drosophila* (Imanishi *et al.*, 2020; Kubota *et al.*, 2019; Pearson *et al.*, 2016). It is thus conceivable that the build-up of collagen IV in the ECM of *mig-6* mutants could result from MIG-17 being inhibited or less efficient, especially since we found that MIG-17 levels are increased in the head region of *mig-6* mutant animals. We directly tested this by overexpression of functional MIG-17/ADAMTS, which did not reverse the collagen IV fibrotic phenotype in *mig-6* mutants, suggesting that MIG-17/ADAMTS is in its active form in *mig-6S* mutants yet unable to degrade collagen IV, perhaps due to its high degree of crosslinking (Krasselt *et al.*, 2020; Potekaevev *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2013). In this scenario, MIG-6 regulates the level and activity of an ADAMTS through its impact on the ECM state.

Interestingly, we show that MIG-6/papilin influences the levels and distribution of MIG-17/ADAMTS and of the extracellular collagen IV crosslinking enzyme PXN-2/peroxidasin in the vicinity of the affected neuronal structures. Other studies have also documented that MIG-6/papilin affects the distribution of MIG-17 in the basement membrane of the developing gonad (Kawano *et al.*, 2009), and *mig-6* depletion by RNAi increased the levels of the ADAMTS proteinases MIG-17 and GON-1, and of PXN-2/peroxidasin-2 in the gonadal basement membrane (Keeley *et al.*, 2020). Whether this involves a physical interaction (direct or indirect) between MIG-6/papilin and these proteins is to be determined. Regardless, these observations together suggest that papilin might play a broad role in collagen IV/ECM remodeling. Importantly, we show that loss of *mig-6S* or loss of *mig-17* profoundly suppresses the neuronal maintenance defects that occur in *sax-7/L1CAM* mutants. Furthermore, losing the function of both MIG-6 and MIG-17 in homozygous double mutant animals did not enhance the suppression of the neuronal maintenance defects of *sax-7* mutants, and loss of one copy of each gene in double heterozygous animals significantly enhanced the suppression compared to each heterozygous single mutant. These observations are consistent with the notion that MIG-6 and MIG-17 function in the same pathway to impact the maintenance of neuronal architecture. Evidence for a functional relationship between MIG-6 and MIG-17 exists also in the context of the *C. elegans* developing gonad, where *mig-6* and *mig-17* genetically interact (Kawano *et al.*, 2009). Importantly, MIG-17 is not involved in ALA-PVD neurons patterning, indicating that MIG-6/Papilin operates through distinct mechanisms depending on the biological context, which is consistent with the specificity of defects displayed by different alleles affecting *mig-6S*, possibly interacting with distinct functional partners through distinct regions of this multidomain protein.

At the level of multicellular neuronal structures, such as ganglia or nerve cords, a delicate balance must exist between ECM stability, which preserves the architecture of the existing neuronal structures, and ECM remodeling, which accommodates growth of the neuronal structures during post-natal life, as well as adapting to shape changes that accompany the animal's movements. The shared fibrotic collagen IV phenotype between *mig-6S* and *mig-17* mutants suggests that the altered state of collagen IV in these two mutants contributes to their ability to sustain neuronal architecture in *sax-7* mutants. An excess of crosslinked collagen IV may reinforce the integrity of the basement membrane, thereby supporting the maintenance of neuronal organization. We favor a model in which enhanced basement membrane integrity leads to maintained neuronal architecture for several reasons. First, the *mig-6* and *mig-17* mutations that do suppress *sax-7*-neuronal disorganization display a dramatic accumulation of extracellular collagen IV. Second, both collagen IV abundance and its crosslinking are required for neuronal maintenance, as reducing collagen IV by *emb-9*(RNAi) significantly reversed the stabilizing effect brought about by loss of MIG-6S or of MIG-17, as does reducing the crosslinking of collagen IV by RNAi knockdown of PXN-2/peroxidasin (Gotenstein *et al.*, 2010). Collagen IV was also key in the role of MIG-6/papilin in modulating the response of neuronal architecture to heightened mechanical stress, as loss of *mig-6* was protective of head ganglia organization in animals subjected to swimming which leads to increased mechanical stress on the nervous system, due to the constant and rapid swimming muscle contractions was also dependent on collagen IV levels. Collectively, these findings underscore that extracellular collagen IV networks are key in neuronal maintenance. The fibrotic-like structures displayed by *mig-6* and *mig-17* mutants are unlikely directly involved in stabilizing neuronal architecture; rather, these fibrotic accumulations are the most obvious manifestations of dysregulated ECM remodelling, which also affects the basement membranes surrounding neuronal structures in *mig-6* and *mig-17* mutants.

Collagen IV, thanks to its unique ability to form intermolecular covalent bonds, provides the basement membrane with the capacity to withstand mechanical stress (Khoshnoodi, Pedchenko et Hudson, 2008; Vanacore *et al.*, 2009). Thus, we characterized the mechanical properties that result from the loss of functional MIG-6/papilin, more specifically, by analyzing the high-frequency longitudinal modulus of tissues, using Brillouin microscopy (Prevedel *et al.*, 2019). We imaged an area neighboring the neurons under study, and compared mechanical properties of *mig-6* mutants and wild-type animals at two ages, earlier in larval life, and just before becoming adults. The area imaged, located in the posterior region of the animal's head, comprises several cell types, including neurons, muscles, glia, pharynx, and their ECM. While the contribution of each individual adjacent cell and of the local ECMs to the measured mechanical

properties cannot be reliably discriminated in intact animals with the current resolution of the Brillouin microscope, ECM including basement membranes, is known to exert a key influence on tissue biomechanics (Chaudhuri *et al.*, 2020; Elosegui-Artola, 2021; Urbanczyk, Layland et Schenke-Layland, 2020). Thus, tissue viscoelastic properties are significantly determined by the ECM (Chaudhuri *et al.*, 2020; Elosegui-Artola, 2021). Our Brillouin spectral analysis revealed that loss of MIG-6/papilin results in altered biomechanical properties in the head region which houses the neuronal ganglia we primarily analyze. Collectively, the imaged tissues and associated ECMs in *mig-6* mutants have reduced viscosity and elasticity, indicating impaired viscoelastic properties. Importantly, cellular viscoelasticity is a regulator of cell behavior, associated with both physiological and pathological states across species (Chaudhuri *et al.*, 2020; Elosegui-Artola, 2021). Thus, having been able to capture changes that inform on the viscoelastic properties of animals lacking MIG-6/papilin is a key finding, especially since few such *in vivo* measurements have been achieved to date (Coraggio *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2023).

The viscosity of a substrate is known to influence cell migration, with cells from normal tissue and tumor cells both exhibiting increased migration speed on highly viscous substrates or extracellular fluids (Bera *et al.*, 2022; Murrell, Kamm et Matsudaira, 2011; Shu et Kaplan, 2022). Also, both higher and lower cellular elasticity are linked to the motility of cancer cells (Conrad *et al.*, 2019; Mierke, 2022; Nikolić, Scarcelli et Tanner, 2022). Conversely, cell adhesion can occur on the surface of low viscosity liquids (Cantini *et al.*, 2020; Kong *et al.*, 2018a). Thus, the decreased viscosity of *mig-6* mutants may somehow, possibly via distinct cell-ECM interactions, result in enhanced cell adhesion enabling neurons to maintain their normal architecture. In addition, *mig-6* mutants present a decrease in loss tangent that translates into decreased viscoelasticity, suggesting that their tissues exhibit more solid-like properties with reduced energy dissipation (Chan, Bevilacqua et Prevedel, 2021). Tissues and matrix mechanics are sensed by cells and converted into chemical signals through mechanotransduction (Elosegui-Artola, 2021; Hui *et al.*, 2021). Thus, the decreased viscoelasticity in *mig-6* mutants, and the proposed associated reduction in energy dissipation, could modulate mechanosensing and regulate cellular responses (Clément *et al.*, 2017; Huerta-López *et al.*, 2024), to better preserve tissue shape and maintain neuronal architecture. Indeed, this may be related to the altered collagen IV levels, organization, and remodeling that we uncovered in *mig-6* mutants, which could profoundly impact the overall ECM composition and organization. A parallel could be drawn with the excessive production of ECM components in tissue fibrosis, which results in decreased viscoelasticity (Hui *et al.*, 2021). Such fibrotic states also lead to progressive matrix stiffening (Hui *et al.*, 2021). The build-up of collagen IV occurring in *mig-6* mutants, and that depleting the

crosslinking enzyme peroxidase/PXN-2 attenuated their fibrotic state, suggests that collagen IV molecules in *mig-6* mutants have increased covalent sulfilimine cross-links, which could lead to increased ECM stiffness (Bhave, Colon et Ferrell, 2017; Nabavizadeh *et al.*, 2019), and consequently, a likely decreased flexibility. Given the expected increased stiffness in *mig-6* mutants and the similar altered remodeling of ECM collagen IV in double *sax-7; mig-6* mutant animals, the mechanical proprieties arising from loss of *mig-6* could help maintain neuronal architecture through increased stiffness.

Overall, we propose that the animal's biomechanical changes resulting from the loss of MIG-6/papilin are linked to their altered ECM state. The differences in biomechanical properties are likely to bring about changes in ECM-neuron interactions, and/or in the state of neurons, such that neuronal architecture is preserved, even in the absence of SAX-7/L1CAM, or in conditions of heightened physical stress from the incessant muscle contractions of continuous swimming. Future studies could further elucidate the underpinnings of this remarkable state resulting from changes in ECM remodeling by the conserved ECM regulator MIG-6/papilin, which safeguards neuronal architecture during post-natal life and into adulthood.

Interestingly, while MIG-6/papilin plays a crucial role in defining the state of the ECM, its effects are specific to the precise molecular landscapes in distinct neuronal structures of the animal. For instance, we found that whereas loss of *mig-6* suppresses the maintenance defects of axon position in the ventral nerve cord that are caused by the loss of adhesion molecule SAX-7/L1CAM, or by loss of basement membrane protein DIG-1, it fails to suppress similar maintenance defects of the same axons when caused by the loss of two-Ig domain proteins ZIG-3 and ZIG-4. Similarly, whereas loss of *mig-6* suppresses the head ganglia defects in both *sax-7/L1CAM* and *dig-1* mutants, it had no effect on tail ganglia maintenance defects displayed by *dig-1* mutants. These observations underscore the complexity of the molecular interactions involving distinct ECM networks that surround different neuronal assemblies. The specificity of MIG-6/papilin's action is also evident in the different developmental consequences of *mig-6* mutations across different contexts, including the gonad, the pharynx, and the ALA-PVD neurons in the lateral nerve tract. This specificity is also reflected in its functional interaction with MIG-17/ADAMTS, which affects head ganglia maintenance and distal tip cell migration (this work, (Kawano *et al.*, 2009)), but not for ALA-PVD neuronal patterning (Ramirez-Suarez *et al.*, 2019). Future studies will help elucidate the interactions among other ECM components that may participate in the remodeling process orchestrated by papilin.

The extracellular matrix (ECM) has emerged as a key regulator of nervous system development and maintenance across diverse species (Miller, Page-McCaw et Broihier, 2008; Page-McCaw, 2008; Sorg *et al.*, 2016). In *C. elegans*, the ECM modulates synaptic development (Ackley *et al.*, 2003), as well as synaptic maintenance, with collagen IV and metalloproteinase GON-1 being implicated in sustaining synapse morphology of neuromuscular junctions (Kurshan *et al.*, 2014) (Qin, Liang et Ding, 2014). In the mammalian central nervous system, the ECM is a large part of the neural tissue and serves various functions ranging from supporting cell migration, to regulating synaptic transmission and plasticity, to actively modulating the neural tissue after injury. In particular, the perineuronal nets (PNNs), a specialized form of ECM surrounding dendritic spines, have been shown to be dynamically regulated, impacting both structural and functional plasticity (Włodarczyk *et al.*, 2011). The ECM composition of PNNs is regulated by the expression of proteases that target distinct PNN, enabling the transition from states of plasticity to stability (Dansie et Ethell, 2011). Disruptions in PNN composition is linked to neurodegenerative diseases (Harkness *et al.*, 2021; Suttikus *et al.*, 2016). Collagen IV is a well-conserved component of basement membranes, including in the vertebrate central nervous system. It is conceivable that functional interactions between papilin, ADAMTS metalloproteinases and ECM molecules, similar to those described in this study, may also occur in mammals to maintain neuronal architecture throughout life.

Neuronal structures need to withstand deformations caused by the animal's growth and body movements to prevent structural damage to neural circuits. How multicellular neuronal assemblies endure mechanical stress to sustain their architecture on the long term remains poorly understood. This work provides a mechanism by which the regulation of ECM remodeling enables and supports the maintenance of neuronal architecture postnatally and into adulthood. Other mechanisms previously described to critically impact the maintenance of neuronal architecture also rely on non-cell-autonomous biological functions. For instance, the secreted immunoglobulin proteins ZIG-3 and ZIG-4 are thought to stabilize axons positioning by modulating inter-axon adhesive properties (Aurelio, Hall et Hobert, 2002; Bénard *et al.*, 2009). The cell adhesion molecule SAX-7/L1CAM mediates cell surface homophilic and heterophilic interactions between neurons and its neighboring cells (e.g, other neurons or epidermal) (Desse *et al.*, 2021; Pocock *et al.*, 2008; Ramirez-Suarez *et al.*, 2019). The secreted basement membrane protein DIG-1 is proposed to bridge interactions between the basement membranes ensheathing neuronal structures and adjoining muscle cells (Bénard *et al.*, 2006). Collagen IV and ADAMTS/GON-1 ensures the maintenance of synaptic morphology at the neuromuscular junction (Kurshan *et al.*, 2014; Qin, Liang et Ding, 2014). MIG-17/ADAMTS maintains synapse location and morphology during post-embryonic growth by modulating

muscle basement membrane, which impacts interactions between epidermis, glia, and the associated synapses (Fan *et al.*, 2020; Shao *et al.*, 2013). The two-immunoglobulin domain protein ZIG-10 expressed on the epidermis underlying the nerve cord maintains synaptic density as the animal grows (Cherra et Jin, 2016). More recently, the interplay between epithelial cells, their ECM, cell junctions and glial cells was shown to ensure the preservation of glia morphology in the face of environmental challenges, which in turn protects the associated neuron's shape and function (Coraggio *et al.*, 2024; Martin *et al.*, 2024). Finally, cytoskeletal components too can act non-cell-autonomously from the underlying epidermis embedding the axon of a neuron to preserve its integrity (Coakley *et al.*, 2020.). Thus, the combined actions of both intrinsic and extrinsic mechanisms safeguard the intricate multicellular structures of the nervous system. Understanding general principles governing the long-term maintenance of the neuronal architectures underlying neural circuits is crucial for elucidating the bases of neurodegenerative conditions.

CHAPITRE 3

ARTICLE 2 - Interplay between MIG-6/papilin and TGF- β signaling promotes extracellular matrix remodeling and modulates the maintenance of neuronal architecture

Malika NADOUR^{1,2}, Robert I. VALETTE R. L.^{1,2}, Noémie FRÉBAULT^{1,2}, Valérie FONTAINE^{1,2}, Lise RIVOLLET^{1,2},
Claire Y. BÉNARD¹⁻³

¹ Université du Québec à Montréal, Department of Biological Sciences, Montreal, QC, Canada

² Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois
(CERMO-FC Research Center), Université du Québec à Montréal, Montreal, QC, Canada

³ University of Massachusetts Chan Medical School, Department of Neurobiology, MA, USA

Manuscrit soumis pour publication à PLOS Genetics le 06 Mai 2025.

Implication des différents auteurs aux travaux de l'article 2 (l'ordre de citation des auteurs reflète l'importance de leur contribution)

Figure	Design expérimental	Construction de outils moléculaires ou génétiques	Acquisition des données et Élaboration de la figure
1A	-	-	Malika Nadour
1B	Lise Rivollet	Ivan Valette, Malika Nadour	Lise Rivollet, Malika Nadour
1C-E	Malika Nadour	Malika Nadour, Ivan Valette	Malika Nadour, Ivan Valette
2A-D	Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour	Malika Nadour, Ivan Valette
2E-F	Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour
2G-H	Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour	Malika Nadour, Ivan Valette,
2I	Malika Nadour	Noémie Frébault, Ivan Valette, Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour
3A	Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour	Malika Nadour, Ivan Valette
3B	Malika Nadour	-	Ivan Valette, Malika Nadour
3C	Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour
3D-D'	Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour	Malika Nadour, Ivan Valette
3E	Malika Nadour	-	Malika Nadour
3F	Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour	Malika Nadour, Ivan Valette
3H-I	Malika Nadour	-	Ivan Valette, Malika Nadour
4A	Malika Nadour	Malika Nadour	Malika Nadour
4B- C	Malika Nadour	Malika Nadour, Ivan Valette	Malika Nadour, Ivan Valette

4D	Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour	Malika Nadour , Ivan Valette
4E	-	-	Malika Nadour
5A	Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour , Valérie Fontaine	Ivan Valette, Malika Nadour
5B	Malika Nadour	Malika Nadour , Ivan Valette	Malika Nadour , Ivan Valette
5C	Malika Nadour	Noémie Frébault, Ivan Valette, Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour
6A	Malika Nadour , Ivan Valette	Ivan Valette	Ivan Valette, Malika Nadour
6B	Malika Nadour , Ivan Valette	Ivan Valette, Lise Rivollet	Ivan Valette, Malika Nadour
6C	Ivan Valette, Malika Nadour , Noémie Frébault	Noémie Frébault, Ivan Valette, Lise Rivollet	Ivan Valette, Noémie Frébault, Malika Nadour
6D	Malika Nadour	Ivan Valette, Malika Nadour	Malika Nadour , Ivan Valette
6E	Malika Nadour , Lise Rivollet	Ivan Valette, Noémie Frébault, Lise Rivollet, Malika Nadour	Malika Nadour , Ivan Valette
6F	Malika Nadour	Ivan Valette	Malika Nadour , Ivan Valette
6G	-	-	Malika Nadour

3.1 Résumé

L'architecture neuronale établie pendant l'embryogenèse persiste tout au long de la vie, garantissant le bon fonctionnement du système nerveux. Cependant, les mécanismes sous-jacents au maintien à long terme de l'organisation neuronale demeurent largement inconnus. Nous avons précédemment montré que la protéine conservée de la matrice extracellulaire MIG-6/papiline impacte la maintenance neuronale en régulant le remodelage du collagène IV. La perte de fonction de MIG-6/papiline entraîne un état fibrotique du collagène IV et des altérations des propriétés biomécaniques des tissus, contribuant ainsi à la stabilisation de l'architecture neuronale. Dans cette étude, nous combinons des approches de génétique moléculaire puissantes et une imagerie quantitative *in vivo* pour comprendre comment ce phénotype fibrotique, dépendant de *mig-6*, est modulé, et ce en explorant l'implication de la voie de signalisation TGF- β , bien connue pour réguler la fibrose chez les mammifères. Nos résultats révèlent que MIG-6/papiline agit comme un régulateur positif de la voie TGF- β , un mécanisme par lequel la composition de la matrice extracellulaire impacte la maintenance neuronale. Ce travail apporte des éléments importants à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la maintenance de l'architecture neuronale et fournit une base pour l'étude des pathologies neurodégénératives et fibrotiques associées au vieillissement.

Mots-clés : Papiline, MIG-6, collagène IV, laminine, fibuline, peroxydase, matrice extracellulaire, fibrose, maintenance neuronale, *C. elegans*

3.2 Abstract

Neuronal architecture established during embryogenesis is preserved throughout life, ensuring normal nervous system function. However, the mechanisms underlying the maintenance of neuronal organization over the long term remain largely unknown. In previous work, we demonstrated that the conserved extracellular matrix protein MIG-6/papilin impacts neuronal maintenance by regulating collagen IV remodeling. Disruption of MIG-6/papilin leads to a fibrotic accumulation of collagen IV and altered tissue biomechanics, thereby stabilizing neuronal architecture. In this study, we combine incisive molecular genetics and *in vivo* quantitative imaging to investigate how this *mig-6*-dependent fibrotic phenotype is modulated. Specifically, we explore the role of the TGF- β pathway, a well-established regulator of fibrosis in mammals. Our findings uncover that MIG-6/papilin acts as a positive regulator of TGF- β signaling, in particular the DBL-1/BMP signaling pathway, a mechanism that modulates ECM composition and impacts neuronal maintenance. This work provides important insights into the molecular mechanisms underlying the long-term preservation of neuronal architecture, contributing to further our understanding of age-related neurodegenerative and fibrotic conditions.

Keywords: Papilin, MIG-6, Collagen IV, Laminin, Fibulin, Peroxidasin, Extracellular matrix, Fibrosis, Neuronal maintenance, *C. elegans*

3.3 Introduction

Proper nervous system function depends not only on the accurate embryonic assembly of its architecture but also on its long-term preservation, as neuronal structures must withstand postnatal growth, maturation, and mechanical stresses from movement or injury (Bénard et Hobert, 2009; Heckman et Doe, 2021; van Dyck et Morrow, 2017). Failure to maintain neuronal organization can compromise neuronal connectivity and function, and indeed, many neurodegenerative diseases are characterized by destabilized neuronal processes and synaptic loss (Hemphill *et al.*, 2015; Sauerbeck *et al.*, 2020; Sultana *et al.*, 2024). Therefore, understanding how nervous system architecture is sustained throughout life is of critical importance.

Although crucial, the molecular mechanisms that protect neuronal architecture over time remain poorly characterized. Growing evidence points to the extracellular matrix (ECM) as a key player in maintaining tissue architecture in the nervous system. In the mature mammalian brain, the ECM constitutes up to 20% of total volume and is organized in both diffuse and condensed forms—such as basement membranes and perineuronal nets—each contributing distinct roles in synaptic plasticity, regenerative capacity, and neuronal stability (Benarroch, 2015; Fawcett, Ohashi et Pizzorusso, 2019; Long et Huttner, 2019). Alterations in ECM composition and organization have been implicated in neurodevelopmental disorders, neurodegenerative conditions, age-related cognitive decline, and brain injury, underscoring the pivotal role of the extracellular environment in both physiological and pathological contexts (Hemphill *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2011). Still, our understanding of how ECM remodeling supports long-term neuronal architecture, particularly *in vivo* in the mature nervous system, remains limited.

More broadly, the ECM is subject to continuous remodeling, marked by dynamic changes in protein content, activity, and modifications such as crosslinking (Bonnans, Chou et Werb, 2014; Yuan *et al.*, 2023). Dysregulated ECM remodeling contributes to fibrosis, characterized by excessive ECM deposition, notably of collagens (Ortiz *et al.*, 2021; Wight et Potter-Perigo, 2011; Wynn, 2008). Transforming growth factor- β (TGF- β) is recognized as the most potent inflammatory mediator driving fibrosis (Ortiz *et al.*, 2021). The TGF- β superfamily comprises highly conserved signaling ligands, including vertebrate bone morphogenetic proteins (BMPs), *Drosophila* Dpp, and *C. elegans* DBL-1 (decapentaplegic/bone morphogenetic protein-like-1) (Balemans et Van Hul, 2002; Hamaratoglu, Affolter et Pyrowolakis, 2014; Suzuki *et al.*, 1999). The TGF- β signaling pathway, particularly the Sma/Mab pathway, is also evolutionarily conserved from invertebrates to humans (Qi *et al.*, 2017). This pathway initiates when BMP ligands bind to transmembrane

serine–threonine kinase receptors, triggering phosphorylation of type I receptors by type II receptors. The intracellular signal is propagated as receptor-activated Smads (R-Smads) are phosphorylated by the type I receptor. Phosphorylated R-Smads then associate with common-mediator Smads (co-Smads) and additional transcription factors to regulate the expression of target genes (Gleason *et al.*, 2014; Katagiri et Watabe, 2016). In mammals, BMPs regulate diverse cellular processes across development and adult tissue maintenance (Wang *et al.*, 2014), including ECM homeostasis and basement membranes remodeling (Schultz *et al.*, 2014). Moreover, the TGF- β signaling pathway may also contribute to neuronal development and function (Hiew *et al.*, 2021; Meyers et Kessler, 2017) by regulating ECM production (Rogister *et al.*, 1993; Wyss-Coray *et al.*, 1995; Ye *et al.*, 2022). The ECM mediates cell adhesion and signaling via cell-ECM interactions, providing cells with growth factors including TGF- β (Jain *et al.*, 2020; Mecham et Gibson, 2015; Yue, 2014). The physical properties of the ECM also affect neural cell behavior (Jain *et al.*, 2020). However, the specific roles of TGF- β in brain ECM are not well understood, and whether TGF- β could participate in the lifelong maintenance of neuronal architecture has not been investigated.

The nematode *Caenorhabditis elegans* offers a genetically tractable *in vivo* model to study ECM roles in maintaining neuronal architecture over an organism's lifetime, including the effects of the TGF- β signaling pathway on ECM organization. Despite undergoing a near 100-fold increase in body size from larva to adult (Knight *et al.*, 2002), the nervous system of *C. elegans* retains its precise architecture established during embryogenesis (White *et al.*, 1986; Witvliet *et al.*, 2021). Neuronal cell bodies are organized into ganglia, and axonal processes follow well-defined tracts, all ensheathed by specialized ECM-rich basement membranes, composed of complex networks of highly cross-linked proteins, including non-fibrillar collagens (e.g. collagen type IV), laminins, fibulins, nidogen, and heparan sulfate proteoglycans (Keeley *et al.*, 2020). The highly stereotyped nervous system and associated ECM enable investigation of ECM contributions to neuronal structures under controlled genetic conditions. Owing to its transparency, genetic tractability, and availability of cell-specific tools, *C. elegans* allows direct observation and manipulation of neurons and ECM components throughout the lifespan.

In *C. elegans*, the TGF- β Sma/Mab signaling pathway operates similarly to its vertebrate counterpart, with the secreted ligand DBL-1 binding to a receptor complex composed of the type II receptor DAF-4 and the type I receptor SMA-6. Ligand binding triggers DAF-4 to phosphorylate SMA-6, which subsequently phosphorylates SMAD proteins. Phosphorylated receptor-regulated SMADs (R-Smads) SMA-2 and SMA-3 associate with the co-Smad SMA-4, allowing their accumulation in the nucleus and transcriptional

regulation of target genes (Gleason *et al.*, 2014; Massagué, 2000; Savage-Dunn, 2005). Documented transcriptional targets of the DBL-1 pathway in *C. elegans* include genes encoding cuticle collagens and ECM-modifying enzymes (Liang *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2010; Madaan *et al.*, 2020; Roberts *et al.*, 2010). The *C. elegans* TGF- β Sma/Mab pathway regulates body size, male-tail morphogenesis, innate immunity, reproductive aging, aversive olfactory learning, among other processes (Foehr *et al.*, 2006; Foehr et Liu, 2008; Luo *et al.*, 2009; Morita, Chow et Ueno, 1999; Nicholas et Hodgkin, 2004; Savage *et al.*, 1996; Schultz *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 1999; Zhang et Zhang, 2012; Zugasti et Ewbank, 2009), and has been implicated in neuronal guidance (Baltaci *et al.*, 2022). However, whether TGF- β plays a role in the long-term maintenance of neuronal architecture has not been explored.

Prior *in vivo* genetic studies using *C. elegans* has provided important insights into the mechanisms supporting the integrity of neuronal assemblies. Among these are immunoglobulin superfamily proteins, including SAX-7 (Desse *et al.*, 2021; Pocock *et al.*, 2008; Sasakura *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Zallen, Kirch et Bargmann, 1999; Zhou et Chen, 2011), homologous to the L1 family of cell adhesion molecules in mammals, the ectodomain of the FGF receptor EGL-15 (Bülow, Boulin et Hobert, 2004) and ECM-associated proteins such as DIG-1 (Bénard *et al.*, 2006; Johnson et Kramer, 2012) and ZIG family members ZIG-3 and ZIG-4 (Aurelio, Hall et Hobert, 2002; Bénard *et al.*, 2009). Loss-of-function mutations in these molecules result in neuronal disorganization emerging late in development, well after normal morphology is established. Roles for the ECM and associated molecules in modulating synaptic maintenance have also been identified in *C. elegans*, with ZIG-10, collagen IV and metalloproteinases ADAMTS/GON-1 and MIG-17/ADAMTS sustaining synapse morphology (Cherra et Jin, 2016; Fan *et al.*, 2020; Kurshan *et al.*, 2014; Qin, Liang et Ding, 2014; Shao *et al.*, 2013).

Through a screen for suppressors of the neuronal disorganization defects in *sax-7* mutants, we previously identified the conserved ECM protein MIG-6/papilin (Nadour *et al.*, 2025), structurally related to ADAMTS proteases. We demonstrated that MIG-6/papilin cooperates with the ECM remodeling protease MIG-17/ADAMTS to regulate collagen IV, a major basement membrane component, highlighting the importance of ECM remodeling in maintaining neural stability. In *mig-6* mutants, collagen IV accumulates excessively and forms fibrotic structures, altering tissue biomechanics, and leading to stabilization of neuronal architecture (Nadour *et al.*, 2025). Conservation of these molecules across species - for instance, L1CAM's role in sustaining adult synapses and behavior in mice (Law *et al.*, 2003; Tai *et al.*, 2019) suggests shared principles underlying nervous system preservation from worms to mammals.

In this study, we investigated how the fibrotic-like ECM phenotype of *mig-6* mutants arises by examining the role of the TGF- β signaling pathway, a key regulator of ECM remodeling and fibrosis in vertebrates. We demonstrate that TGF- β signaling modulates the fibrotic ECM phenotype in *mig-6* mutants: inhibition of TGF- β markedly exacerbates the collagen IV fibrotic phenotype and enhances the suppression of *sax-7* neuronal defects, while overexpression of TGF- β pathway components reduces this suppression. These findings suggest that a balance between MIG-6 function and TGF- β signaling fine-tunes collagen IV homeostasis and neuronal stability. Moreover, we show that other ECM components, including laminin and fibulin, contribute to this neuronal maintenance mechanism. Altogether, our work provides new insights into the interplay between ECM remodeling and a conserved signaling pathway, TGF- β signaling, in maintaining nervous system architecture and offers potential parallels to fibrotic mechanisms implicated in aging and neurodegenerative diseases.

3.4 Materials and Methods

C. elegans strains and genetics

Strains were cultured at 20°C on nematode growth medium (NGM) agar plates seeded with *E. coli* OP50 bacteria as described (Brenner 1974), unless otherwise specified. N2 is the reference wild-type strain. Mutant alleles used and strains constructed, using standard genetic procedures, are listed in Supplemental Table 4. Genotypes were confirmed by visible phenotypes when possible, and by genotyping PCR or sequencing, using primers listed in Supplemental Table 5. All mutant alleles and reporter strains were outcrossed at least three times prior to strain building or analysis.

Neuroanatomical analyses

The cell bodies of neurons ASH/ASI and their axons, which project into the nerve ring, were visualized using reporter *Psra-6::DsRed2 (hdlIs26)* in 2-day old adult nematodes (selected as late L4 and observed 48 hours later). These animals were mounted on 5% agarose pads, immobilized with 75 mM NaN₃, and observed under fluorescence microscopes Axio Scope.A1 or Axio Imager.M2 (Zeiss), with a 40x objective. Images were acquired using an AxioCam camera (Zeiss) and processed using ZEN (Zeiss). In wild type animals, the ASHL/R and the ASIL/R soma are located posterior to the nerve ring. An animal was counted as mutant when at least one of the ASH/ASI soma, along the antero-posterior axis of the animal, was not posterior to the nerve ring (but either anterior to or flanking the nerve ring).

Analysis of Collagen IV fibrotic structures

2-day old adults (selected as late L4 and observed 48 hours later) were mounted on 5% agarose pads and immobilized with 75 mM NaN₃ and observed under fluorescence microscope Axio Imager.M2 (Zeiss), with a Plan Apo 40x/0.95 NA objective. Images were acquired using an AxioCam camera (Zeiss) and processed using ZEN (Zeiss). Fibrotic collagen IV are enrichments of EMB-9::mCherry signal present in the posterior head region of *mig-6(qv33)* mutant animals (Nadour *et al.*, 2025). These structures are virtually never observed in the wild type and are different from the wild-type pattern of collagen IV signal present along the body wall muscles basal lamina. To assess the presence of collagen IV fibrotic-like structures in each animal, z-stacks were captured, and all the z-planes images were examined. Elongated structures of collagen IV accumulation that were present in the posterior part of the head, and that are distinct from

the faint basement membrane signal along body wall muscles, were considered to be collagen IV fibrotic structures (Nadour *et al.*, 2025). The number of fibrotic structures per genotype was also counted.

Microscopy and fluorescence intensity quantification

Animals were observed at precise ages: as "young adults" (animals that just molted from the L4 stage, <3 hours after the L4 molt), "2-day old adults" (48 hours after the young adult stage), or "3-day old adults" (72 hours after the young adult stage). They were mounted on 5% agarose pads with 75 mM NaN₃, and images were acquired as a z-stack using a Plan Apo 40x/0.95 NA objective on a Zeiss Axio Imager.M2 (equipped with an AxioCam camera and ZEN software). *AutoQuant X deconvolution* software was used to remove blur and enhance contrast and resolution. A Nikon A1 laser scanning confocal microscope (equipped with an EMCCD camera and NIS elements software) was also used for image acquisition and analysis, using either a Plan Apo λ 40x/0.95 NA or Plan Apo λ 60x/1.4 NA oil immersion objective.

The fluorescence intensity of EMB-9::mCherry, mNG::PXN-2, laminin::GFP, mNG::fibulin, MIG-6S::mNG, DBL-1::GFP, and GFP::SMA-3 signals were quantified using ImageJ software as integrated densities (IntDen) of sum intensity z-projections. For each fluorescence reporter, the appropriate imaging channel was used with all image acquisition parameters being fixed across all genotypes examined for a given reporter, including exposure time, excitation intensity, and gain, taking great care to avoid saturation. The region of interest (ROI) containing mCherry, GFP, or mNG fluorescence signals on the images was outlined manually for whole head, or by using a desired ROI (as shown on each figure). The background signal was determined by choosing four ROIs from regions adjacent to the head but located outside of it; the mean fluorescence of the four background ROIs was subtracted from signal intensity. The following formula was used to correct for background fluorescence: Corrected IntDen = IntDen of experimental ROI - (mean of background ROI * area of experimental ROI).

Transgenes and rescue assay experiments

Pelt-3::sma-6 (pRG62). This plasmid was generated by Padgett lab (Gleason *et al.*, 2014) and provided by Roger Pocock's lab (Monash University).

Prab-3::sma-6 (pCB503). The *sma-6* cDNA sequence [2649 bp] was amplified from pRG62 [*Pelt-3::sma-6::GFP*] using primers oCB2370 (CATGATACCGGTTAAGATTGATTGGTGGCTG) and oCB2388

(CATGATGGATCCGTTGAAAAATGAACATCACC) to add AgeI and BamHI sites, and digested. The *sax-7S* cDNA was removed from plasmid pCB428 (*Prab-3::sax-7S*, (Desse *et al.*, 2021) by digesting with AgeI and BamHI; the released vector backbone was then ligated with the *sma-6* cDNA.

Pmyo-3::sma-6 (pCB504). The *sma-6* cDNA sequence [2649 bp] was amplified from pRG62 [*Pelt-3::sma-6::GFP*] using primers oCB2389 (CATGATTCTAGAAGTTGAAAAATGAACATCACC) and oCB2390 (TACGATCTCGAGTTAAGATTGATTGGTGGCTG) to add XbaI and XhoI sites, and digested. The *sdn-1* cDNA was removed from plasmid pCB423 (*Pmyo-3::sdn-1*, (Blanchette *et al.*, 2015) by digesting with XbaI and XhoI; the released vector backbone was ligated with the *sma-6* cDNA.

All inserts of finalized clones were verified by sequencing.

Transgenic animals were generated by standard microinjection techniques (Mello et Fire, 1995). For *sma-6* rescue assays by expression of *sma-6(+)* from different tissues, plasmid pRG62 [*Pelt-3::sma-6*] was injected at a concentration of 10 ng/μL with *lgc-11::gfp* as coinjection marker; pCB503 [*Prab-3::sma-6*] was injected at 25 ng/μL with *lgc-11::gfp* as a coinjection marker; and pCB504 [*Pmyo-3::sma-6*] was injected at 1 ng/μL with *lgc-11::gfp* as coinjection marker. All coinjection markers were injected at 50 ng/μL. pBSK(+) was added to each mix to reach a final DNA concentration of 200 ng/μL. To generate transgenic animals in the *sax-7(qv30); mig-6(qv33)* background, DNA mixes were injected into a strain where the *mig-6(qv33)* mutation is balanced [*sax-7(qv30); mig-6(qv33)/dpy-11(e224) oyls14*]. Wild-type background *hdls26* was injected to generate control transgenic strains. All transgenic strains are listed in Supplemental Table 4.

RNA interference assays

RNAi experiments were performed by the feeding method using RNAi bacterial clones from the Ahringer RNAi library (Kamath et Ahringer, 2003; Timmons et Fire, 1998), whose identities were verified by sequencing. Single colonies for the L4440 empty vector negative control, or for clones targeting *dbl-1*, *daf-4*, *sma-2*, *sma-3*, *sma-4*, *lam-1*, *lam-2*, or *fbl-1* were obtained on LB plates with ampicillin (75 μg/mL) and tetracycline (12.5 μg/mL). They were then grown in LB medium with ampicillin (75 μg/mL) for 16 hours at 37°C, to which 1 mM IPTG was added and incubated for an additional hour to induce dsRNA expression (2 mM IPTG was used in the case of *fbl-1* RNAi experiments). Concentrated cultures were seeded onto NGM plates containing 75 μg ampicillin and 1 mM IPTG, and then left to dry at room temperature for overnight

induction. For all RNAi clones (*dbl-1*, *daf-4*, *sma-2*, *sma-3*, *sma-4*, *lam-1*, *lam-2*, *fbl-1*, or empty vector control), synchronized L1 larvae (Stiernagle, 2006) were distributed onto RNAi plates (control and RNAi plates), incubated at 20°C, and examined as at 2-day old adults (48 hours post L4).

Quantification of body length

2-day old adult nematodes (selected as late L4 and observed 48 hours later) were mounted on 5% agarose pads, immobilized with 75 mM NaN₃. Body length was measured, from the mouth opening to the anus on DIC images by using the measurement tool in Axio Imager.M2 (Zeiss).

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using R (version 4.1.2) using the R Stats package ('stats' version 4.4.2). Data are presented as mean $\pm$ standard error of proportion, or as mean $\pm$ standard error of the mean. As indicated in each Figure Legend, statistical tests were performed using z-test, unpaired two-tailed Student's t-test, or one-way ANOVA when applicable (for parametric datasets). For non-parametric datasets, the Wilcoxon-Mann-Whitney test was used. Appropriate *post-hoc* tests were performed for multiple comparisons: Bonferroni correction was applied after z-tests and Wilcoxon-Mann-Whitney tests, while Tukey HSD correction was applied following ANOVA. All sample sizes and raw data are available in Supplementary Information.

3.5 Results

3.5.1 The TGF- β pathway interacts with the ECM modulator *mig-6/papilin* in neuronal maintenance

We previously uncovered that a modified state of the ECM surrounding neuronal structures positively impacts the long-term maintenance of neuronal organization (Nadour *et al.*, 2025). Indeed, loss of *mig-6/papilin*, a conserved ECM protein that impacts collagen IV remodelling (Keeley *et al.*, 2020; Nadour *et al.*, 2025) suppresses the neuronal disorganization displayed by mutants of the *sax-7* neuronal maintenance gene (Nadour *et al.*, 2025). Chemosensory neurons ASH and ASI, which can be readily visualized with reporter *Psra-6::DsRed2* (Fig. 3.1B)(Desse *et al.*, 2021), acquire a stereotypical positioning during embryogenesis that is preserved throughout life and constitute a reliable model to study the maintenance of neuronal architecture lifelong. In wild-type animals, the soma of neurons ASH and ASI are located posterior to the nerve ring (where their axons project). In *sax-7* mutants, whereas these neurons initially develop normally during earlier development, they later progressively become displaced from the 4th larval stage onward, with neuronal soma getting displaced and the nerve ring shifting posteriorly, which leads to the soma aligning with or being anterior to the nerve ring (Fig. 3.1B, 3.2A) (Desse *et al.*, 2021; Pocock *et al.*, 2008; Zallen, Kirch et Bargmann, 1999). Loss of function of *mig-6/papilin per se* does not alter neuronal organization, quite the opposite, it stabilizes neuronal organization in *sax-7* mutants (Fig. 3.1B, 3.2A), and also safeguards ASH/ASI architecture in otherwise wild-type animals subjected to the stressful condition of constant swimming (Nadour *et al.*, 2025).

The *mig-6/papilin* mutation stabilizing effect on neuronal architecture results from an altered ECM state, characterized by the build-up of major extracellular matrix component collagen IV, which accumulates as fibrotic forms (Nadour *et al.*, 2025). The TGF- β /BMP pathway has been extensively implicated as a key modulator of fibrosis in vertebrates. We therefore asked whether the TGF- β pathway in *C. elegans* may also impact the state of the ECM particularly in relation with the maintenance of neuronal architecture. We focused on the *C. elegans* DBL-1/SMA-6/DAF-4 pathway as it has been documented to regulate mainly the collagen composition of a specialized ECM (of the cuticle encasing the animal's the body), and because ECM collagens can, in turn, influence this signaling cascade (Madaan *et al.*, 2020; Madaan *et al.*, 2018). This TGF- β pathway is composed of evolutionarily conserved core components: the ligand (DBL-1/BMP), type I and type II receptors (SMA-6/RI and DAF-4/RII), and the R-Smads downstream effectors (SMA-2 and SMA-3), and the co-Smad (SMA-4) (Fig. 3.1A;

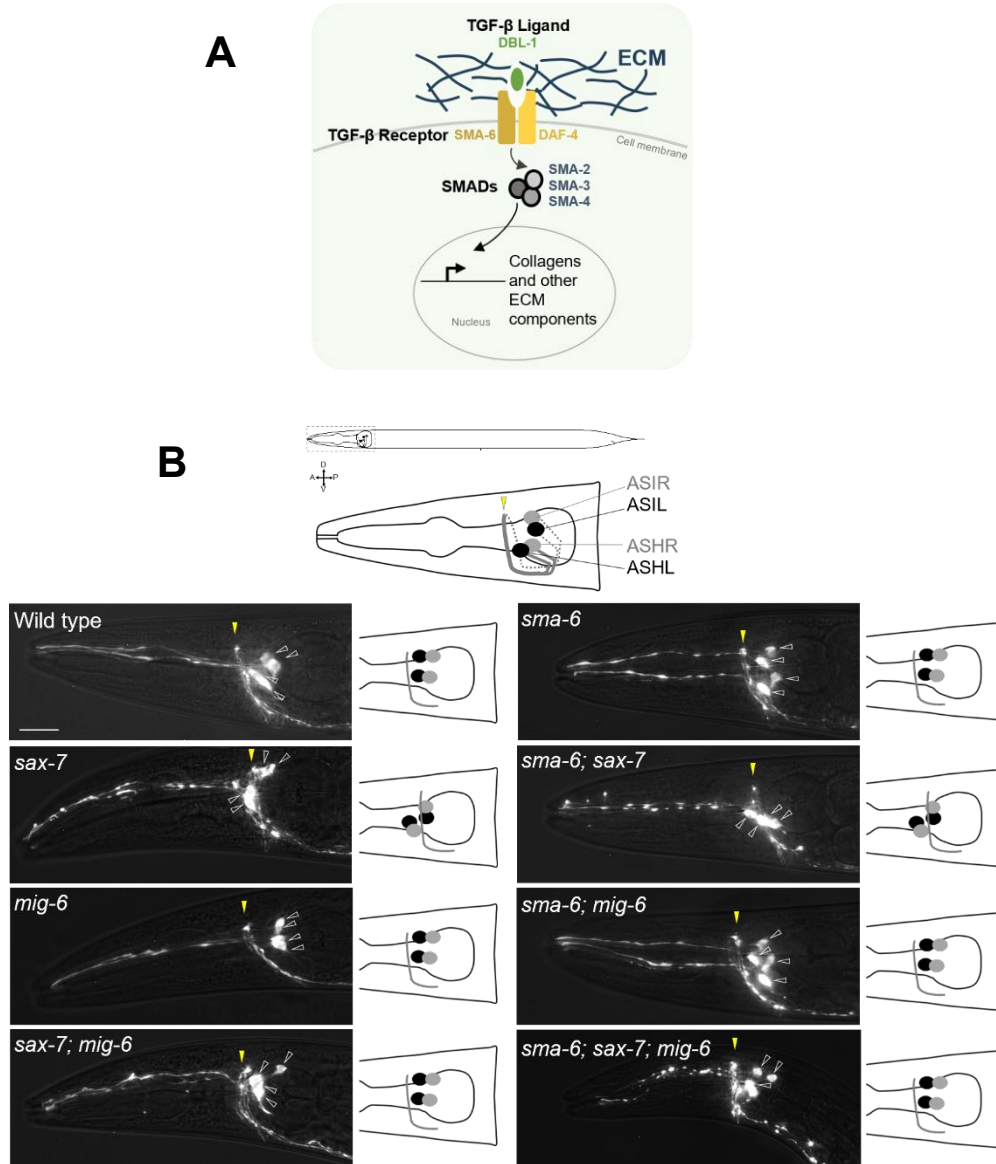


Figure 3.1 Disruption of the TGF- β pathway enhances the neuronal stabilization resulting from the loss of *mig-6/papilin*.

(A) Schematics of the conserved TGF- β pathway (*C. elegans* protein names are indicated), which regulates ECM genes' expression. (B) Fluorescence images of the head region of 2-day-old adults, where the chemosensory neurons ASH and ASI were visualized using fluorescent reporter *Psra-6::DsRed2* (schematized above and on the right). In the wild type, the four cell bodies (indicated by empty arrowheads; each ASH and ASI pair has a soma in the left ganglion and a soma in the right ganglion) are positioned posterior to the nerve ring (indicated by the yellow arrowhead) throughout life. In *sax-7* mutants, ASH and ASI soma, as well as the nerve ring, are initially positioned normally but by the 4th larval stage or older their relative positioning becomes progressively altered. Mutation *mig-6(qv33)* suppresses the neuronal disorganization of *sax-7* mutants. Scale bar, 20 μ m.

(DeGroot *et al.*, 2019; Estevez *et al.*, 1993; Krishna, Maduzia et Padgett, 1999; Morita, Chow et Ueno, 1999; Morita *et al.*, 2002; Savage *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1999).

We explored whether this TGF- β pathway impacts neuronal maintenance by testing genetic interactions with *sax-7* and *mig-6S/papilin*. We knocked down components of the DBL-1/TGF- β pathway using RNA interference (RNAi) to deplete transcripts of *dbl-1*, *daf-4*, *sma-2*, *sma-3*, or *sma-4*, as well as using a null mutation in the gene *sma-6*, *wk7*. These genetic manipulations of the TGF- β pathway were combined with the null mutation *sax-7(qv30)* (Desse *et al.*, 2021) and the well-characterized missense *mig-6(qv33)* mutation [(Nadour *et al.*, 2025); null *mig-6* mutants are sterile (Kawano *et al.*, 2009)]. We found that inactivating the TGF- β pathway by *dbl-1*(RNAi) ligand knockdown, *sma-6(wk7)* receptor mutation, *daf-4*(RNAi) receptor knockdown, or knockdown of the downstream effectors by *sma-2*(RNAi), *sma-3*(RNAi) or *sma-4*(RNAi) -in an otherwise wild-type background- did not impact the architecture of the ASH/ASI neurons (Fig. 3.1B, 3.2A-C). Thus, inactivation (by *sma-6*/receptor mutation) or downregulation (by RNAi) of the TGF- β pathway alone does not affect the development or position maintenance of these neurons. Similarly, the ASH/ASI neurons in animals lacking both TGF- β signaling and *mig-6/papilin* were also like the wild type (Fig. 3.1B, 3.2A-C). Further, knockdown of the TGF- β pathway in the *sax-7(qv30)* mutant background resulted in animals that are identical to *sax-7* single mutants (Fig. 3.1B, 3.2A-C), indicating that the TGF- β pathway does not modify the mutant neuronal phenotype associated with *sax-7*. In contrast, combining the inactivation of the TGF- β pathway with the *mig-6(qv33)* mutation resulted in an enhanced suppression of the *sax-7* neuronal maintenance defects compared to the suppression obtained by the *mig-6* mutation alone. Indeed, whereas in double mutant animals *sax-7; mig-6* the loss of function of *mig-6/papilin* suppresses *sax-7* defects from 90% to 40%, the combined disruption of the TGF- β pathway consistently leads to a more profound reduction of the neuronal defects down to 20-30% in triple loss of function animals *sma-6; sax-7; mig-6*, or in double mutant animals *sax-7; mig-6* treated with RNAi targeting any of the five TGF- β pathway components (Fig. 3.1B, 3.2A-C). These results reveal an impact of the TGF- β pathway on neuronal maintenance in a *mig-6*-dependent manner, with its loss amplifying or potentiating the stabilizing effect of the loss of function of *mig-6/papilin* on neuronal architecture. This raises the possibility that the TGF- β signaling pathway might be implicated in the mechanism through which *mig-6/papilin* modulates neuronal maintenance.

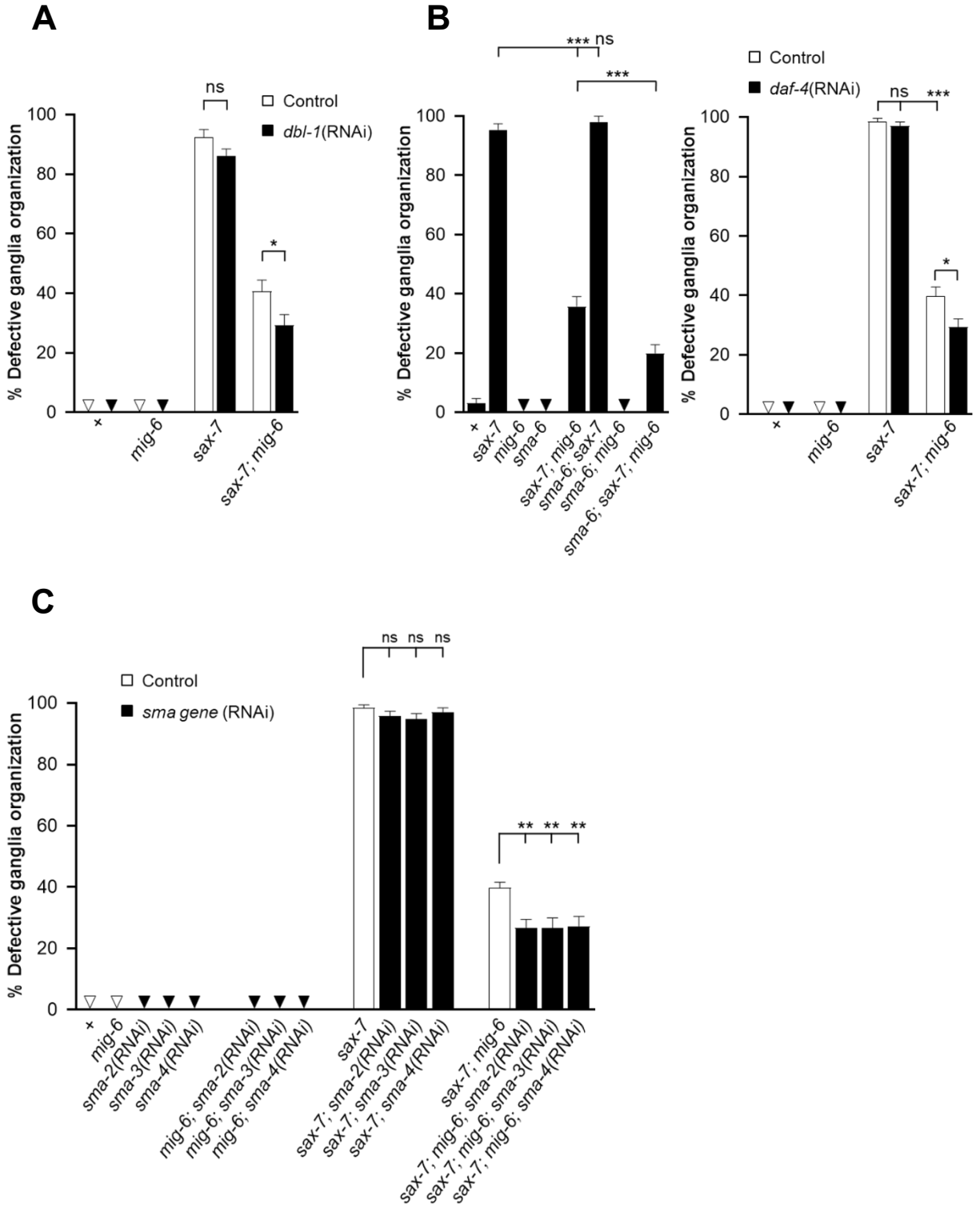


Figure 3.2 Quantification of the effect of TGF- β pathway disruption on the neuronal stabilization in *mig-6/papilin* mutants.

(A) Depletion of the TGF- β ligand DBL-1 by RNAi enhances the suppression of *sax-7* neuronal defects by *mig-6(qv33)*. Quantification of ASH and ASI displacement in 2-day adults of wild type, *sax-7(qv30)*, and *mig-6(qv33)* single and double mutant animals, treated with *dbl-1*(RNAi) [or control (empty RNAi vector)] since the L1 stage. (B) Loss of function of TGF- β type 1 receptor subunit SMA-6 and depletion of TGF- β type 2 receptor subunit DAF-4 by RNAi enhance the suppression of *sax-7* neuronal defects by *mig-6(qv33)*. Quantification of ASH and ASI displacement in 2-day adults of wild type, *sax-7(qv30)*, and *mig-6(qv33)* single and double mutants combined with the *sma-6(wk7)* mutation, or with *daf-4*(RNAi) treatment [or control RNAi (empty vector)] since the L1 stage. (C) Depletion of the TGF- β pathway downstream effectors SMADs by RNAi enhances the suppression of *sax-7* neuronal defects by *mig-6(qv33)*. Quantification of neurons ASH and ASI displacement in 2-day-old adults subjected to *sma-2*(RNAi), *sma-3*(RNAi), or *sma-4*(RNAi) [or control RNAi (empty vector)] since the L1 stage. Error bars are the standard error of the proportion. Comparisons were made with z-tests. Note: Throughout all figures of this work, asterisks denote significant difference (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$); n.s., not significant; appropriate *post hoc* tests were performed for multiple comparisons (see Materials and Methods); “+” indicates wild-type strain; the small triangles indicate 0% penetrance; all sample sizes.

3.5.2 *mig-6*-dependent collagen IV remodeling is affected by the TGF- β pathway

mig-6/papilin plays a key role in collagen IV homeostasis (Keeley *et al.*, 2020; Nadour *et al.*, 2025), and we previously demonstrated that both levels and the reticulation of collagen IV in the head region -in the vicinity of neuronal structures under study- are key for neuronal maintenance (Nadour *et al.*, 2025). Since TGF- β pathway disruption intensified the *mig-6*-mutation stabilizing effect on neuronal architecture (Fig. 3.1A,B, 3.2A-C), we asked whether the altered collagen IV state of *mig-6* mutants might also further be exacerbated by the loss of TGF- β pathway function. To test this, we constructed mutant strains of *mig-6(qv33)* and *sma-6(wk7)* carrying reporter *qyls46 Pemb-9::EMB-9::mCherry* (Ihara *et al.*, 2011) to visualize collagen IV in the head region. Compared to wild-type animals, *mig-6/papilin* mutants accumulate collagen IV at higher levels (Fig. 3.3 A,D, (Nadour *et al.*, 2025), including in form of extracellular fibrotic-like structures (Fig. 3.3A-C, (Nadour *et al.*, 2025). In contrast, we found that TGF- β receptor *sma-6* single mutants display collagen IV pattern and levels similar to the wild type (Fig. 3.3A-D). We next examined collagen IV in double mutants *sma-6; mig-6*, where analysis of the percentage of animals displaying fibrotic-like structures did not reveal differences with the already fully penetrant *mig-6* single mutants (Fig. 3.3B). We therefore quantified the number of fibrotic-like collagen IV structures per animal and found that the fibrotic phenotype significantly increases in *sma-6; mig-6* double mutants, compared to *mig-6* single mutants (Fig. 3.3C). Collagen IV fluorescence intensity also increases in *sma-6; mig-6*, compared to *mig-6* single mutants (Fig. 3.3D), indicating that while loss of TGF- β pathway signaling alone does not alter collagen IV, it heightens the already compromised state of collagen IV of *mig-6/papilin* mutants.

We next tested whether increased TGF- β pathway signaling by overexpression of the type I receptor SMA-6 would affect collagen IV, as overactivation of TGF- β signaling in vertebrates leads to fibrosis (Sanderson *et al.*, 1995; Sonnylal *et al.*, 2007; Vallance *et al.*, 2005), and its inhibition attenuates fibrosis (Fukasawa *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2000). We generated a strain of transgenic animals carrying multiple wild-type copies of *sma-6(+)* (using extrachromosomal array *yxEx615 [P_{sma-6}::sma-6(+)]*, (Zhang et Zhang, 2012)) and the collagen IV reporter. Overexpression of SMA-6 leads to the appearance of collagen IV fibrotic-like structures (Fig. 3.3E) and an increase in overall collagen IV levels (Fig. 3.3F). These findings align with previous reports on the role of the TGF- β pathway in regulating collagen levels in the ECM (Coker *et al.*, 1997; Cutroneo *et al.*, 2007; Hocevar et Howe, 2000; Ignatz et Massague, 1986; Younai *et al.*, 1994).

Similarly, we examined the pattern of a collagen IV crosslinking enzyme, peroxidasin-2 (Gotenstein *et al.*, 2018; Gotenstein *et al.*, 2010), which we reported to be important for collagen IV organization in the context of neuronal maintenance, and which is upregulated in *mig-6* mutants (Nadour *et al.*, 2025) (Fig. 3.4A,B). Using a reporter for peroxidasin-2 (*qy76 mNG::peroxidasin-2*, (Keeley *et al.*, 2020), we found that loss of the TGF- β receptor SMA-6 alone does not alter PXN-2/peroxidasin levels (Fig 3.4A,B). In contrast, the combined loss of the TGF- β receptor and of *mig-6/papilin* in double mutant animals *sma-6; mig-6* leads to increased peroxidasin-2 levels compared to *mig-6* single mutants (Fig. 3.4A,B). We also examined animals overexpressing SMA-6 (using *P_{sma-6}::sma-6(+)*) and found that it did not impact peroxidasin-2 levels (Fig. 3.4C). Collectively, these results show that the TGF- β pathway modulates collagen IV remodeling in *mig-6* mutants. TGF- β pathway activation promotes collagen accumulation, consistent with its established role in vertebrate fibrosis, while loss of TGF- β signaling exacerbates ECM defects in *mig-6* animals.

3.5.3 Loss of *mig-6/papilin* function and alteration of the TGF- β pathway affect ECM proteins laminin and fibulin

Collagen IV remodeling is affected in *mig-6* mutants (Nadour *et al.*, 2025), which is further exacerbated by alterations in the TGF- β pathway (Fig. 3.3A-F, 3.4A-C), known to regulate the expression of several ECM genes in vertebrates (Hocevar et Howe, 2000; Ignatz et Massague, 1986; Juhl *et al.*, 2020) and of cuticle collagens and cuticle ECM-associated genes in *C. elegans* (Fernando *et al.*, 2011; Lakdawala *et al.*, 2019; Liang *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2015). This prompted us to investigate

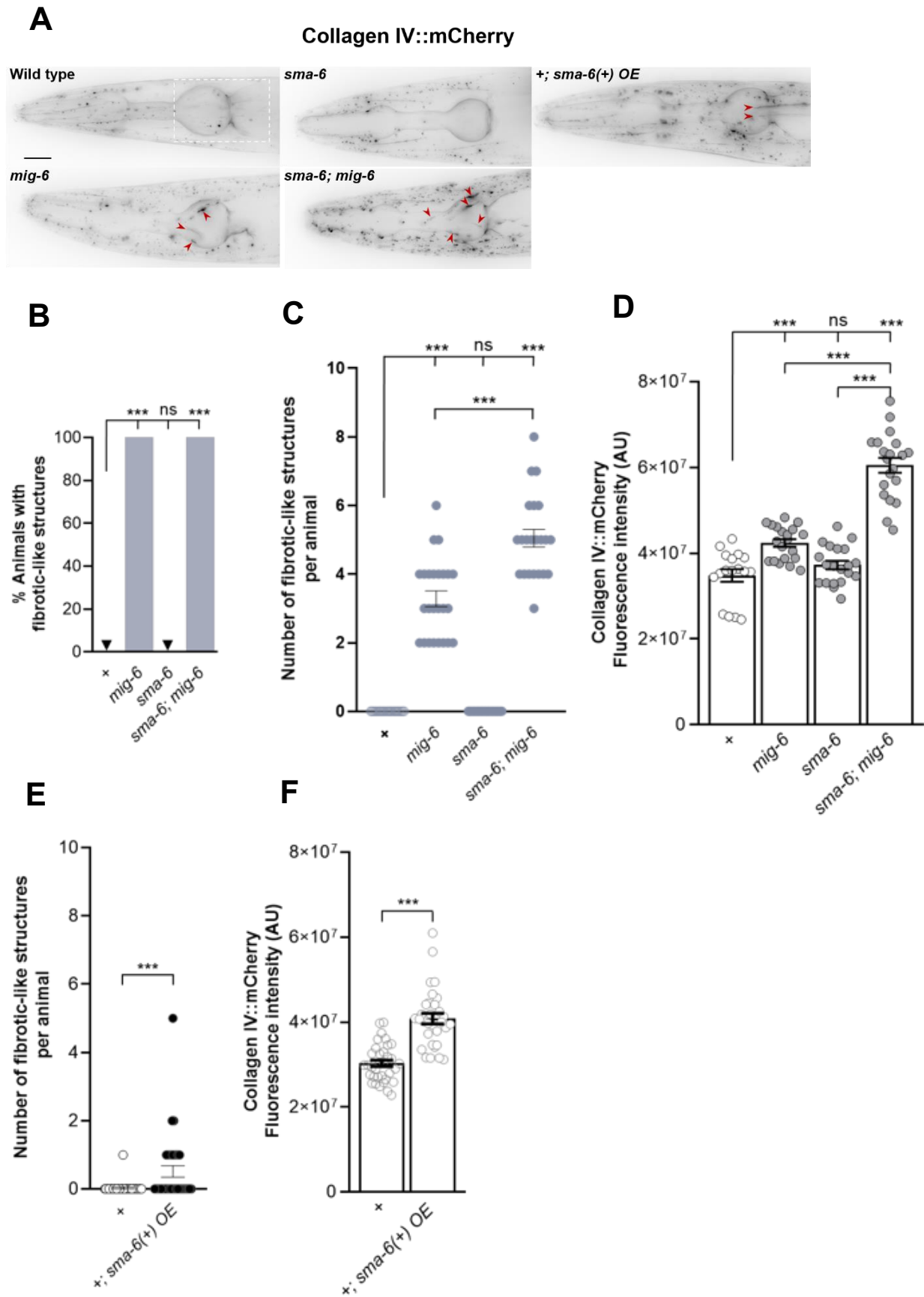


Figure 3.3 Altering TGF- β pathway function enhances the collagen IV fibrotic state of *mig-6/papilin* mutants.

(A-F) Analysis of 2-day-old adult animals; collagen IV was visualized using *qyls46* *Pemb-9::EMB-9::mCherry*. (A) Fluorescence images (deconvoluted sum projections) of the head region, where ganglia harboring neurons ASH and ASI are located. Red arrowheads indicate fibrotic-like structures observed in mutants. Mutant animals for *mig-6(qv33)* display collagen IV fibrotic-like structures and abundant intracellular accumulations (small dotted signals). Loss of function of the TGF- β receptor SMA-6 alone in single mutants *sma-6(wk7)* does not affect collagen IV pattern. In double mutants *sma-6(wk7); mig-6(qv33)*, the loss of *sma-6* enhances the collagen IV phenotypes of *mig-6* mutants. Overexpression of the TGF- β receptor in the wild-type background animals +; *sma-6(+)* OE (using *yxEx615 [P_{sma-6}::sma-6(+)]*), increases collagen IV build-up phenotypes. (B) Percentage of animals displaying collagen IV fibrotic-like structures. (C) Quantification of the number of collagen IV fibrotic-like structures observed per animal. (D) Quantification of EMB-9::mCherry fluorescence intensity in the head region overlapping with the pharyngeal terminal bulb (indicated with a white rectangle in A, which is the region where the majority of fibrotic-like structures are observed, (Nadour *et al.*, 2025)). (E) Quantification of the number of collagen IV fibrotic-like structures observed per animal in control and *sma-6(+)* OE. (F) Quantification of EMB-9::mCherry fluorescence intensity in the head region overlapping with the pharyngeal terminal bulb (indicated with a white rectangle in A), in control and *sma-6(+)* OE. Error bars are the standard error of the proportion (in B) or of the mean (in C-F). z-test (B), Wilcoxon Mann-Whitney test (C), ANOVA (D), Wilcoxon test (E), t-test (F). A.U., arbitrary units. OE, overexpression of wild-type copies. Scale bars, 20 μ m.

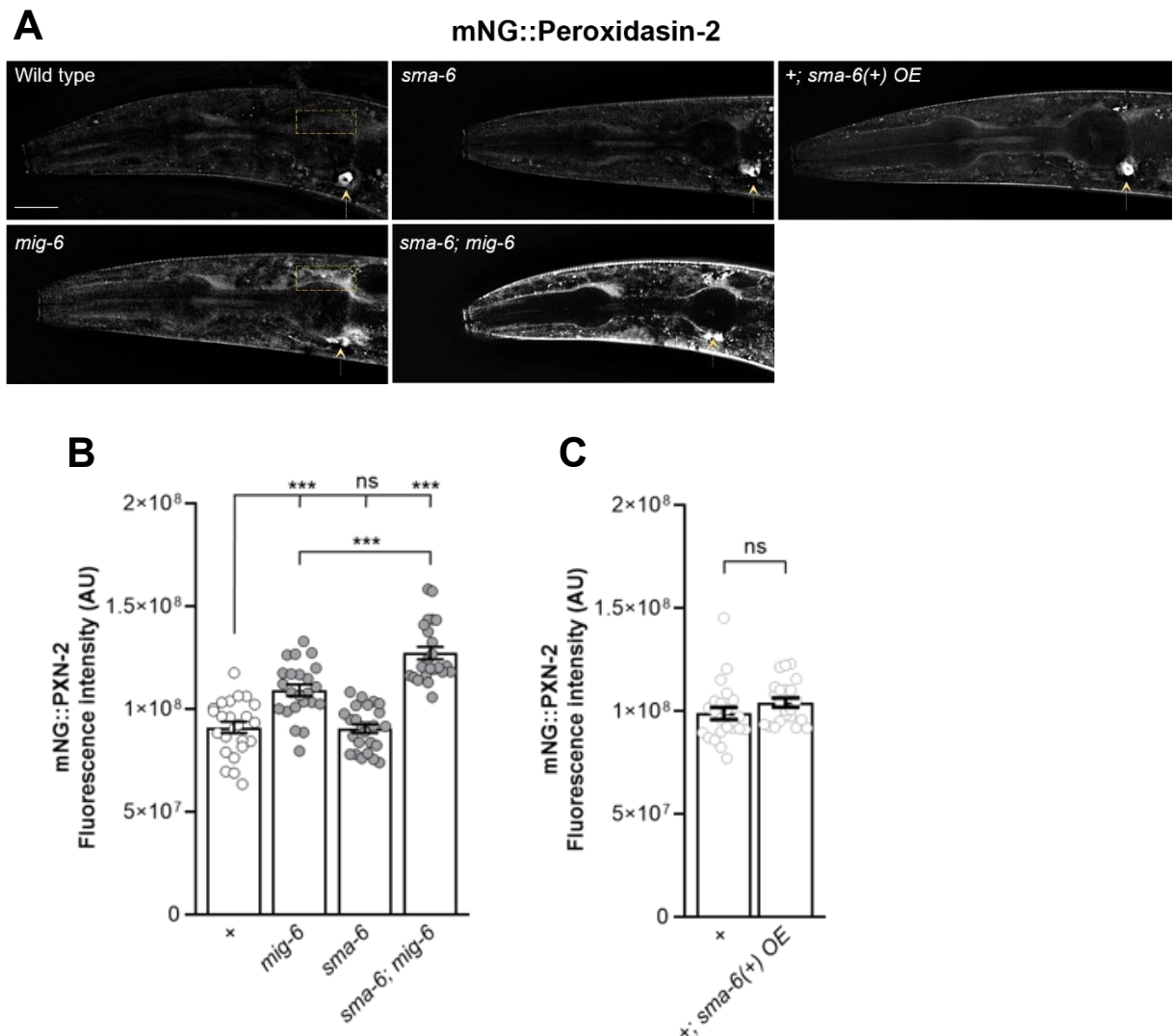


Figure 3.4 Altering TGF- β pathway function affects peroxidasin levels in *mig-6/papilin* mutants.

(A-C) Analysis of young adult animals, where collagen IV crosslinking enzyme peroxidasin-2 is visualized using reporter *qy76* mNG::peroxidasin-2. (A) Fluorescence images of the head region (deconvoluted sum projections). Arrows indicate an unidentified ventral structure observed in animals expressing mNG::peroxidasin-2. (B, C) Quantification of fluorescence intensity of mNG::peroxidasin-2 in mutant animals (B) or in animals overexpressing *sma-6(+)* C). The yellow rectangle in G indicates the region of interest used (selected as it in the collagen IV fibrotic structures area, and it avoids the intense unidentified ventral structure that would mask more subtle differences if included). Error bars are the standard error of the mean (B-C). ANOVA (B), t-test (C). A.U., arbitrary units. OE, overexpression of wild-type copies. Scale bars, 20 μ m.

whether *mig-6/papilin* and the TGF- β pathway might more broadly affect the ECM organization in the context of head neuronal structures. We thus examined laminin, the second major ECM component. Laminins are heterotrimers composed of α , β , and γ chains. *C. elegans* encodes two α subunits (*lam-3* and *epi-1*), one β subunit (*lam-1*), and one γ subunit (*lam-2*) that form two distinct laminin heterotrimers (Jayadev *et al.*, 2019; Kramer, 2005). We constructed mutant strains carrying a reporter for laminin (using *qyls7* [*Plam-1::lam-1::gfp*]) (Hagedorn *et al.*, 2009). We found that single mutants for *mig-6/papilin* and for *sma-6*/TGF- β receptor have increased laminin levels compared to wild type, whereas double mutants *sma-6; mig-6* exhibited significantly reduced levels, even lower than wild-type animals (Fig. 3.5A,B). Furthermore, in animals overexpressing the SMA-6 receptor (using *P_{sma-6}::sma-6(+)*), laminin levels were also increased (Fig.3.5C). These results indicate that *mig-6/papilin* is important to regulate laminin levels in the ECM, and that TGF- β pathway dysregulation, by both loss of function and overexpression, alters laminin levels.

Next, we chose to examine a more dynamic ECM component, fibulin, especially since *mig-6* interacts with *mig-17/ADAMTS* in neuronal maintenance (Nadour *et al.*, 2025), a gene that interacts with the fibulin gene (*fbl-1*) in the context of the developing gonad in *C. elegans* (Imanishi *et al.*, 2020; Kubota, Kuroki et Nishiwaki, 2004; Kubota *et al.*, 2008). We thus explored if the levels and pattern of fibulin are affected in *mig-6* mutants, as well as in animals with altered TGF- β function, by constructing mutant strains carrying a reporter to examine fibulin (using *qy62* *P_{fbl-1}::mNG::FBL-1*, a knockin reporter that labels all *fbl-1* isoforms (Keeley *et al.*, 2020)). In wild-type animals, fibulin displays strong enrichments in the anterior region of the head, where it lines muscle tracks (Fig. 3.6A; (Keeley *et al.*, 2020)). It is also observed as a fainter signal along the basement membrane of the pharynx and occasionally as spherical accumulations at the posterior ends of the anterior and terminal pharyngeal bulbs (Fig. 3.6A-D).

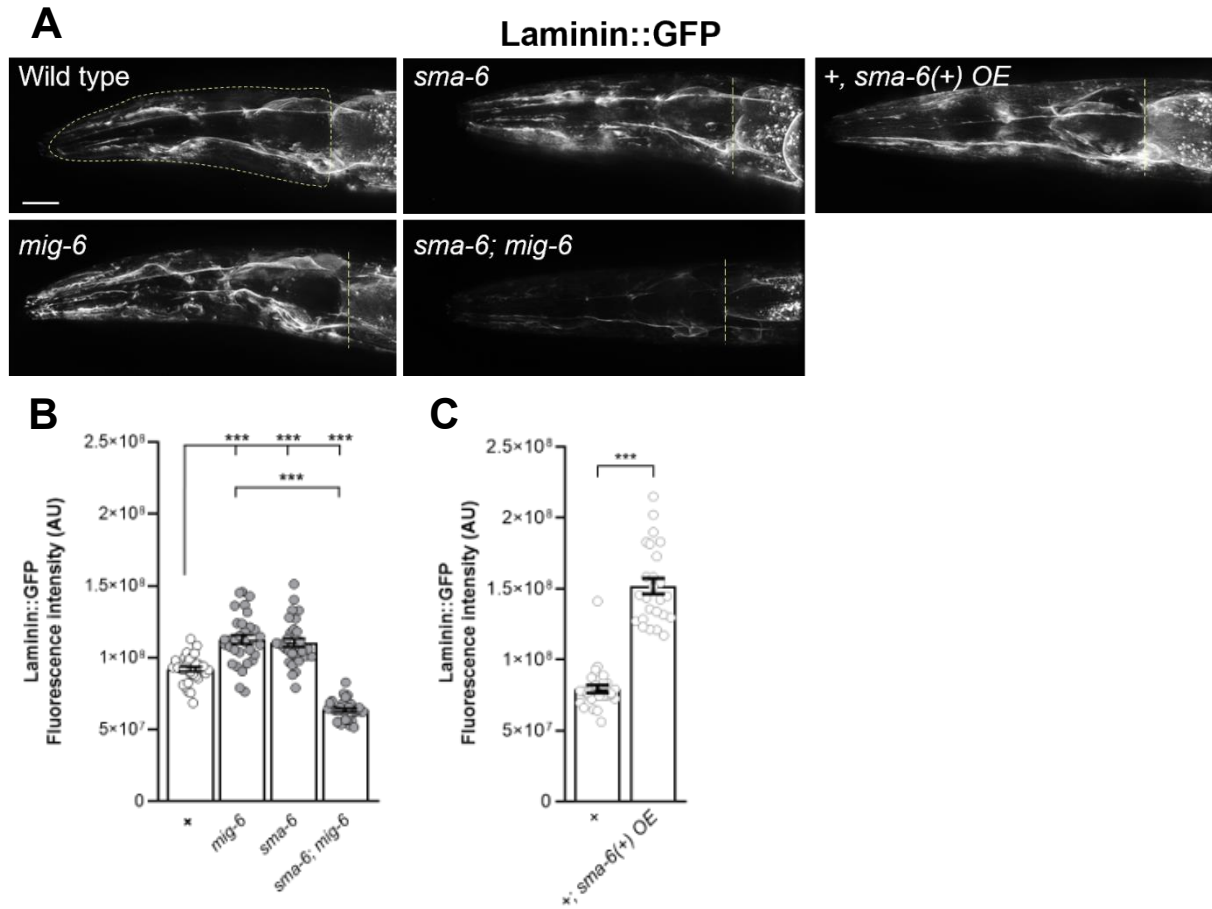


Figure 3.5 MIG-6/papilin and the TGF- β pathway regulate ECM protein laminin.

(A-C) Laminin was visualized using reporter *qyls7 Plam-1::lam-1::GFP* in 2-day old adult animals. (A) Fluorescence images (deconvoluted sum projections) of the head region showing the ROI used for laminin::GFP signal quantification, outlined in yellow on the wild-type image. For visual clarity, only the posterior limit (yellow line) of the corresponding ROIs is indicated for other genotypes. (B,C) Quantification of the fluorescence intensity of laminin::GFP in the head region, as shown in A. Error bars are the standard error of the mean (B, C). ANOVA (B), Wilcoxon test (C). A.U., arbitrary units. Scale bars, 20 μ m.

In the examined mutants, fibulin displays complex region-specific changes in both distribution and expression levels. In *mig-6* single mutants, while the anterior head signal is unchanged (Fig. 3.6C), the overall signal at the posterior bulb region is lower (Fig. 3.6D), posterior-bulb accumulations are more frequent (Fig. 3.6B, also on the anterior bulb region, data not shown), and elongated fibrotic-like structures of fibulin occur. In *sma-6* single mutants, fibulin distribution is unaffected, but its levels are strongly decreased (Fig. 3.6A-D). In the double mutant *sma-6; mig-6* animals, the changes in fibulin localization are comparable to those of *mig-6* single mutants (Fig. 3.6A,C), but fibulin levels in the anterior head region and the posterior bulb area are intermediate between those of *mig-6* and *sma-6* single mutants (Fig.

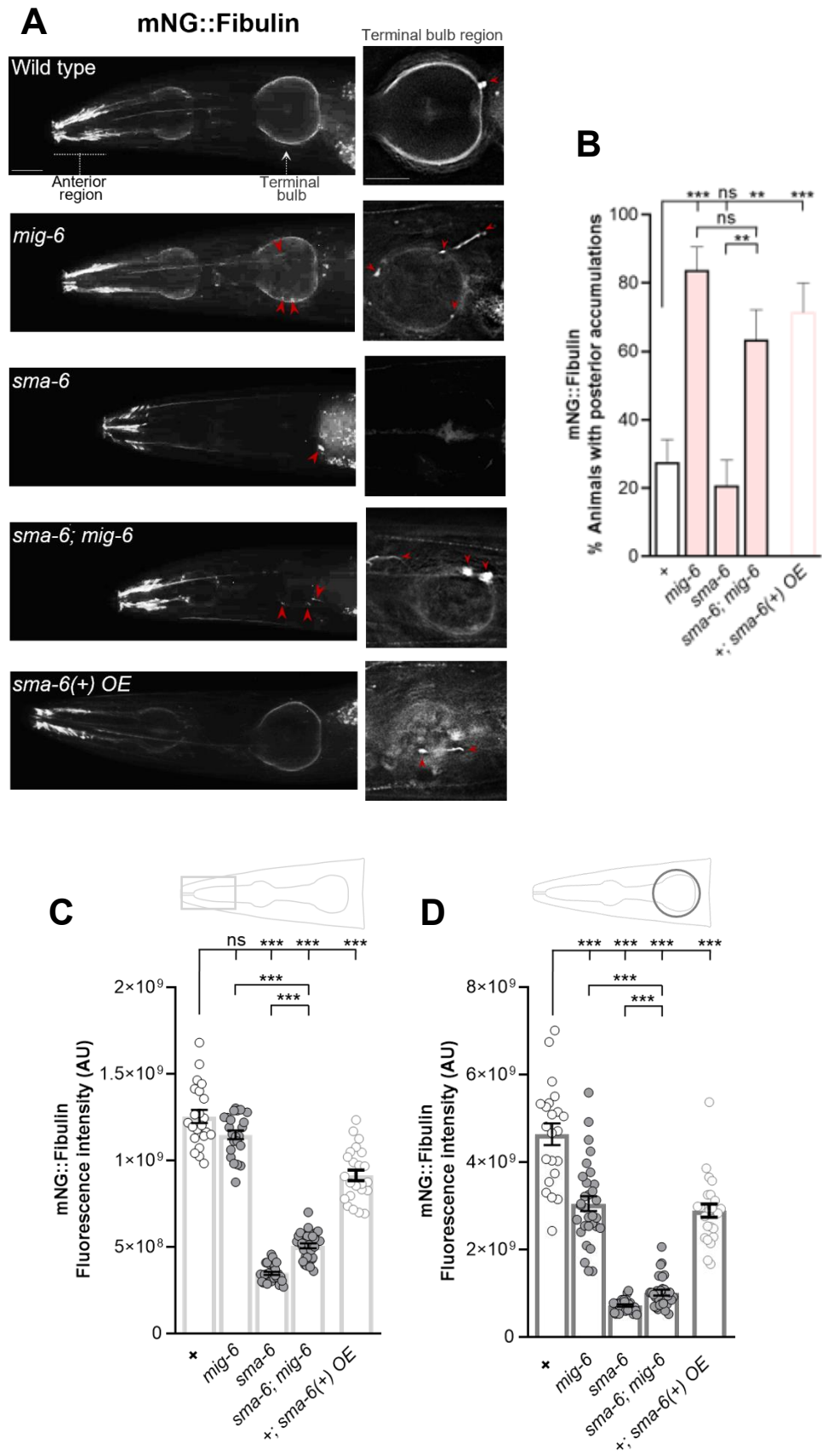


Figure 3.6 MIG-6/papilin and the TGF- β pathway regulate ECM protein fibulin.

(A-D) Fibulin was visualized using the mNG::fibulin knock-in reporter *qy62 P_{fbl-1}::mNG::fbl-1* in 3-day adult animals. (A) Left panels are fluorescence images of the entire head (deconvoluted sum projections). Because the mNG::fibulin fluorescence signal is much more intense in the "nose region", separate sets of animals were imaged using the appropriate acquisition settings to capture the fainter signal in the region of the terminal bulb (right panels; single deconvoluted planes). Examples of fibulin accumulations are indicated by red arrowheads. (B) Quantification of the percentage of animals displaying fibulin accumulations in the terminal bulb region. (C) Quantification of the fluorescence intensity of mNG::fibulin in the nose region (fibulin tracks, pale grey rectangle) and in the terminal bulb region (dark grey circle) (D). Error bars are the standard error of the proportion (B) or of the mean (C, D). ANOVA (C, D), z-tests (B). A.U., arbitrary units. Scale bars, 20 μ m.

3.6C,D). Finally, overactivation of TGF- β pathway through *sma-6(+)* overexpression (as above) alters fibulin distribution (Fig. 3.6A,B) and decreases its levels (Fig. 3.6C,D). Together, these results show that both *mig-6/papilin* and the TGF- β pathway affect fibulin. Overall, ECM components laminin and fibulin appear to be differently regulated by *mig-6/papilin* and TGF- β signaling.

3.5.4 Laminin and fibulin are required for neuronal maintenance roles of MIG-6/papilin and TGF- β pathway

We previously showed that collagen IV levels -and its crosslinking- are key for the neuronal stabilizing effect of *mig-6/papilin* mutation (Nadour *et al.*, 2025). This led us to investigate whether increased laminin levels, observed in *mig-6* mutants, might contribute to *mig-6*-mediated effect on neuronal maintenance. To test this, we depleted laminin by RNAi of *lam-1* or *lam-2* subunits in animals carrying *Psra-6::DsRed2* to visualize the ASH/ASI neurons. We found that the loss of laminin does not affect ASH/ASI organization (Fig. 3.7A), either in wild-type or in *mig-6* single mutant animals (Fig. 3.7A). However, in *sax-7; mig-6* double mutant animals, depletion of either *lam-1* or *lam-2* leads to the reappearance of *sax-7* neuronal maintenance defects (Fig. 3.7A), indicating that laminin is required for the suppression of *sax-7* neuronal defects implicating *mig-6/papilin* loss of function.

Similarly, we examined the effect of depleting fibulin on neuronal maintenance by knocking down *fbl-1* by RNAi. *fbl-1* depletion does not affect the neuronal phenotype in wild-type animals, nor in single mutants *mig-6* or *sax-7* (Fig. 3.7B). However, in *sax-7; mig-6* double mutants, *fbl-1* knockdown restored neuronal defects (Fig. 3.7B), indicating that fibulin, like laminin, is also involved in the mechanism by which *mig-6* mutation suppresses *sax-7* neuronal defects.

Given that TGF- β pathway disruptions affect laminin and fibulin levels and distribution (Fig. 3.5A-C, 3.6A-C), we next asked if the impact of the TGF- β pathway in *mig-6* mutation-mediated neuronal maintenance

(Fig. 3.1A,B, 3.2A-C) also depends on laminin and fibulin levels. We knocked down *lam-2* or *fbl-1* by RNAi and found that loss of laminin or of fibulin in *sma-6* single mutants, or in *sma-6; mig-6* double mutants, has no effect on neuronal maintenance. *sax-7* defects are modestly reduced by *fbl-1*(RNAi), but not by *lam-1*(RNAi). In contrast, knockdown of *lam-2* or *fbl-1* in triple mutant animals *sma-6; sax-7; mig-6* leads to the reappearance of the neuronal *sax-7* defects (Fig. 3.7C), consistent with the notion that laminin and fibulin may participate in the mechanism by which *sma-6* loss of function enhances the *mig-6*-mutation neuronal stabilizing effect. Finally, we probed if overexpression of *sma-6(+)* alone, which impacted collagen IV, laminin, and fibulin levels/patterns (Figs. 3.3A-F, 3.4A-C, 3.5A-C and 3.6A-D), could modify the *sax-7* neuronal maintenance defects. We found that overexpression of the TGF receptor SMA-6(+) in *sax-7* mutants leaves their neuronal disorganization defects unchanged (Fig. 3.7D). Together, these results suggest that TGF- β pathway disruption alone is not sufficient to induce an ECM state capable of stabilizing neuronal architecture. Rather, the effects of TGF- β inactivation on ECM composition appear to impact neuronal architecture only when combined with the altered ECM state present in *mig-6/papilin* mutants, thereby potentiating ECM remodeling and its impact on neuronal architecture (Fig. 3.8).

3.5.5 Disruption of TGF- β signaling pathway alters expression levels of MIG-6S/papilin

Given the genetic interactions between *mig-6/papilin* and the TGF- β pathway documented above, we asked whether the expression levels of papilin protein might be affected by TGF- β signaling disruption. We previously demonstrated that the short isoform of *mig-6/papilin* is responsible for modulating collagen IV remodeling and neuronal maintenance (Nadour *et al.*, 2025). We thus generated an integrated transgene of the short isoform (*Pmig-6::MIG-6S::mNG*) to examine the distribution of MIG-6S/papilin protein in strains with altered TGF- β function carrying this reporter. We examined MIG-6S levels in *dbl-1(nk3)* null mutants (Morita, Chow et Ueno, 1999), as well as upon RNAi-mediated knockdown of the downstream effectors *sma-2* and *sma-3*, and found that loss of the TGF- β ligand or of the TGF- β effectors leads to increased levels of MIG-6S (Fig. 3.9A,B). We further examined MIG-6S levels in animals overexpressing the TGF- β receptor SMA-6 and found that this also increases MIG-6S levels (Fig. 3.9C). Thus, MIG-6S protein levels are affected by both upregulation and downregulation of the TGF- β pathway.

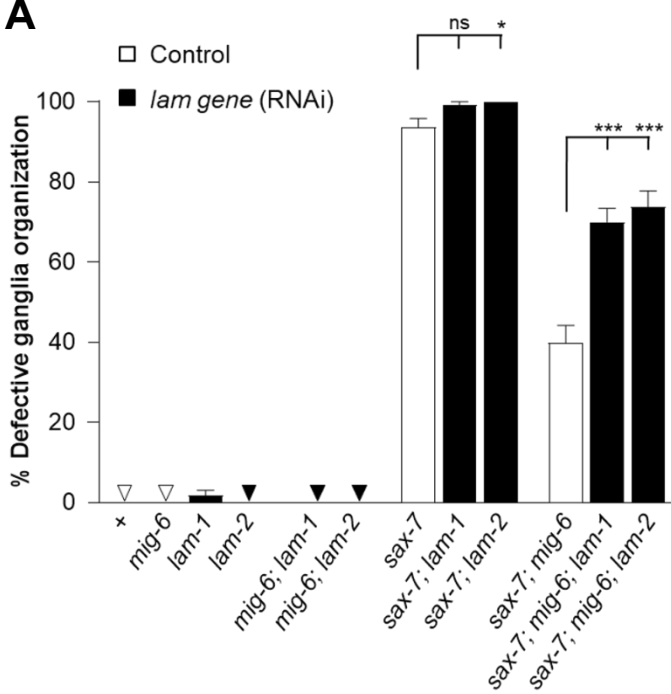
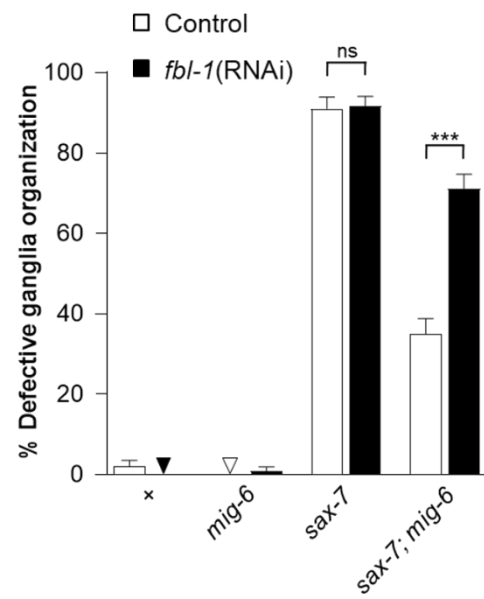
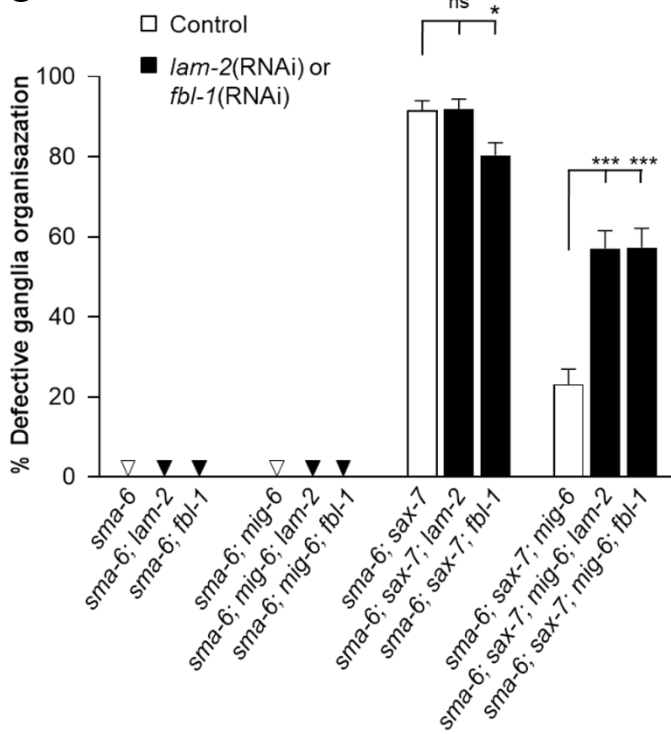
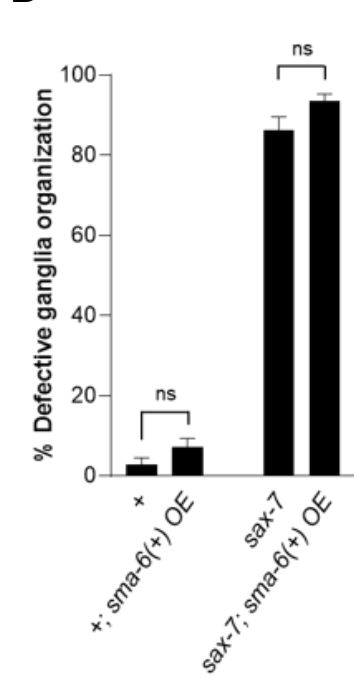
A**B****C****D**

Figure 3.7 Neuronal stabilization by *mig-6* mutation, and its enhancement through TGF- β signaling inactivation, requires laminin and fibulin.

(A,B) Quantification of neurons ASH and ASI displacement (using *hds26 Psra-6::DsRed2*, as in Fig. 3.1, 3.2) in 2-day old adult animals subjected to control RNAi (empty vector) or to *lam-1(RNAi)* or *lam-2(RNAi)* in A, or *fbl-1(RNAi)* in B. The suppression of the *sax-7* neuronal maintenance defects by *mig-6(qv33)* mutation is reversed by depletion of laminin or of fibulin. (C) Quantification of neurons ASH and ASI displacement in 2-day old adult animals upon depletion of laminin or fibulin by *lam-2(RNAi)* or *fbl-1(RNAi)* in animals lacking TGF- β receptor *sma-6*. The depletion of either laminin or fibulin suppresses the enhancement by loss of TGF- β receptor on the suppression of *sax-7* defects by *mig-6* mutation. (D) Quantification of neurons ASH and ASI displacement in 2-day old adult wild-type and transgenic animals overexpressing the TGF- β receptor using *sma-6(+)* OE (as in Figs. 3.3, 3.4, 3.5 and 3.6). Error bars are the standard error of the proportion. z-tests were performed.

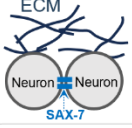
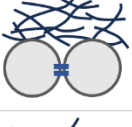
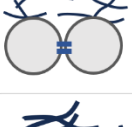
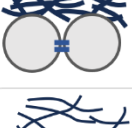
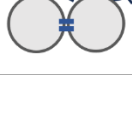
	Collagen IV	Peroxidasin-2	Laminin	Fibulin	Do gene alteration(s) suppress <i>sax-7</i> mutants defects?
Wild type 	Normal	Normal	Normal	Normal	--
<i>mig-6(lf)</i> 	↑	↑	↑	↓ and changed distribution	Yes
<i>sma-6(lf)</i> 	Normal	Normal	↑	↓	No
<i>sma-6(lf); mig-6(lf)</i> 	↑↑	↑↑	↓	↓ and changed distribution	Yes, enhanced suppression
<i>sma-6(++)</i> OE 	↑	Normal	↑	↓ and changed distribution	No

Figure 3.8 Summary of the impact of the interaction between *mig-6* and TGF- β signaling pathway. lf, loss of function; OE, overexpression of wild-type copies.

Summary of the impacts of *mig-6/papilin* loss of function, combined with the loss of the TGF- β receptor, as well as the effect of TGF- β receptor overexpression, on ECM components regulation (increased or decreased levels are indicated by arrows) and on the maintenance of neuronal positioning.

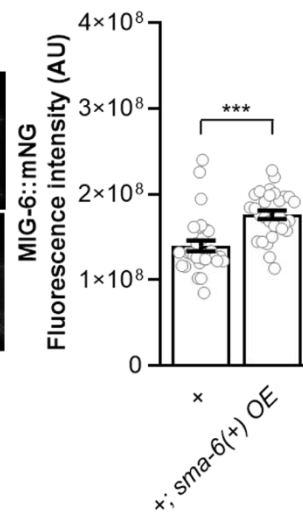
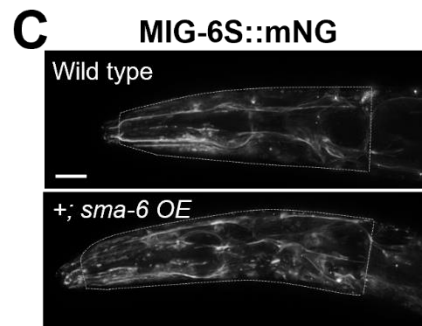
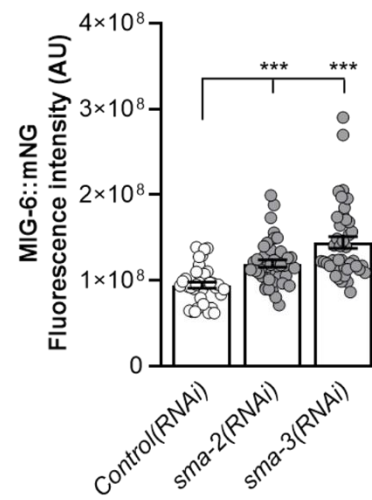
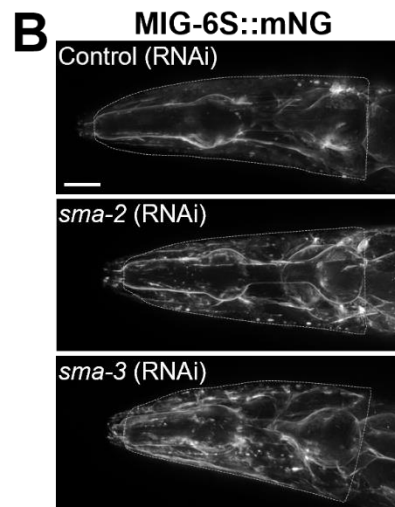
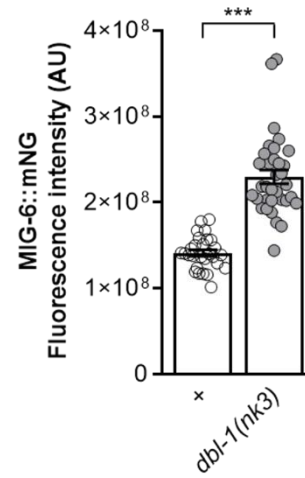
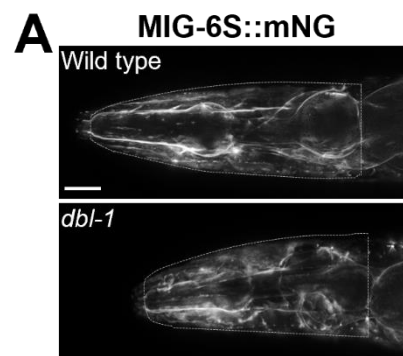


Figure 3.9 TGF- β pathway loss or overexpression both increase MIG-6S/papilin levels.

(A-C) Fluorescence images of MIG-6S::mNG using reporter *qvl59 Pmig-6::mig-6S::mNG* in the head region of 2-day-old adult animals (deconvoluted sum projections). The ROI used for quantification is indicated by the white head contour. (A) Quantification of MIG-6S::mNG signal in control and TGF- β ligand *dbl-1(nk3)* mutants, (B) in animals subjected to *sma-2(RNAi)*, *sma-3(RNAi)*, or control RNAi (empty vector), and (C) in *sma-6(+)* OE transgenic animals and controls. Error bars are the standard error of the mean. t-test (A, C), ANOVA (B). A.U., arbitrary units. Scale bars, 20 μ m.

3.5.6 Loss of *mig-6/papilin* leads to lowered TGF- β signaling

We next sought out to determine whether TGF- β signaling is altered in *mig-6* mutants, since the inactivation of this pathway potentiates the effect of *mig-6* mutation on neuronal maintenance, suggesting that TGF- β signaling may already be attenuated in *mig-6* mutants. In support of this notion, we noticed that *mig-6* mutants exhibit a reduced body length compared to wild-type animals, as previously noted by (Shibata *et al.*, 2016), which is a characteristic of diminished TGF- β signaling, as this pathway positively regulates body length in *C. elegans* (Wang, Tokarz et Savage-Dunn, 2002; Yoshida *et al.*, 2001). We measured body length and confirmed that *mig-6* mutants are indeed smaller than the wild type (Fig. 3.10A). To further probe TGF- β pathway activity in *mig-6* mutants we examined the effect of overexpression of the DBL-1 ligand. We used transgene *ctls40 Pdbl-1::dbl-1(+)* that overactivates TGF- β signaling, with transgenic animals having very long bodies (Bowman *et al.*, 2020; Suzuki *et al.*, 1999). Whereas *dbl-1(+)* overexpression did increase body length in otherwise wild-type animals, as expected, this increase in body length was abrogated in *mig-6* mutants (Fig. 3.10A). This result indicates that loss of *mig-6* function impairs TGF- β pathway activation by ligand overexpression in this context.

One possibility for *mig-6* mutants' smaller body length may be decreased DBL-1 levels. To test this, we measured the levels of the DBL-1 ligand using a well-established reporter transgene for DBL-1 (*texls100 Pdbl-1::dbl-1::gfp* (Schultz *et al.*, 2014)). We observed that DBL-1, which is known to be expressed in several head neurons (Duerr *et al.*, 2008; Morita, Chow et Ueno, 1999; Suzuki *et al.*, 1999; Zhang et Zhang, 2012), shows a stronger signal in these neurons in *mig-6* mutants compared to the wild type (Fig. 3.10B). However, *texls100* expressing DBL-1::GFP enables to visualize DBL-1 expression inside neurons, while extracellular DBL-1 is not visible, meaning this transgene does not report on the levels of ligand actually reaching the receptor expressed by distant epidermal cells (Roux *et al.*, 2023). To better characterize the activation state of the TGF- β pathway in *mig-6* mutants, we therefore measured the levels of the SMA-3 downstream effector using reporter *qcls6 Psmg-3::GF::SMA-3* (Wang, Tokarz et Savage-Dunn, 2002). We found that the levels of GFP::SMA-3 are significantly decreased in *mig-6* mutants compared to wild-type

animals (Fig. 3.10C). This indicates that the loss of function of *mig-6/papilin* results in reduced TGF- β signaling activity.

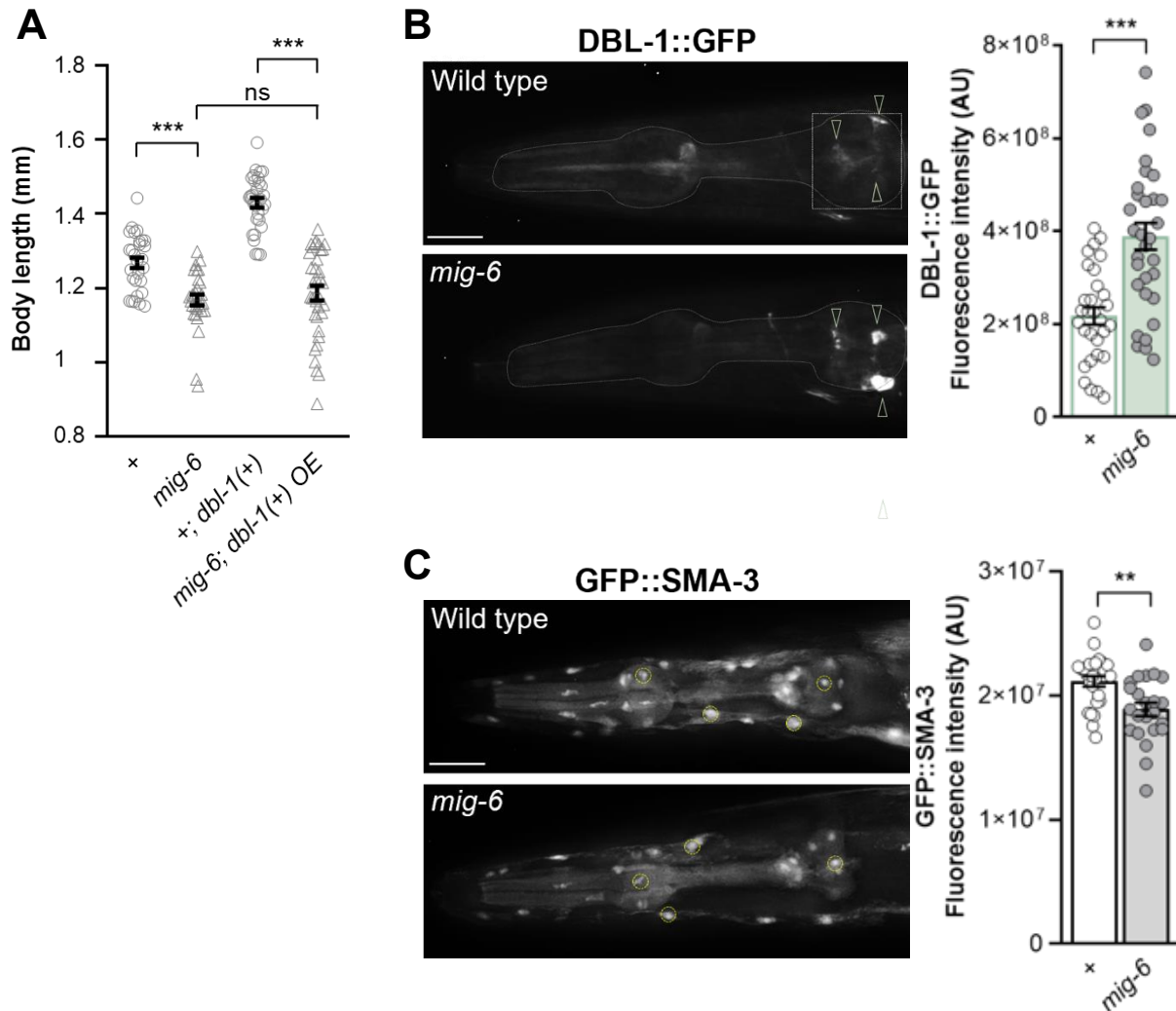


Figure 3.10 TGF- β signaling is attenuated in *mig-6* mutants.

(A) *mig-6* impacts DBL-1/TGF- β -mediated body length regulation. Analysis of body length of 2-day old wild-type and *mig-6* mutant animals, with or without *dbl-1* overexpression [*ctls40*, *Pdbl-1::dbl-1(+)*]. (B) Fluorescence images and quantification of DBL-1::GFP of 2-day old control and *mig-6(qv33)* mutant animals. The ROI for DBL-1::GFP signal quantification is indicated (white square). Arrowheads point to signal in DBL-1-expressing neurons. (C) Fluorescence images and quantification of GFP::SMA-3 [*qcls6* (GFP::SMA-3)] of 1-day old adult control and *mig-6(qv33)* mutant animals. ROIs used were four nuclei per animal (small yellow circles); the graph provides the average of signal intensities for four nuclei per animal. Error bars are the standard error of the mean (A-C). Wilcoxon-Mann-Whitney test (A), t-test (B, C). Scale bars, 20 μ m.

To further confirm that decreased TGF- β pathway activity contributes to *mig-6*-mutation-mediated neuronal stabilization, we tested the effect of overexpressing the DBL-1 ligand (using *ctIs40 Pdbl-1::dbl-1+*), (Bowman *et al.*, 2020; Suzuki *et al.*, 1999). For this, we constructed several strains of single and double mutants of *sax-7(qv30)* and *mig-6(qv33)* carrying this *dbl-1(+)* transgene (and the *Psra-6::DsRed2* reporter to visualize neurons ASH/ASI). We found that *dbl-1(+)* overexpression does not impact neuronal maintenance in wild-type animals, nor in *mig-6* or *sax-7* single mutants (Fig. 3.11A). However, *dbl-1(+)* overexpression significantly reverses the suppression of the *sax-7(qv30)* neuronal defects by *mig-6(qv33)*, as the penetrance of neuronal defects goes from 30% to nearly 80% in double mutants *sax-7; mig-6* overexpressing *dbl-1(+)* (Fig. 3.11A). This finding indicates that the attenuated activity of TGF- β pathway is part of the neuronal stabilization observed with *mig-6*/papilin loss of function.

In the context of body length regulation, the SMA-6 and DAF-4 receptor subunits function in the epidermis, which is the tissue that secretes the ECM components of the cuticle. To determine in which cell type the TGF- β receptor might function in the context of the maintenance of head neuronal architecture, we drove expression of wild-type copies of *sma-6(+)* by the epidermis, body wall muscles, or neurons, using heterologous promoters, and examined the effect on neuronal architecture. We found that the overexpression of *sma-6(+)* in the epidermis, but not in other cell types, partially reverses the suppression of *sax-7* neuronal defects by *mig-6* mutation. Indeed, double mutant animals *sax-7; mig-6* carrying *Pelt-3::sma-6(+)* display approximately 50% neuronal defects compared to the 30% of control double mutant animals *sax-7; mig-6* (Fig. 3.11B). Importantly, the reappearance of neuronal defects is not simply due to *sma-6(+)* overexpression by the epidermis, as controls in the wild-type background does not cause neuronal defects (Fig. 3.11C). Thus, overactivation of the TGF- β pathway counteracts the suppression effect of the *mig-6* mutation specifically, further supporting the notion that TGF- β pathway activity is reduced in *mig-6* mutants.

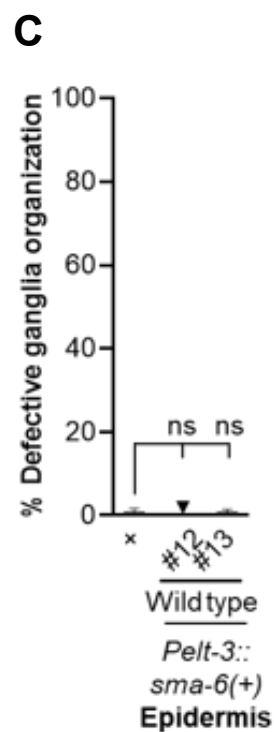
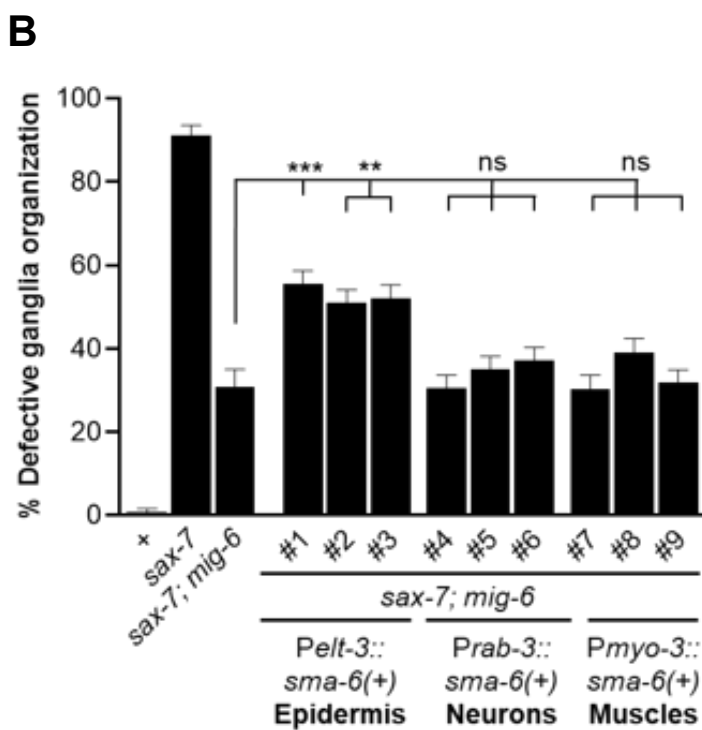
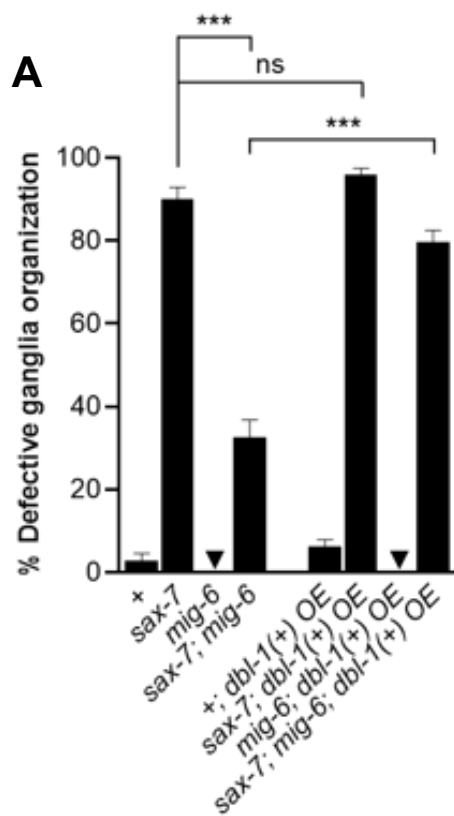


Figure 3.11 Overexpression of TGF- β ligand or receptor counteracts the effects of *mig-6* mutation on neuronal maintenance.

(A-C) Quantification of neurons ASH and ASI displacement (using *hdl-26 Psra-6::DsRed2*, as in Fig. 3.1 and 3.2) in 2-day old adult animals. (A) Overexpression of TGF- β ligand *dbl-1(+)* reverses the suppression of *sax-7(qv30)* neuronal defects by loss of *mig-6*. (B) Overexpression of TGF- β receptor *sma-6(+)* in the epidermis reverses the suppression of *sax-7(qv30)* neuronal defects by *mig-6(qv33)*. (C) Control of overexpression of TGF- β receptor *sma-6(+)* in the epidermis, which leaves neuronal organization unaffected. Error bars are the standard error of the proportion (A-C). z-tests.

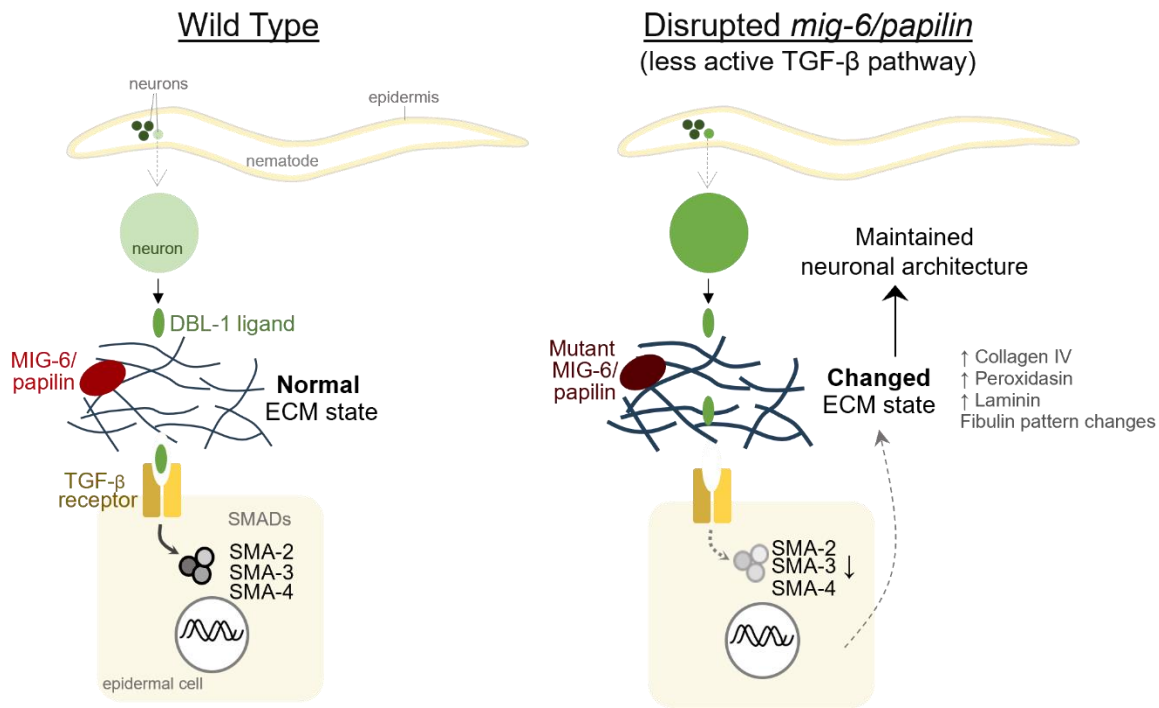


Figure 3.12 Proposed model : MIG-6/papilin regulates ECM remodeling and positively modulates TGF- β pathway.

Model for the roles of MIG-6/papilin and of TGF- β pathway in neuronal maintenance. TGF- β ligand DBL-1, produced by neurons, signals through SMA-6/DAF-4 receptors on epidermal cells to regulate ECM gene expression; the resulting levels and organization of the encoded ECM proteins contribute to neuronal maintenance. In *mig-6(qv33)* mutants, the altered state of the ECM (fibrotic, more abundant and more crosslinked) may hinder ligand accessibility to their receptors, thus reducing TGF- β receptor availability at the cell surface, impacting SMAD activation, and ultimately resulting in the inactivation or reduced efficiency of TGF- β signaling.

3.6 Discussion

In our previous work, we demonstrated that the conserved extracellular matrix protein MIG-6/papilin regulates collagen IV remodeling and modulates neuronal architecture. Loss of MIG-6/papilin function leads to fibrotic collagen IV accumulation and altered tissue biomechanics, promoting the stabilization of neuronal structures (Nadour *et al.*, 2025). In the present study, we explore the underpinnings of the fibrosis-like phenotype observed in *mig-6* mutants, focusing on the TGF- β signaling pathway, a well-established driver of fibrosis in mammals. Our results uncover a mechanism by which MIG-6/papilin affects TGF- β signaling to regulate ECM composition and impact neuronal maintenance, revealing MIG-6/papilin as a novel positive modulator of TGF- β pathway activity.

3.6.1 The TGF- β pathway functions with *mig-6* to regulate the extracellular matrix

The ECM is continuously remodeled by processes such as synthesis, secretion, modification, and degradation of its components, which is essential for tissue architecture restructuring during development and for maintaining normal organ homeostasis (Cox et Erler, 2011; Lu *et al.*, 2011). In addition, the ECM undergoes profound remodeling under pathological situations, including tissue fibrosis and cancer (Cox et Erler, 2011; Lu *et al.*, 2011). Here, we extend our analysis of the altered ECM state resulting from loss of *mig-6/papilin* function and reveal interactions with the TGF- β signaling pathway. Loss of *mig-6/papilin* leads to an accumulation of crosslinked collagen IV (Keeley *et al.*, 2020; Nadour *et al.*, 2025), with increased levels of peroxidase -the enzyme responsible for crosslinking collagen IV chains (Nadour *et al.*, 2025). Beyond collagen IV, we also found that other key ECM components are also affected in *mig-6/papilin* mutants: laminin accumulates at higher levels within the ECM, while fibulin displays altered distribution patterns and locally reduced levels (Figs. 3.3, 3.4, 3.5, 3.6). Thus, since the loss of function of *mig-6/papilin* leads to a fibrotic-like ECM state, we propose that MIG-6/papilin plays an anti-fibrotic role in ECM remodeling.

Interestingly, disruption of the TGF- β pathway further modifies the *mig-6* mutants' ECM phenotypes: inactivation of TGF- β in the double mutants *sma-6; mig-6* results in an even greater accumulation of fibrotic collagen IV compared to *mig-6* single mutants (Figs. 3.3, 3.4). Laminin levels decrease upon TGF- β inactivation (Figs. 3.5, 3.6), while the distribution of fibulin appears similarly affected as in *mig-6* mutants, depending on regions of fibulin enrichment (Figs. 3.5, 3.6). Furthermore, overactivation of the TGF- β pathway promotes the accumulation of ECM proteins, including both collagen IV and laminin (Figs. 3.3,

3.4, 3.5, 3.6), consistent with findings in other organisms (Frangogiannis, 2020; Yun, Kim et Kim, 2019). Notably, we also observed that MIG-6S/papilin levels are regulated by TGF signaling (Fig. 3.9). Altogether, we demonstrate that loss of *mig-6*/papilin leads to a fibrotic-like ECM state analogous to that described in fibrosis, a phenotype that is further exacerbated by the disruption of TGF- β signaling pathway.

Fibrosis, a pathological hallmark of many chronic inflammatory diseases, is characterized by the excessive accumulation of multiple ECM components (Wynn et Ramalingam, 2012). In mammalian models, TGF- β ligands are upregulated and activated within fibrotic tissues, playing a key role in driving fibrogenic responses in multiple organs, including the skin, kidney, colon, lungs, liver, and intestines (Frangogiannis, 2020). *mig-6* mutants display an increase in collagen IV, accompanied by a fibrotic phenotype. TGF- β is known to promote fibrosis by enhancing both the synthesis and accumulation of diverse collagens (Yun, Kim et Kim, 2019), and contributes to their post-translational crosslinking, enhancing their stability (Frangogiannis, 2020). Here, notably, we found that loss of MIG-6 results in accumulations of non-fibrillar collagen IV in fibrotic forms, a phenomenon also documented in various mammalian tissues, including the liver and kidneys, as well as in the basement membrane of *Drosophila* egg chambers (Bülow et Boor, 2019; Crest *et al.*, 2017; Isabella et Horne-Badovinac, 2016; Lausecker, Lennon et Randles, 2022; Mak et Mei, 2017; Wu *et al.*, 2021).

Peroxidasin catalyzes sulfilimine bond formation within collagen IV networks, thus consolidating basement membranes (Sitole et Mavri-Damelin, 2018). Importantly, peroxidasin has been reported to be highly expressed in fibrotic contexts, including in murine models of kidney fibrosis and non-alcoholic fatty liver disease (Colon *et al.*, 2019; Péterfi *et al.*, 2009; Sojoodi *et al.*, 2022). Conversely, peroxidasin deficiency has been associated with fibrosis regression and improved liver function, likely due to the looser, poorly crosslinked collagen matrix, which facilitates collagen removal (Sojoodi *et al.*, 2022). The levels of peroxidasin respond to TGF- β in a context-dependent manner: it is induced by TGF- β in pulmonary and dermal fibroblasts, and in kidney fibrosis (Péterfi *et al.*, 2009), but it is downregulated by TGF- β 1 during TGF- β 1-induced epidermal-to-mesenchymal transition (Sitole et Mavri-Damelin, 2018). In our study, we observed elevated expression levels of peroxidasin in *mig-6/papilin* mutants (Nadour *et al.*, 2025; Figs. 3.3, 3.4), indicating that MIG-6/Papilin regulates collagen IV crosslinking in the ECM.

In addition to collagen IV remodeling in *mig-6* mutants, we found that laminin also accumulates in these mutants (Figs. 3.5, 3.6). Laminin has been reported to be increased in fibrosis in different tissues (Lan et

Chung, 2012; Lee *et al.*, 2018a; Ning *et al.*, 2014). Interestingly, laminin has been implicated in collagen IV recruitment into the basement membrane (Jayadev *et al.*, 2019; Matsubayashi *et al.*, 2017; Urbano *et al.*, 2009), raising the possibility that the higher levels of laminin in *mig-6* mutants could contribute to their increased collagen IV accumulation. In contrast, in *sma-6; mig-6* double mutants, laminin levels are decreased. This may reflect a feedback response related to the state of the ECM, combined with the loss of TGF- β signaling: decreased laminin may limit further collagen IV recruitment, already excessively accumulated in these double mutants. Additionally, since laminin function has been associated with TGF- β pathway inhibition (Ning *et al.*, 2014), laminin may be downregulated in these animals where the TGF- β pathway is both attenuated by the *mig-6* mutation (as discussed below) and inactivated by the TGF- β receptor mutation.

We also found that *mig-6/papilin* mutants display an altered distribution of fibulin (Figs. 3.5, 3.6), an ECM protein that interacts genetically with MIG-17/ADAMTS during gonad morphogenesis (Kubota, Kuroki et Nishiwaki, 2004), and that we have found to function in the same pathway as *mig-6* in the context of neuronal maintenance (Nadour *et al.*, 2025). Fibulin is a dynamic ECM component, as demonstrated in *C. elegans* (Keeley *et al.*, 2020), and has been reported to be elevated in pulmonary tissue fibrosis, where it regulates TGF- β and is proposed to act as a driver of TGF- β -induced fibrosis (Liu *et al.*, 2019). Additionally, previous studies in *C. elegans* have shown that *fbl-1* regulates gonad-arm elongation and expansion (Hesselson et Kimble, 2006; Kubota *et al.*, 2012). Mutations in *fbl-1* bypass the requirement for MIG-17/ADAMTS in directing distal tip cell migration, and fibulin localizes to the gonadal basement membrane in a MIG-17-dependent manner (Kubota, Kuroki et Nishiwaki, 2004). Furthermore, mutations in *emb-9* (collagen IV) have been shown to suppress *fbl-1* null phenotypes, suggesting that fibulin regulates EMB-9/collagen IV accumulation in the gonadal basement membrane (Kubota *et al.*, 2012). More recently, fibulin has been identified as a mediator of a basement membrane linkage (B-LINK) supporting the uterus during egg-laying in *C. elegans* (Gianakas *et al.*, 2022). Collectively, these findings imply that fibulin may play a role in stabilizing collagen IV in its fibrotic form in *mig-6* mutants, thereby promoting neuronal maintenance by supporting the ECM structure and integrity.

3.6.2 MIG-6/papilin regulates ECM remodeling through modulation of the TGF- β pathway

Our findings suggest that TGF- β signaling is attenuated in *mig-6/papilin* mutants, supported by multiple lines of evidence (Figs. 3.1, 3.2, 3.7, 3.10, 3.11): (1) *mig-6* mutants exhibit the reduced body length compared to wild-type animals; (2) loss-of-function mutations or RNAi-mediated knockdown of TGF- β pathway components (ligand, receptor, intracellular effectors) enhance the suppression of the *sax-7* neuronal maintenance defects by *mig-6* loss-of-function; (3) overexpression of the TGF- β ligand or receptor—thereby forcibly activating the pathway—counteracts the suppression mediated by *mig-6* mutation and reinstates *sax-7* neuronal defects; and (4) nuclear levels of TGF- β pathway intracellular cofactor SMA-3 are reduced in *mig-6* mutants relative to wild type, reflecting a decrease in TGF- β pathway activity in *mig-6* mutants.

One possible explanation for the downregulation of TGF- β signaling in *mig-6* mutants is altered diffusion of the DBL-1 ligand ((Muller et Schier, 2011; Wang *et al.*, 2016; Yamada, Doyle et Lu, 2022) caused by the ECM's altered state, with increased matrix components and a more crosslinked collagen IV network (Nadour *et al.*, 2025). Alternatively, excessive accumulation of ECM components, such as collagen IV, may favor their binding to the TGF- β ligand, thereby competing with the receptor for the ligand availability and reducing pathway activation (Paralkar, Vukicevic et Reddi, 1991; Wilson *et al.*, 2022). Additionally, changes in the biomechanical properties of the ECM in *mig-6* mutants (Nadour *et al.*, 2025) may impair TGF- β signaling, as mechanical cues are known to influence ligand bioavailability and activation (Hinz, 2015; Maeda *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2023). For instance, in other systems, the TGF- β ligand is secreted as an inactive form requiring extracellular activation (Chia *et al.*, 2024; Robertson et Rifkin, 2016; Shi *et al.*, 2011). It is conceivable that ECM-degrading enzymes, including MIG-17/ADAMTS that functionally interacts with *mig-6/papilin* (Nadour *et al.*, 2025), may participate in this activation mechanism, thus being impaired in *mig-6* mutants and ultimately leading to lower pathway efficiency.

A key finding from our study is that fibrosis persists in *mig-6* mutants despite attenuation of TGF- β signaling. This observation is unexpected, as TGF- β pathway inhibition typically reduces fibrosis studies in vertebrate models (Fukasawa *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2020). Our results raise the possibility that the ability of TGF- β signaling to regulate the expression of ECM components may depend on papilin. It will be important to determine whether transcription of ECM components is unchanged despite TGF- β pathway inhibition in *mig-6* mutants, or whether other pathways may drive fibrosis independently of TGF-

β , such as MAPK, Wnt/ β -catenin, JAK/STAT, or RAS/ERK signaling (Zhao *et al.*, 2022a; Zhou, Ling et Shi, 2024).

It is well documented that TGF- β overexpression promotes fibrosis in both *in vivo* and *in vitro* models (Frangogiannis, 2020; Lee *et al.*, 2018b; Yun, Kim et Kim, 2019). In humans, TGF- β overexpression induces pronounced fibrotic changes across multiple tissues (Sanderson *et al.*, 1995; Sime *et al.*, 1997; Sonnylal *et al.*, 2007). Conversely, loss of one of the downstream effectors, for instance, has been shown to reduce tissue fibrosis in various organs, such as skin (Lakos *et al.*, 2004), kidney (Inazaki *et al.*, 2004), lung (Zhao *et al.*, 2002), liver (Lee *et al.*, 2016), and intestine (Latella *et al.*, 2009; Zanninelli *et al.*, 2006). The activation of TGF- β signaling through overexpression of TGF- β type I receptor, or of DBL-1 ligand, leads to the reappearance of the *sax-7* mutants' neuronal defects, specifically in the *mig-6* mutant background. This is consistent with the notion that the TGF- β pathway is less active in *mig-6* mutants, and that the state of TGF- β signaling is critical for the mechanisms by which *mig-6* loss of function suppresses *sax-7* neuronal defects. Based on our findings, we thus propose that MIG-6/papilin may act as a positive modulator of the TGF- β pathway. Further investigation is needed to determine whether the positive effect of MIG-6 on TGF- β signaling is direct or mediated through indirect mechanisms.

MIG-6/Papilin is an ADAMTS-like protein (Rypdal *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2021). ADAMTS-like proteins (ADAMTSLs) are structurally related to the ADAMTS family of ECM proteases (Apte, 2009; Drechsler *et al.*, 2013) but lack a catalytic domain (Zhang *et al.*, 2021). Elevated levels of ADAMTSLs have been reported in fibrotic conditions, including increased ADAMTSL1-5 and papilin in the hearts of mice with fibrosis (Corey *et al.*, 2022; Rypdal *et al.*, 2022). Interestingly, ADAMTSL2 has been proposed to function in a negative feedback loop regulating TGF- β signaling, with elevated ADAMTSL2 attenuating TGF- β pathway activity, potentially by acting upstream of active, released TGF- β (Rypdal *et al.*, 2022). This inhibitory role of ADAMTSL2 contrasts with our findings for wild-type MIG-6/papilin function, which promotes TGF- β signaling (as TGF- β signaling is attenuated in loss-of-function *mig-6* mutants). Similar regulatory diversity has been reported for BMP signaling, where both positive and negative regulators have been identified. For example, in *C. elegans*, transmembrane regulators such as DRAG-1 (Tian *et al.*, 2010), UNC-40/neogenin (Tian *et al.*, 2013), SMA-10/LRIG (de Lucas *et al.*, 2021), CRM-1/CRIM (Fung *et al.*, 2007), and tetraspanins (Liu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017), as well as enzymes SUP-17/ADAM10 and ADT-2/ADAM ((Fernando *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017) act to positively regulate BMP signaling. On the other hand, LON-2/glypican and LON-1 have been described as negative regulators of the pathway (Gumienny *et al.*,

2007; Maduzia *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 2002). In sum, our study identifies MIG-6/Papilin as a novel extracellular matrix positive regulator of TGF- β signaling.

We also found that neuronal DBL-1::GFP levels are elevated in *mig-6* mutants compared to wild-type animals (Figs. 3.10, 3.11). As GFP fusion proteins frequently are not reliably detected in the acidic extracellular milieu, it is possible that this reporter only informs on the intracellular levels of DBL-1::GFP. In any case, the observation that DBL-1::GFP levels are elevated in *mig-6* mutants suggests that MIG-6/papilin may be required for normal expression and/or secretion of DBL-1 into the ECM. Alternatively, insufficient DBL-1 delivery to its target may ultimately lead to reduced TGF- β pathway activity, triggering a compensatory feedback mechanism to increase *dbl-1* expression, suggesting a role of MIG-6/papilin in DBL-1 distribution in the ECM. In *C. elegans*, it has been shown that ADT-2/ADAMTS is necessary for normal DBL-1 expression levels to maintain normal cuticle structure and regulate body size (Fernando *et al.*, 2011).

Both the loss of TGF- β signaling and its overactivation -via overexpression of the *sma-6* type I receptor- lead to increased MIG-6S/papilin levels (Fig. 3.9). We propose that under TGF- β pathway overactivation, which induces a fibrotic state, elevated papilin levels may act to compensate and maintain a normal ECM state. Conversely, the increase in MIG-6S/papilin levels observed upon disruption of the TGF- β pathway suggests that TGF- β signaling may normally act to downregulate papilin expression. Interestingly, this is reminiscent of findings that ADAMTSL2 expression is regulated by TGF- β during fibrous tissue differentiation in the sclerotome (Clayton *et al.*, 2020).

3.6.3 A *mig-6*-dependent role for the TGF- β signaling pathway in neuronal maintenance

We previously showed that collagen IV (both its levels and crosslinking) is required for the maintenance of neuronal architecture mediated by loss of *mig-6*/papilin function (Nadour *et al.*, 2025). We have now found that laminin and fibulin are also necessary in the mechanism by which the ECM contributes to maintaining neuronal organization in *mig-6* mutants, as knockdown of laminin or fibulin reverses the suppression of *sax-7* neuronal maintenance defects by *mig-6* mutation (Figs. 3.5, 3.6). We further show that the TGF- β pathway impacts ECM remodeling, which is consistent with its previously described roles in apical ECM regulation in the context of cuticle formation in *C. elegans* (Goodman et Savage-Dunn, 2022; Lakdawala *et al.*, 2019; Madaan *et al.*, 2018; Schultz *et al.*, 2014). Here, we studied the role of the TGF- β pathway on the ECM that composes the basement membrane ensheathing head neuronal structures, which comprises collagen IV. We found that, in this context, the TGF- β pathway impacts ECM regulation

in a *mig-6*-dependent manner: with normal *mig-6/papilin* function, inactivation of the TGF- β pathway only minimally affects the ECM composition in the head region and has no impact on neuronal organization. However, when *mig-6* is mutated, the impact of TGF- β on neuronal maintenance is revealed, with loss of TGF- β signaling pathway components -including of the ligand *dbl-1*, the receptors *sma-6* and *daf-4*, and the downstream effectors- enhancing the suppression of *sax-7* neuronal defects by *mig-6* mutation (Figs. 3.1, 3.2). Conversely, TGF- β components overexpression has no effect on neuronal organization by itself, but efficiently counteracts the suppression of *sax-7* neuronal defects by *mig-6* (Figs. 3.10, 3.11).

Thus, we identified a nonautonomous mechanism involving TGF- β signaling in the epidermis that contributes to the maintenance of neuronal organization in *C. elegans*. The neuronally-produced TGF- β ligand DBL-1 is known to signal to peripheral tissues by binding to the heterodimeric receptor complex composed of the type 1 receptor SMA-6 and type 2 receptor DAF-4, and acts via the nucleocytoplasmic SMAD proteins SMA-2, SMA-3, and SMA-4 (Arneaud *et al.*, 2022; Gumienny et Savage-Dunn, 2013; Morita, Chow et Ueno, 1999; Roberts *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 1999). Our working model (Fig. 3.12) proposes that the TGF- β pathway contributes to long-term neuronal maintenance in a *mig-6*-dependent manner: DBL-1 ligand generated from a subset of neurons (Zhang et Zhang, 2012) signals through the SMA-6/DAF-4 receptors in the epidermis to regulate gene expression, including ECM genes impacting neuronal maintenance. As discussed above, in *mig-6* mutants, the TGF- β signaling pathway appears to be less active, which may be attributable to the fibrotic ECM environment in *mig-6* mutants (Nadour *et al.*, 2025), further altering the regulation of ECM remodeling. In sum, our findings reveal a novel mechanism in MIG-6/papilin contributes to ECM remodeling, at least in part through regulation of the TGF- β pathway, and provide molecular insight into how a fibrosis-like state supports the long-term maintenance of neuronal architecture. This work underscores the critical role of the ECM in safeguarding neuronal architecture—an area that remains relatively unexplored.

CHAPITRE 4

DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans cette thèse, nous avons exploré le rôle d'une protéine conservée de la MEC, MIG-6/papiline, appartenant à la famille des ADAMTSL, dans le maintien de l'architecture du système nerveux chez *C. elegans*. Notre étude s'est concentrée sur la compréhension du rôle de MIG-6/papiline dans la MEC, en examinant d'autres composants tels que le collagène IV, des enzymes extracellulaires jouant un rôle dans le remodelage et l'organisation du collagène IV, telles que MIG-17/ADAMTS et la peroxydasine-2, ainsi que d'autres éléments majeurs de la MEC, comme la laminine et une protéine régulatrice, la fibuline. Par ailleurs, pour la première fois, nous avons mis en évidence l'implication de la voie TGF- β dans la maintenance neuronale, de manière dépendante de la protéine MIG-6/papiline.

Ce travail contribue à approfondir notre compréhension du rôle de MIG-6/papiline dans la MEC en général, et spécifiquement dans le maintien de l'organisation des neurones chez *C. elegans*. Le mécanisme d'action de la papiline dans la MEC reste en effet mal compris. À travers cette étude, nous avons mis en évidence que MIG-6/papiline joue un rôle anti-fibrotique en régulant les niveaux et/ou la distribution de certaines protéines de la MEC, telles que le collagène IV, la laminine, la peroxydasine-2, MIG-17/ADAMTS et la fibuline. Nous avons également révélé que, via la régulation du remodelage de la MEC, MIG-6/papiline affecte la maintenance de l'architecture du système nerveux. De plus, nous avons montré que MIG-6/papiline régule la voie de signalisation TGF- β pour moduler la maintenance neuronale. Nos résultats démontrent que la MEC joue un rôle essentiel dans le maintien de l'architecture neuronale, un domaine de recherche encore peu exploré.

Nous avons observé une corrélation entre la présence des structures fibrotiques de collagène IV et la maintenance neuronale, bien que cela ne signifie pas nécessairement que les structures fibrotiques jouent un rôle direct dans ce processus. Nous pensons que les structures fibrotiques représentent une manifestation visible et mesurable du remodelage de la MEC observé chez les mutants *mig-6*. De plus, nous avons montré qu'en plus des composants affectant le collagène IV, d'autres éléments de la MEC, tel que la réticulation, jouent un rôle crucial dans le mécanisme de suppression des défauts de maintenance neuronale chez les mutants *sax-7* par la perte de fonction de *mig-6*. Cela met en évidence le rôle global et complexe de l'ensemble des composants de la MEC dans ce processus. Il reste encore beaucoup à

découvrir concernant la localisation et l'origine de ces accumulations. Ce point sera abordé plus en détail plus tard dans la discussion.

Nos résultats suggèrent que la voie TGF- β est moins active chez les mutants *mig-6*, comme le montre : 1) la taille réduite des vers par rapport aux animaux de type sauvage; 2) le fait que la perte de fonction des composants de la voie TGF- β (ligands, récepteurs, effecteurs intracellulaires) renforce l'effet suppresseur de la perte de fonction de *mig-6* sur les défauts de maintenance neuronale des mutants *sax-7*; 3) la surexpression du ligand TGF- β (DBL-1) et de son récepteur (SMA-6) — en activant de manière forcée la voie — antagonise la suppression par la mutation de *mig-6* et entraîne le retour des défauts neuronaux observés chez les mutants *sax-7* dans les doubles mutants *sax-7; mig-6* ; et enfin 4) les niveaux de l'un des cofacteurs intracellulaires de la voie la voie TGF- β , la protéine GFP::SMA-3, sont plus faibles dans les noyaux des mutants *mig-6* que dans ceux du type sauvage, ce qui reflète une activité réduite de la voie TGF- β chez les mutants *mig-6*.

Il reste à comprendre pourquoi la voie TGF- β est moins active chez les mutants *mig-6*. Il serait pertinent d'examiner si les niveaux d'expression des récepteurs SMA-6 et DAF-4 sont altérés chez les mutants *mig-6*, ainsi que d'explorer un éventuel problème lié à la diffusion du ligand DBL-1 dans une MEC présentant des niveaux plus élevés de ses composants et un réseau de collagène IV plus réticulé. L'analyse de la distribution extracellulaire de DBL-1, combinée à une étude par FRAP, utilisant une version fluorescente de DBL-1, pourrait permettre de répondre à cette question. L'inhibition de la voie TGF- β pourrait également résulter de l'accumulation des composants de la MEC initialement transcrits et traduits. Par exemple, l'accumulation excessive du collagène IV pourrait conduire à son interaction avec le ligand TGF- β et rentrer donc en compétition avec le récepteur TGF- β (Paralkar, Vukicevic et Reddi, 1991; Wilson *et al.*, 2022), ce qui entraînerait la diminution de l'efficacité de la voie. Par ailleurs, les propriétés biomécaniques de la MEC pourraient également jouer un rôle dans la perturbation de la voie TGF- β chez les mutants *mig-6*, un point qui sera abordé plus tard dans la discussion.

D'autre part, un résultat clé de nos travaux est que, malgré l'atténuation ou la désactivation de la voie TGF- β chez les mutants *mig-6*, la fibrose persiste. Ce résultat est atypique, car des études dans d'autres modèles animaux tels que le rat et la souris montrent que l'inhibition de la voie TGF- β réduit la fibrose (Fukasawa *et al.*, 2004; Kuwahara *et al.*, 2002; Nagashio *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2000). Nos résultats suggèrent que peut être la capacité de la voie TGF- β à moduler l'expression des composants de la MEC

dépend de la papiline. Il serait également intéressant de vérifier si la transcription des composants de la MEC continue malgré l'inhibition de la voie TGF- β chez les mutants *mig-6*, ou si c'est plutôt d'autres voies parallèles, qui médient la fibrose, qui interviennent pour compenser l'inhibition de la voie TGF- β telles que les signalisations MAPK, Wnt/ β -caténine, JAK/STAT et RAS/ERK (Zhao *et al.*, 2022a; Zhou, Ling et Shi, 2024).

Nos recherches sur le stress mécanique mettent en évidence le rôle de MIG-6/papiline dans la régulation de la protection et de la maintenance de la structure neuronale en réponse au stress mécanique. Il serait pertinent d'explorer d'autres formes de stress mécanique, en dehors de la nage, ainsi que d'autres situations traumatiques susceptibles d'affecter les neurones, comme une pression osmotique élevée ou la culture des animaux sur un substrat plus rigide (Oorloff *et al.*, 2024).

Ci-dessous je discute plusieurs pistes d'expérimentations futures qui aideraient à approfondir notre compréhension du rôle de MIG-6/papiline dans la MEC et de son impact sur la maintenance neuronale.

4.1 Explorer le rôle de MIG-6/papiline sur d'autres structures neuronales

4.1.1 Rôle de MIG-6/papiline sur d'autres groupes de neurones

Nous avons observé que MIG-6/Papiline joue un rôle clé dans la maintenance de l'architecture de certains neurones chimiosensoriels localisés dans les ganglions latéraux de la tête et dans la corde nerveuse ventrale, des structures qui sont entourées par la MB (Altun *et al.*, 2024). Afin d'élargir cette étude, il serait pertinent d'examiner d'autres types de neurones localisés dans les mêmes ganglions, comme d'autres neurones chimiosensoriels ou des interneurones, ou bien d'autres neurones situés dans d'autres ganglions, tels que le ganglion ventral et le ganglion rétrovésiculaire, qui sont eux aussi entourés par la MB. Une approche intéressante pour visualiser la position de ces neurones sensoriels dans leur ensemble serait l'utilisation du colorant fluorescent Dil, permettant de marquer les six paires de neurones amphides dans la tête (Altun *et al.*, 2024). Par contre, l'efficacité de cette coloration est variable, et les 12 neurones colorés dans la tête ne peuvent pas être identifiés individuellement, ce qui rend les analyses moins concluantes. Une souche récemment développée, NeuroPAL, utilise une série de transgènes multicolores pour marquer 118 classes de neurones chez *C. elegans* avec différentes combinaisons de protéines fluorescentes (Santiago *et al.*, 2022; Yemini *et al.*, 2021), ce qui permettrait une exploration approfondie. En croisant la souche NeuroPAL avec les simples mutants *sax-7* et *mig-6*, et les doubles mutants *sax-7; mig-6*, il serait possible d'examiner la position de divers neurones à différents stades de développement et de mettre en évidence d'éventuels phénotypes développementaux ou de maintenance.

4.1.2 Rôle de MIG-6/papiline sur la morphologie synaptique

Le rôle de MIG-6/papiline dans la morphologie synaptique représente également un objectif dans l'étude de son impact sur le système nerveux. L'anneau nerveux qui contient, entre autres, les neurones étudiés ASH et ASI, est l'élément principal du cerveau de *C. elegans*. Cet anneau nerveux, un faisceau tridimensionnel de neurites, abrite un grand nombre de synapses (Cook, Kalinski et Hobert, 2023; Moyle *et al.*, 2021; Singhvi et Shaham, 2019). Des travaux antérieurs ont révélé que *mig-17/ADAMTS*, un interacteur génétique de *mig-6*, joue un rôle dans la maintenance des synapses du neurone AIY (Fan *et al.*, 2020)). Cette observation soutient l'hypothèse selon laquelle MIG-6/papiline, et plus généralement la MEC, sont impliqués dans le maintien des synapses de l'anneau nerveux.

Pour étudier l'organisation synaptique, plusieurs outils génétiques et d'imagerie peuvent être utilisés, tels que des rapporteurs fluorescents marquant les composants pré- et post-synaptiques (Calahorra et Izquierdo, 2018; Mizumoto, Jin et Bessereau, 2023). De plus, des méthodes basées sur la complémentation fonctionnelle entre deux fragments de GFP exprimés dans les neurones pré- et post-synaptiques (GRASP) (Feinberg *et al.*, 2008) ou encore la méthode iBLINC *in vivo* (Desbois *et al.*, 2015), pourraient être appliquées. L'étude des synapses dans l'anneau nerveux, jusqu'à récemment difficile, est désormais rendue plus faisable grâce à l'apparition de nouveaux rapporteurs synaptiques chez *C. elegans* (Majeed *et al.*, 2024). En outre, la quantification des signaux synaptiques et l'analyse de l'ultrastructure synaptique, notamment dans des régions à forte densité synaptique et à morphologie complexe comme l'anneau nerveux, sont grandement facilitées par le pipeline WormPsyQi développé pour cette analyse (Majeed *et al.*, 2024).

4.1.3 Rôle de la glie dans la maintenance neuronale dans le contexte des mutants *mig-6*

Il serait également intéressant d'étudier le rôle de la glie dans le mécanisme de la maintenance neuronale médié par MIG-6/papiline. Récemment, une analyse RNAseq des cellules gliales nommées GLR chez *C. elegans* a montré un enrichissement de transcrits de gènes codant les composants de la MEC tels que le collagène IV, MIG-6/papilin et SPARC dans ces cellules GLR (Stefanakis *et al.*, 2024). Ces résultats nous laissent penser qu'il serait intéressant d'explorer la possible action de MIG-6 et des autres composants de la MEC (MIG-17/ADAMTS, peroxydase-2, etc.) à partir des cellules GLR. Une expérience serait de tester si la fonction de *mig-6* serait restaurée à partir de la glie, surtout que le sauvetage sous le contrôle du promoteur endogène de *mig-6* est partiel. Il serait également intéressant d'étudier le rôle des cellules gliales dans la maintenance de la position de l'anneau nerveux et des somas neuronaux chez les mutants

mig-6, surtout que les cellules gliales (CEPsh et GLR) entrent en contact avec l'anneau nerveux (Shaham, 2015; Singhvi et Shaham, 2019). De plus, des gènes impliqués dans la transmission synaptique sont enrichis dans les GLR (Stefanakis *et al.*, 2024), ce qui souligne l'importance d'examiner la glie également dans le contexte du rôle de *mig-6* dans le développement ou de la maintenance synaptique.

Enfin, il serait pertinent d'étudier le rôle potentiel de la glie dans la signalisation TGF- β en lien avec la maintenance neuronale chez les mutants *mig-6*. Plusieurs études, par exemple chez la souris et la drosophile, ont rapporté que le ligand TGF- β et son récepteur peuvent être produits par la glie (Bedolla *et al.*, 2024; Fuentes-Medel *et al.*, 2012; Guevara et Ortiz, 2021; Qin *et al.*, 2018). Vu que le sauvetage de la fonction du récepteur TGF- β codé par le gène *sma-6* à partir de l'épiderme n'est que partiel, un rôle possible d'autres tissus/cellules n'est pas exclu. Il serait donc utile de tester si le récepteur SMA-6 joue un rôle à partir de la glie chez *C. elegans* et cela en l'exprimant spécifiquement dans la glie dans les triples mutants *sma-6; sax-7; mig-6*. En effet, chez la drosophile, les composants de TGF- β sont requis dans la glie pour la maintenance des neurones sensoriels et leur protection contre une dégénérescence dépendante de l'âge (Lassetter *et al.*, 2023). Ces résultats supportent la notion d'un rôle probable de la voie TGF- β gliale dans la maintenance neuronale.

4.2 Mieux comprendre et caractériser le remodelage de la MEC dans le contexte des mutants *mig-6*

4.2.1 Examiner plus précisément l'état, la localisation et l'origine du collagène IV chez les mutants *mig-6*

Nous avons observé que les mutants *mig-6* se distinguent par la présence de structures fibrotiques de collagène IV. Cependant, l'aspect macromoléculaire, l'origine, et la localisation précise et de ces structures reste à déterminer. En raison du renouvellement lent du collagène IV, il n'a pas été possible de caractériser sa dynamique (synthèse et dégradation) en utilisant la méthode FRAP. Pour surmonter cette limitation, nous pourrions recourir à la photo-conversion de la protéine EMB-9 fusionnée à Dendra, une protéine fluorescente verte photo-convertible (Keeley *et al.*, 2020). Cette approche consiste à convertir Dendra du vert au rouge par exposition à une longueur d'onde spécifique. En présence d'une dynamique, nous pourrions observer le déplacement de la protéine photo-convertie d'une zone à une autre.

Dans notre contexte, une photo-conversion ciblée du collagène IV dans des tissus producteurs, tels que les cellules musculaires, pourrait permettre de déterminer si du collagène IV photoconverti en rouge apparaît au niveau des structures fibrotiques. Une telle observation suggérerait que le collagène IV

mobilisé vers les structures fibrotiques provient d'une synthèse continue. Cela s'alignerait avec des travaux récents montrant que la protéine EMB-9 est continuellement synthétisée et contribue à l'épaississement de la MB (Teuscher *et al.*, 2024). En revanche, si les structures fibrotiques conservent leur fluorescence verte sans trace de Dendra photo-converti, cela orienterait plutôt l'hypothèse vers un remodelage du collagène IV déjà présent dans la MEC. Nos résultats suggèrent que ce remodelage impliquerait une réticulation accrue du collagène IV, sous l'effet de la peroxydasine, et son accumulation dans la MEC. Il serait intéressant de réaliser cette expérience de photo-conversion en une étude longitudinale, c'est-à-dire, en examinant le même individu à différents stades de développement afin d'observer comment une structures fibrotiques se forment, ou encore d'effectuer de l'imagerie en temps réel pour suivre cette dynamique en temps réel en immobilisant des vers vivants dans des coussins d'hyrogel, ce qui permet leur observation pendant des heures (Albrecht et Bargmann, 2011). Par ailleurs, une autre approche complémentaire consisterait à mener des expériences d'ARNi pour dépléter les transcrits de *emb-9* codant pour une sous-unité du collagène IV dans des tissus spécifiques, tels que les muscles et la cellule mésodermale de la tête (cellule appelée 'hmc'). Ces expériences seraient suivies d'une quantification précise des caractéristiques des structures fibrotiques, notamment leur intensité, leur longueur et leur nombre. Cette stratégie permettrait d'identifier le ou les tissus responsables de la production du collagène IV impliqué dans la formation des structures fibrotiques.

Par ailleurs, l'utilisation de la microscopie électronique offrirait une meilleure résolution pour étudier en détail les structures fibrotiques de collagène IV, leur localisation et leur distribution au niveau ultrastructural. Cela permettrait également d'évaluer comment ces structures influencent la MB autour des ganglions neuronaux et des tissus ou structures adjacentes, tels que les muscles, l'épiderme et les cellules gliales. Cette approche permettrait d'étudier de manière précise la morphologie et l'ultrastructure de la MB, notamment autour des ganglions neuronaux et des muscles, en examinant des paramètres tels que son apparence générale, son épaisseur, sa localisation et sa distribution, et de les comparer à celles observées chez le type sauvage.

Un autre objectif de cette partie serait d'explorer le rôle d'autres composants de la MEC dans le mécanisme de la formation des structures fibrotiques de collagène IV chez les mutants *mig-6*. À travers nos travaux, nous avons mis en évidence l'interaction génétique entre certains composants de la MEC (MIG-6/papiline, collagène IV, peroxydasine, MIG-17/ADAMTS, laminine et fibuline). Cependant, il reste nécessaire d'approfondir l'analyse pour mieux comprendre le rôle de chacun des composants identifiés

dans le mécanisme par lequel *mig-6*/papiline impacte la maintenance neuronale en lien avec la MEC. Une approche potentielle consisterait à utiliser des techniques d'ARNi combinées à un suivi de l'expression et de la distribution de ces composants dans la MEC. Cela permettrait de révéler la dynamique de la MEC et le remodelage associé. Par exemple, la laminine, étant le premier composant incorporé dans la MEC et jouant un rôle clé dans le recrutement du collagène IV (Jayadev *et al.*, 2019; Matsubayashi *et al.*, 2017; Urbano *et al.*, 2009) pourrait être un élément crucial. Une première étape serait de vérifier si la déplétion de la laminine supprimerait le phénotype de structures fibrotiques de collagène IV chez les mutants *mig-6*. En effet, nous avons observé des niveaux élevés de laminine chez les mutants *mig-6*, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme favorisant l'augmentation de la laminine, ce qui stimulerait le recrutement du collagène vers les structures fibrotiques. Cette hypothèse mériterait d'être confirmée par d'autres expérimentations. D'autres part, nos résultats préliminaires montrent que la fibuline colocalise avec le collagène IV au niveau des structures fibrotiques (travaux de Ivan Valette). Ceci suggérerait que la fibuline pourrait jouer un rôle dans le recrutement et/ou dans le changement de l'organisation du collagène IV chez les mutants *mig-6*.

D'autres études seront nécessaires pour déterminer la chronologie des événements au niveau de la MEC, notamment en ce qui concerne le recrutement des différents composants de la MEC étudiés dans cette thèse. Ces recherches permettront de clarifier si ces événements font partie d'un mécanisme unique ou s'il existe des mécanismes parallèles générant ces états fibrotiques chez les mutants *mig-6*. Les résultats de ces études fourniront une meilleure compréhension du rôle de chaque composant identifié et de leur éventuelle interdépendance fonctionnelle dans la maintenance neuronale dans le contexte des mutants *mig-6*.

En outre, nous souhaitons, par une approche protéomique, identifier les molécules dont les niveaux sont affectés dans différentes souches (type sauvage et mutants *mig-6*, *sax-7*, *sma-6*, *sma-6; mig-6*, etc.). Avec le doctorant Ivan Valette et en collaboration avec le laboratoire de la Pre Lekha Sleno, nous avons testé plusieurs protocoles d'extraction, incluant une méthode indépendante de l'enrichissement en MEC (extraction par l'urée ou en utilisant un tensioactif et un agent chaotrope par la méthode SCAD (surfactant and chaotropic agent assisted sequential extraction/on-pellet digestion)) et une méthode dépendante de l'enrichissement en MEC (avec le chlorure de guanidinium Gnd-HCL et le tampon HA hydroxylamine) en utilisant des protocoles disponibles mais pas optimisés pour la MEC de *C. elegans* (Krasny *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2018; McCabe *et al.*, 2021). Nos résultats préliminaires ont montré que la méthode d'extraction au

tampon HA permettait de récupérer le plus grand nombre de protéines matricielles solubles. Cependant, le nombre de protéines détectées reste limité, et leur quantification par spectrométrie de masse ne corrèle pas parfaitement avec les données de quantification par fluorescence. Nous prévoyons d'améliorer les protocoles pour mieux dissocier les protéines fortement réticulées, notamment grâce à l'utilisation d'un cocktail d'enzymes capable de rompre les liaisons associées aux modifications post-traductionnelles. Il sera également nécessaire d'optimiser les protocoles pour éliminer les protéines cuticulaires en amont de la digestion trypsique.

4.3 Mieux comprendre l'interaction de MIG-6/papiline avec les métalloprotéinases MIG-17 et GON-1

D'après nos résultats, il est concevable que MIG-6/papiline joue un rôle régulateur sur la métalloprotéinase MIG-17/ADAMTS. Nous avons observé que l'enzyme MIG-17 présente un niveau d'expression élevé chez les mutants *mig-6*. Par ailleurs, la perte de fonction de cette enzyme entraîne un phénotype similaire à celui observé chez les mutants *mig-6*, tant au niveau neuronal (suppression des défauts des mutants *sax-7*) qu'au niveau de la MEC (structures fibrotiques de collagène IV). Cela suggère que MIG-6 pourrait agir comme un activateur de MIG-17/ADAMTS, et que cette enzyme serait inhibée en l'absence de MIG-6. Une autre explication possible est que l'état modifié de la MEC, notamment la réticulation du collagène IV, empêche l'enzyme MIG-17 de dégrader son probable substrat, le collagène IV (Krasselt *et al.*, 2020; Potekaev *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2013).

Pour tester la première hypothèse, nous pourrions réaliser une analyse par immunobuvardage afin de distinguer les formes active et inactive (proforme) de MIG-17::GFP, qui diffèrent par leur taille (Ihara et Nishiwaki, 2007), chez le type sauvage et les mutants *mig-6*. Si la proforme prédomine chez les mutants *mig-6*, cela soutiendrait l'idée que MIG-6/papiline inhibe l'activité de MIG-17/ADAMTS. En revanche, si la forme active est plus présente, cela pourrait indiquer que la réticulation plus importante du collagène IV est responsable de l'inefficacité de MIG-17/ADAMTS. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions analyser les deux formes de MIG-17/ADAMTS chez le contrôle et après l'ARNi de *pxn-2*, et vérifier si une réduction de la réticulation du collagène IV, suite à la déplétion de *pxn-2*, permettrait de restaurer l'activité de MIG-17/ADAMTS. Nous sommes plus en faveur de la deuxième hypothèse, car la surexpression de MIG-17/ADAMTS n'a pas supprimé le phénotype de structures fibrotiques de collagène IV chez les mutants *mig-6*. De plus, MIG-17 n'est pas une véritable ADAMTS puisqu'elle ne présente pas de domaine TSP1 dans sa structure (les domaines TSP1 sont impliqués dans les interactions entre les ADAMTS et la papiline chez la drosophile (Kramerova *et al.*, 2000)), et donc l'interaction physique de MIG-17 avec MIG-6 semble peu

probable. Enfin, il a été suggéré que MIG-17 pourrait s'activer par un mécanisme autocatalytique (Ihara et Nishiwaki, 2007) donc probablement de façon indépendante de MIG-6.

Chez *C. elegans*, une autre ADAMTS importante est GON-1, dont les niveaux sont influencés par la perte de fonction de *mig-6* dans le contexte de la gonade (Keeley *et al.*, 2020). GON-1 et MIG-17 jouent un rôle essentiel dans la morphogenèse et la croissance de la gonade (Blelloch et Kimble, 1999; Keeley *et al.*, 2020; Nishiwaki, Hisamoto et Matsumoto, 2000). GON-1 et MIG-17 pourraient donc être également impliquées dans la maintenance neuronale, d'autant plus que GON-1 est exprimée dans les neurones (Yoshina et Mitani, 2015) et participe à la maintenance synaptique (Kurshan *et al.*, 2014). De plus, une perte de fonction de *gon-1* entraîne une accumulation de collagène IV fibrotique dans la MB de la gonade (Keeley *et al.*, 2020). En outre, *gon-1* et *mig-17* interagissent avec *fb1-1* pour réguler la croissance et la morphogenèse gonadiques (Hesselson *et al.*, 2004; Kubota, Kuroki et Nishiwaki, 2004; Kubota *et al.*, 2008). Étudier les interactions potentielles entre ces deux ADAMTS et la fibuline dans le cadre de la maintenance neuronale médiée par MIG-6 serait donc particulièrement intéressant.

4.4 Le remodelage de la MEC chez les mutants *mig-6* affecterait-il les voies de transduction du signal mécanique ?

Nous avons démontré que la MEC subit un remodelage suite de la perte de fonction de *mig-6/papiline*, et que la perte de fonction de *mig-6* stabilise le positionnement des neurones des mutants *sax-7/L1CAM* chez *C. elegans*. La question qui pourrait se poser est la suivante : est-ce que l'état de la MEC, suite de la perte de fonction de *mig-6*, et qui est associé à un changement dans les propriétés mécaniques des tissus tel que nous avons établi par microscopie Brillouin, est perçu par les neurones ou autres cellules comme un stimulus mécanique (plus faible ou plus fort comparé au type sauvage)? Cela pourrait-il avoir un lien avec la maintenance neuronale? Si la réponse est oui, il serait pertinent de se demander si ce stimulus induit un changement au niveau moléculaire de la machinerie impliquée dans la transduction du signal mécanique de la MEC vers les cellules.

Il est bien établi, notamment dans des modèles cellulaires *in vitro*, que les forces mécaniques influençant les fonctions cellulaires, peuvent être perçues et converties en signaux biochimiques au niveau du complexe d'adhésion focale où les cellules s'attachent physiquement à la MEC (Seong *et al.*, 2013). Ainsi, nous proposons d'évaluer l'activité du complexe d'adhésion focale ou les modifications éventuelles de ses composants chez les mutants *mig-6* et d'autres mutants de la MEC. De plus, chez *C. elegans*, l'accès à la

MEC, notamment celle entourant les neurones, ainsi que la mesure de ses propriétés mécaniques, est très difficile à réaliser voire impossible avec les techniques actuelles. Ainsi, nous proposons de réaliser une mesure indirecte de la force qui serait générée dans la MEC et ce en étudiant le complexe d'adhésion focale. Cela nous permettrait d'évaluer la transduction d'un éventuel signal biomécanique venant de la MEC vers les cellules. Répondre à ces questions aiderait à savoir si le remodelage de la MEC affecte le complexe de l'adhésion focale et si ce dernier médie la maintenance neuronale chez les mutants *mig-6*.

Les adhésions focales sont des sites d'adhérence cellule-MEC jouant un rôle dans l'ancrage et la migration cellulaire, ainsi que dans des processus tels que l'organogenèse et la morphogenèse (Labouesse et Georges-Labouesse, 2003) (Burridge, 2017; Legerstee et Houtsmuller, 2021; Seong *et al.*, 2013). Sur le plan structural, les adhésions focales sont des assemblages multiprotéiques macromoléculaires situés à l'extrémité des fibres d'actines spécialisées, liant ces dernières à la MEC (Mavrakis et Juanes, 2023; Owen *et al.*, 2022). Les protéines composant les adhésions focales, qui sont largement étudiées, englobent les intégrines, la paxilline, la FAK (Focal Adhesion Kinase), la taline, et la vinculine (Chastney, Conway et Ivaska, 2021; Hu *et al.*, 2014; Legerstee et Houtsmuller, 2021; Tsujioka *et al.*, 2023). La formation d'un complexe d'adhésion focale commence par la liaison des intégrines à la MEC suivie par leur regroupement et d'un changement de leur conformation qui entraîne leur activation. Par la suite, plusieurs protéines adaptatrices intracellulaires, telles que la taline et la paxilline, sont recrutées ce qui favorise l'activation et le regroupement des intégrines (Kuo, 2014; Legerstee et Houtsmuller, 2021; Yang et Plotnikov, 2021). Ce processus se poursuit par le recrutement de plusieurs centaines d'autres protéines adaptatrices liant finalement la MEC au cytosquelette d'actine (Burridge, 2017; Kuo, 2014; Legerstee et Houtsmuller, 2021).

Chez *C. elegans*, les protéines d'adhésion focale sont caractérisées dans les muscles (sites d'attachement) (Cram, Fontanez et Schwarzbauer, 2008; Lin *et al.*, 2003; Moulder *et al.*, 1996). Des homologues du complexe d'adhésion focale ont été identifiés tels que KIN-32/FAK, TLN-1/ taline, et DEB-1/vinculine, en plus des intégrines (Cram, Fontanez et Schwarzbauer, 2008; Lin *et al.*, 2003; Moulder *et al.*, 1996; Teuscher *et al.*, 2024). Plusieurs mutants affectant les composant des adhésions focales existent chez *C. elegans* tels que *kin-32(ok166)*, *deb-1(st555)*, *tln-1(e259)*, ainsi que des mutants d'intégrines tels que *pat-3(rh54)*. L'utilisation de ces mutants et des approches d'ARNi permettraient d'explorer le rôle du complexe de l'adhésion focale dans la maintenance neuronale dans le contexte des mutants *mig-6*. Par exemple, il serait pertinent d'examiner si les intégrines, connues pour leur capacité à détecter la composition et les forces mécaniques de la MEC (Humphrey, Dufresne et Schwartz, 2014; Li *et al.*, 2023), agissent comme des

mécanorécepteurs dans le contexte de la maintenance neuronale. Chez *C. elegans*, les intégrines sont constituées d'une sous-unité α (PAT-2 ou INA-1) et d'une sous-unité β (PAT-3) (Kramer, 2005). Tester la perte de fonction de ces différentes sous-unités d'intégrines permettrait d'étudier leur impact sur la maintenance neuronale dans le double mutants *sax-7; mig-6* par exemple. Par ailleurs, il serait intéressant d'explorer si les effets des intégrines sur la maintenance neuronale dépendent des composants du complexe d'adhésion focale, tels que KIN-32, la paxilline et la vinculine. Ces investigations pourraient permettre de révéler le rôle des forces mécaniques médiées par le complexe de l'adhésion focale dans la maintenance neuronale.

Il serait également intéressant d'examiner si l'expression et la distribution des intégrines sont altérées chez les mutants *mig-6* et le double mutant *sax-7; mig-6*. Si un regroupement des intégrines était observé, une étude approfondie pourrait être menée pour étudier un éventuel recrutement des composants majeurs du complexe de l'adhésion focale tels que la paxilline, la vinculine et la KIN-32 en utilisant des versions fluorescentes de ces protéines.

Par ailleurs, d'autres travaux ont impliqué certains composants du complexe de l'adhésion focale dans la fibrose (Hijazi, Shi et Rockey, 2023; Van De Water, Varney et Tomasek, 2013; Wen *et al.*, 2022; Wong *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2024). Par exemple, l'expression et l'activité de la FAK sont nécessaires pour l'induction d'un phénotype pro-fibrotique et son inhibition *in vivo* conduit à une réduction de la fibrose dans divers organes, tels que les poumons et le foie, ainsi que dans les tissus cancéreux (Lagares *et al.*, 2012; Lagares et Kapoor, 2013; Weng *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017). De plus, une forte expression de FAK a été observée dans les zones fibrotiques de collagène dans le foie (Desai *et al.*, 2016). Récemment, la FAK a aussi été impliquée dans l'expression et le remodelage du collagène I (Rajshankar *et al.*, 2020). D'autres part, les intégrines sont régulées positivement chez des patients ou modèles murins atteints de fibrose hépatique, musculaire et rénale, et leur inhibition montre des effets anti-fibrotiques (Conroy, Kitto et Henderson, 2016; Hintermann et Christen, 2019; Wen *et al.*, 2022). Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'impact du complexe de l'adhésion focale sur le phénotype fibrotique du collagène IV et d'autres composants extracellulaires régulés à la hausse chez les mutants *mig-6*. Par exemple, une analyse des effets de la perte de fonction ou de la surexpression de composants du complexe de l'adhésion focale, tels que KIN-32 sur les structures fibrotiques serait pertinente. Cependant, il a été rapporté que la FAK pourrait favoriser l'hydrolyse du collagène IV en régulant l'expression de facteurs clefs tels que les MMP (Luo *et al.*, 2024). À l'inverse, il serait également intéressant de voir comment les molécules de la MEC, notamment

celles affectées dans les mutants *mig-6* telles que le collagène IV, la laminine, la fibuline et la peroxydasine, affecteraient l'état de la FAK (KIN-32), ou des autres composants du complexe de l'adhésion focale par déplétion ou surexpression de celles-ci.

De plus, certains composants du complexe d'adhésion focale, tels que la FAK et les intégrines, ont été impliqués dans la signalisation de la voie TGF- β (Wen *et al.*, 2022). L'activation du ligand TGF- β pourrait en effet être induite/déclenchée par les intégrines et la FAK (Distler *et al.*, 2019; Meng, Nikolic-Paterson et Lan, 2016; Wen *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2017). En conséquence, il serait important de tester si la perte de fonction des intégrines et des autres composants du complexe de l'adhésion focale affecte le rôle de la voie TGF- β dans la maintenance neuronale, notamment par le biais du remodelage de MEC.

Il est établi que des forces générées dans la cellule et dans son microenvironnement s'exercent sur le complexe de l'adhésion focales ce qui permet à la cellule de détecter les propriétés mécaniques de la MEC (Ringer *et al.*, 2017; Yang et Plotnikov, 2021). Une question pertinente à explorer est donc de savoir comment la composition et les propriétés biomécaniques de la MEC régulent la maintenance neuronale. Nos résultats de microscopie Brillouin indiquent que les tissus chez les mutants *mig-6* présentent une viscosité et une élasticité réduites par rapport au type sauvage. Ces changements dans les propriétés biomécaniques sont-ils liés au mécanisme par lequel MIG-6 agit dans la maintenance neuronale? Pour répondre à cette question, l'état biomécanique des tissus chez les mutants *mig-6* ainsi que les doubles *sax-7; mig-6* seront examinés après déplétion de composants clefs de la MEC remodelés chez les mutants *mig-6* et qui affectent la maintenance neuronale tels que le collagène IV, la peroxydasine et la laminine. Les propriétés biomécaniques chez le simple mutant *mig-6* et chez le double mutant *sax-7; mig-6* seront-elles altérées par la déplétion de ces composants qui affectent l'état de la MEC? Des mesures par microscopie Brillouin nous permettrait d'apporter des réponses à cette question.

Par ailleurs, il est établi que l'assemblage des adhésions focales est affecté par les propriétés mécaniques de l'environnement externe (Pelham Jr et Wang, 1997) (Burridge, 2017; Cao *et al.*, 2017). Dans le cadre de notre étude, il serait intéressant d'explorer si les changements de viscosité et d'élasticité suggérés par microscopie chez les mutants *mig-6* affectent l'assemblage et le désassemblage du complexe de l'adhésion focale. Cela pourrait être testé par manipulation de la MEC en ciblant des composants clés remodelés chez les mutants *mig-6*, comme nous l'avons suggéré précédemment. De plus, il pourrait être investigué si les propriétés biomécaniques des tissus des mutants *mig-6* sont responsables de l'inactivation de la voie TGF-

β , étant donné que les propriétés mécaniques de la MEC ont un grand impact sur l'activation et la disponibilité du ligand TGF- β (Hinz, 2015; Maeda *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2023).

4.5 Rôle de la papiline chez l'humain et dans le contexte de la fibrose

Dans ce présent travail, nous avons impliquée MIG-6/papiline dans la fibrose, y compris via la modulation de la voie TGF- β , une voie clé largement impliquée dans les différents types de fibrose. La fibrose est la formation d'une quantité anormalement abondante de tissu cicatriciel anormal à la suite de lésions, en particulier dans les maladies inflammatoires chroniques (Ye *et al.*, 2023; Pohlers *et al.*, 2009). Elle se caractérise par une augmentation de la production des composants de la MEC et peut entraîner de la fibrose et des dommages dans certains organes tels que le foie, le rein et les poumons (Ku, Raiten et Li, 2024; Pohlers *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2022a). L'incidence annuelle des maladies majeures liées à la fibrose est estimée à environ 4 968 cas pour 100 000 personnes chaque année, représentant une charge de morbidité importante et étant responsable d'environ 45 % des décès dans les pays industrialisés (Ye *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2022a). Ainsi, la fibrose est de plus en plus reconnue comme un problème de santé majeur.

Plusieurs stratégies thérapeutiques chez l'humain sont en développement ou en cours d'essais, centrées surtout sur la voie TGF- β , une cible importante dans la progression de la fibrose (Deng *et al.*, 2024; Pohlers *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2002). Ces approches incluent des traitements ciblant le ligand TGF- β , sa synthèse, sa liaison au récepteur, ou son activation, ainsi que des médicaments bloquant le récepteur TGF- β ou inhibant les effecteurs de la voie SMADs (Deng *et al.*, 2024; Pohlers *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2022a). Ainsi, la signalisation TGF- β représente une stratégie prometteuse pour le traitement de maladies liées à la fibrose (Deng *et al.*, 2024; Specia *et al.*, 2012; Yun, Kim et Kim, 2019).

Cependant, le rôle bifonctionnel du TGF- β , à la fois pro-fibrotique et anti-inflammatoire, exige une grande prudence lors de l'application de traitements ciblant cette voie (Frangogiannis, 2020; Kong *et al.*, 2018b; Pohlers *et al.*, 2009) en raison des effets physiologiques bénéfiques qu'une réaction fibrotique peut avoir dans certaines situations. En effet, la fibrose peut servir de réponse réparatrice ou protectrice pour maintenir la structure et prévenir des conséquences fonctionnelles indésirables, notamment dans les organes incapables de se régénérer, comme le cœur (Kong *et al.*, 2018; Frangogiannis, 2020). Dans le système nerveux, un tel remodelage de la MEC contribue également à la formation de cicatrices après des blessures et des événements traumatiques (Fehlberg et Lee, 2022; Ayazi *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2020;

Reinhard et al., 2017, 2021; Hesp et al., 2018; Goritz et al., 2011; Hawinkels et Ten Dijke, 2011). Du fait que la voie TGF- β est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires, son inhibition systémique globale et ou son inactivation prolongée pourrait entraîner des risques tels qu'une mauvaise cicatrisation, des défauts vasculaires ou le développement de tumeurs (Kong et al., 2018; Frangogiannis, 2020; Li et al., 2021; Kulkarni et al., 1993 ; Nomura et Li, 1998 Yun et al, 2019). Trouver un équilibre entre la limitation de l'évolution de la fibrose chez les patients tout en préservant ses effets bénéfiques constitue un véritable défi thérapeutique. De plus, en raison de l'interaction complexe de plusieurs voies de signalisation dans le processus de la fibrose, des schémas thérapeutiques multi-cibles pourraient être bénéfiques pour traiter la fibrose (Ye et al., 2022).

Dans le cadre de notre travail, nous avons démontré que la papiline régule positivement la voie TGF- β , et que la perte de fonction de la voie TGF- β semble potentiellement jouer un rôle pro-fibrotique *in vivo*. Bien qu'il reste encore beaucoup à découvrir et à comprendre, la papiline émerge comme un nouveau facteur impliqué dans cette voie, mettant en évidence l'importance de la MEC dans le contrôle de cette signalisation et la modulation de la fibrose. L'inhibition de la papiline, ainsi que des protéines qu'elle affecte, mérite donc d'être davantage explorées comme nouvelles cibles thérapeutiques. Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour le traitement de pathologies telles que la fibrose mais aussi des maladies dont l'origine est une dérégulation des composants MEC causant des pathologies telles que celles liées à la MEC et certains cancers. La mise en évidence du rôle modulateur de la papiline de la voie TGF- β par MIG-6/papiline pourrait ouvrir des portes à la recherche sur l'implication de la MEC dans cette voie et penser à de nouvelles cibles thérapeutiques parmi le matrisome. Cibler la synthèse, le remodelage et la dégradation de la MEC pourrait constituer un outil important pour le suivi de l'évolution du phénotype fibrotique au fil du temps (Golusda et al, 2021). L'utilisation d'approches comme la protéomique permettrait de détecter les empreintes de peptides résultants des protéines de la MEC régulées à la baisse ou à la hausse par la fibrose, et d'identifier d'éventuels fragments bioactifs autres que le collagène IV, et aider pour le diagnostic et au suivi de la progression de la maladie et à l'évaluation thérapeutique (Morten Karsdal et al 2025). De plus, la microscopie peut être utilisée pour analyser l'organisation de la MEC et ses altérations dans le cas de la fibrose et aider également à poser le diagnostic et suivre l'effet du traitement.

Il serait également pertinent de développer davantage *C. elegans* comme un modèle d'étude de la fibrose *in vivo*. Ce modèle permet d'ouvrir de nouvelles perspectives dans l'élucidation des mécanismes moléculaires sous-jacents à la fibrose et dans le développement de thérapies ciblées, en approfondissant

la compréhension des voies moléculaires impliquées dans la fibrose, en particulier celles qui ne sont pas encore bien caractérisées dans les autres modèles. En effet, à ce jour, peu d'études ont exploré l'utilisation de *C. elegans* comme modèle pour la fibrose, bien que quelques travaux aient suggéré son potentiel dans l'analyse de certaines voies biologiques associées à cette pathologie (He et al., 2012; Deng et al., 2021). D'ailleurs, l'utilisation de *C. elegans* serait particulièrement rentable et avantageuse, grâce à sa capacité à favoriser des approches à haut débit pour tester de nouvelles molécules thérapeutiques. Cependant, *C. elegans* présente certaines limites en tant que modèle de recherche, notamment en raison de son anatomie simple, qui est une force par ailleurs, mais qui limite certaines études de la fibrose dans des organes précis, par exemple, étant donnée l'absence de poumons, foie ou reins. Sa petite taille complique aussi certaines manipulations expérimentales. Cependant, le choix d'un modèle dépend des objectifs de recherche, chaque organisme a ses avantages et ses inconvénients (Ha et al., 2022), et *C. elegans* reste très attrayant pour les analyses génético-moléculaires efficaces et incisives *in vivo*.

CONCLUSION

Le maintien de l'organisation neuronale sur le long terme est essentiel au bon fonctionnement du système nerveux, dont l'architecture est mise à l'épreuve par des contraintes mécaniques, entre autres, tout au long de la vie. Des perturbations de cette stabilité structurelle peuvent entraîner des dysfonctionnements neuronaux impliqués associés à certaines pathologies.

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes régissant cette maintenance neuronale, le laboratoire a réalisé un crible génétique chez *C. elegans* qui nous a permis de mettre en évidence une nouvelle molécule impactant la maintenance neuronale. En effet, une mutation qui supprime les défauts de maintenance neuronale des mutants *sax-7/L1CAM* a été isolée, et ce travail de recherche a identifié la mutation comme étant dans le gène *mig-6/papiline*. L'objectif de cette thèse s'inscrit dans le but de comprendre le mécanisme moléculaire par lequel la protéine extracellulaire conservée MIG-6/papiline intervient dans la maintenance de l'architecture neuronale chez *C. elegans*.

Nos résultats montrent que *mig-6* agit de façon post-développementale et que l'isoforme courte MIG-6S fonctionne à partir des muscles pour maintenir l'architecture neuronale. MIG-6S coopère avec la métalloprotéinase extracellulaire MIG-17/ADAMTS pour moduler l'organisation du collagène IV, un composant majeur des MB. Chez les mutants *mig-6*, le collagène IV s'accumule de manière anormale, y compris sous forme de structures fibrotiques, modifiant les propriétés biomécaniques des tissus environnants. Nous avons démontré également que les niveaux de collagène IV ainsi que sa réticulation, catalysé par l'enzyme extracellulaire la peroxydasine, sont essentiels pour l'effet de stabilisation neuronale médiée par la mutation *mig-6*. Nous avons révélé également que le remodelage du collagène IV dans la MEC chez les mutants *mig-6* joue un rôle protecteur même chez le type sauvage en préservant les neurones du déplacement induit par un stress mécanique accru.

Afin d'explorer la régulation et l'origine de l'état fibrotique de la MEC observé chez les mutants *mig-6*, nous avons étudié la voie TGF- β , une voie de signalisation bien connue pour son implication dans la fibrose. Nous avons observé que l'inhibition de la signalisation TGF- β chez les mutants *mig-6* accentue l'accumulation des structures fibrotiques de collagène IV et renforce la suppression des défauts neuronaux de *sax-7*. À l'inverse, la surexpression de composants de cette voie contrecarre cette suppression. De plus, nous avons montré que MIG-6/papiline agit comme un modulateur positif de la voie TGF- β , ce qui suggère

que le rôle de MIG-6 dans le remodelage de la MEC implique cette voie de signalisation. De plus, nous avons trouvé que le rôle de MIG-6 impactant l'architecture neuronale implique également d'autres éléments de la MEC, tels que la laminine et la fibuline.

Ce travail met en lumière un nouveau mécanisme de la maintenance neuronale faisant intervenir la MEC et sa régulation par la protéine MIG-6/papiline. Pour la première fois, nous avons également mis en évidence l'implication de la voie TGF- β dans la maintenance de l'architecture neuronale, et ce de manière *mig-6*-dépendante. Ces données mettent en évidence l'implication fondamentale, mais encore largement méconnue, de la MEC dans la stabilité à long terme de l'architecture neuronale. De manière intéressante, et au regard de la conservation évolutive de composants majeurs de la MEC tels que le collagène IV, la laminine et la papiline, ainsi que de la voie de signalisation TGF- β , nos travaux apportent un éclairage nouveau sur les mécanismes fondamentaux régissant la préservation de l'organisation neuronale au sein du système nerveux tout au long de la vie. Des perspectives prometteuses pour l'étude des pathologies neurologiques liées au vieillissement, impliquant la MEC, ainsi que pour celle des maladies fibrotiques, se profilent.

ANNEXE A

Figures et tableaux supplémentaires pour chapitre 2

Fig. A 1 Forward F2 clonal genetic screen to identify novel neuronal maintenance factors by searching for modifiers of the defective head neuronal organization of <i>sax-7</i> mutants.....	177
Fig. A 2 <i>mig-6</i> mutants have normal body wall muscle structure.....	177
Fig. A 3 ColabFold 1.5.2-related information on MIG-6S.	178
Fig. A 4 Control assays using a recombinant transgene of <i>mig-6S</i> lacking the Kunitz domains in wild-type animals.....	178
Fig. A 5 The longer pharynx of <i>mig-17</i> mutants does not affect the position of ASH and ASI soma and of the nerve ring relative to body length.	180
Fig. A 6 Collagen IV levels increase with age in <i>mig-6</i> mutant animals.	180
Fig. A 7 Collagen IV stability in the basement membrane is not affected by <i>mig-6</i> loss of function.....	181
Fig. A 8 Refractive index measurements, as well as Brillouin shift, linewidth, and loss tangent quantifications, in wild-type and <i>mig-6</i> mutant animals.	183
Fig. A 9 <i>emb-9</i> (RNAi) treatment decreases collagen IV levels as expected, and <i>pxn-2</i> (RNAi) treatment does not significantly affect the penetrance of the fibrotic phenotype.....	183
Table. A 1 List of strains used.....	184
Table. A 2 Detailed information on transgenic strains used.	189
Table. A 3 List of primers used.	192

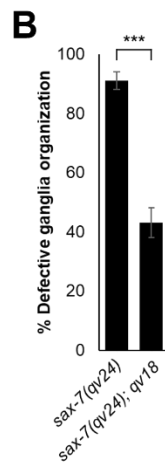
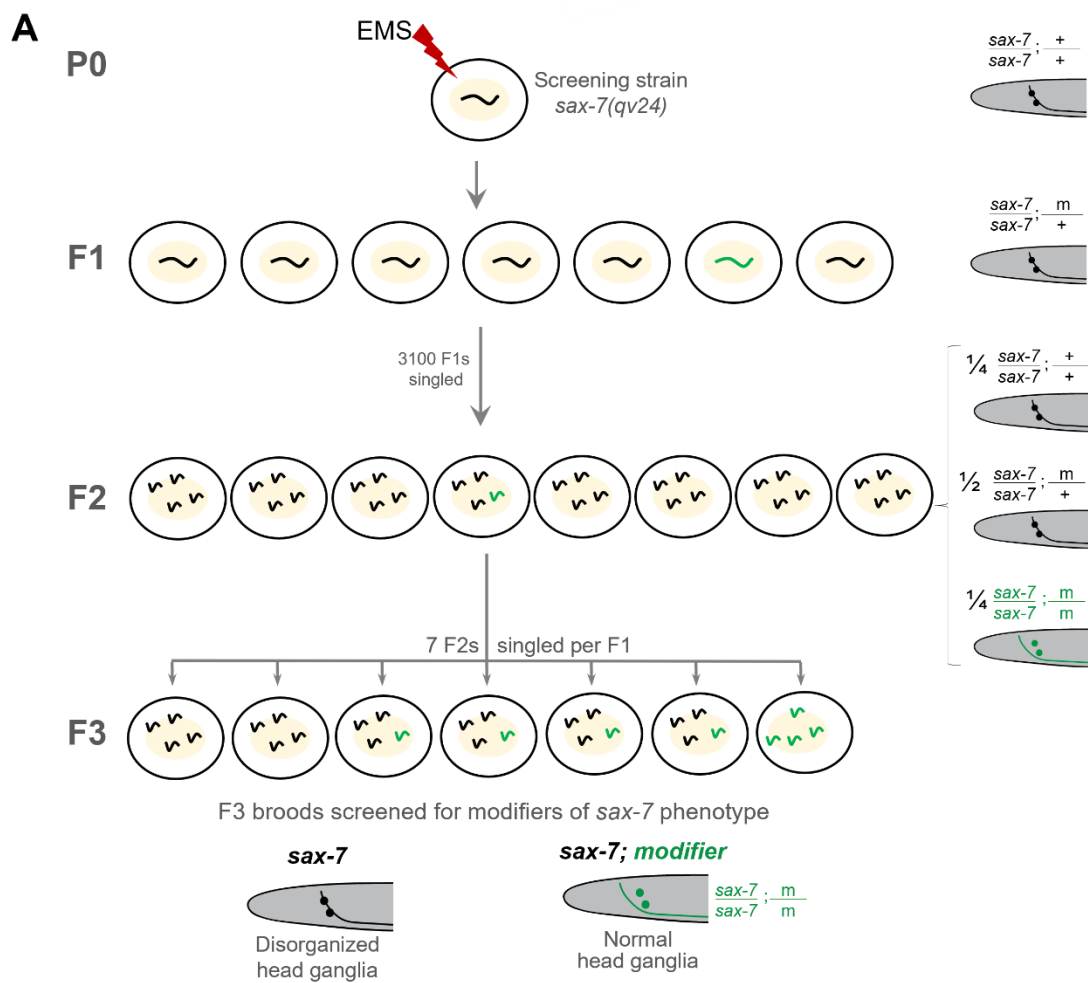


Fig. A 1 Forward F2 clonal genetic screen to identify novel neuronal maintenance factors by searching for modifiers of the defective head neuronal organization of *sax-7* mutants.

(A) Schematic of the forward genetic screen carried out to identify novel neuronal maintenance factors. P0 *sax-7(qv24)* L4 worms were mutagenized with ethyl methanesulfonate (EMS). 3 100 F1 progeny of the mutagenized P0s were picked singly onto new plates; rare animals containing a potential modifier mutation of the *sax-7* head neuronal disorganization phenotype would be heterozygous at this generation and visible only if the mutation were dominant and highly penetrant. Thus, for each F1, 7 F2s were picked singly onto new plates. If an F2 animal was heterozygous for a modifier mutation, then one quarter of its brood (F3) would be homozygous for the modifier mutation (represented in green). If an F2 animal was homozygous for a modifier mutation, its F3 brood would be homozygous for the modifier mutation. Broods of F3 adult animals were screened by fluorescence microscopy on a stereoscope to find those where a large proportion of animals displayed a modified head ganglia organization phenotype compared to non-mutagenized *sax-7(qv24)* adults. (B) Quantification of chemosensory neurons ASH and ASI disorganization in 2-day-old adults of *sax-7(qv24)* and double mutant animals *sax-7(qv24); qv18*, which were less defective compared to *sax-7* mutants, indicating that the newly isolated mutation *qv18* suppresses the neuronal defects of *sax-7* mutants. As a note, the molecular lesion present in allele *mig-6(qv33)* used in this report is identical to that of *qv18* as *qv33* was CRISPR-Cas9 generated to introduce the mutation *qv18* in a clean background. Error bars are the standard error of the proportion. Asterisks denote significant difference: *** $P \leq 0.001$ (z-test). Sample sizes and data in Supplementary Information.

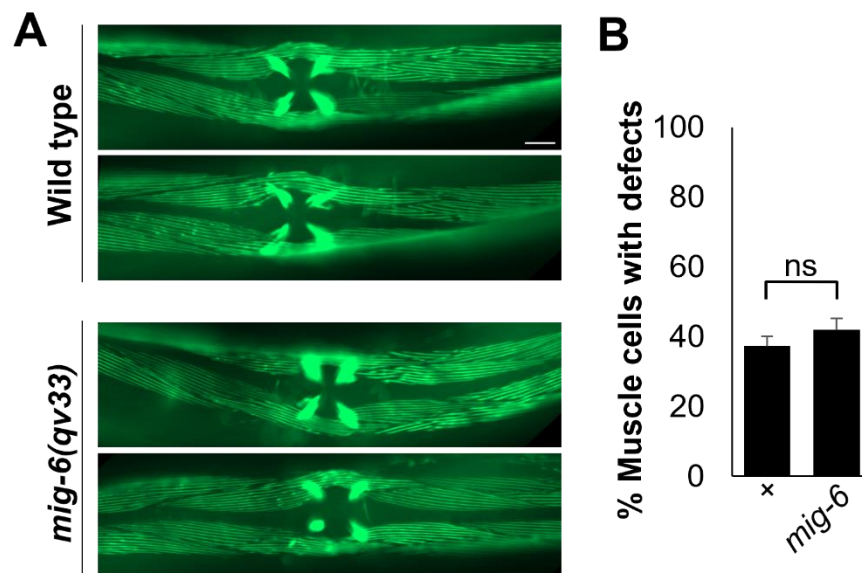


Fig. A 2 *mig-6* mutants have normal body wall muscle structure.

(A) Images of body wall muscles in the central region of the animal's body in wild-type and *mig-6(qv33)* mutant 1-day-old adults visualized with the *stEx30 Pmyo-3::GFP::MYO-3* reporter. Muscles of the vulva are also visible (center of images). (B) Quantification of body wall muscle phenotype (sarcomere organization) in wild type and *mig-6* mutants. Error bars are the standard error of the proportion. Sample sizes and data in Supplementary Information. "+" indicates wild-type strain; n.s., not significant (z-test). Scale bar, 20 μ m.

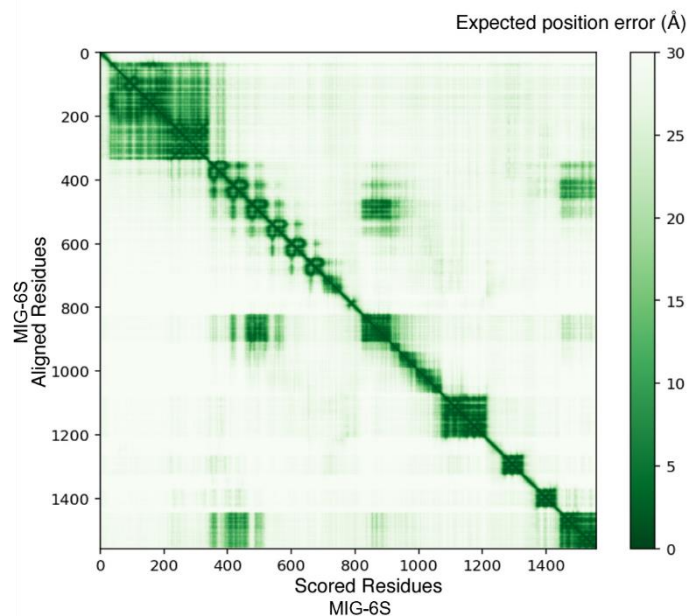


Fig. A 3 ColabFold 1.5.2-related information on MIG-6S.

Predicted aligned errors (PAE) corresponding to the predicted structure of MIG-6S shown on Fig. 1D". This PAE analysis shows regions of high confidence (dark green) and low confidence (pale green) in relative domain positioning.

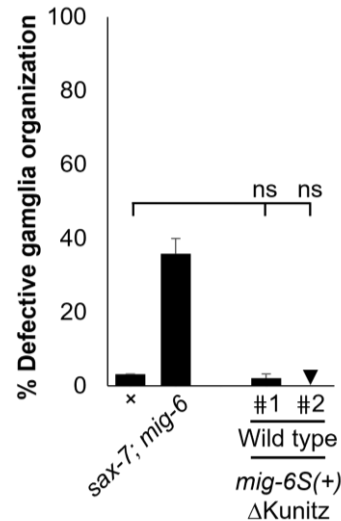


Fig. A 4 Control assays using a recombinant transgene of *mig-6S* lacking the Kunitz domains in wild-type animals.

Two independent transgenic lines overexpressing *mig-6S* lacking the Kunitz domains display normal neuronal organization, indicating that overexpression of this transgene does not lead to neuronal defects. Thus, the restoration of neuronal defects in *sax-7; mig-6* double mutants expressing this transgene (Fig. 2.3A) is the result of this transgene's rescuing activity. Error bars are the standard error of the proportion. Sample sizes and data in Supplementary Information. "+" indicates wild-type strain; n.s., not significant (z-test).

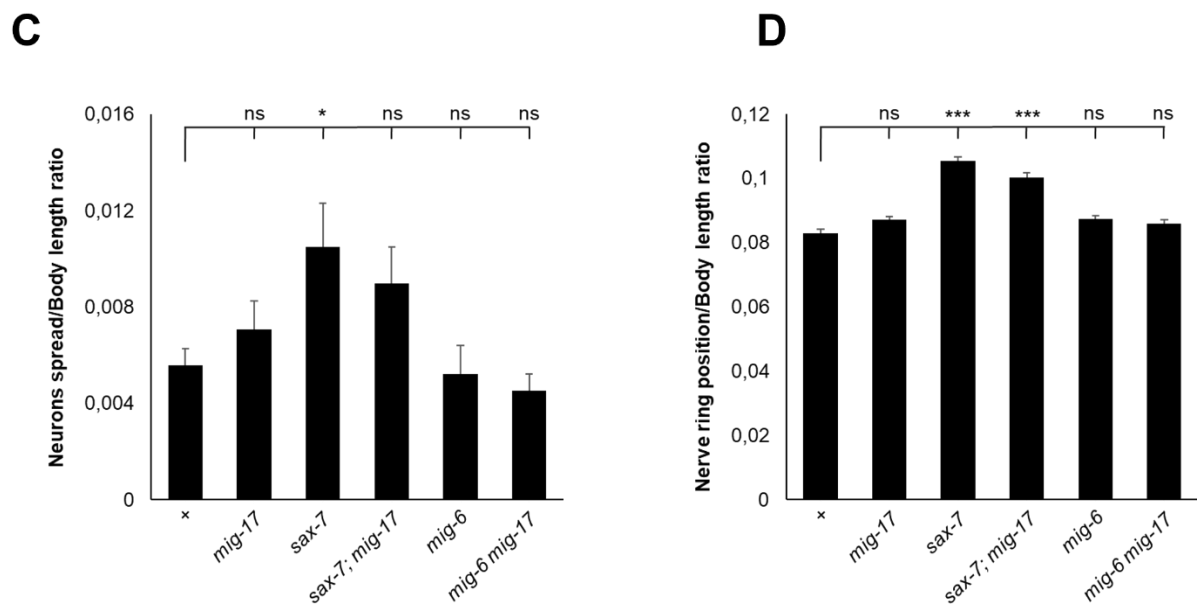
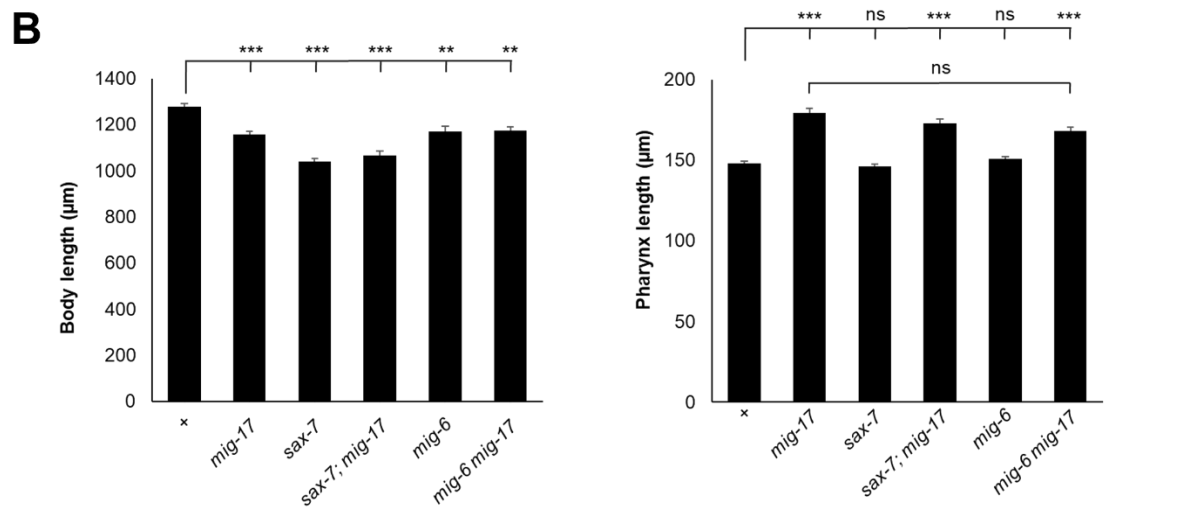
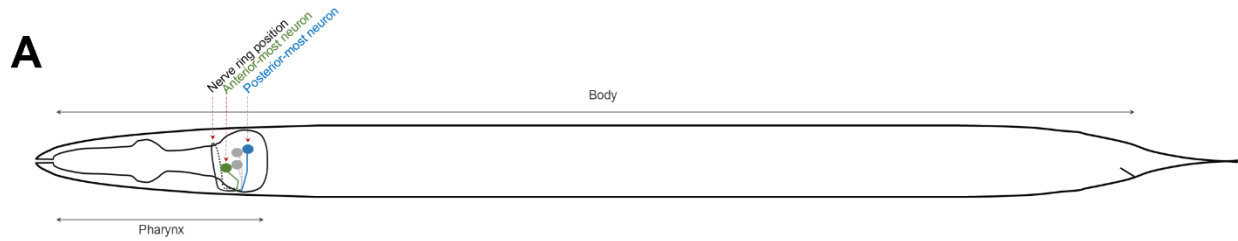


Fig. A 5 The longer pharynx of *mig-17* mutants does not affect the position of ASH and ASI soma and of the nerve ring relative to body length.

We measured the distribution of neuronal soma positions and the position of the nerve ring, and calculated ratios of neuronal position to body length. (A) Schematic diagram of *C. elegans* hermaphrodite with four chemosensory neurons ASI and ASH drawn, left and right for each pair (as would be visualized using reporter *hds26 Psra-6::DsRed2*). The most anterior soma of the four neurons, the most posterior soma of the four neurons, and the nerve ring are indicated. Body length was measured as the distance from the mouth opening to the anus, and pharynx length was measured as the distance between the mouth opening and the posterior edge of the terminal bulb. (B) Analysis of body and pharynx lengths of 2-day-old wild-type animals and mutants *mig-17*, *mig-6* and *sax-7*, as well as single or combined mutant animals of *mig-17* with *sax-7* or *mig-6* mutations. (C) Quantification of the ratio between the spread of neuronal positions (distance between the position of the anterior most neuron to the posterior most neuron in each animal) and the body length of 2-day-old animals. The higher the ratio, the more posterior the neuronal structures are. For example, because of head ganglia defects in *sax-7* mutants, the ratios appear higher in these mutants. (D) Quantification of the ratio between the nerve ring position and the body length in 2-day-old animals. The position of head neuronal structures, including soma and nerve ring, does not depend on pharynx length, being in a conserved position relative to body length. Thus, in *mig-17* mutants, despite their longer pharynx, there is no difference in neuronal position of their somas and nerve ring compared to the wild type. Error bars are the standard error of the mean. Asterisks denote significant difference: * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$ (Wilcoxon Mann-Whitney test for body length and ANOVA for pharynx length in B; ANOVA in C and D); P -values were corrected by multiplying by the number of comparisons, Bonferroni correction; sample sizes and data in Supplementary Information). "+" indicates wild-type strain; n.s., not significant.

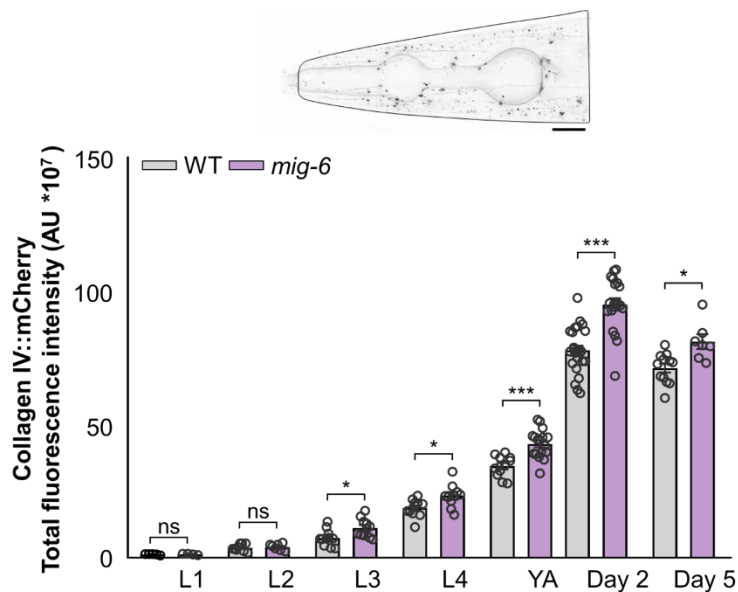
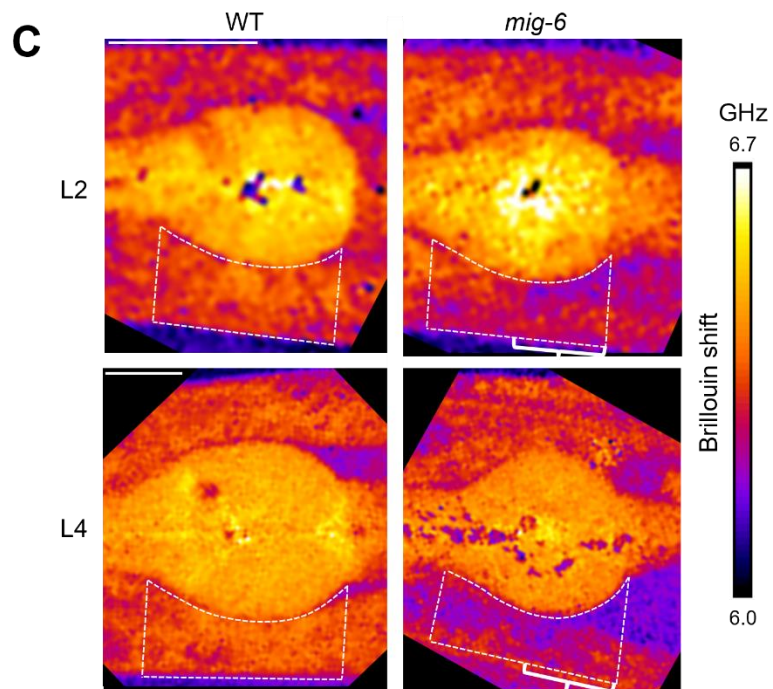
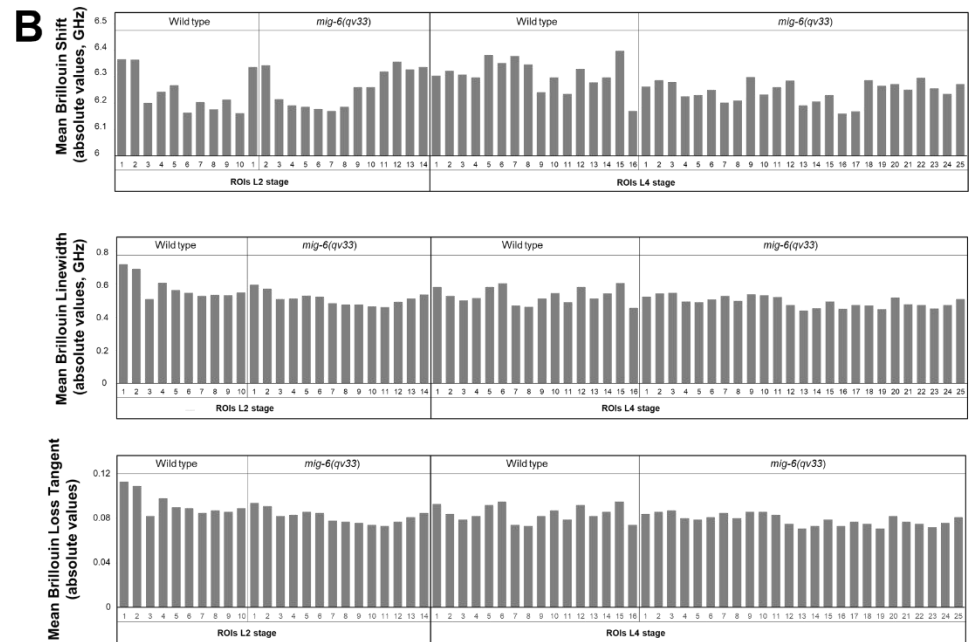
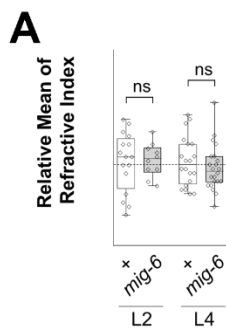


Fig. A 6 Collagen IV levels increase with age in *mig-6* mutant animals.

Quantification of fluorescence intensity of EMB-9::mCherry (*qyls46 Pemb-9::emb-9::mCherry*) in the head region at larval stages (L1, L2, L3, and L4), and adult ages (young adult, 2- and 5-day-old adult animals) in control animals and *mig-6(qv33)* mutants. ROI was drawn from the mouth opening to a position posterior to terminal bulb by 20% of the pharynx length. A.U., arbitrary units. Scale bar, 20 μ m. Error bars are the standard error of the mean. Asterisks denote significant difference: * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$ (Wilcoxon test to compare data of the first larval stage L1 between WT and *mig-6* mutants and t-test for the other stages); P -values were corrected by multiplying by the number of comparisons, Bonferroni correction; sample sizes and data in Supplementary Information). n.s., not significant.



Stage	Genotype	Total number of ROIs	% ROIs with lower shift in posterior zone
L2	Wild type	10	0
	<i>mig-6(qv33)</i>	14	28.6
L4	Wild type	16	18.8
	<i>mig-6(qv33)</i>	25	92.0

Fig. A 8 Refractive index measurements, as well as Brillouin shift, linewidth, and loss tangent quantifications, in wild-type and *mig-6* mutant animals.

(A) Absolute values of the refractive index of ROIs measured in wild-type and *mig-6* mutant animals are not significantly different. Error bars are the standard error of the mean; n.s., not significant (t-test); sample sizes and data in Supplementary Information). (B) Quantification of Brillouin shift, linewidth, and loss tangent in each ROI in wild-type and *mig-6* mutant animals at L2 and L4 stages. (C) The posterior zone of the head region around the pharynx (indicated by brackets) shows less elasticity in *mig-6* mutants. Brillouin shift images of wild-type and *mig-6* mutant animals at L2 and L4 stages; scale bar, 20 μ m. Table provides the quantification of the percentage of ROIs with a lower Brillouin shift in this posterior zone.

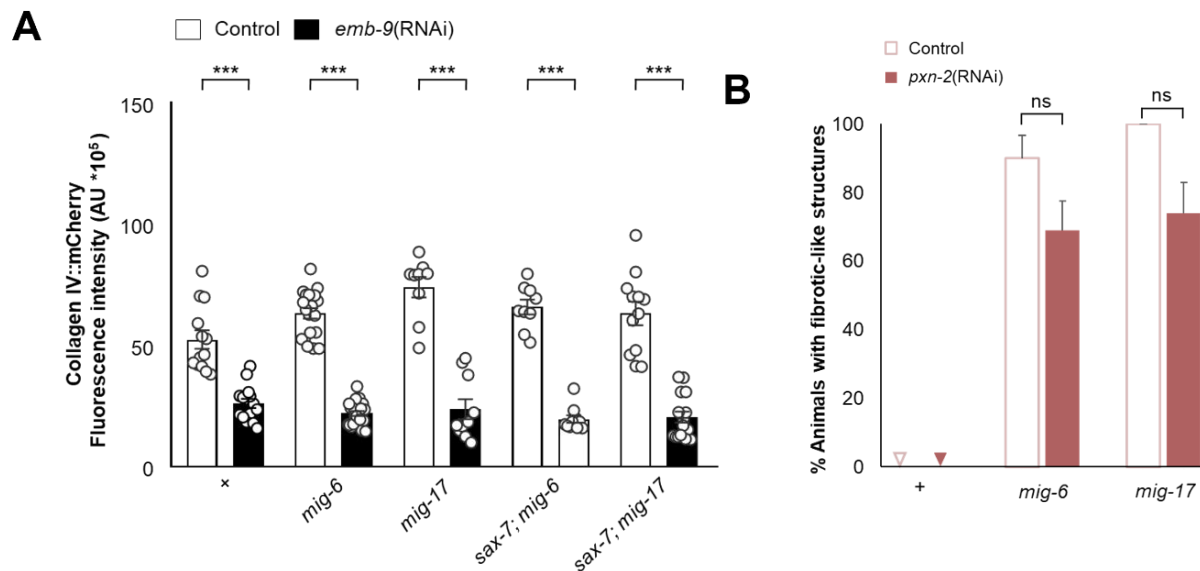


Fig. A 9 *emb-9*(RNAi) treatment decreases collagen IV levels as expected, and *pxn-2*(RNAi) treatment does not significantly affect the penetrance of the fibrotic phenotype.

(A) Quantification of fluorescence intensity of EMB-9::mCherry in the head region in 2-day-old adult animals, which were subjected to control (empty vector) or *emb-9*(RNAi), indicating efficient collagen IV depletion. A.U., arbitrary units. Error bars are the standard error of the mean. Asterisks denote significant difference: * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$ (Wilcoxon Mann-Whitney test); P -values were corrected by multiplying by the number of comparisons, Bonferroni correction; sample sizes and data in Supplementary Information). n.s., not significant. (B) Quantification of percentage of 2-day-old animals displaying fibrotic-like structures in adult animals, which were subjected to control (empty vector) or *pxn-2*(RNAi). *pxn-2* depletion does not significantly decrease the percentage of animals displaying fibrotic-like structures (however, the number and continuity of these fibrotic-like structures are profoundly affected by *pxn-2*(RNAi), see Fig. 2.16B, C, D). n.s., not significant (z-test).

Table. A 1 List of strains used.

Strain	Genotype	Transgene	Reference
N2			(Brenner, 1974)
VH648	<i>hdlIs26 III</i>	<i>Podr-2::cfp; Psra-6::DsRed2</i>	(Hutter, 2003)
VQ51	<i>oyIs14 V</i>	<i>Psra-6::gfp; lin-15(+)</i>	(Sarafi-Reinach et al., 2001), further outcrossed for this study
VQ1253	<i>evIs213</i>	<i>Pmig-17::mig-17::gfp; unc119(+)</i>	(Kawano et al., 2009)
NK364	<i>unc-119(ed3) III; qyIs46 X</i>	<i>Pemb-9::emb-9::mCherry; unc-119(+)</i>	(Ihara et al., 2011)
VQ1485	<i>qyIs161</i>	<i>Pemb-9::emb-9::Dendra + unc-119(+)</i>	(Ihara et al., 2011), further outcrossed for this study
NK2326	<i>emb-9(qy24[emb-9::mNG+loxP]) III</i>	<i>emb-9::mNG+loxP</i> knock in	(Keeley et al., 2020)
DE60	<i>dnIs13; him-5(e1490) V</i>	<i>Pgly-18::gfp; unc-119(+)</i>	(Levy-Strumpf et Culotti, 2014)
NK2565	<i>qy76 X</i>	<i>mNeonGreen::pxn-2</i>	(Bénard et al., 2009)
VQ2147	<i>stEx30</i>	<i>Pmyo-3::GFP::myo-3 + rol-6(su1006)]</i>	(Campagnola et al., 2002)
Neuronal phenotype characterization			
VQ307	<i>sax-7(qv24) IV; oyIs14 V</i>		This study
VQ373	<i>sax-7(qv24) IV; qv18 oyIs14 V</i>		This study
VQ1061	<i>sax-7(qv30) IV; hdlIs26 III</i>		This study
VQ1076	<i>mig-6(qv33) V; hdlIs26 III</i>		This study
VQ1077	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdlIs26 III</i>		This study
VQ1138	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdlIs26 III; qvEx336</i>	<i>Pmig-6::mig-6S</i>	This study
VQ1139	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdlIs26 III; qvEx337</i>	<i>Pmig-6::mig-6S</i>	This study
VQ1152	<i>mig-6(k177) V; hdlIs26 III</i>		This study
VQ1154	<i>mig-6(ev700) V; hdlIs26 III</i>		This study
VQ1074	<i>mig-6(ev701) V; hdlIs26 III</i>		This study

VQ1070	<i>mig-6(sa580) V; hdl26 III</i>		This study
VQ1130	<i>dpy-11(e224) oyls14 V</i>		This study
VQ1178	<i>mig-6(e1931)/dpy-11(e224) oyls14 V; hdl26 III</i>		This study
VQ1153	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(k177) V; hdl26 III</i>		This study
VQ1155	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(ev700) V; hdl26 III</i>		This study
VQ1075	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(ev701) V; hdl26 III</i>		This study
VQ1069	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(sa580) V; hdl26 III</i>		This study
VQ1213	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(e1931)/dpy-11(e224) oyls14 V; hdl26 III</i>		This study
OH8608	<i>zig-3(tm924) zig-4(gk34) X; hdl26 III</i>		(Bénard <i>et al.</i> , 2009)
VQ1195	<i>mig-6(qv33) V; zig-3(tm924) zig-4(gk34) X; hdl26 III</i>		This study
VQ1169	<i>dig-1(n1321) hdl26 III</i>		This study
VQ1231	<i>mig-6(qv33) V; dig-1(n1321) hdl26 III</i>		This study
VQ2379	<i>dig-1(ky188) hdl26 III</i>		This study
VQ2443	<i>dig-1(ky188) hdl26 III; mig-6(qv33)/dpy-11(e224) oyls14 V</i>		This study
VQ1251	<i>mig-17(k174) V; hdl26 III</i>		This study
VQ1256	<i>sax-7(qv30) IV; mig-17(k174); hdl26 III</i>		This study
VQ1309	<i>mig-6(qv33) mig-17(k174) V; hdl26 III</i>		This study
VQ1328	<i>sax-7(qv30); mig-6(qv33) mig-17(k174) V; hdl26 III</i>		This study
VQ1252	<i>mig-17(k174)/dpy-11(e224) oyls14 V; hdl26 III</i>		This study
VQ1717	<i>sax-7(qv30) IV; dpy-11(e224) oyls14/+ V; hdl26 III</i>		This study
VQ1190	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33)/dpy-11(e224) oyls14 V; hdl26 III</i>		This study
VQ1257	<i>sax-7(qv30) IV; mig-17(k174)/dpy-11(e224) oyls14 V; hdl26 III</i>		This study
VQ1687	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) mig-17(k174)/dpy-11(e224) oyls14 V; hdl26 III</i>		This study
VQ1235	<i>adt-2(wk156) X; hdl26 III</i>		This study
VQ1243	<i>sax-7(qv30) IV; adt-2(wk156) X; hdl26 III</i>		This study
VQ1177	<i>mig-6(qv33) V; adt-2(wk156) X; hdl26 III</i>		This study
VQ1244	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; adt-2(wk156) X; hdl26 III</i>		This study
VQ1436	<i>oyls14 V; qyls46 X</i>		This study
VQ2067	<i>sax-7(qv30); oyls14; qyls46</i>		This study
Rescue assays with <i>mig-6S</i> minigene			
VQ1138	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx336</i>	<i>Pmig-6::mig-6S</i>	This study
VQ1139	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx337</i>	<i>Pmig-6::mig-6S</i>	This study

Rescue assays with recombinant versions of MIG-6S			
VQ1927	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx608</i>	<i>Pmyo-3::mig-6SΔPapilin cassette/Lagrin repeats</i>	This study
VQ1928	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx609</i>	<i>Pmyo-3::mig-6SΔPapilin cassette/Lagrin repeats</i>	This study
VQ1936	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx610</i>	<i>Pmyo-3::mig-6SΔKunitz protease inhibitor domains</i>	This study
VQ1960	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx615</i>	<i>Pmyo-3::mig-6SΔKunitz protease inhibitor domains</i>	This study
Control strains for rescue assays with recombinant versions of MIG-6S			
VQ1961	<i>hdl26 III; qvEx616</i>	<i>Pmyo-3::mig-6SΔKunitz protease inhibitor domains</i>	This study
VQ1986	<i>hdl26 III; qvEx607</i>	<i>Pmyo-3::mig-6SΔKunitz protease inhibitor domains</i>	This study
Tissue-specific rescue assays			
VQ1656	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx520</i>	<i>Prgef-1::mig-6S</i>	This study
VQ1657	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx521</i>	<i>Prgef-1::mig-6S</i>	This study
VQ1347	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx522</i>	<i>Prgef-1::mig-6S</i>	This study
VQ1659	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx523</i>	<i>Prgef-1::mig-6S</i>	This study
VQ1661	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx525</i>	<i>Prgef-1::mig-6S</i>	This study
VQ1662	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx526</i>	<i>Prgef-1::mig-6S</i>	This study
VQ1348	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx375</i>	<i>Pdpy-7::mig-6S</i>	This study
VQ1663	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx527</i>	<i>Pdpy-7::mig-6S</i>	This study
VQ1664	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx528</i>	<i>Pdpy-7::mig-6S</i>	This study
VQ1378	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx394</i>	<i>Pdpy-7::mig-6S</i>	This study
VQ1674	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx538</i>	<i>Pdpy-7::mig-6S</i>	This study
VQ1675	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx539</i>	<i>Pdpy-7::mig-6S</i>	This study
VQ1346	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx373</i>	<i>Pmyo-3::mig-6S</i>	This study
VQ1940	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx611</i>	<i>Pmyo-3::mig-6S</i>	This study
VQ1669	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx533</i>	<i>Pmyo-3::mig-6S</i>	This study
VQ1344	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx372</i>	<i>Pmyo-3::mig-6S</i>	This study
VQ1380	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx396</i>	<i>Pmyo-3::mig-6S</i>	This study
VQ1396	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III;</i>	<i>Pmyo-3::mig-6S</i>	This study

	<i>qvEx405</i>		
VQ1536	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) mig-17(k174) V; hds26 III; qvEx396</i>	<i>Pmyo-3::mig-6S</i>	This study
VQ1537	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) mig-17(k174) V; hds26 III; qvEx405</i>	<i>Pmyo-3::mig-6S</i>	This study
Control strains for tissue-specific rescue assays			
VQ1389	<i>hds26 III; qvEx402</i>	<i>Prgef-1::mig-6S</i>	This study
VQ1670	<i>hds26 III; qvEx534</i>	<i>Prgef-1::mig-6S</i>	This study
VQ1383	<i>hds26 III; qvEx399</i>	<i>Prgef-1::mig-6S</i>	This study
VQ1671	<i>hds26 III; qvEx535</i>	<i>Prgef-1::mig-6S</i>	This study
VQ1672	<i>hds26 III; qvEx536</i>	<i>Prgef-1::mig-6S</i>	This study
VQ1673	<i>hds26 III; qvEx537</i>	<i>Prgef-1::mig-6S</i>	This study
VQ1676	<i>hds26 III; qvEx540</i>	<i>Pdpy-7::mig-6S</i>	This study
VQ1390	<i>hds26 III; qvEx403</i>	<i>Pdpy-7::mig-6S</i>	This study
VQ1391	<i>hds26 III; qvEx404</i>	<i>Pdpy-7::mig-6S</i>	This study
VQ1677	<i>hds26 III; qvEx541</i>	<i>Pdpy-7::mig-6S</i>	This study
VQ1678	<i>hds26 III; qvEx542</i>	<i>Pdpy-7::mig-6S</i>	This study
VQ1665	<i>hds26 III; qvEx529</i>	<i>Pmyo-3::mig-6S</i>	This study
VQ1666	<i>hds26 III; qvEx530</i>	<i>Pmyo-3::mig-6S</i>	This study
VQ1381	<i>hds26 III; qvEx397</i>	<i>Pmyo-3::mig-6S</i>	This study
VQ1667	<i>hds26 III; qvEx531</i>	<i>Pmyo-3::mig-6S</i>	This study
VQ1382	<i>hds26 III; qvEx398</i>	<i>Pmyo-3::mig-6S</i>	This study
VQ1668	<i>hds26 III; qvEx532</i>	<i>Pmyo-3::mig-6S</i>	This study
Collagen IV phenotype characterization			
VQ1176	<i>mig-6(qv33) V; qyls46 X</i>		This study
VQ1570	<i>mig-6(k177) V; qyls46 X</i>		This study
VQ1544	<i>mig-6(e1931)/dpy-11(e224) oyls14 V; qyls46 X</i>		This study
VQ1443	<i>mig-17(k174) V; qyls46 X</i>		This study
VQ1498	<i>mig-6(qv33) mig17(k174) V; qyls46 X</i>		This study
VQ1477	<i>mig-6(qv33)/dpy-11(e224) oyls14 V; qyls46 X</i>		This study
VQ1563	<i>mig-17(k174)/dpy-11(e224) oyls14 V; qyls46 X</i>		This study
VQ1481	<i>mig-6(qv33) mig-17(k174)/dpy-11 oyls14 V; qyls46 X</i>		This study
VQ1470	<i>evls213; qyls46 X</i>		This study
VQ1562	<i>mig-6(qv33) V; evls213; qyls46 X</i>		This study
VQ1202	<i>sax-7(qv30) IV; qyls46 X</i>		This study
VQ1215	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; qyls46 X</i>		This study
VQ1573	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(k177) V; qyls46 X</i>		This study
VQ1516	<i>sax-7(qv30) IV; mig-17(k174) V; qyls46 X</i>		This study
Rescue assays for collagen IV fibrotic phenotype			

VQ1428	<i>mig-6(qv33) V; qyls46 X; qvEx434</i>	<i>Pmig-6::mig-6S</i>	This study
MIG-17 expression pattern			
VQ1562	<i>mig-6(qv33) V; evls213 ; qyls46 X</i>		
PXN-2 expression pattern			
VQ1547	<i>mig-6(qv33) V; qy76 X</i>		This study
Body wall muscles and other mesodermal cells marker			
VQ1448	<i>qyls46 X; dnls13; him-5(e1490) V</i>		This study
VQ1463	<i>mig-6(qv33) V; qyls46; dnls13</i>		This study
Body wall muscles structure characterization			
VQ2301	<i>mig-6(qv33)V; stEx30</i>		This study

Table. A 2 Detailed information on transgenic strains used.

Strain	Genotype	Transgene	Reference
Rescue assay with <i>mig-6S</i> minigene			
VQ1138	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx336</i>	pCB202 [<i>Pmig-6::mig-6S</i>] at 5 ng/μL, <i>ttx-3::mcherry</i> , pBSK+. Line 1	This study
VQ1139	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx337</i>	pCB202 [<i>Pmig-6::mig-6S</i>] at 5 ng/μL, <i>ttx-3::mcherry</i> , pBSK+. Line 2	This study
Rescue assays with recombinant versions of MIG-6S			
VQ1927	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx608</i>	pCB483 [<i>Pmyo-3::mig-6SΔpapilin cassette/lagrin repeats</i>] 1 ng/μL, pHP6 [<i>Plgc-11::GFP</i>], pBSK+. Line #1	This study
VQ1928	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx609</i>	pCB483 [<i>Pmyo-3::mig-6SΔpapilin cassette/lagrin repeats</i>] 1 ng/μL, pHP6 [<i>Plgc-11::GFP</i>], pBSK+. Line #2	This study
VQ1936	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx610</i>	pCB492 [<i>Pmyo-3::mig-6SΔKunitz domains</i>] 1 ng/μL, pHP6 [<i>Plgc-11::GFP</i>], pBSK+. Line #1	This study
VQ1960	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx615</i>	pCB492 [<i>Pmyo-3::mig-6SΔKunitz domains</i>] 1 ng/μL, pHP6 [<i>Plgc-11::GFP</i>], pBSK+. Line #2	This study
Control strains for rescue assays with recombinant versions of MIG-6S			
VQ1961	<i>hdl26 III; qvEx616</i>	pCB492 [<i>Pmyo-3::mig-6SΔKunitz domains</i>] 1 ng/μL, pHP6 [<i>Plgc-11::GFP</i>], pBSK+. Line 1	This study
VQ1986	<i>hdl26 III; qvEx617</i>	pCB492 [<i>Pmyo-3::mig-6SΔKunitz domains</i>] 1 ng/μL, pHP6 [<i>Plgc-11::GFP</i>], pBSK+. Line 2	This study
Tissue-specific rescue assays			
VQ1656	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; dls26 III; qvEx520</i>	pCB408 [<i>Prgef-1::mig-6S</i>] at 7 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #1	This study
VQ1657	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; dls26 III; qvEx521</i>	pCB408 [<i>Prgef-1::mig-6S</i>] at 7 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #2	This study
VQ1347	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx522</i>	pCB408 [<i>Prgef-1::mig-6S</i>] at 7 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #3	This study
VQ1659	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx523</i>	pCB408 [<i>Prgef-1::mig-6S</i>] at 7 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #4	This study
VQ1661	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx525</i>	pCB408 [<i>Prgef-1::mig-6S</i>] at 7 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #5	This study
VQ1662	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl26 III; qvEx526</i>	pCB408 [<i>Prgef-1::mig-6S</i>] at 7 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #6	This study
VQ1348	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; dls26 III; qvEx375</i>	pCB409 [<i>Pdpy-7::mig-6S</i>] at 0.5 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #7	This study
VQ1663	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; dls26 III;</i>	pCB409 [<i>Pdpy-7::mig-6S</i>] at 0.5 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #8	This study

	<i>qvEx527</i>		
VQ1664	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; dls26 III; qvEx528</i>	pCB409 [<i>Pdpy-7::mig-6S</i>] at 0.5 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #9	This study
VQ1378	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; dls26 III; qvEx394</i>	pCB409 [<i>Pdpy-7::mig-6S</i>] at 0.5 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #10	This study
VQ1674	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; dls26 III; qqvEx538</i>	pCB409 [<i>Pdpy-7::mig-6S</i>] at 0.1 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #11	This study
VQ1675	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; dls26 III; qqvEx539</i>	pCB409 [<i>Pdpy-7::mig-6S</i>] at 0.1 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #12	This study
VQ1346	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; dls26 III; qvEx373</i>	pCB416 [<i>Pmyo-3::mig-6S</i>] at 1 ng/μL, <i>Pceh-22::GFP</i> , pBSK+. Line #13	This study
VQ1940	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hds26 III; qvEx611</i>	pCB416 [<i>Pmyo-3::mig-6S</i>] at 1 ng/μL, <i>Pceh-22::GFP</i> , pBSK+. Line #14	This study
VQ1669	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hds26 III; qvEx533</i>	pCB416 [<i>Pmyo-3::mig-6S</i>] at 1 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #15	This study
VQ1344	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hds26 III; qvEx372</i>	pCB416 [<i>Pmyo-3::mig-6S</i>] at 1 ng/μL, <i>Pceh-22::GFP</i> , pBSK+. Line #16	This study
VQ1380	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; dls26 III; qvEx396</i>	pCB416 [<i>Pmyo-3::mig-6S</i>] at 1 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #17	This study
VQ1396	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; dls26 III; qvEx405</i>	CB416 [<i>Pmyo-3::mig-6S</i>] at 1 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #18	This study
Dependency of <i>mig-6S</i> rescue on <i>mig-17</i> function			
VQ1536	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) mig-17(k174) V; hds26 III; qvEx396</i>	pCB416 [<i>Pmyo-3::mig-6S</i>] at 1 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #17	This study
VQ1537	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) mig-17(k174) V; hds26 III; qvEx405</i>	pCB416 [<i>Pmyo-3::mig-6S</i>] at 1 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #18	This study
Control strains for tissue-specific rescue assays			
VQ1389	<i>hds26 III; qvEx402</i>	pCB408 [<i>Prgef-1::mig-6S</i>] at 7 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #1	This study
VQ1670	<i>hds26 III; qvEx534</i>	pCB408 [<i>Prgef-1::mig-6S</i>] at 7 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> pBSK+. Line #2	This study
VQ1383	<i>hds26 III; qvEx399</i>	pCB408 [<i>Prgef-1::mig-6S</i>] at 7 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #3	This study
VQ1671	<i>hds26 III; qvEx535</i>	pCB408 [<i>Prgef-1::mig-6S</i>] at 7 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #4	This study
VQ1672	<i>hds26 III; qvEx536</i>	pCB408 [<i>Prgef-1::mig-6S</i>] at 7 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #5	This study
VQ1673	<i>hds26 III; qvEx537</i>	pCB408 [<i>Prgef-1::mig-6S</i>] at 7 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #6	This study
VQ1676	<i>hds26 III; qvEx540</i>	pCB409 [<i>Pdpy-7::mig-6S</i>] at 0.1 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line # 1	This study
VQ1390	<i>hds26 III; qvEx403</i>	pCB409 [<i>Pdpy-7::mig-6S</i>] at 0.1 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #2	This study
VQ1391	<i>hds26 III; qvEx404</i>	pCB409 [<i>Pdpy-7::mig-6S</i>] at 0.1 ng/μL, <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #3	This study

VQ1677	<i>hdls26 III; qvEx541</i>	pCB409 [<i>Pdpy-7::mig-6S</i>] at 0.1 ng/ μ L, This study <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #4
VQ1678	<i>hdls26 III; qvEx542</i>	pCB409 [<i>Pdpy-7::mig-6S</i>] at 0.1 ng/ μ L, This study <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #5
VQ1665	<i>hdls26 III; qvEx529</i>	pCB416 [<i>Pmyo-3::mig-6S</i>] at 1 ng/ μ L, This study <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #1
VQ1666	<i>hdls26 III; qvEx530</i>	pCB416 [<i>Pmyo-3::mig-6S</i>] at 1 ng/ μ L, This study <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #2
VQ1381	<i>hdls26 III; qvEx397</i>	pCB416 [<i>Pmyo-3::mig-6S</i>] at 1 ng/ μ L, This study <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #3
VQ1667	<i>hdls26 III; qvEx531</i>	pCB416 [<i>Pmyo-3::mig-6S</i>] at 1 ng/ μ L, This study <i>Plgc-11::GFP rfp</i> , pBSK+. Line #4
VQ1382	<i>hdls26 III; qvEx398</i>	pCB416 [<i>Pmyo-3::mig-6S</i>] at 1 ng/ μ L, This study <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #5
VQ1668	<i>hdls26 III; qvEx532</i>	pCB416 [<i>Pmyo-3::mig-6S</i>] at 1 ng/ μ L, This study <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line #6
Rescue assays of collagen IV fibrotic phenotype		
VQ1428	<i>mig-6(qv33) V; qyls46 X; qvEx434</i>	pZH125.3 [<i>Pmig-6::mig-6S</i>] at 5 ng/ μ L This study <i>Plgc-11::GFP</i> , pBSK+. Line 1

Table. A 3 List of primers used.

Gene	Primer	Sequence	PCR product (bp)
sax-7(qv30)			
Mutant specific	oCB747	tctctcaaaattcttcgcaagc	336
	oCB1025	cgggaagaaatgaacagga	
Wild-type specific	oCB1022	tggtggtagcgatggtgtag	609
	oCB1023	agttcgatgttctcggctgt	
mig-6(qv33)			
	oCB2241	ctccaaggaagagcctatcc	586
	oCB2242	cgagcagttagagcatccg	
<i>Bam</i> HI digestion			
Mutant specific			586
Wild-type specific			203 and 383
mig-6(k177) sequencing			
	oCB1602	acacggacacaagactcgtcg	501
	OCB1603	ttggcaacatcagcttcaagg	
mig-6(ev700) sequencing			
	oCB1574	gttgagtgtgccaccattgc	357
	oCBQc21	gaaggatgatcgctcacatcc	
mig-6(ev701) sequencing			
	oCB1574	gttgagtgtgccaccattgc	357
	oCBQc21	gaaggatgatcgctcacatcc	
mig-6(sa580) sequencing			
	oCB1571	cgaagaccgaattcggatgc	547
	oCB1572	gcacgagtctttccgtctgg	
adt-2(ok595) sequencing			
	OCB1388	ttaccagacaaccggtaggg	554
	OCB1389	tgatgacatgatatgcttgg	
zig-3(tm924) sequencing			
Mutant specific	oCBQc39	aaaaatgctgctcatctgcatatctgtcc	544
	oCBQc40	Ttaagcaatatgtttttggtggg	
Wild-type specific	oCBQc40	gggtcctacagtcgagtcagg	413
	oCBQc38	ccactggattttccggatgagaa	
zig-4(gk34) sequencing			
Mutant specific	oCBQc43	ggcccgttcaggagtacaacgacaacacag	924
	oCBQc42	Cgcggttggttaaaggaatgtttcttggcg	
Wild-type specific	oCBQc41	atgtgatataatgtccactcctgctgtacc	596
	oCBQc42	cgcggttggttaaaggaatgtttcttggcg	
zig-5(ok1065)			
Mutant specific	oTB34	aatgctagcggtagcatgtttcgtcctatccg	721
	oTB52	gcatgttcccgttatcgattttggcg	
Wild-type specific	oTB34	aatgctagcggtagcatgtttcgtcctatccg	469

	oCB120	ctcgaaataggtacatgtcaacc	
<i>zig-8(ok561)</i>			
Mutant specific	oCB210	aataagatcgctaaccgttataag	335
	oCB209	gcaagagcgataataggtagg	
Wild-type specific	oCB201	gtgtaggctaggaaatcgggtggg	316
	oCB209	gcaagagcgataataggtagg	

ANNEXE B

Tableaux supplémentaires pour chapitre 3

Table. B 1 List of strains used.	195
Table. B 2 List of primers used.	197

Table. B 1 List of strains used.

Strain	Genotype	Transgene	Reference
N2			(Brenner, 1974)
VH648	<i>hdlIs26 III</i>	<i>Podr-2::cfp; Psra-6::DsRed2</i>	(Hutter, 2003)
VQ1742	<i>qyls9 II</i>	Integration of <i>dzEx1622 [Pmig-6::mNeonGreen::mig-6S]</i> . <i>dzEx1622</i> described in (Ramirez-Suarez <i>et al.</i> , 2019)	This study
NK245	<i>qyls7 X</i>	<i>lam-1::gfp</i>	(Hagedorn <i>et al.</i> , 2009)
NK364	<i>unc-119(ed3) III; qyls46 X</i>	<i>Pemb-9::emb-9::mCherry; unc-119(+)</i>	(Ihara <i>et al.</i> , 2011)
NK2565	<i>pxn-2(qy76) X</i>	<i>mNeonGreen::pxn-2 N-term</i>	(Keeley <i>et al.</i> , 2020)
NK2579	<i>fbl-1(qy62) IV</i>	<i>mNG+loxP::fbl-1</i>	(Keeley <i>et al.</i> , 2020)
BW1940	<i>ctIs40 X</i>	<i>dbl-1(+)</i> + <i>Psur-5::GFP</i>	(Suzuki <i>et al.</i> , 1999)
TLG182	<i>texIs100 IV</i>	<i>Pdbl-1::dbl-1:gfp ; Pttx-3::rfp</i>	(Schultz <i>et al.</i> , 2014)
NU3	<i>dbl-1(nk3) V</i>		(Morita, Chow et Ueno, 1999)
LT186	<i>sma-6(wk7) II</i>		(Krishna, Maduzia et Padgett, 1999)
RJP1553	<i>sma-6(wk7) II; zdIs13 IV; yxEx615</i> [<i>Psma-6::sma-6; Punc-yxEx615</i>]		(Baltaci <i>et al.</i> , 2022; Zhang et Zhang, 2012)
CS152	<i>sma-3(wk30) III; qcls6</i> [<i>GFP::SMA-3 + rol-6(d)</i>]		(Wang, Tokarz et Savage-Dunn, 2002)
Neuronal phenotype characterization			
VQ1061	<i>sax-7(qv30) IV; hdlIs26 III</i>		(Nadour <i>et al.</i> , 2025)
VQ1076	<i>mig-6(qv33) V; hdlIs26 III</i>		(Nadour <i>et al.</i> , 2025)
VQ1077	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdlIs26 III</i>		(Nadour <i>et al.</i> , 2025)
VQ1828	<i>sma-6(wk7) II; hdlIs26 III</i>		This study
VQ1852	<i>sma-6(wk7) II; mig-6(qv33) V; hdlIs26 III</i>		This study
VQ1866	<i>sma-6(wk7) II; sax-7(qv30) IV; hdlIs26 III</i>		This study
VQ1905	<i>sma-6(wk7) II; sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdlIs26 III</i>		This study
VQ1932	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdlIs26 III; ctIs40 X</i>		This study
VQ1933	<i>sax-7(qv30) IV; hdlIs26 III; ctIs40 X</i>		This study

VQ1934	<i>mig-6(qv33) V; hdl526 III; ctls40 X</i>		This study
VQ1935	<i>hdl526 III; ctls40 X</i>		This study
Tissue-specific rescue assays			
VQ2024	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl526 III; qvEx632</i>	<i>Pelt-3::sma-6::gfp</i>	This study
VQ2096	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl526 III; qvEx667</i>	<i>Pelt-3::sma-6::gfp</i>	This study
VQ2097	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl526 III; qvEx668</i>	<i>Pelt-3::sma-6::gfp</i>	This study
VQ2044	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl526 III; qvEx641</i>	<i>Prab-3::sma-6</i>	This study
VQ2045	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl526 III; qvEx642</i>	<i>Prab-3::sma-6</i>	This study
VQ2046	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl526 III; qvEx643</i>	<i>Prab-3::sma-6</i>	This study
VQ2075	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl526 III; qvEx653</i>	<i>Pmyo-3::sma-6</i>	This study
VQ2076	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl526 III; qvEx654</i>	<i>Pmyo-3::sma-6</i>	This study
VQ2077	<i>sax-7(qv30) IV; mig-6(qv33) V; hdl526 III; qvEx655</i>	<i>Pmyo-3::sma-6</i>	This study
Control strains for tissue-specific rescue assays			
VQ2071	<i>hdl526 III; qvEx650</i>	<i>Pelt-3::sma-6::gfp</i>	This study
VQ2073	<i>hdl526 III; qvEx652</i>	<i>Pelt-3::sma-6::gfp</i>	This study
EMB-9/Collagen IV expression pattern			
VQ1776	<i>mig-6(qv33) V; emb-9(qy24) III</i>		(Nadour <i>et al.</i> , 2025)
VQ1843	<i>sma-6(wk7) II; emb-9(qy24) III</i>		This study
VQ1176	<i>mig-6(qv33) V; qyls46 X</i>		(Nadour <i>et al.</i> , 2025)
VQ1795	<i>sma-6(wk7) II; qyls46 X</i>		This study
VQ1839	<i>sma-6(wk7) II; mig-6(qv33) V; qyls46 X</i>		This study
VQ1997	<i>qyls46 X; yxEx615</i>	<i>Psma-6::sma-6</i>	This study
PXN-2/Peroxidasin expression pattern			
VQ1547	<i>mig-6(qv33) V; pxn-2(qy76) X</i>		(Nadour <i>et al.</i> , 2025)
VQ1938	<i>sma-6(wk7) II; pxn-2(qy76) X</i>		This study
VQ1946	<i>sma-6(wk7) II; mig-6(qv33) V; pxn-2(qy76) X</i>		This study
VQ2034	<i>pxn-2(qy76) X; yxEx615</i>	<i>Psma-6::sma-6</i>	This study
VQ2035	<i>mig-6(qv33) V; pxn-2(qy76) X; yxEx615</i>	<i>Psma-6::sma-6</i>	This study
FBL-1/Fibulin expression pattern			
VQ1837	<i>mig-6(qv33) V; fbl-1(qy62) IV</i>		This study

VQ1904	<i>sma-6(wk7) II; fbl-1(qy62) IV</i>		This study
VQ1906	<i>sma-6(wk7) II; mig-6(qv33) V; fbl-1(qy62) IV</i>		This study
VQ2113	<i>fbl-1(qy62) IV; yxEx615</i>	<i>Psma-6::sma-6</i>	This study
LAM-1/Laminin expression pattern			
VQ1175	<i>mig-6(qv33) V; qyls7 X</i>		This study
VQ1876	<i>sma-6(wk7) II; qyls7 X</i>		This study
VQ1880	<i>sma-6(wk7) II; mig-6(qv33) V; qyls7 X</i>		This study
VQ2152	<i>qyls7 X; yxEx615</i>	<i>Psma-6::sma-6</i>	This study
MIG-6S/Papilin expression pattern			
VQ1998	<i>dbl-1(nk3) V; qvls9 II</i>		This study
VQ2013	<i>qvls9 II; yxEx615</i>	<i>Psma-6::sma-6</i>	This study
DBL-1 expression pattern			
VQ1971	<i>mig-6(qv33) V; texls100 IV</i>		This study
GFP::SMA-3			
VQ1996	<i>qcls6</i>		This study
VQ2017	<i>mig-6(qv33) V; qcls6</i>		This study

Table. B 2 List of primers used.

Gene	Primer	Sequence	PCR product (bp)	Note
<i>sax-7(qv30)</i>				
Mutant specific	oCB747	TCTCTCAAAATTCTTCGCAAGC	336	
	oCB1025	CGGGAAGAAATGAAACAGGA		
Wild-type specific	oCB212	GAAATACACACAAATACGAGTGC	592	
	oCB723	TAGTTGATTAAAATGTTTCAAGATTG		
<i>mig-6(qv33)</i>				
	oCB2241	CTCCCAAGGAAGAGCCTATCC	586	BamHI digestion: Mutant, band 586 bp WT, two bands at 203 and 383 bp
	oCB2242	CGAGCAGTTAGAGCATCCG		

BIBLIOGRAPHIE

- Abd El-Meguid M, Dawood RM, Mokhles MA et El Awady MK (2018) Extrahepatic upregulation of transforming growth factor beta 2 in HCV genotype 4-induced liver fibrosis. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 38: 341-347.
- Ackley BD, Kang SH, Crew JR, Suh C, Jin Y et Kramer JM (2003) The basement membrane components nidogen and type XVIII collagen regulate organization of neuromuscular junctions in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience* 23: 3577-3587.
- Akella JS, Wloga D, Kim J, Starostina NG, Lyons-Abbott S, Morrisette NS, Dougan ST, Kipreos ET et Gaertig J (2010) MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature* 467: 218-222.
- Al-Shaer A, Lyons A, Ishikawa Y, Hudson BG, Boudko SP et Forde NR (2021) Sequence-dependent mechanics of collagen reflect its structural and functional organization. *Biophysical Journal* 120: 4013-4028.
- Alberts B, Heald R, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K et Walter P (2022) Molecular Biology of the Cell: Seventh International Student Edition with Registration Card. -.
- Albrecht DR et Bargmann CI (2011) High-content behavioral analysis of *Caenorhabditis elegans* in precise spatiotemporal chemical environments. *Nature Methods* 8: 599-605.
- Altun Z, Herndon L, Wolkow C, Crocker C, Lints R et Hall D (2024) WormAtlas. 2002–2024. -.
- Ambade AS, Hassoun PM et Damico RL (2021) Basement membrane extracellular matrix proteins in pulmonary vascular and right ventricular remodeling in pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 65: 245-258.
- Amran A, Pigatto L, Pocock R et Gopal S (2021) Functions of the extracellular matrix in development: lessons from *Caenorhabditis elegans*. *Cellular Signalling* 84: 110006.
- Anazco C, Lopez-Jimenez AJ, Rafi M, Vega-Montoto L, Zhang MZ, Hudson BG et Vanacore RM (2016) Lysyl Oxidase-like-2 Cross-links Collagen IV of Glomerular Basement Membrane. *Journal of Biological Chemistry* 291: 25999-26012.
- Apte SS (2009) A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 284: 31493-31497.

Apte SS et Parks WC (2015) Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biology* 44: 1-6.

Arikawa-Hirasawa E, Le AH, Nishino I, Nonaka I, Ho NC, Francomano CA, Govindraj P, Hassell JR, Devaney JM, Spranger J, et al. (2002) Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *American Journal of Human Genetics* 70: 1368-1375.

Arndt S, Wacker E, Dorn C, Koch A, Saugspier M, Thasler WE, Hartmann A, Bosserhoff AK et Hellerbrand C (2015) Enhanced expression of BMP6 inhibits hepatic fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 64: 973-981.

Arneaud SL, McClendon J, Tatge L, Watterson A, Zuurbier KR, Madhu B, Gumienny TL et Douglas PM (2022) Reduced bone morphogenic protein signaling along the gut–neuron axis by heat shock factor promotes longevity. *Aging Cell* 21: e13693.

Arribere JA, Bell RT, Fu BX, Artiles KL, Hartman PS et Fire AZ (2014) Efficient marker-free recovery of custom genetic modifications with CRISPR/Cas9 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 198: 837-846.

Auer S, Schicht M, Hoffmann L, Budday S, Frischknecht R, Blumcke I et Paulsen F (2025) The role of perineuronal nets in physiology and disease: insights from recent studies. *Cells* 14: 321.

Aumailley M, Wiedemann H, Mann K et Timpl R (1989) Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *European Journal of Biochemistry* 184: 241-248.

Aurelio O, Boulin T et Hobert O (2003) Identification of spatial and temporal cues that regulate postembryonic expression of axon maintenance factors in the *C. elegans* ventral nerve cord. *Development* 130: 599-610.

Aurelio O, Hall DH et Hobert O (2002) Immunoglobulin-domain proteins required for maintenance of ventral nerve cord organization. *Science* 295: 686-690.

Bacaj T et Shaham S (2007) Temporal control of cell-specific transgene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 176: 2651-2655.

Baker KD, Gray AR et Richardson R (2017) The development of perineuronal nets around parvalbumin gabaergic neurons in the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala of rats. *Behavioral Neuroscience* 131: 289-303.

- Baldwin AK, Simpson A, Steer R, Cain SA et Kielty CM (2013) Elastic fibres in health and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 15: e8.
- Balemans W et Van Hul W (2002) Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Developmental Biology* 250: 231-250.
- Balmer TS, Carels VM, Frisch JL et Nick TA (2009) Modulation of perineuronal nets and parvalbumin with developmental song learning. *Journal of Neuroscience* 29: 12878-12885.
- Balogh GT, Illes J, Szekely Z, Forrai E et Gere A (2003) Effect of different metal ions on the oxidative damage and antioxidant capacity of hyaluronic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 410: 76-82.
- Baltaci O, Pedersen ME, Sherry T, Handley A, Snieckute G, Cao W, Haas M, Archer S et Pocock R (2022) Atypical TGF- β signaling controls neuronal guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Iscience* 25: 103791.
- Bandzerewicz A et Gadomska-Gajadur A (2022) Into the Tissues: Extracellular Matrix and Its Artificial Substitutes: Cell Signalling Mechanisms. *Cells* 11: 914.
- Bargmann CI (1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 282: 2028-2033.
- Barth JL, Argraves KM, Roark EF, Little CD et Argraves WS (1998) Identification of chicken and *C. elegans* fibulin-1 homologs and characterization of the *C. elegans* fibulin-1 gene. *Matrix Biology* 17: 635-646.
- Baum PD et Garriga G (1997) Neuronal migrations and axon fasciculation are disrupted in *ina-1* integrin mutants. *Neuron* 19: 51-62.
- Beanan MJ et Strome S (1992) Characterization of a germ-line proliferation mutation in *C. elegans*. *Development* 116: 755-766.
- Bedolla A, Wegman E, Weed M, Stevens MK, Ware K, Paranjpe A, Alkhimovitch A, Ifergan I, Taranov A, Peter JD, et al. (2024) Adult microglial TGF β 1 is required for microglia homeostasis via an autocrine mechanism to maintain cognitive function in mice. *Nature Communications* 15: 5306.
- Belle M, Godefroy D, Couly G, Malone SA, Collier F, Giacobini P et Chedotal A (2017) Tridimensional Visualization and Analysis of Early Human Development. *Cell* 169: 161-173 e112.
- Bénard C et Hobert O (2009) Looking beyond development: maintaining nervous system architecture. *Current Topics in Developmental Biology* 87: 175-194.

- Bénard C, Tjoe N, Boulin T, Recio J et Hobert O (2009) The small, secreted immunoglobulin protein ZIG-3 maintains axon position in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 183: 917-927.
- Bénard CY, Blanchette C, Recio J et Hobert O (2012) The secreted immunoglobulin domain proteins ZIG-5 and ZIG-8 cooperate with L1CAM/SAX-7 to maintain nervous system integrity. *PLOS Genetics* 8: e1002819.
- Bénard CY, Boyanov A, Hall DH et Hobert O (2006) DIG-1, a novel giant protein, non-autonomously mediates maintenance of nervous system architecture. *Development* 133: 3329-3340.
- Benarroch EE (2015) Extracellular matrix in the CNS: dynamic structure and clinical correlations. *Neurology* 85: 1417-1427.
- Bera K, Kiepas A, Godet I, Li Y, Mehta P, Ifemembi B, Paul CD, Sen A, Serra SA et Stoletov K (2022) Extracellular fluid viscosity enhances cell migration and cancer dissemination. *Nature* 611: 365-373.
- Beramendi A, Peron S, Casanova G, Reggiani C et Cantera R (2007) Neuromuscular junction in abdominal muscles of *Drosophila melanogaster* during adulthood and aging. *Journal of Comparative Neurology* 501: 498-508.
- Berri S, Boyle JH, Tassieri M, Hope IA et Cohen N (2009) Forward locomotion of the nematode *C. elegans* is achieved through modulation of a single gait. *HFSP Journal* 3: 186-193.
- Bevilacqua C, Gomez JM, Fiuza U-M, Chan CJ, Wang L, Hambura S, Eguren M, Ellenberg J, Diz-Muñoz A et Leptin M (2023) High-resolution line-scan Brillouin microscopy for live imaging of mechanical properties during embryo development. *Nature Methods* 20: 755-760.
- Bevilacqua C, Sánchez-Iranzo H, Richter D, Diz-Muñoz A et Prevedel R (2019) Imaging mechanical properties of sub-micron ECM in live zebrafish using Brillouin microscopy. *Biomedical Optics Express* 10: 1420-1431.
- Bhave G, Colon S et Ferrell N (2017) The sulfilimine cross-link of collagen IV contributes to kidney tubular basement membrane stiffness. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 313: F596-F602.
- Bhave G, Cummings CF, Vanacore RM, Kumagai-Cresse C, Ero-Tolliver IA, Rafi M, Kang J-S, Pedchenko V, Fessler LI et Fessler JH (2012) Peroxidase forms sulfilimine chemical bonds using hypohalous acids in tissue genesis. *Nature Chemical Biology* 8: 784-790.

- Biernacka A, Dobaczewski M et Frangogiannis NG (2011) TGF-beta signaling in fibrosis. *Growth Factors* 29: 196-202.
- Bitanhirwe BK et Woo T-UW (2014) Perineuronal nets and schizophrenia: the importance of neuronal coatings. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 45: 85-99.
- Blanchette CR, Perrat PN, Thackeray A et Benard CY (2015) Glypican Is a Modulator of Netrin-Mediated Axon Guidance. *PLOS Biology* 13: e1002183.
- Blelloch R et Kimble J (1999) Control of organ shape by a secreted metalloprotease in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 399: 586-590.
- Blelloch R, Santa Anna-Arriola S, Gao D, Li Y, Hodgkin J et Kimble J (1999) The *gon-1* gene is required for gonadal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 216: 382-393.
- Bonnans C, Chou J et Werb Z (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15: 786-801.
- Bonnefoy A et Legrand C (2000) Proteolysis of subendothelial adhesive glycoproteins (fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor) by plasmin, leukocyte cathepsin G, and elastase. *Thrombosis Research* 98: 323-332.
- Booth AJ, Hadley R, Cornett AM, Dreffs AA, Matthes SA, Tsui JL, Weiss K, Horowitz JC, Fiore VF et Barker TH (2012) Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for *in vitro* investigation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 186: 866-876.
- Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD et Ruoslahti E (1992) Natural inhibitor of transforming growth factor- β protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 360: 361-364.
- Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB et Ruoslahti E (1990) Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature* 346: 371-374.
- Borgen MA, Giles AC, Wang D et Grill B (2019) Synapse maintenance is impacted by ATAT-2 tubulin acetyltransferase activity and the RPM-1 signaling hub. *Elife* 8: e44040.
- Bornstein P (2009) Matricellular proteins: an overview. *Journal of Cell Communication and Signaling* 3: 163-165.

- Bornstein P et Sage EH (2002) Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current Opinion in Cell Biology* 14: 608-616.
- Bosiacki M, Gąsowska-Dobrowolska M, Kojder K, Fabiańska M, Jeżewski D, Gutowska I et Lubkowska A (2019) Perineuronal nets and their role in synaptic homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 4108.
- Boulin T, Etchberger JF et Hobert O (2006) Reporter gene fusions. Dans *WormBook: The Online Review of C elegans Biology*
- Bowman R, Balukoff N, Clemons A, Koury E, Ford T, Baxi K, Egydio de Carvalho C et Smolikove S (2020) Akirin Is Required for Muscle Function and Acts Through the TGF-beta Sma/Mab Signaling Pathway in *Caenorhabditis elegans* Development. *Genes, Genomes, Genetics* 10: 387-400.
- Brandenburg C et Blatt GJ (2022) Region-specific alterations of perineuronal net expression in postmortem autism brain tissue. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 15: 838918.
- Brauer K, Werner L et Leibnitz L (1982) Perineuronal nets of glia. *Journal für Hirnforschung* 23: 701-708.
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94.
- Brown KL, Cummings CF, Vanacore RM et Hudson BG (2017) Building collagen IV smart scaffolds on the outside of cells. *Protein Science* 26: 2151-2161.
- Bruckner G, Brauer K, Hartig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard N, Oertel WH et Reichenbach A (1993) Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia* 8: 183-200.
- Bruckner G et Grosche J (2001) Perineuronal nets show intrinsic patterns of extracellular matrix differentiation in organotypic slice cultures. *Experimental Brain Research* 137: 83-93.
- Bruckner G, Grosche J, Schmidt S, Hartig W, Margolis RU, Delpech B, Seidenbecher CI, Czaniera R et Schachner M (2000) Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *Journal of Comparative Neurology* 428: 616-629.
- Brümmendorf T, Kenwrick S et Rathjen FG (1998) Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Current Opinion in Neurobiology* 8: 87-97.
- Brümmendorf T et Rathjen FG (1996) Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Current Opinion in Neurobiology* 6: 584-593.

- 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 RD et Boor P (2019) Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. *J Histochem Cytochem* 67: 643-661.
- Bülow RD et Boor P (2019) Extracellular matrix in kidney fibrosis: more than just a scaffold. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 67: 643-661.
- Burrige K (2017) Focal adhesions: a personal perspective on a half century of progress. *FEBS Journal* 284: 3355-3361.
- Cabungcal JH, Steullet P, Morishita H, Kraftsik R, Cuenod M, Hensch TK et Do KQ (2013) Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 9130-9135.
- Caceres R, Bojanala N, Kelley LC, Dreier J, Manzi J, Di Federico F, Chi Q, Risler T, Testa I, Sherwood DR et Plastino J (2018) Forces drive basement membrane invasion in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115: 11537-11542.
- Calahorra F et Izquierdo PG (2018) The presynaptic machinery at the synapse of *C. elegans*. *Invertebrate Neuroscience* 18: 4.
- Camp GV, Vits L, Coucke P, Lyonnet S, Schrandt-Stumpel C, Darby J, Holden J, Munnich A et Willems PJ (1993) A duplication in the L1CAM gene associated with X-linked hydrocephalus. *Nature Genetics* 4: 421-425.
- Campagnola PJ, Millard AC, Terasaki M, Hoppe PE, Malone CJ et Mohler WA (2002) Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophysical Journal* 82: 493-508.
- Campbell A, Fessler L, Salo T et Fessler J (1987) Papilin: a *Drosophila* proteoglycan-like sulfated glycoprotein from basement membranes. *Journal of Biological Chemistry* 262: 17605-17612.
- Candiello J, Balasubramani M, Schreiber EM, Cole GJ, Mayer U, Halfter W et Lin H (2007) Biomechanical properties of native basement membranes. *The FEBS Journal* 274: 2897-2908.
- Cantini M, Donnelly H, Dalby MJ et Salmeron - Sanchez M (2020) The plot thickens: the emerging role of matrix viscosity in cell mechanotransduction. *Advanced Healthcare Materials* 9: 1901259.

- Cao J, Packer JS, Ramani V, Cusanovich DA, Huynh C, Daza R, Qiu X, Lee C, Furlan SN et Steemers FJ (2017) Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science* 357: 661-667.
- Carceller H, Guirado R, Ripolles-Campos E, Teruel-Marti V et Nacher J (2020) Perineuronal Nets Regulate the Inhibitory Perisomatic Input onto Parvalbumin Interneurons and gamma Activity in the Prefrontal Cortex. *Journal of Neuroscience* 40: 5008-5018.
- Carulli D, Broersen R, de Winter F, Muir EM, Meskovic M, de Waal M, de Vries S, Boele HJ, Canto CB, De Zeeuw CI et Verhaagen J (2020) Cerebellar plasticity and associative memories are controlled by perineuronal nets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117: 6855-6865.
- Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JC, Putignano E, Poli A, Forostyak S, Andrews MR, Deepa SS, Glant TT et Fawcett JW (2010) Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* 133: 2331-2347.
- Cassada RC et Russell RL (1975) The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 46: 326-342.
- Cassandras M, Wang C, Kathiriya J, Tsukui T, Matatia P, Matthay M, Wolters P, Molofsky A, Sheppard D, Chapman H et Peng T (2020) Gli1(+) mesenchymal stromal cells form a pathological niche to promote airway progenitor metaplasia in the fibrotic lung. *Nature cell biology* 22: 1295-1306.
- Cawston TE et Young DA (2010) Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown. *Cell Tissue Res* 339: 221-235.
- Cebul ER, McLachlan IG et Heiman MG (2020) Dendrites with specialized glial attachments develop by retrograde extension using SAX-7 and GRDN-1. *Development* 147: dev180448.
- Celio MR, Spreafico R, De Biasi S et Vitellaro-Zuccarello L (1998) Perineuronal nets: past and present. *Trends in Neurosciences* 21: 510-515.
- 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 CJ, Bevilacqua C et Prevedel R (2021) Mechanical mapping of mammalian follicle development using Brillouin microscopy. *Communications Biology* 4: 1133.

- Chang Z, Kishimoto Y, Hasan A et Welham NV (2014) TGF-beta3 modulates the inflammatory environment and reduces scar formation following vocal fold mucosal injury in rats. *Disease Models & Mechanisms* 7: 83-91.
- Chastney MR, Conway JRW et Ivaska J (2021) Integrin adhesion complexes. *Current Biology* 31: R536-R542.
- Chaudhuri O, Cooper-White J, Janmey PA, Mooney DJ et Shenoy VB (2020) Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature* 584: 535-546.
- Chen C-H, Chen Y-C, Jiang H-C, Chen C-K et Pan C-L (2013) Neuronal aging: learning from *C. elegans*. *Journal of Molecular Signaling* 8: 1-10.
- Chen C-H, Hsu H-W, Chang Y-H et Pan C-L (2019) Adhesive L1CAM-robo signaling aligns growth cone F-actin dynamics to promote axon-dendrite fasciculation in *C. elegans*. *Developmental cell* 48: 215-228. e215.
- Chen L, Ong B et Bennett V (2001) LAD-1, the *Caenorhabditis elegans* L1CAM homologue, participates in embryonic and gonadal morphogenesis and is a substrate for fibroblast growth factor receptor pathway-dependent phosphotyrosine-based signaling. *Journal of Cell Biology* 154: 841-856.
- Chen L et Zhou S (2010) "CRASH" ing with the worm: insights into L1CAM functions and mechanisms. *Developmental dynamics: An official publication of the American Association of Anatomists* 239: 1490-1501.
- Cheng Z, Yi P, Wang X, Chai Y, Feng G, Yang Y, Liang X, Zhu Z, Li W et Ou G (2013) Conditional targeted genome editing using somatically expressed TALENs in *C. elegans*. *Nature Biotechnology* 31: 934-937.
- Cherra III SJ, Goncharov A, Boassa D, Ellisman M et Jin Y (2020) *C. elegans* MAGU-2/Mpp5 homolog regulates epidermal phagocytosis and synapse density. *Journal of Neurogenetics* 34: 298-306.
- Cherra SJ et Jin Y (2016) A two-immunoglobulin-domain transmembrane protein mediates an epidermal-neuronal interaction to maintain synapse density. *Neuron* 89: 325-336.
- Chia ZJ, Cao YN, Little PJ et Kamato D (2024) Transforming growth factor-beta receptors: versatile mechanisms of ligand activation. *Acta Pharmacologica Sinica* 45: 1337-1348.
- Cho U, Zimmerman SM, Chen L-c, Owen E, Kim JV, Kim SK et Wandless TJ (2013) Rapid and tunable control of protein stability in *Caenorhabditis elegans* using a small molecule. *PLOS ONE* 8: e72393.

- Chong MK, Cebul ER, Mizeracka K et Heiman MG (2021) Loss of the Extracellular Matrix Protein DIG-1 Causes Glial Fragmentation, Dendrite Breakage, and Dendrite Extension Defects. *Journal of developmental biology* 9: 42.
- Chung YH, Huang YH, Chu TH, Chen CL, Lin PR, Huang SC, Wu DC, Huang CC, Hu TH, Kao YH et Tai MH (2018) BMP-2 restoration aids in recovery from liver fibrosis by attenuating TGF-beta1 signaling. *Laboratory Investigation* 98: 999-1013.
- Clay MR et Sherwood DR (2015) Basement Membranes in the Worm: A Dynamic Scaffolding that Instructs Cellular Behaviors and Shapes Tissues. *Current Topics in Membranes* 76: 337-371.
- Clayton SW, Ban GI, Liu C et Serra R (2020) Canonical and noncanonical TGF- β signaling regulate fibrous tissue differentiation in the axial skeleton. *Scientific Reports* 10: 21364.
- Clément R, Dehapiot B, Collinet C, Lecuit T et Lenne P-F (2017) Viscoelastic dissipation stabilizes cell shape changes during tissue morphogenesis. *Current Biology* 27: 3132-3142. e3134.
- Clevers H, Loh KM et Nusse R (2014) An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* 346: 1248012.
- Coakley S, Ritchie FK, Galbraith KM et Hilliard MA (2020) Epidermal control of axonal attachment via β -spectrin and the GTPase-activating protein TBC-10 prevents axonal degeneration. *Nature Communications* 11: 133.
- Cocciolone AJ, Hawes JZ, Staiculescu MC, Johnson EO, Murshed M et Wagenseil JE (2018) Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 315: H189-H205.
- Cohen N, Taylor J, Scott L, Guillery R, Soriano P et Furley A (1998) Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Current Biology* 8: 26-33.
- Cohn JA, Cebul ER, Valperga G, Brose L, de Bono M, Heiman MG et Pierce JT (2020) Long-term activity drives dendritic branch elaboration of a *C. elegans* sensory neuron. *Developmental Biology* 461: 66-74.
- Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Lympny PA, du Bois RM, Jeffery PK et McAnulty RJ (1997) Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. *American Journal of Pathology* 150: 981-991.

- Coker ZN, Troyanova-Wood M, Steelman ZA, Ibey BL, Bixler JN, Scully MO et Yakovlev VV (2024) Brillouin microscopy monitors rapid responses in subcellular compartments. *PhotonIX* 5: 9.
- Colon S, Luan H, Liu Y, Meyer C, Gewin L et Bhawe G (2019) Peroxidase and eosinophil peroxidase, but not myeloperoxidase, contribute to renal fibrosis in the murine unilateral ureteral obstruction model. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 316: F360-F371.
- Conrad C, Gray KM, Stroka KM, Rizvi I et Scarcelli G (2019) Mechanical characterization of 3D ovarian cancer nodules using Brillouin confocal microscopy. *Cellular and Molecular Bioengineering* 12: 215-226.
- Conroy KP, Kitto LJ et Henderson NC (2016) α v integrins: key regulators of tissue fibrosis. *Cell and Tissue Research* 365: 511-519.
- Consortium* CeS (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2018.
- Cook SJ, Kalinski CA et Hobert O (2023) Neuronal contact predicts connectivity in the *C. elegans* brain. *Current Biology* 33: 2315-2320. e2312.
- Coraggio F, Bhushan M, Roumeliotis S, Caroti F, Bevilacqua C, Prevedel R et Rapti G (2024) Age-progressive interplay of HSP-proteostasis, ECM-cell junctions and biomechanics ensures *C. elegans* astroglial architecture. *Nature Communications* 15: 2861.
- Corey KE, Pitts R, Lai M, Loureiro J, Masia R, Osganian SA, Gustafson JL, Hutter MM, Gee DW et Meireles OR (2022) ADAMTSL2 protein and a soluble biomarker signature identify at-risk non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis in adults with NAFLD. *Journal of Hepatology* 76: 25-33.
- Corsi AK, Wightman B et Chalfie M (2015) A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 200: 387-407.
- Cowan RL, Wilson CJ, Emson PC et Heizmann CW (1990) Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. *Journal of Comparative Neurology* 302: 197-205.
- Cox TR et Erler JT (2011) Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease Models & Mechanisms* 4: 165-178.
- Cram EJ, Fontanez KM et Schwarzbauer JE (2008) Functional characterization of KIN - 32, the *Caenorhabditis elegans* homolog of focal adhesion kinase. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 237: 837-846.

- Crest J, Diz-Munoz A, Chen D-Y, Fletcher DA et Bilder D (2017) Organ sculpting by patterned extracellular matrix stiffness. *Elife* 6: e24958.
- Cummings CF, Pedchenko V, Brown KL, Colon S, Rafi M, Jones-Paris C, Pokydeslava E, Liu M, Pastor-Pareja JC et Stothers C (2016) Extracellular chloride signals collagen IV network assembly during basement membrane formation. *Journal of Cell Biology* 213: 479-494.
- Cutroneo KR, White SL, Phan SH et Ehrlich HP (2007) Therapies for bleomycin induced lung fibrosis through regulation of TGF-beta1 induced collagen gene expression. *Journal of Cellular Physiology* 211: 585-589.
- Dansie LE et Ethell IM (2011) Casting a net on dendritic spines: the extracellular matrix and its receptors. *Developmental Neurobiology* 71: 956-981.
- De Luca C et Papa M (2017) Matrix metalloproteinases, neural extracellular matrix, and central nervous system pathology. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 148: 167-202.
- de Lucas MP, Jimenez M, Sanchez-Pavon P, Saez AG et Lozano E (2021) SMA-10 Is a non-canonical member of the TGF-beta Sma/Mab pathway and immunity regulator via the DAF-2 insulin receptor in *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 638.
- Deepa SS, Carulli D, Galtrey C, Rhodes K, Fukuda J, Mikami T, Sugahara K et Fawcett JW (2006) Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* 281: 17789-17800.
- DeGroot MS, Shi H, Eastman A, McKillop AN et Liu J (2019) The *Caenorhabditis elegans* SMOC-1 protein acts cell nonautonomously to promote bone morphogenetic protein signaling. *Genetics* 211: 683-702.
- Dendooven A, van Oostrom O, van der Giezen DM, Leeuwis JW, Snijckers C, Joles JA, Robertson EJ, Verhaar MC, Nguyen TQ et Goldschmeding R (2011) Loss of endogenous bone morphogenetic protein-6 aggravates renal fibrosis. *American Journal of Pathology* 178: 1069-1079.
- Deng Z, Fan T, Xiao C, Tian H, Zheng Y, Li C et He J (2024) TGF- β signaling in health, disease and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 9: 61.
- Desai SS, Tung JC, Zhou VX, Grenert JP, Malato Y, Rezvani M, Español - Suárez R, Willenbring H, Weaver VM et Chang TT (2016) Physiological ranges of matrix rigidity modulate primary mouse hepatocyte function in part through hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Hepatology* 64: 261-275.

- Desbois M, Cook SJ, Emmons SW et Bülow HE (2015) Directional trans-synaptic labeling of specific neuronal connections in live animals. *Genetics* 200: 697-705.
- Desse VE, Blanchette CR, Nadour M, Perrat P, Rivollet L, Khandekar A et Benard CY (2021) Neuronal postdevelopmentally acting SAX-75/L1CAM can function as cleaved fragments to maintain neuronal architecture in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 218: iyab086.
- Di Donato V, De Santis F, Albadri S, Auer TO, Duroure K, Charpentier M, Concordet JP, Gebhardt C et Del Bene F (2018) An Attractive Reelin Gradient Establishes Synaptic Lamination in the Vertebrate Visual System. *Neuron* 97: 1049-1062 e1046.
- Diaz-Balzac CA, Lazaro-Pena MI, Ramos-Ortiz GA et Bulow HE (2015) The Adhesion Molecule KAL-1/anosmin-1 Regulates Neurite Branching through a SAX-7/L1CAM-EGL-15/FGFR Receptor Complex. *Cell Reports* 11: 1377-1384.
- Dickinson DJ, Ward JD, Reiner DJ et Goldstein B (2013) Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nature Methods* 10: 1028-1034.
- Ding X, Zhu XL, Xu DH, Li S, Yang Q, Feng X, Wei YG, Li H, Yang L, Zhang YJ, et al. (2023) NPM promotes hepatotoxin-induced fibrosis by inhibiting ROS-induced apoptosis of hepatic stellate cells and upregulating IncMIAT-induced TGF-beta2. *Cell Death & Disease* 14: 575.
- Distler JH, Györfi A-H, Ramanujam M, Whitfield ML, Königshoff M et Lafyatis R (2019) Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nature Reviews Rheumatology* 15: 705-730.
- Dituri F, Cossu C, Mancarella S et Giannelli G (2019) The interactivity between TGFbeta and BMP signaling in organogenesis, fibrosis, and cancer. *Cells* 8: 1130.
- Dityatev A, Bruckner G, Dityateva G, Grosche J, Kleene R et Schachner M (2007) Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev Neurobiol* 67: 570-588.
- Dityatev A et Rusakov DA (2011) Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr Opin Neurobiol* 21: 353-359.
- Doitsidou M, Jarriault S et Poole RJ (2016) Next-generation sequencing-based approaches for mutation mapping and identification in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 204: 451-474.
- Doitsidou M, Poole RJ, Sarin S, Bigelow H et Hobert O (2010) *C. elegans* mutant identification with a one-step whole-genome-sequencing and SNP mapping strategy. *PLOS ONE* 5: e15435.

- Dong X, Liu OW, Howell AS et Shen K (2013) An extracellular adhesion molecule complex patterns dendritic branching and morphogenesis. *Cell* 155: 296-307.
- Dorris ER, Phelan DE, Russell J et Murphy M (2024) Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of transforming growth factor beta and fibrosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 738: 150497.
- Drabikowski K, Trzebiatowska A et Chiquet-Ehrismann R (2005) *ten-1*, an essential gene for germ cell development, epidermal morphogenesis, gonad migration, and neuronal pathfinding in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 282: 27-38.
- Drechsler M, Schmidt AC, Meyer H et Paululat A (2013) The conserved ADAMTS-like protein lonely heart mediates matrix formation and cardiac tissue integrity. *PLOS Genetics* 9: e1003616.
- Duan H, Wearne SL, Rocher AB, Macedo A, Morrison JH et Hof PR (2003) Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cerebral Cortex* 13: 950-961.
- Duerr JS, Han HP, Fields SD et Rand JB (2008) Identification of major classes of cholinergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Comparative Neurology* 506: 398-408.
- El Ayadi A, Jay JW et Prasai A (2020) Current Approaches Targeting the Wound Healing Phases to Attenuate Fibrosis and Scarring. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 1105.
- Elosegui-Artola A (2021) The extracellular matrix viscoelasticity as a regulator of cell and tissue dynamics. *Current Opinion in Cell Biology* 72: 10-18.
- Estevez M, Attisano L, Wrana JL, Albert PS, Massagué J et Riddle DL (1993) The *daf-4* gene encodes a bone morphogenetic protein receptor controlling *C. elegans* dauer larva development. *Nature* 365: 644-649.
- Fan J, Ji T, Wang K, Huang J, Wang M, Manning L, Dong X, Shi Y, Zhang X, Shao Z et Colón-Ramos DA (2020) A muscle-epidermis-glia signaling axis sustains synaptic specificity during allometric growth in *Caenorhabditis elegans*. *Elife* 9: e55890.
- Fang-Yen C, Wyart M, Xie J, Kawai R, Kodger T, Chen S, Wen Q et Samuel AD (2010) Biomechanical analysis of gait adaptation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 20323-20328.
- Fawcett JW, Oohashi T et Pizzorusso T (2019) The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. *Nature Reviews Neuroscience* 20: 451-465.

- Feinberg EH, VanHoven MK, Bendesky A, Wang G, Fetter RD, Shen K et Bargmann CI (2008) GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron* 57: 353-363.
- Fernando T, Flibotte S, Xiong S, Yin J, Yzeiraj E, Moerman DG, Meléndez A et Savage-Dunn C (2011) *C. elegans* ADAMTS ADT-2 regulates body size by modulating TGF β signaling and cuticle collagen organization. *Developmental Biology* 352: 92-103.
- Fessler JH, Kramerova I, Kramerov A, Chen Y et Fessler LI (2004) Papilin, a novel component of basement membranes, in relation to ADAMTS metalloproteases and ECM development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 1079-1084.
- Fidler AL, Vanacore RM, Chetyrkin SV, Pedchenko VK, Bhawe G, Yin VP, Stothers CL, Rose KL, McDonald WH, Clark TA, et al. (2014) A unique covalent bond in basement membrane is a primordial innovation for tissue evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 331-336.
- Fielenbach N et Antebi A (2008) *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes & Development* 22: 2149-2165.
- 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.
- Fitzgerald MC et Schwarzbauer JE (1998) Importance of the basement membrane protein SPARC for viability and fertility in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 8: 1285-1288.
- Fletcher DA et Mullins RD (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463: 485-492.
- Foehr ML, Lindy AS, Fairbank RC, Amin NM, Xu M, Yanowitz J, Fire AZ et Liu J (2006) An antagonistic role for the *C. elegans* Schnurri homolog SMA-9 in modulating TGF β signaling during mesodermal patterning. *Development* 133: 2887-2896.
- Foehr ML et Liu J (2008) Dorsoventral patterning of the *C. elegans* postembryonic mesoderm requires both LIN-12/Notch and TGF β signaling. *Developmental Biology* 313: 256-266.
- Fox JW, Mayer U, Nischt R, Aumailley M, Reinhardt D, Wiedemann H, Mann K, Timpl R, Krieg T, Engel J et al. (1991) Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO Journal* 10: 3137-3146.
- Francis R et Waterston RH (1991) Muscle cell attachment in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cell Biology* 114: 465-479.

- Frangogiannis NG (2020) Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *Journal of Experimental Medicine* 217: e20190103.
- Fransen E, d'Hooge R, Van Camp G, Verhoye M, Sijbers J, Reyniers E, Soriano P, Kamiguchi H, Willemsen R, Koekkoek SK, et al. (1998) L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Human Molecular Genetics* 7: 999-1009.
- Fransen E, Van Camp G, Vits L et Willems PJ (1997) L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite. *Human Molecular Genetics* 6: 1625-1632.
- Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D et Gundelfinger ED (2009) Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nature Neuroscience* 12: 897-904.
- Fuentes-Medel Y, Ashley J, Barria R, Maloney R, Freeman M et Budnik V (2012) Integration of a retrograde signal during synapse formation by glia-secreted TGF-beta ligand. *Current Biology* 22: 1831-1838.
- Fukasawa H, Yamamoto T, Suzuki H, Togawa A, Ohashi N, Fujigaki Y, Uchida C, Aoki M, Hosono M, Kitagawa M et Hishida A (2004) Treatment with anti-TGF-beta antibody ameliorates chronic progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF-beta signaling. *Kidney International* 65: 63-74.
- Fung WY, Fat KFC, Eng CKS et Lau CK (2007) crm-1 facilitates BMP signaling to control body size in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 311: 95-105.
- Geissler M, Gottschling C, Aguado A, Rauch U, Wetzel CH, Hatt H et Faissner A (2013) Primary hippocampal neurons, which lack four crucial extracellular matrix molecules, display abnormalities of synaptic structure and function and severe deficits in perineuronal net formation. *Journal of Neuroscience* 33: 7742-7755.
- Gianakas CA, Keeley DP, Ramos-Lewis W, Park K, Jayadev R, Kenny IW, Chi Q et Sherwood DR (2022) Hemicentin-mediated type IV collagen assembly strengthens juxtaposed basement membrane linkage. *Journal of Cell Biology* 222: e202112096.
- Gleason RJ, Akintobi AM, Grant BD et Padgett RW (2014) BMP signaling requires retromer-dependent recycling of the type I receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 2578-2583.
- Godenschwege TA, Kristiansen LV, Uthaman SB, Hortsch M et Murphey RK (2006) A conserved role for *Drosophila* Neuroglian and human L1-CAM in central-synapse formation. *Current Biology* 16: 12-23.

- Gonzalez EA, Lund RJ, Martin KJ, McCartney JE, Tondravi MM, Sampath TK et Hruska KA (2002) Treatment of a murine model of high-turnover renal osteodystrophy by exogenous BMP-7. *Kidney International* 61: 1322-1331.
- Goodman MB et Savage-Dunn C (2022) Reciprocal interactions between transforming growth factor beta signaling and collagens: Insights from *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Dynamics* 251: 47-60.
- Gotenstein JR, Koo CC, Ho TW et Chisholm AD (2018) Genetic suppression of basement membrane defects in *Caenorhabditis elegans* by gain of function in extracellular matrix and cell-matrix attachment genes. *Genetics* 208: 1499-1512.
- Gotenstein JR, Swale RE, Fukuda T, Wu Z, Giurumescu CA, Goncharov A, Jin Y et Chisholm AD (2010) The *C. elegans* peroxidase PXN-2 is essential for embryonic morphogenesis and inhibits adult axon regeneration. *Development* 137: 3603-3613.
- Graham PL, Johnson JJ, Wang S, Sibley MH, Gupta MC et Kramer JM (1997) Type IV collagen is detectable in most, but not all, basement membranes of *Caenorhabditis elegans* and assembles on tissues that do not express it. *Journal of Cell Biology* 137: 1171-1183.
- Guan R, Yuan L, Li J, Wang J, Li Z, Cai Z, Guo H, Fang Y, Lin R, Liu W, et al. (2022) Bone morphogenetic protein 4 inhibits pulmonary fibrosis by modulating cellular senescence and mitophagy in lung fibroblasts. *European Respiratory Journal* 60: 2102307.
- Guevara C et Ortiz FC (2021) Glial-derived transforming growth factor beta1 (TGF-beta1): a key factor in multiple sclerosis neuroinflammation. *Neural Regeneration Research* 16: 510-511.
- 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.
- Gumienny TL et Savage-Dunn C (2013) TGF-beta signaling in *C. elegans*. *WormBook* 1-34.
- Guo T, Wantono C, Tan Y, Deng F, Duan T et Liu D (2023) Regulators, functions, and mechanotransduction pathways of matrix stiffness in hepatic disease. *Frontiers in Physiology* 14: 1098129.
- Guo X, Johnson JJ et Kramer JM (1991) Embryonic lethality caused by mutations in basement membrane collagen of *C. elegans*. *Nature* 349: 707-709.

- Guo X et Kramer J (1989) The two *Caenorhabditis elegans* basement membrane (type IV) collagen genes are located on separate chromosomes. *Journal of Biological Chemistry* 264: 17574-17582.
- Gupta MC, Graham PL et Kramer JM (1997) Characterization of $\alpha 1$ (IV) collagen mutations in *Caenorhabditis elegans* and the effects of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ (IV) mutations on type IV collagen distribution. *Journal of Cell Biology* 137: 1185-1196.
- Ha NM, Tran SH, Shim Y-H et Kang K (2022) *Caenorhabditis elegans* as a powerful tool in natural product bioactivity research. *Applied Biological Chemistry* 65: 18.
- 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.
- Hall NG, Klenotic P, Anand-Apte B et Apte SS (2003) ADAMTSL-3/punctin-2, a novel glycoprotein in extracellular matrix related to the ADAMTS family of metalloproteases. *Matrix Biology* 22: 501-510.
- Hamaratoglu F, Affolter M et Pyrowolakis G (2014) Dpp/BMP signaling in flies: from molecules to biology. *Seminars in cell & developmental biology* 32: 128-136.
- Harkness JH, Gonzalez AE, Bushana PN, Jorgensen ET, Hegarty DM, Di Nardo AA, Prochiantz A, Wisor JP, Aicher SA, Brown TE et Sorg BA (2021) Diurnal changes in perineuronal nets and parvalbumin neurons in the rat medial prefrontal cortex. *Brain Struct Funct* 226: 1135-1153.
- Hartig W, Brauer K et Bruckner G (1992) Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *NeuroReport* 3: 869-872.
- Harunaga JS, Doyle AD et Yamada KM (2014) Local and global dynamics of the basement membrane during branching morphogenesis require protease activity and actomyosin contractility. *Developmental Biology* 394: 197-205.
- Haspel J et Grumet M (2003) The L1CAM extracellular region: a multi-domain protein with modular and cooperative binding modes. *Frontiers in Bioscience* 8: s1210-s1225.
- He C, Song W, Weston TA, Tran C, Kurtz I, Zuckerman JE, Guagliardo P, Miner JH, Ivanov SV, Bougoure J, et al. (2020) Peroxidasin-mediated bromine enrichment of basement membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117: 15827-15836.
- He Z et Yu Q (2018) Identification and characterization of functional modules reflecting transcriptome transition during human neuron maturation. *BMC Genomics* 19: 262.

Heckman EL et Doe CQ (2021) Establishment and maintenance of neural circuit architecture. *Journal of Neuroscience* 41: 1119-1129.

Heiman MG et Bulow HE (2024) Dendrite morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 227: iyae056.

Hemnes AR et Humbert M (2017) Pathobiology of pulmonary arterial hypertension: understanding the roads less travelled. *European Respiratory Review* 26: 170093.

Hemphill MA, Dauth S, Yu CJ, Dabiri BE et Parker KK (2015) Traumatic brain injury and the neuronal microenvironment: a potential role for neuropathological mechanotransduction. *Neuron* 85: 1177-1192.

Herndon LA, Schmeissner PJ, Dudaronek JM, Brown PA, Listner KM, Sakano Y, Paupard MC, Hall DH et Driscoll M (2002) Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature* 419: 808-814.

Herndon LA, Wolkow CA, Driscoll M et Hall DH (2017) Effects of Ageing on the Basic Biology and Anatomy of *C. elegans*. *Ageing: Lessons from C elegans* 9-39.

Hess M, Gomariz A, Goksel O et Ewald CY (2019) *In-vivo* quantitative image analysis of age-related morphological changes of *C. elegans* neurons reveals a correlation between neurite bending and novel neurite outgrowths. *eNeuro* 6: ENEURO.0014-0019.

Hesselson D et Kimble J (2006) Growth control by EGF repeats of the *C. elegans* Fibulin-1C isoform. *Journal of Cell Biology* 175: 217-223.

Hesselson D, Newman C, Kim KW et Kimble J (2004) GON-1 and fibulin have antagonistic roles in control of organ shape. *Current Biology* 14: 2005-2010.

Hiew L-F, Poon C-H, You H-Z et Lim L-W (2021) TGF- β /Smad signalling in neurogenesis: implications for neuropsychiatric diseases. *Cells* 10: 1382.

Hijazi N, Shi Z et Rockey DC (2023) Paxillin regulates liver fibrosis via actin polymerization and ERK activation in hepatic stellate cells. *Journal of Cell Science* 136: jcs261122.

Hintermann E et Christen U (2019) The many roles of cell adhesion molecules in hepatic fibrosis. *Cells* 8: 1503.

- Hinz B (2009) Tissue stiffness, latent TGF- β 1 activation, and mechanical signal transduction: implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Current rheumatology reports* 11: 120-126.
- Hinz B (2012) Mechanical aspects of lung fibrosis: a spotlight on the myofibroblast. *Proceedings of the American Thoracic Society* 9: 137-147.
- Hinz B (2015) The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biology* 47: 54-65.
- Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G et Chaponnier C (2001) Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Molecular Biology of the Cell* 12: 2730-2741.
- Hirohata S, Wang LW, Miyagi M, Yan L, Seldin MF, Keene DR, Crabb JW et Apte SS (2002) Punctin, a novel ADAMTS-like molecule, ADAMTSL-1, in extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry* 277: 12182-12189.
- Hobert O et Bülow H (2003) Development and maintenance of neuronal architecture at the ventral midline of *C. elegans*. *Current Opinion in Neurobiology* 13: 70-78.
- Hocevar BA et Howe PH (2000) Analysis of TGF-beta-mediated synthesis of extracellular matrix components. *Methods in Molecular Biology* 142: 55-65.
- Hof PR et Morrison JH (2004) The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends in Neurosciences* 27: 607-613.
- Hohenester E et Yurchenco PD (2013) Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adhesion & Migration* 7: 56-63.
- Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Hashimoto T, Kaneko T, Takeuchi K et Nishi M (2015) A newly identified mouse hypothalamic area having bidirectional neural connections with the lateral septum: the perifornical area of the anterior hypothalamus rich in chondroitin sulfate proteoglycans. *European Journal of Neuroscience* 42: 2322-2334.
- Horne-Badovinac S (2020) Mobilizing the Matrix for Organ Morphogenesis. *Developmental Cell* 54: 1-2.
- Hortsch M (2000) Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Molecular and Cellular Neuroscience* 15: 1-10.
- Hortsch M, Nagaraj K et Mualla R (2014) The L1 family of cell adhesion molecules: a sickening number of mutations and protein functions. *Advances in Neurobiology* 8: 195-229.

- Hosokawa R, Nonaka K, Morifuji M, Shum L et Ohishi M (2003) TGF-beta 3 decreases type I collagen and scarring after labioplasty. *Journal of Dental Research* 82: 558-564.
- Hresko MC, Williams BD et Waterston RH (1994) Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cell Biology* 124: 491-506.
- 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.
- Hu YL, Lu S, Szeto KW, Sun J, Wang Y, Lasheras JC et Chien S (2014) FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells. *Scientific Reports* 4: 6024.
- Huang CC HD, Hedgecock EM, Kao G, Karantza V, Vogel BE, Hutter H, Chisholm AD, Yurchenco PD, Wadsworth WG (2003) Laminin alpha subunits and their role in *C. elegans* development. *Development* 130: 3343-3358.
- Huang E, Peng N, Xiao F, Hu D, Wang X et Lu L (2020a) The Roles of immune cells in the pathogenesis of fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 5203.
- Huang TT, Matsuyama HJ, Tsukada Y, Singhvi A, Syu RT, Lu Y, Shaham S, Mori I et Pan CL (2020b) Age-dependent changes in response property and morphology of a thermosensory neuron and thermotaxis behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 19: e13146.
- Huerta-López C, Clemente-Manteca A, Velázquez-Carreras D, Espinosa FM, Sanchez JG, Martínez-del-Pozo Á, García-García M, Martín-Colomo S, Rodríguez-Blanco A, Esteban-González R, et al. (2024) Cell response to extracellular matrix viscous energy dissipation outweighs high-rigidity sensing. *Science Advances* 10: eadf9758.
- Hui E, Moretti L, Barker TH et Caliri SR (2021) The combined influence of viscoelastic and adhesive cues on fibroblast spreading and focal adhesion organization. *Cellular and Molecular Bioengineering* 14: 427-440.
- Humeres C, Shinde AV, Tuleta I, Hernandez SC, Hanna A, Huang S, Venugopal H, Aguilan JT, Conway SJ, Sidoli S et Frangogiannis NG (2024) Fibroblast Smad7 Induction Protects the Remodeling Pressure-Overloaded Heart. *Circ Res* 135: 453-469.
- Humphrey JD, Dufresne ER et Schwartz MA (2014) Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15: 802-812.

- Hutter H (2003) Extracellular cues and pioneers act together to guide axons in the ventral cord of *C. elegans*. *Development* 130: 5307-5318.
- Hutter H, Vogel BE, Plenefisch JD, Norris CR, Proenca RB, Spieth J, Guo C, Mastwal S, Zhu X, Scheel J et Hedgecock EM (2000) Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science* 287: 989-994.
- Hwang ES, Thiagarajan G, Parmar AS et Brodsky B (2010) Interruptions in the collagen repeating tripeptide pattern can promote supramolecular association. *Protein Science* 19: 1053-1064.
- Ignatz RA et Massague J (1986) Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry* 261: 4337-4345.
- Ihara S, Hagedorn EJ, Morrissey MA, Chi Q, Motegi F, Kramer JM et Sherwood DR (2011) Basement membrane sliding and targeted adhesion remodels tissue boundaries during uterine–vulval attachment in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Cell Biology* 13: 641-651.
- Ihara S et Nishiwaki K (2007) Prodomain - dependent tissue targeting of an ADAMTS protease controls cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO Journal* 26: 2607-2620.
- Ihara S et Nishiwaki K (2008) Stage - specific activation of MIG - 17/ADAMTS controls cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *The FEBS Journal* 275: 4296-4305.
- Imanishi A, Aoki Y, Kakehi M, Mori S, Takano T, Kubota Y, Kim H-S, Shibata Y et Nishiwaki K (2020) Genetic interactions among ADAMTS metalloproteases and basement membrane molecules in cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE* 15: e0240571.
- Inazaki K, Kanamaru Y, Kojima Y, Sueyoshi N, Okumura K, Kaneko K, Yamashiro Y, Ogawa H et Nakao A (2004) Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction. *Kidney International* 66: 597-604.
- Iozzo RV et Gubbiotti MA (2018) Extracellular matrix: the driving force of mammalian diseases. *Matrix Biology* 71: 1-9.
- Isabella AJ et Horne-Badovinac S (2016) Rab10-mediated secretion synergizes with tissue movement to build a polarized basement membrane architecture for organ morphogenesis. *Developmental Cell* 38: 47-60.

- Jafari G, Burghoorn J, Kawano T, Mathew M, Mörck C, Axäng C, Ailion M, Thomas JH, Culotti JG, Swoboda P et Pilon M (2010) Genetics of extracellular matrix remodeling during organ growth using the *Caenorhabditis elegans* pharynx model. *Genetics* 186: 969-982.
- Jain D, Mattiassi S, Goh EL et Yim EK (2020) Extracellular matrix and biomimetic engineering microenvironment for neuronal differentiation. *Neural Regeneration Research* 15: 573-585.
- Jakovljević A, Tucić M, Blažiková M, Korenić A, Missirlis Y, Stamenković V et Andjus P (2021) Structural and functional modulation of perineuronal nets: in search of important players with highlight on tenascins. *Cells* 10: 1345.
- Jarriault S et Greenwald I (2005) Evidence for functional redundancy between *C. elegans* ADAM proteins SUP-17/Kuzbanian and ADM-4/TACE. *Developmental Biology* 287: 1-10.
- Jayadev R, Chi Q, Keeley DP, Hastie EL, Kelley LC et Sherwood DR (2019) α -Integrins dictate distinct modes of type IV collagen recruitment to basement membranes. *Journal of Cell Biology* 218: 3098-3116.
- Jayadev R et Sherwood DR (2017) Morphogenesis: shaping tissues through extracellular force gradients. *Current Biology* 27: R850-R852.
- Jeffery TK, Upton PD, Trembath RC et Morrell NW (2005) BMP4 inhibits proliferation and promotes myocyte differentiation of lung fibroblasts via Smad1 and JNK pathways. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 288: L370-378.
- Jenkins RH et Fraser DJ (2011) BMP-6 emerges as a potential major regulator of fibrosis in the kidney. *The American Journal of Pathology* 178: 964-965.
- Johnson RP et Kramer JM (2012) Neural maintenance roles for the matrix receptor dystroglycan and the nuclear anchorage complex in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 190: 1365-1377.
- Jouet M, Rosenthal A, Armstrong G, MacFarlane J, Stevenson R, Paterson J, Metzenberg A, Ionasescu V, Temple K et Kenwrick S (1994) X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nature Genetics* 7: 402-407.
- Juhl P, Bondesen S, Hawkins CL, Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Davies MJ et Siebuhr AS (2020) Dermal fibroblasts have different extracellular matrix profiles induced by TGF-beta, PDGF and IL-6 in a model for skin fibrosis. *Scientific Reports* 10: 17300.
- Kamath RS et Ahringer J (2003) Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 30: 313-321.

- Kamath VV, Krishnamurthy S, Satelur KP et Rajkumar K (2015) Transforming growth factor-beta1 and TGF-beta2 act synergistically in the fibrotic pathway in oral submucous fibrosis: An immunohistochemical observation. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology* 36: 111-116.
- Kang SH et Kramer JM (2000) Nidogen is nonessential and not required for normal type IV collagen localization in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell* 11: 3911-3923.
- Kao G, Huang CC, Hedgecock EM, Hall DH et Wadsworth WG (2006) The role of the laminin beta subunit in laminin heterotrimer assembly and basement membrane function and development in *C. elegans*. *Developmental Biology* 290: 211-219.
- Karamanos NK, Piperigkou Z, Theocharis AD, Watanabe H, Franchi M, Baud S, Brezillon S, Götte M, Passi A, Vigetti D, et al. (2018) Proteoglycan chemical diversity drives multifunctional cell regulation and therapeutics. *Chemical Reviews* 118: 9152-9232.
- Karamanos NK TA, Piperigkou Z, Manou D, Passi A, Skandalis SS, Vynios DH, Orian-Rousseau V, Ricard-Blum S, Schmelzer CEH, Duca L, Durbeek M, Afratis NA, Troeberg L, Franchi M, Masola V, Onisto M. (2021) A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. . *FEBS Journal* 88: 6850-6912.
- Karsdal MA, Daniels SJ, Holm Nielsen S, Bager C, Rasmussen DG, Loomba R, Surabattula R, Villesen IF, Luo Y, Shevell D, et al. (2020) Collagen biology and non - invasive biomarkers of liver fibrosis. *Liver International* 40: 736-750.
- Karsdal MA, Nielsen SH, Leeming DJ, Langholm LL, Nielsen MJ, Manon-Jensen T, Siebuhr A, Gudmann NS, Ronnow S, Sand JM, et al. (2017) The good and the bad collagens of fibrosis - Their role in signaling and organ function. *Advanced Drug Delivery Reviews* 121: 43-56.
- Katagiri T et Watabe T (2016) Bone morphogenetic proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8: a021899.
- Katayama H, Yamamoto A, Mizushima N, Yoshimori T et Miyawaki A (2008) GFP-like proteins stably accumulate in lysosomes. *Cell Structure and Function* 33: 1-12.
- Katsuno Y, Qin J, Oses-Prieto J, Wang H, Jackson-Weaver O, Zhang T, Lamouille S, Wu J, Burlingame A, Xu J et Derynck R (2018) Arginine methylation of SMAD7 by PRMT1 in TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition and epithelial stem-cell generation. *The Journal of Biological Chemistry* 293: 13059-13072.

- Kawano T, Zheng H, Merz DC, Kohara Y, Tamai KK, Nishiwaki K et Culotti JG (2009) *C. elegans mig-6* encodes papilin isoforms that affect distinct aspects of DTC migration, and interacts genetically with *mig-17* and collagen IV. *Development* 136: 1433–1442.
- Keeley DP, Hastie E, Jayadev R, Kelley LC, Chi Q, Payne SG, Jeger JL, Hoffman BD et Sherwood DR (2020) Comprehensive endogenous tagging of basement membrane components reveals dynamic movement within the matrix scaffolding. *Developmental Cell* 54: 60-74. e67.
- Keeley DP et Sherwood DR (2019) Tissue linkage through adjoining basement membranes: The long and the short term of it. *Matrix Biology* 75-76: 58-71.
- Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN et Edwards DR (2015) The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biology* 16: 1-16.
- Kenwrick S et Doherty P (1998) Neural cell adhesion molecule L1: relating disease to function. *Bioessays* 20: 668-675.
- Kenwrick S, Watkins A et Angelis ED (2000) Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Human molecular genetics* 9: 879-886.
- Khandekar A (2015) Age-related Changes in the Neuronal Architecture of *Caenorhabditis Elegans*: A Dissertation. *Doctor of philosophy*: -.
- Khoshnoodi J, Cartailier J-P, Alvares K, Veis A et Hudson BG (2006) Molecular recognition in the assembly of collagens: terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers. *Journal of Biological Chemistry* 281: 38117-38121.
- Khoshnoodi J, Pedchenko V et Hudson BG (2008) Mammalian collagen IV. *Microscopy Research and Technique* 71: 357-370.
- Kim HS et Nishiwaki K (2015) Control of the basement membrane and cell migration by ADAMTS proteinases: Lessons from *C. elegans* genetics. *Matrix Biology* 44-46: 64-69.
- Kim KW et Jin Y (2015) Neuronal responses to stress and injury in *C. elegans*. *FEBS Letters* 589: 1644-1652.
- Kim S-H, Turnbull J et Guimond S (2011) Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *The Journal of Endocrinology* 209: 139-151.
- Kim S et Wadsworth WG (2000) Positioning of longitudinal nerves in *C. elegans* by nidogen. *Science* 288: 150-154.

- Knight CG, Patel MN, Azevedo RB et Leroi AM (2002) A novel mode of ecdysozoan growth in *Caenorhabditis elegans*. *Evolution & Development* 4: 16-27.
- Koch DW, Schnabel LV, Ellis IM, Bates RE et Berglund AK (2022) TGF- β 2 enhances expression of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cell paracrine factors with known associations to tendon healing. *Stem cell research & therapy* 13: 477.
- Koch SC, Nelson A et Hartenstein V (2021) Structural aspects of the aging invertebrate brain. *Cell and Tissue Research* 383: 931-947.
- Koenig BB, Cook JS, Wolsing DH, Ting J, Tiesman JP, Correa PE, Olson CA, Pecquet AL, Ventura F, Grant RA et al. (1994) Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Molecular Cell Biology* 14: 5961-5974.
- Kong D, Megone W, Nguyen KD, Di Cio S, Ramstedt M et Gautrot JE (2018a) Protein nanosheet mechanics controls cell adhesion and expansion on low-viscosity liquids. *Nano Letters* 18: 1946-1951.
- Kong R, Wang N, Luo H et Lu J (2018b) Hesperetin mitigates bile duct ligation-induced liver fibrosis by inhibiting extracellular matrix and cell apoptosis via the TGF- β 1/Smad pathway. *Current Molecular Medicine* 18: 15-24.
- Korotchenko S, Zanicchi FC, Diaspro A et Dityatev A (2014) Zooming in on the (Peri) synaptic Extracellular Matrix. *Nanoscale Imaging of Synapses: New Concepts and Opportunities* 187-203.
- Kramer JM (2005) Basement membranes. *WormBook* 1-15.
- Kramerova IA, Kawaguchi N, Fessler LI, Nelson RE, Chen Y, Kramerov AA, Kusche-Gullberg M, Kramer JM, Ackley BD, Sieron AL, et al. (2000) Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. *Development* 127: 5475-5485.
- Kramerova IA, Kramerov AA et Fessler JH (2003) Alternative splicing of papilin and the diversity of *Drosophila* extracellular matrix during embryonic morphogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 226: 634-642.
- Krasny L, Paul A, Wai P, Howard BA, Natrajan RC et Huang PH (2016) Comparative proteomic assessment of matrisome enrichment methodologies. *Biochemical Journal* 473: 3979-3995.

- Krasselt K, Frommelt C, Brunner R, Rauscher FG, Francke M et Körber N (2020) Various cross-linking methods inhibit the collagenase I degradation of rabbit scleral tissue. *BMC Ophthalmology* 20: 1-10.
- Kravtsov V, Oren-Suissa M et Podbilewicz B (2017) The fusogen AFF-1 can rejuvenate the regenerative potential of adult dendritic trees by self-fusion. *Development* 144: 2364-2374.
- Krishna S, Maduzia LL et Padgett RW (1999) Specificity of TGF β signaling is conferred by distinct type I receptors and their associated SMAD proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 126: 251-260.
- Ku JC, Raiten J et Li Y (2024) Understanding fibrosis: Mechanisms, clinical implications, current therapies, and prospects for future interventions. *Biomedical Engineering Advances* 100118.
- Kubota Y, Kuroki R et Nishiwaki K (2004) A fibulin-1 homolog interacts with an ADAM protease that controls cell migration in *C. elegans*. *Current Biology* 14: 2011-2018.
- Kubota Y, Nagata K, Sugimoto A et Nishiwaki K (2012) Tissue architecture in the *Caenorhabditis elegans* gonad depends on interactions among fibulin-1, type IV collagen and the ADAMTS extracellular protease. *Genetics* 190: 1379-1388.
- Kubota Y, Nishiwaki K, Ito M et Sugimoto A (2019) The role of tissue inhibitors of metalloproteinases in organ development and regulation of ADAMTS family metalloproteinases in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 212: 523-535.
- Kubota Y, Ohkura K, Tamai KK, Nagata K et Nishiwaki K (2008) MIG-17/ADAMTS controls cell migration by recruiting nidogen to the basement membrane in *C. elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 20804-20809.
- Kular JK, Basu S et Sharma RI (2014) The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering* 5: 2041731414557112.
- Kuno K, Baba C, Asaka A, Matsushima C, Matsushima K et Hosono R (2002) The *Caenorhabditis elegans* ADAMTS family gene *adt-1* is necessary for morphogenesis of the male copulatory organs. *Journal of Biological Chemistry* 277: 12228-12236.
- Kuno K et Matsushima K (1998) ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *Journal of Biological Chemistry* 273: 13912-13917.

- Kuo JC (2014) Focal adhesions function as a mechanosensor. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 126: 55-73.
- Kurshan PT, Phan AQ, Wang GJ, Crane MM, Lu H et Shen K (2014) Regulation of synaptic extracellular matrix composition is critical for proper synapse morphology. *Journal of Neuroscience* 34: 12678-12689.
- Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K et Imaizumi T (2002) Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 106: 130-135.
- Kwok JC, Dick G, Wang D et Fawcett JW (2011) Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Developmental Neurobiology* 71: 1073-1089.
- Labouesse M (2012) Role of the extracellular matrix in epithelial morphogenesis: a view from *C. elegans*. *Organogenesis* 8: 65-70.
- Labouesse M et Georges-Labouesse E (2003) Cell adhesion: parallels between vertebrate and invertebrate focal adhesions. *Current Biology* 13: R528-530.
- Lacin H, Zhu Y, DiPaola JT, Wilson BA, Zhu Y et Skeath JB (2024) A genetic screen in *Drosophila* uncovers a role for senseless-2 in surface glia in the peripheral nervous system to regulate CNS morphology. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 14: jkae152.
- Lagares D, Busnadiego O, Garcia-Fernandez RA, Kapoor M, Liu S, Carter DE, Abraham D, Shi-Wen X, Carreira P, Fontaine BA, et al. (2012) Inhibition of focal adhesion kinase prevents experimental lung fibrosis and myofibroblast formation. *Arthritis Rheum* 64: 1653-1664.
- Lagares D et Kapoor M (2013) Targeting focal adhesion kinase in fibrotic diseases. *BioDrugs* 27: 15-23.
- Laje G, Allen AS, Akula N, Manji H, Rush AJ et McMahon FJ (2009) Genome-wide association study of suicidal ideation emerging during citalopram treatment of depressed outpatients. *Pharmacogenetics and Genomics* 19: 666-674.
- Lakdawala MF, Madhu B, Faure L, Vora M, Padgett RW et Gumieny TL (2019) Genetic interactions between the DBL-1/BMP-like pathway and dpy body size-associated genes in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell* 30: 3151-3160.
- Lakos G, Takagawa S, Chen S-J, Ferreira AM, Han G, Masuda K, Wang X-J, DiPietro LA et Varga J (2004) Targeted disruption of TGF- β /Smad3 signaling modulates skin fibrosis in a mouse model of scleroderma. *The American Journal of Pathology* 165: 203-217.

- Lan HY et Chung AC-K (2012) TGF- β /Smad signaling in kidney disease. *Seminars in Nephrology* 32: 236-243.
- Laronha H Cl, Portugal J, Azul A, Polido M, Petrova KT, Salema-Oom M, Caldeira J. (2020) Challenges in Matrix Metalloproteinases Inhibition. . *Biomolecules* 10: 717.
- Lassetter AP, Corty MM, Barria R, Sheehan AE, Hill JQ, Aicher SA, Fox AN et Freeman MR (2023) Glial TGF β activity promotes neuron survival in peripheral nerves. *Journal of Cell Biology* 222: e202111053.
- Latella G, Vetuschi A, Sferra R, Zanninelli G, D'angelo A, Catitti V, Caprilli R, Flanders K et Gaudio E (2009) Smad3 loss confers resistance to the development of trinitrobenzene sulfonic acid–induced colorectal fibrosis. *European Journal of Clinical Investigation* 39: 145-156.
- Lausecker F, Lennon R et Randles MJ (2022) The kidney matrisome in health, aging, and disease. *Kidney international* 102: 1000-1012.
- Law JW, Lee AY, Sun M, Nikonenko AG, Chung SK, Dityatev A, Schachner M et Morellini F (2003) Decreased anxiety, altered place learning, and increased CA1 basal excitatory synaptic transmission in mice with conditional ablation of the neural cell adhesion molecule L1. *Journal of Neuroscience* 23: 10419-10432.
- LeBleu VS, Macdonald B et Kalluri R (2007) Structure and function of basement membranes. *Experimental Biology and Medicine* 232: 1121-1129.
- Lee C-M, Cho SJ, Cho W-K, Park JW, Lee J-H, Choi AM, Rosas IO, Zheng M, Peltz G, Lee CG et Elias JA (2018a) Laminin α 1 is a genetic modifier of TGF- β 1–stimulated pulmonary fibrosis. *JCI Insight* 3: e99574.
- Lee JI, Wright JH, Johnson MM, Bauer RL, Sorg K, Yuen S, Hayes BJ, Nguyen L, Riehle KJ et Campbell JS (2016) Role of Smad3 in platelet-derived growth factor-C-induced liver fibrosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 310: C436-C445.
- Lee S-E, Massie I, Meran L et Li VS (2018b) Extracellular matrix remodeling in intestinal homeostasis and disease. *Advances in Stem Cells and their Niches* 2: 99-140.
- Legerstee K et Houtsmuller AB (2021) A Layered View on Focal Adhesions. *Biology (Basel)* 10: 1189.
- Leitinger B et Hohenester E (2007) Mammalian collagen receptors. *Matrix Biology* 26: 146-155.

- Leivonen SK LK, Decock J, Chantry A, Edwards DR, Kähäri VM. (2013) TGF- β -elicited induction of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 expression in fibroblasts involves complex interplay between Smad3, p38 α , and ERK1/2. . *PLOS ONE* 8: e57474. .
- Levy-Strumpf N et Culotti JG (2014) Netrins and Wnts function redundantly to regulate antero-posterior and dorso-ventral guidance in *C. elegans*. *PLOS Genetics* 10: e1004381.
- Levy C, Brooks JM, Chen J, Su J et Fox MA (2015) Cell-specific and developmental expression of lectican-cleaving proteases in mouse hippocampus and neocortex. *Journal of Comparative Neurology* 523: 629-648.
- Li C, Qiu S, Liu X, Guo F, Zhai J, Li Z, Deng L, Ge L, Qian H, Yang L et Xu B (2023) Extracellular matrix-derived mechanical force governs breast cancer cell stemness and quiescence transition through integrin-DDR signaling. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8: 247.
- Li L-B, Lei H, Arey RN, Li P, Liu J, Murphy CT, Xu XS et Shen K (2016) The neuronal kinesin UNC-104/KIF1A is a key regulator of synaptic aging and insulin signaling-regulated memory. *Current Biology* 26: 605-615.
- Li S, Qi Y, McKee K, Liu J, Hsu J et Yurchenco PD (2017) Integrin and dystroglycan compensate each other to mediate laminin-dependent basement membrane assembly and epiblast polarization. *Matrix Biology* 57-58: 272-284.
- Li X, Wu X, Lu T, Kuang C, Si Y, Zheng W, Li Z et Xue Y (2024) Perineuronal Nets in the CNS: Architects of Memory and Potential Therapeutic Target in Neuropsychiatric Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 25: 3412.
- Liang J, Yu L, Yin J et Savage-Dunn C (2007) Transcriptional repressor and activator activities of SMA-9 contribute differentially to BMP-related signaling outputs. *Developmental Biology* 305: 714-725.
- Lin X, Qadota H, Moerman DG et Williams BD (2003) *C. elegans* PAT-6/actopaxin plays a critical role in the assembly of integrin adhesion complexes *in vivo*. *Current Biology* 13: 922-932.
- Lin Y-C et Koleske AJ (2010) Mechanisms of synapse and dendrite maintenance and their disruption in psychiatric and neurodegenerative disorders. *Annual Review of Neuroscience* 33: 349-378.
- Lipachev N, Arnst N, Melnikova A, Jäälinoja H, Kochneva A, Zhigalov A, Kuleshkaya N, Aganov AV, Mavlikeev M, Rauvala H, et al. (2019) Quantitative changes in perineuronal nets in development and posttraumatic condition. *Journal of Molecular Histology* 50: 203-216.

- Liu G, Cooley MA, Jarnicki AG, Borghuis T, Nair PM, Tjin G, Hsu AC, Haw TJ, Fricker M, Harrison CL, et al. (2019) Fibulin-1c regulates transforming growth factor- β activation in pulmonary tissue fibrosis. *JCI Insight* 4: e124529.
- Liu Z, Shi H, Szymczak LC, Aydin T, Yun S, Conostas K, Schaeffer A, Ranjan S, Kubba S, Alam E, et al. (2015) Promotion of bone morphogenetic protein signaling by tetraspanins and glycosphingolipids. *PLOS Genetics* 11: e1005221.
- Loerch PM, Lu T, Dakin KA, Vann JM, Isaacs A, Geula C, Wang J, Pan Y, Gabuzda DH, Li C, et al. (2008) Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. *PLOS ONE* 3: e3329.
- Long KR et Huttner WB (2019) How the extracellular matrix shapes neural development. *Royal Society Open Biology* 9: 180216.
- López B, González A, Querejeta R, Larman M et Díez J (2006) Alterations in the pattern of collagen deposition may contribute to the deterioration of systolic function in hypertensive patients with heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 48: 89-96.
- Lu P, Takai K, Weaver VM et Werb Z (2011) Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a005058.
- Luo C, Chang J, Yao W, Qian W, Bai Y, Fu S et Xia C (2024) Mechanism of collagen type IV regulation by focal adhesion kinase during retained fetal membranes in dairy cows. *Scientific Reports* 14: 23250.
- Luo S, Kleemann GA, Ashraf JM, Shaw WM et Murphy CT (2010) TGF- β and insulin signaling regulate reproductive aging via oocyte and germline quality maintenance. *Cell* 143: 299-312.
- Luo S, Schaefer AM, Dour S et Nonet ML (2014) The conserved LIM domain-containing focal adhesion protein ZYX-1 regulates synapse maintenance in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 141: 3922-3933.
- Luo S, Shaw WM, Ashraf J et Murphy CT (2009) TGF- β Sma/Mab signaling mutations uncouple reproductive aging from somatic aging. *PLOS Genetics* 5: e1000789.
- Lupori L, Totaro V, Cornuti S, Ciampi L, Carrara F, Grilli E, Viglione A, Tozzi F, Putignano E, Mazziotti R, et al. (2023) A comprehensive atlas of perineuronal net distribution and colocalization with parvalbumin in the adult mouse brain. *Cell Reports* 42: 112788.
- Ma F, Liu F, Xu W et Li L (2018) Surfactant and Chaotropic Agent Assisted Sequential Extraction/On-Pellet Digestion (SCAD) for Enhanced Proteomics. *Journal of Proteome Research* 17: 2744-2754.

- Macalma T, Otte J, Hensler ME, Bockholt SM, Louis HA, Kalff-Suske M, Grzeschik K-H, von der Ahe D et Beckerle MC (1996) Molecular characterization of human zyxin. *Journal of Biological Chemistry* 271: 31470-31478.
- Madaan U, Faure L, Chowdhury A, Ahmed S, Ciccarelli EJ, Gumienny TL et Savage-Dunn C (2020) Feedback regulation of BMP signaling by *Caenorhabditis elegans* cuticle collagens. *Molecular Biology of the Cell* 31: 825-832.
- Madaan U, Yzeiraj E, Meade M, Clark JF, Rushlow CA et Savage-Dunn C (2018) BMP signaling determines body size via transcriptional regulation of collagen genes in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 210: 1355-1367.
- Maduzia LL, Gumienny TL, Zimmerman CM, Wang H, Shetgiri P, Krishna S, Roberts AF et Padgett RW (2002) *lon-1* regulates *Caenorhabditis elegans* body size downstream of the *dbl-1* TGF β signaling pathway. *Developmental Biology* 246: 418-428.
- Madzharova E, Kastl P, Sabino F et auf dem Keller U (2019) Post-translational modification-dependent activity of matrix metalloproteinases. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 3077.
- Maeda T, Sakabe T, Sunaga A, Sakai K, Rivera AL, Keene DR, Sasaki T, Stavnezer E, Iannotti J, Schweitzer R, et al. (2011) Conversion of mechanical force into TGF- β -mediated biochemical signals. *Current Biology* 21: 933-941.
- Majeed M, Han H, Zhang K, Cao WX, Liao C-P, Hobert O et Lu H (2024) Toolkits for detailed and high-throughput interrogation of synapses in *C. elegans*. *Elife* 12: RP91775.
- Mak KM et Mei R (2017) Basement membrane type IV collagen and laminin: an overview of their biology and value as fibrosis biomarkers of liver disease. *The Anatomical Record* 300: 1371-1390.
- Maldonado M et Nam J (2013) The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *BioMed Research International* 2013: 284873.
- Mariano V, Domínguez-Iturza N, Neukomm LJ et Bagni C (2018) Maintenance mechanisms of circuit-integrated axons. *Current Opinion in Neurobiology* 53: 162-173.
- Markaki M et Tavernarakis N (2020) *Caenorhabditis elegans* as a model system for human diseases. *Current Opinion in Biotechnology* 63: 118-125.
- Martin CG, Bent JS, Hill T, Topalidou I et Singhvi A (2024) Epithelial UNC-23 limits mechanical stress to maintain glia-neuron architecture in *C. elegans*. *Developmental Cell* 59: 1668-1688.

- Masola V, Bellin G, Gambaro G et Onisto M (2018) Heparanase: a multitasking protein involved in extracellular matrix (ECM) remodeling and intracellular events. *Cells* 7: 236.
- Massagué J (2000) How cells read TGF- β signals. *Nature reviews Molecular cell biology* 1: 169-178.
- Matsubayashi Y, Louani A, Dragu A, Sanchez-Sanchez BJ, Serna-Morales E, Yolland L, Gyoergy A, Vizcay G, Fleck RA, Heddleston JM, et al. (2017) A moving source of matrix components is essential for *de novo* basement membrane formation. *Current Biology* 27: 3526-3534 e3524.
- Matthews RT, Kelly GM, Zerillo CA, Gray G, Tiemeyer M et Hockfield S (2002) Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *Journal of Neuroscience* 22: 7536-7547.
- Matus DQ, Li XY, Durbin S, Agarwal D, Chi Q, Weiss SJ et Sherwood DR (2010) *In vivo* identification of regulators of cell invasion across basement membranes. *Science Signaling* 3: ra35.
- Mavrakis M et Juanes MA (2023) The compass to follow: Focal adhesion turnover. *Current Opinion in Cell Biology* 80: 102152.
- McCabe MC, Schmitt LR, Hill RC, Dzieciatkowska M, Maslanka M, Daamen WF, van Kuppevelt TH, Hof DJ et Hansen KC (2021) Evaluation and refinement of sample preparation methods for extracellular matrix proteome coverage. *Molecular & Cellular Proteomics* 20: 100079.
- McCall AS, Cummings CF, Bhavé G, Vanacore R, Page-McCaw A et Hudson BG (2014) Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture. *Cell* 157: 1380-1392.
- McCarthy KJ (2015) The Basement Membrane Proteoglycans Perlecan and Agrin: Something Old, Something New. *Current Topics in Membranes* 76: 255-303.
- McRae PA et Porter BE (2012) The perineuronal net component of the extracellular matrix in plasticity and epilepsy. *Neurochemistry International* 61: 963-972.
- Mecham RP et Gibson MA (2015) The microfibril-associated glycoproteins (MAGPs) and the microfibrillar niche. *Matrix Biology* 47: 13-33.
- Meighan CM et Schwarzbauer JE (2007) Control of *C. elegans* hermaphrodite gonad size and shape by vab-3/Pax6-mediated regulation of integrin receptors. *Genes & development* 21: 1615-1620.

- Melentijevic I, Toth ML, Arnold ML, Guasp RJ, Harinath G, Nguyen KC, Taub D, Parker JA, Neri C, Gabel CV, et al. (2017) *C. elegans* neurons jettison protein aggregates and mitochondria under neurotoxic stress. *Nature* 542: 367-371.
- 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. *The EMBO Journal* 10: 3959.
- Meltzer LA, Yabaluri R et Deisseroth K (2005) A role for circuit homeostasis in adult neurogenesis. *Trends in Neurosciences* 28: 653-660.
- Mendibil U, Ruiz-Hernandez R, Retegi-Carrion S, Garcia-Urquia N, Olalde-Graells B et Abarrategi A (2020) Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 5447.
- Meneely PM, Dahlberg CL et Rose JK (2019) Working with worms: *Caenorhabditis elegans* as a model organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 19: e35.
- Meng XM, Nikolic-Paterson DJ et Lan HY (2016) TGF-beta: the master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology* 12: 325-338.
- 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: 174-187.
- Meyers EA et Kessler JA (2017) TGF- β family signaling in neural and neuronal differentiation, development, and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9: a022244.
- Miekus N, Luise C, Sippl W, Baczek T, Schmelzer CEH et Heinz A (2019) MMP-14 degrades tropoelastin and elastin. *Biochimie* 165: 32-39.
- Mierke CT (2022) Viscoelasticity, like forces, plays a role in mechanotransduction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10: 789841.
- Miller CM, Page-McCaw A et Broihier HT (2008) Matrix metalloproteinases promote motor axon fasciculation in the *Drosophila* embryo. *Development* 135: 95-109.
- Minevich G, Park DS, Blankenberg D, Poole RJ et Hobert O (2012) CloudMap: a cloud-based pipeline for analysis of mutant genome sequences. *Genetics* 192: 1249-1269.

- Mizumoto K, Jin Y et Bessereau JL (2023) Synaptogenesis: unmasking molecular mechanisms using *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 223: iyac176.
- Montag-Sallaz M, Schachner M et Montag D (2002) Misguided axonal projections, neural cell adhesion molecule 180 mRNA upregulation, and altered behavior in mice deficient for the close homolog of L1. *Molecular and Cellular Biology* 22: 7967-7981.
- Morales-Nebreda LI, Rogel MR, Eisenberg JL, Hamill KJ, Soberanes S, Nigdelioglu R, Chi M, Cho T, Radigan KA, Ridge KM, et al. (2015) Lung-specific loss of $\alpha 3$ laminin worsens bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 52: 503-512.
- Morawski M, Bruckner MK, Riederer P, Bruckner G et Arendt T (2004) Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Experimental Neurology* 188: 309-315.
- Morawski M, Reinert T, Meyer-Klaucke W, Wagner FE, Troger W, Reinert A, Jager C, Bruckner G et Arendt T (2015) Ion exchanger in the brain: Quantitative analysis of perineuronally fixed anionic binding sites suggests diffusion barriers with ion sorting properties. *Scientific Reports* 5: 16471.
- Morita K, Chow KL et Ueno N (1999) Regulation of body length and male tail ray pattern formation of *Caenorhabditis elegans* by a member of TGF- β family. *Development* 126: 1337-1347.
- Morita K, Flemming AJ, Sugihara Y, Mochii M, Suzuki Y, Yoshida S, Wood WB, Kohara Y, Leroi AM et Ueno N (2002) A *Caenorhabditis elegans* TGF - β , DBL - 1, controls the expression of LON - 1, a PR - related protein, that regulates polyploidization and body length. *The EMBO Journal* 21: 1063–1073.
- Morrison JH et Baxter MG (2012) The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature Reviews Neuroscience* 13: 240-250.
- Morrissey MA, Jayadev R, Miley GR, Blebea CA, Chi Q, Ihara S et Sherwood DR (2016) SPARC promotes cell invasion *in vivo* by decreasing type IV collagen levels in the basement membrane. *PLOS Genetics* 12: e1005905.
- Morrissey MA, Keeley DP, Hagedorn EJ, McClatchey STH, Chi Q, Hall DH et Sherwood DR (2014) B-LINK: a hemiscentin, plakin, and integrin-dependent adhesion system that links tissues by connecting adjacent basement membranes. *Developmental Cell* 31: 319-331.
- Mortensen J, Lindholm M, Langholm L, Kjeldsen J, Bay-Jensen A, Karsdal M et Manon-Jensen T (2019) The intestinal tissue homeostasis—the role of extracellular matrix remodeling in inflammatory bowel disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 13: 977-993.

- Moseley-Alldredge M, Sheoran S, Yoo H, O’Keefe C, Richmond JE et Chen L (2022) A role for the Erk MAPK pathway in modulating SAX-7/L1CAM-dependent locomotion in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 220: iyab215.
- Moulder G, Huang MM, Waterston R et Barstead R (1996) Talin requires beta-integrin, but not vinculin, for its assembly into focal adhesion-like structures in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell* 7: 1181-1193.
- Moy SS, Nonneman RJ, Young NB, Demyanenko GP et Maness PF (2009) Impaired sociability and cognitive function in Nrcam-null mice. *Behavioural Brain Research* 205: 123-131.
- Moyle MW, Barnes KM, Kuchroo M, Gonopolskiy A, Duncan LH, Sengupta T, Shao L, Guo M, Santella A, Christensen R, et al. (2021) Structural and developmental principles of neuropil assembly in *C. elegans*. *Nature* 591: 99-104.
- Mulcahy B, Witvliet D, Mitchell J, Schalek R, Berger D, Wu Y, Holmyard D, Lu Y, Ahamed T, Samuel A, et al. (2022) Post-embryonic remodeling of the *C. elegans* motor circuit. *Current Biology* 32: 4645-4659.
- Mullen GP, Rogalski TM, Bush JA, Gorji PR et Moerman DG (1999) Complex patterns of alternative splicing mediate the spatial and temporal distribution of perlecan/UNC-52 in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell* 10: 3205-3221.
- Muller P et Schier AF (2011) Extracellular movement of signaling molecules. *Developmental Cell* 21: 145-158.
- Muriel JM, Dong C, Hutter H et Vogel BE (2005) Fibulin-1C and Fibulin-1D splice variants have distinct functions and assemble in a hemicentin-dependent manner. *Development* 132: 4223-4234.
- Murrell M, Kamm R et Matsudaira P (2011) Substrate viscosity enhances correlation in epithelial sheet movement. *Biophysical Journal* 101: 297-306.
- Myllyharju J et Kivirikko KI (2001) Collagens and collagen-related diseases. *Annals of Medicine* 33: 7-21.
- Naba A (2024) Mechanisms of assembly and remodelling of the extracellular matrix. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 25: 865-885.
- Nabavizadeh A, Bayat M, Kumar V, Gregory A, Webb J, Alizad A et Fatemi M (2019) Viscoelastic biomarker for differentiation of benign and malignant breast lesion in ultra-low frequency range. *Scientific Reports* 9: 5737.

- Nadour M, Valette R. L. RI, Biard M, Frebault N, Rivollet L, St-Louis P, Blanchette CR, Thackeray A, Perrat P, Bevilacqua C, et al. (2025) Remodeling of extracellular matrix collagen IV by MIG-6/papilin regulates neuronal architecture. *bioRxiv* -.
- Nagaraj K, Mualla R et Hortsch M (2013) The L1 family of cell adhesion molecules: a sickening number of mutations and protein functions. *Cell Adhesion Molecules: Implications in Neurological Diseases* 195-229.
- Nagase H, Visse R et Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 69: 562-573.
- Nagashio Y, Ueno H, Imamura M, Asaumi H, Watanabe S, Yamaguchi T, Taguchi M, Tashiro M et Otsuki M (2004) Inhibition of transforming growth factor beta decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice. *Laboratory Investigation* 84: 1610-1618.
- Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M et Ueno H (2000) Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 32: 247-255.
- Nardi JB, Martos R, Walden KK, Lampe DJ et Robertson HM (1999) Expression of lacunin, a large multidomain extracellular matrix protein, accompanies morphogenesis of epithelial monolayers in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 883-897.
- Neumann B et Hilliard MA (2014) Loss of MEC-17 leads to microtubule instability and axonal degeneration. *Cell Reports* 6: 93-103.
- Nicholas HR et Hodgkin J (2004) Responses to infection and possible recognition strategies in the innate immune system of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Immunology* 41: 479-493.
- Nicholson C et Syková E (1998) Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends in Neurosciences* 21: 207-215.
- Nikolić M, Scarcelli G et Tanner K (2022) Multimodal microscale mechanical mapping of cancer cells in complex microenvironments. *Biophysical Journal* 121: 3586-3599.
- Ning L, Kurihara H, De Vega S, Ichikawa-Tomikawa N, Xu Z, Nonaka R, Kazuno S, Yamada Y, Miner JH et Arikawa-Hirasawa E (2014) Laminin $\alpha 1$ regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF- β pathway. *The American Journal of Pathology* 184: 1683-1694.

- Nishiwaki K, Hisamoto N et Matsumoto K (2000) A metalloprotease disintegrin that controls cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 288: 2205-2208.
- Ong CH, Tham CL, Harith HH, Firdaus N et Israf DA (2021) TGF-beta-induced fibrosis: A review on the underlying mechanism and potential therapeutic strategies. *European Journal of Pharmacology* 911: 174510.
- Oorloff M, Hruby A, Averbukh M, Alcala A, Dutta N, Minor C, Castro Torres T, Moaddeli D, Vega M, Kim J, et al. (2024) Growth on stiffer substrates impacts animal health and longevity in *C. elegans*. *PLOS ONE* 19: :e0302673.
- Ortiz C, Schierwagen R, Schaefer L, Klein S, Trepats X et Trebicka J (2021) Extracellular matrix remodeling in chronic liver disease. *Current Tissue Microenvironment Reports* 2: 41-52.
- Owen LM, Bax NA, Weis WI et Dunn AR (2022) The C-terminal actin-binding domain of talin forms an asymmetric catch bond with F-actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119: e2109329119.
- Page-McCaw A (2008) Remodeling the model organism: matrix metalloproteinase functions in invertebrates. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19: 14-23.
- Page TL, Einstein M, Duan H, He Y, Flores T, Rolshud D, Erwin JM, Wearne SL, Morrison JH et Hof PR (2002) Morphological alterations in neurons forming corticocortical projections in the neocortex of aged Patas monkeys. *Neuroscience Letters* 317: 37-41.
- Pan C-L, Peng C-Y, Chen C-H et McIntire S (2011) Genetic analysis of age-dependent defects of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 9274-9279.
- Paralkar VM, Vukicevic S et Reddi AH (1991) Transforming growth factor beta type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: implications for development. *Dev Biol* 143: 303-308.
- Parkin JD, San Antonio JD, Pedchenko V, Hudson B, Jensen ST et Savige J (2011) Mapping structural landmarks, ligand binding sites, and missense mutations to the collagen IV heterotrimers predicts major functional domains, novel interactions, and variation in phenotypes in inherited diseases affecting basement membranes. *Human Mutation* 32: 127-143.
- Pearson JR, Zurita F, Tomás-Gallardo L, Díaz-Torres A, Díaz de la Loza MdC, Franze K, Martín-Bermudo MD et González-Reyes A (2016) ECM-Regulator *timp* is required for stem cell niche organization and cyst production in the *Drosophila* ovary. *PLOS Genetics* 12: e1005763.

- Pedersen G, Saermark T, Kirkegaard T et Brynskov J (2009) Spontaneous and cytokine induced expression and activity of matrix metalloproteinases in human colonic epithelium. *Clinical & Experimental Immunology* 155: 257-265.
- Pegorier S, Campbell GA, Kay AB et Lloyd CM (2010) Bone morphogenetic protein (BMP)-4 and BMP-7 regulate differentially transforming growth factor (TGF)-beta1 in normal human lung fibroblasts (NHLF). *Respiratory research* 11: 85.
- Pelham Jr RJ et Wang Y-I (1997) Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 13661-13665.
- Péterfi Z, Donkó A, Orient A, Sum A, Prókai A, Molnár B, Veréb Z, Rajnavölgyi E, Kovács KJ, Müller V, et al. (2009) Peroxidasin is secreted and incorporated into the extracellular matrix of myofibroblasts and fibrotic kidney. *The American Journal of Pathology* 175: 725-735.
- Pierce-Shimomura JT, Chen BL, Mun JJ, Ho R, Sarkis R et McIntire SL (2008) Genetic analysis of crawling and swimming locomotory patterns in *C. elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 20982-20987.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW et Maffei L (2002) Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 298: 1248-1251.
- Pocock R, Bénard CY, Shapiro L et Hobert O (2008) Functional dissection of the *C. elegans* cell adhesion molecule SAX-7, a homologue of human L1. *Molecular and Cellular Neuroscience* 37: 56-68.
- Pocock R et Hobert O (2008) Oxygen levels affect axon guidance and neuronal migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Neuroscience* 11: 894-900.
- Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW et Wolf G (2009) TGF- β and fibrosis in different organs—molecular pathway imprints. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1792: 746-756.
- Pompili S, Latella G, Gaudio E, Sferra R et Vetuschi A (2021) The charming world of the extracellular matrix: a dynamic and protective network of the intestinal wall. *Frontiers in Medicine* 8: 610189.
- Poschl E, Schlotzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y et Mayer U (2004) Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131: 1619-1628.

- Potekaev NN, Borzykh OB, Medvedev GV, Petrova MM, Gavriluk OA, Karpova EI, Trefilova VV, Demina OM, Popova TE et Shnayder NA (2021) Genetic and epigenetic aspects of skin collagen fiber turnover and functioning. *Cosmetics* 8: 92.
- Pozzi A, Yurchenco PD et Iozzo RV (2017) The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biology* 57: 1-11.
- Prevedel R, Diz-Muñoz A, Ruocco G et Antonacci G (2019) Brillouin microscopy: an emerging tool for mechanobiology. *Nature Methods* 16: 969-977.
- Pujala A et Koyama M (2019) Chronology-based architecture of descending circuits that underlie the development of locomotor repertoire after birth. *Elife* 8: e42135.
- Qadota H, Inoue M, Hikita T, Köppen M, Hardin JD, Amano M, Moerman DG et Kaibuchi K (2007) Establishment of a tissue-specific RNAi system in *C. elegans*. *Gene* 400: 166-173.
- Qi W, Yan Y, Pfeifer D, Donner V, Gromoff E, Wang Y, Maier W et Baumeister R (2017) *C. elegans* DAF-16/FOXO interacts with TGF- β /BMP signaling to induce germline tumor formation via mTORC1 activation. *PLOS Genetics* 13: e1006801.
- Qin J, Liang J et Ding M (2014) Perlecan antagonizes collagen IV and ADAMTS9/GON-1 in restricting the growth of presynaptic boutons. *Journal of Neuroscience* 34: 10311-10324.
- Qin Y, Garrison BS, Ma W, Wang R, Jiang A, Li J, Mistry M, Bronson RT, Santoro D, Franco C, et al. (2018) A Milieu Molecule for TGF-beta Required for Microglia Function in the Nervous System. *Cell* 174: 156-171 e116.
- Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS et Asaduzzaman SM (2015) TGF-beta/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Research* 3: 15005.
- Rajshankar D, Wang B, Worndl E, Menezes S, Wang Y et McCulloch CA (2020) Focal adhesion kinase regulates tractional collagen remodeling, matrix metalloproteinase expression, and collagen structure, which in turn affects matrix - induced signaling. *Journal of Cellular Physiology* 235: 3096-3111.
- 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.

- Rasmussen JP, Reddy SS et Priess JR (2012) Laminin is required to orient epithelial polarity in the *C. elegans* pharynx. *Development* 139: 2050-2060.
- Ricard-Blum S (2011) The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a004978.
- Richard MB, Taylor SR et Greer CA (2010) Age-induced disruption of selective olfactory bulb synaptic circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 15613-15618.
- Ringer P, Weißl A, Cost A-L, Freikamp A, Sabass B, Mehlich A, Tramier M, Rief M et Grashoff C (2017) Multiplexing molecular tension sensors reveals piconewton force gradient across talin-1. *Nature Methods* 14: 1090-1096.
- Ritty TM, Ditsios K et Starcher BC (2002) Distribution of the elastic fiber and associated proteins in flexor tendon reflects function. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 268: 430-440.
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH et al. (1986) Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 4167-4171.
- Roberts AF, Gumieny TL, Gleason RJ, Wang H et Padgett RW (2010) Regulation of genes affecting body size and innate immunity by the DBL-1/BMP-like pathway in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Developmental Biology* 10: 1-10.
- Robertson IB et Rifkin DB (2016) Regulation of the Bioavailability of TGF-beta and TGF-beta-Related Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8: a021907.
- 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.
- Rogalski TM, Williams BD, Mullen GP et Moerman DG (1993) Products of the *unc-52* gene in *Caenorhabditis elegans* are homologous to the core protein of the mammalian basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *Genes & Development* 7: 1471-1484.
- Rogister B, Delree P, Leprince P, Martin D, Sadzot C, Malgrange B, Munaut C, Rigo J, Lefebvre P et Octave JN (1993) Transforming growth factor β as a neuronogial signal during peripheral nervous system response to injury. *Journal of Neuroscience Research* 34: 32-43.

- Rolf B, Bastmeyer M, Schachner M et Bartsch U (2002) Pathfinding errors of corticospinal axons in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *Journal of Neuroscience* 22: 8357-8362.
- Rosenthal A, Jouet M et Kenwrick S (1992) Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 mRNA in a family with X-linked hydrocephalus. *Nature Genetics* 2: 107-112.
- Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten Dijke P, Heldin CH et Miyazono K (1995) Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 7632-7636.
- Rougon G et Hobert O (2003) New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. *Annual Review of Neuroscience* 26: 207-238.
- Roussos A, Kitopoulou K, Borbolis F et Palikaras K (2023) *Caenorhabditis elegans* as a model system to study human neurodegenerative disorders. *Biomolecules* 13: 478.
- Roux AE, Yuan H, Podshivalova K, Hendrickson D, Kerr R, Kenyon C et Kelley D (2023) Individual cell types in *C. elegans* age differently and activate distinct cell-protective responses. *Cell Reports* 42: 112902.
- Rowe RG et Weiss SJ (2008) Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends in Cell Biology* 18: 560-574.
- Rozario T et DeSimone DW (2010) The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Developmental Biology* 341: 126-140.
- Rypdal KB, Apte SS et Lunde IG (2024) Emerging roles for the ADAMTS-like family of matricellular proteins in cardiovascular disease through regulation of the extracellular microenvironment. *Molecular Biology Reports* 51: 280.
- Rypdal KB, Olav Melleby A, Robinson EL, Li J, Palmero S, Seifert DE, Martin D, Clark C, López B et Andreassen K (2022) ADAMTSL3 knock-out mice develop cardiac dysfunction and dilatation with increased TGF β signalling after pressure overload. *Communications Biology* 5: 1392.
- Saito A, Horie M et Nagase T (2018) TGF-beta signaling in lung health and disease. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 2460.
- Sakai LY et Keene DR (1994) [2] Fibrillin: Monomers and microfibrils. *methods in enzymology* 245: 29-52.

- Sakai LY, Keene DR, Renard M et De Backer J (2016) FBN1: The disease-causing gene for Marfan syndrome and other genetic disorders. *Gene* 591: 279-291.
- Sakurai K, Migita O, Toru M et Arinami T (2002) An association between a missense polymorphism in the close homologue of L1 (CHL1, CALL) gene and schizophrenia. *Molecular psychiatry* 7: 412-415.
- Sakurai T, Ramoz N, Reichert JG, Corwin TE, Kryzak L, Smith CJ, Silverman JM, Hollander E et Buxbaum JD (2006) Association analysis of the NrCAM gene in autism and in subsets of families with severe obsessive-compulsive or self-stimulatory behaviors. *Psychiatric Genetics* 16: 251-257.
- Sanchez B, Kraszewski P, Lee S et Cope EC (2024) From molecules to behavior: Implications for perineuronal net remodeling in learning and memory. *Journal of Neurochemistry* 168: 1854-1876.
- Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB et Thorgeirsson SS (1995) Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 2572-2576.
- Santiago ER, Shelar A, Christie NT, Lewis - Hayre MR et Koelle MR (2022) Using NeuroPAL multicolor fluorescence labeling to identify neurons in *C. elegans*. *Current Protocols* 2: e610.
- Sarafi-Reinach TR, Melkman T, Hobert O et Sengupta P (2001) The *lin-11* LIM homeobox gene specifies olfactory and chemosensory neuron fates in *C. elegans*. *Development* 128: 3269-3281.
- Sarrazin S, Lamanna WC et Esko JD (2011) Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a004952.
- Sasakura H, Inada H, Kuhara A, Fusaoka E, Takemoto D, Takeuchi K et Mori I (2005) Maintenance of neuronal positions in organized ganglia by SAX-7, a *Caenorhabditis elegans* homologue of L1. *The EMBO Journal* 24: 1477-1488.
- Sauerbeck AD, Gangolli M, Reitz SJ, Salyards MH, Kim SH, Hemingway C, Gratuze M, Makkapati T, Kerschensteiner M et Holtzman DM (2020) SEQUIN multiscale imaging of mammalian central synapses reveals loss of synaptic connectivity resulting from diffuse traumatic brain injury. *Neuron* 107: 257-273. e255.
- Saunders NR, Noor NM, Dziegielewska KM, Wheaton BJ, Liddelow SA, Steer DL, Ek CJ, Habgood MD, Wakefield MJ et Lindsay H (2014) Age-dependent transcriptome and proteome following transection of neonatal spinal cord of *Monodelphis domestica* (South American grey short-tailed opossum). *PLOS ONE* 9: e99080.

- Savage-Dunn C (2005) TGF-beta signaling. *WormBook* 1.
- Savage-Dunn C et Padgett RW (2017) The TGF-beta Family in *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9: a022178.
- Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun C-Y, Baird SE et Padgett RW (1996) *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 790-794.
- Scarcelli G, Polacheck WJ, Nia HT, Patel K, Grodzinsky AJ, Kamm RD et Yun SH (2015) Noncontact three-dimensional mapping of intracellular hydromechanical properties by Brillouin microscopy. *Nature Methods* 12: 1132-1134.
- Schäfer MK et Frotscher M (2012) Role of L1CAM for axon sprouting and branching. *Cell and Tissue Research* 349: 39-48.
- Schuler SC, Liu Y, Dumontier S, Grandbois M, Le Moal E, Cornelison D et Bentzinger CF (2022) Extracellular matrix: Brick and mortar in the skeletal muscle stem cell niche. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10: 1056523.
- Schultz GS et Wysocki A (2009) Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen* 17: 153-162.
- Schultz RD, Bennett EE, Ellis EA et Gumienny TL (2014) Regulation of extracellular matrix organization by BMP signaling in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE* 9: e101929.
- Schuppel K, Brauer K, Hartig W, Grosche J, Earley B, Leonard BE et Bruckner G (2002) Perineuronal nets of extracellular matrix around hippocampal interneurons resist destruction by activated microglia in trimethyltin-treated rats. *Brain Research* 958: 448-453.
- Schwarz V, Pan J, Voltmer-Irsch S et Hutter H (2009) IgCAMs redundantly control axon navigation in *Caenorhabditis elegans*. *Neural Development* 4: 1-15.
- Seeger G, Brauer K, Hartig W et Bruckner G (1994) Mapping of perineuronal nets in the rat brain stained by colloidal iron hydroxide histochemistry and lectin cytochemistry. *Neuroscience* 58: 371-388.
- Semba RD, Zhang P, Dufresne C, Gao T, Al - Jadaan I, Craven ER, Qian J, Edward DP et Mahale A (2021) Primary angle closure glaucoma is characterized by altered extracellular matrix homeostasis in the iris. *PROTEOMICS–Clinical Applications* 15: 2000094.

- Sengle G, Tsutsui K, Keene DR, Tufa SF, Carlson EJ, Charbonneau NL, Ono RN, Sasaki T, Wirtz MK et Samples JR (2012) Microenvironmental regulation by fibrillin-1. *PLOS Genetics* 8: e1002425.
- Seong J, Tajik A, Sun J, Guan JL, Humphries MJ, Craig SE, Shekaran A, Garcia AJ, Lu S, Lin MZ, et al. (2013) Distinct biophysical mechanisms of focal adhesion kinase mechanoactivation by different extracellular matrix proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 19372-19377.
- Shah M, Foreman DM et Ferguson MW (1995) Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *Journal of Cell Science* 108 (Pt 3): 985-1002.
- Shaham S (2015) Glial development and function in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7: a020578.
- Shao Z, Watanabe S, Christensen R, Jorgensen EM et Colón-Ramos DA (2013) Synapse location during growth depends on glia location. *Cell* 154: 337-350.
- Shaye DD et Greenwald I (2011) OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLOS ONE* 6: e20085.
- Shen HH (2018) Core Concept: Perineuronal nets gain prominence for their role in learning, memory, and plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115: 9813-9815.
- Shen Z, Zhang X, Chai Y, Zhu Z, Yi P, Feng G, Li W et Ou G (2014) Conditional knockouts generated by engineered CRISPR-Cas9 endonuclease reveal the roles of coronin in *C. elegans* neural development. *Developmental Cell* 30: 625-636.
- Sherwood DR (2015) A developmental biologist's "outside-the-cell" thinking. *Journal of Cell Biology* 210: 369-372.
- Sherwood DR et Sternberg PW (2003) Anchor cell invasion into the vulval epithelium in *C. elegans*. *Developmental Cell* 5: 21-31.
- Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T et Springer TA (2011) Latent TGF-beta structure and activation. *Nature* 474: 343-349.
- Shi X, Young CD, Zhou H et Wang X (2020) Transforming Growth Factor-beta Signaling in Fibrotic Diseases and Cancer-Associated Fibroblasts. *Biomolecules* 10: 1666.

- Shibata Y, Huang Y, Yoshida M et Nishiwaki K (2024) Mutations in fibulin-1 and collagen IV suppress the short healthspan of *mig-17/ADAMTS* mutants in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE* 19: e0305396.
- Shibata Y, Kawakado Y, Hori N, Tanaka K, Inoue R, Takano T, Kubota Y et Nishiwaki K (2016) Organ length control by an ADAMTS extracellular protease in *Caenorhabditis elegans*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 6: 1449-1457.
- Shida T CJ, Xu Z, Goodman MB, Nachury MV. (2010) The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 21517-21522.
- Shu W et Kaplan C (2022) Cell spreading and migration on viscoelastic substrates: a bio-chemo-mechanical multiscale model. *APS March Meeting Abstracts 2022*: W07. 006.
- Sibley MH, Johnson JJ, Mello CC et Kramer JM (1993) Genetic identification, sequence, and alternative splicing of the *Caenorhabditis elegans* alpha 2 (IV) collagen gene. *Journal of Cell Biology* 123: 255-264.
- Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Csaky KG et Gauldie J (1997) Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *The Journal of clinical investigation* 100: 768-776.
- Singhvi A et Shaham S (2019) Glia-neuron interactions in *Caenorhabditis elegans*. *Annual Review of Neuroscience* 42: 149-168.
- Sitole BN et Mavri-Damelin D (2018) Peroxidasin is regulated by the epithelial-mesenchymal transition master transcription factor Snai1. *Gene* 646: 195-202.
- Skeath JB, Wilson BA, Romero SE, Snee MJ, Zhu Y et Lacin H (2017) The extracellular metalloprotease AdamTS-A anchors neural lineages in place within and preserves the architecture of the central nervous system. *Development* 144: 3102-3113.
- Sojoodi M, Erstad DJ, Barrett SC, Salloum S, Zhu S, Qian T, Colon S, Gale EM, Jordan VC et Wang Y (2022) Peroxidasin deficiency re-programs macrophages toward pro-fibrosis function and promotes collagen resolution in liver. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 13: 1483-1509.
- Sonnlyal S, Denton CP, Zheng B, Keene DR, He R, Adams HP, VanPelt CS, Geng YJ, Deng JM et Behringer RR (2007) Postnatal induction of transforming growth factor β signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma. *Arthritis & Rheumatism* 56: 334-344.

- Sorg BA, Berretta S, Blacktop JM, Fawcett JW, Kitagawa H, Kwok JC et Miquel M (2016) Casting a wide net: role of perineuronal nets in neural plasticity. *Journal of Neuroscience* 36: 11459-11468.
- Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, Mullen AM, Bayon Y, Pandit A et Raghunath M (2019) The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. *Advanced Materials* 31: 1801651.
- Souslova T, Marple TC, Spiekerman AM et Mohammad AA (2013) Personalized medicine in Alzheimer's disease and depression. *Contemporary Clinical Trials* 36: 616-623.
- Specia S, Giusti I, Rieder F et Latella G (2012) Cellular and molecular mechanisms of intestinal fibrosis. *World Journal of Gastroenterology* 18: 3635.
- Spinale FG, Janicki JS et Zile MR (2013) Membrane-associated matrix proteolysis and heart failure. *Circulation Research* 112: 195-208.
- Stefanakis N, Jiang J, Liang Y et Shaham S (2024) LET-381/FoxF and its target UNC-30/Pitx2 specify and maintain the molecular identity of *C. elegans* mesodermal glia that regulate motor behavior. *EMBO Journal* 43: 956-992.
- Stein GM et Murphy CT (2012) The intersection of aging, longevity pathways, and learning and memory in *C. elegans*. *Frontiers in Genetics* 3: 259.
- Stetler-Stevenson WG (1999) Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *Journal of Clinical Investigation* 103: 1237-1241.
- Stevenson TJ, Trinh T, Kogelschatz C, Fujimoto E, Lush ME, Piotrowski T, Brimley CJ et Bonkowski JL (2012) Hypoxia disruption of vertebrate CNS pathfinding through ephrinB2 is rescued by magnesium. *PLOS Genetics* 8: e1002638.
- Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook: The online review of C elegans biology* -.
- 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.
- Sultana OF, Bandaru M, Islam MA et Reddy PH (2024) Unraveling the complexity of human brain: Structure, function in healthy and disease states. *Ageing Research Reviews* 100: 102414.

- Sundaramoorthy M, Meiyappan M, Todd P et Hudson BG (2002) Crystal structure of NC1 domains: Structural basis for type IV collagen assembly in basement membranes. *Journal of Biological Chemistry* 277: 31142-31153.
- Sundararajan L, Stern J et Miller III DM (2019) Mechanisms that regulate morphogenesis of a highly branched neuron in *C. elegans*. *Developmental Biology* 451: 53-67.
- Sutherland TE, Dyer DP et Allen JE (2023) The extracellular matrix and the immune system: A mutually dependent relationship. *Science* 379: eabp8964.
- Suttkus A, Holzer M, Morawski M et Arendt T (2016) The neuronal extracellular matrix restricts distribution and internalization of aggregated Tau-protein. *Neuroscience* 313: 225-235.
- Suzuki Y, Yandell MD, Roy PJ, Krishna S, Savage-Dunn C, Ross RM, Padgett RW et Wood WB (1999) A BMP homolog acts as a dose-dependent regulator of body size and male tail patterning in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 126: 241-250.
- Sznitman J, Purohit PK, Krajacic P, Lamitina T et Arratia PE (2010) Material properties of *Caenorhabditis elegans* swimming at low Reynolds number. *Biophysical Journal* 98: 617-626.
- Tai Y, Gallo NB, Wang M, Yu J-R et Van Aelst L (2019) Axo-axonic innervation of neocortical pyramidal neurons by GABAergic chandelier cells requires AnkyrinG-associated L1CAM. *Neuron* 102: 358-372. e359.
- Talior - Volodarsky I, Arora PD, Wang Y, Zeltz C, Connelly KA, Gullberg D et McCulloch CA (2015) Glycated collagen induces $\alpha 11$ integrin expression through TGF - $\beta 2$ and Smad3. *Journal of cellular physiology* 230: 327-336.
- Tam RY, Fuehrmann T, Mitrousis N et Shoichet MS (2014) Regenerative therapies for central nervous system diseases: a biomaterials approach. *Neuropsychopharmacology* 39: 169-188.
- 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.
- Tavakoli S, Evans A, Oommen OP, Creemers L, Nandi JB, Hilborn J et Varghese OP (2023) Unveiling extracellular matrix assembly: Insights and approaches through bioorthogonal chemistry. *Mater Today Bio* 22: 100768.

- Teoh J-S, Vasudevan A, Wang W, Dhananjay S, Chandhok G, Pocock R, Koushika SP et Neumann B (2022) Synaptic branch stability is mediated by non-enzymatic functions of MEC-17/ α TAT1 and ATAT-2. *Scientific Reports* 12: 14003.
- Testa D, Prochiantz A et Di Nardo AA (2019) Perineuronal nets in brain physiology and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 89: 125-135.
- Teuscher AC, Statzer C, Goyala A, Domenig SA, Schoen I, Hess M, Hofer AM, Fossati A, Vogel V, Goksel O, et al. (2024) Longevity interventions modulate mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis in *C. elegans*. *Nature Communications* 15: 276.
- Theocharis AD, Manou D et Karamanos NK (2019) The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *The FEBS Journal* 286: 2830-2869.
- Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C et Karamanos NK (2016) Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews* 97: 4-27.
- Tian C, Sen D, Shi H, Foehr ML, Plavskin Y, Vatamaniuk OK et Liu J (2010) The RGM protein DRAG-1 positively regulates a BMP-like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 137: 2375-2384.
- Tian C, Shi H, Xiong S, Hu F, Xiong W-C et Liu J (2013) The neogenin/DCC homolog UNC-40 promotes BMP signaling via the RGM protein DRAG-1 in *C. elegans*. *Development* 140: 4070-4080.
- Timmons L et Fire A (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395: 854-854.
- Timpl R et Brown JC (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* 18: 123-132.
- Tola EN, Koroglu N, Yildirim GY et Koca HB (2018) The role of ADAMTS-2, collagen type-1, TIMP-3 and papilin levels of uterosacral and cardinal ligaments in the etiopathogenesis of pelvic organ prolapse among women without stress urinary incontinence. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 231: 158-163.
- Topalidou I, Keller C, Kalebic N, Nguyen KC, Somhegyi H, Politi KA, Heppenstall P, Hall DH et Chalfie M (2012) Genetically separable functions of the MEC-17 tubulin acetyltransferase affect microtubule organization. *Current Biology* 22: 1057-1065.
- Topf U et Chiquet-Ehrismann R (2011) Genetic interaction between *Caenorhabditis elegans* teneurin ten-1 and prolyl 4-hydroxylase phy-1 and their function in collagen IV-mediated basement

- membrane integrity during late elongation of the embryo. *Molecular Biology of the Cell* 22: 3331-3343.
- Toth ML, Melentijevic I, Shah L, Bhatia A, Lu K, Talwar A, Naji H, Ibanez-Ventoso C, Ghose P et Jevince A (2012) Neurite sprouting and synapse deterioration in the aging *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Journal of Neuroscience* 32: 8778-8790.
- Tsujioka M, Miyazawa K, Ohmuraya M, Nibe Y, Shirokawa T, Hayasaka H, Mizushima T, Fukuma T et Shimizu S (2023) Identification of a novel type of focal adhesion remodelling via FAK/FRNK replacement, and its contribution to cancer progression. *Cell Death & Disease* 14: 256.
- Urbanczyk M, Layland SL et Schenke-Layland K (2020) The role of extracellular matrix in biomechanics and its impact on bioengineering of cells and 3D tissues. *Matrix Biology* 85: 1-14.
- Urbano JM, Torgler CN, Molnar C, Tepass U, López-Varea A, Brown NH, de Celis JF et Martín-Bermudo MD (2009) Drosophila laminins act as key regulators of basement membrane assembly and morphogenesis. *Development* 136: 4165-4176.
- Uyemura K, Takeda Y, Asou H et Hayasaka K (1994) Neural cell adhesion proteins and neurological diseases. *The Journal of Biochemistry* 116: 1187-1192.
- Valdez G, Tapia JC, Kang H, Clemenson Jr GD, Gage F, Lichtman JW et Sanes JR (2010) Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 14863-14868.
- Vallance BA, Gunawan MI, Hewlett B, Bercik P, Van Kampen C, Galeazzi F, Sime PJ, Gauldie J et Collins SM (2005) TGF- β 1 gene transfer to the mouse colon leads to intestinal fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 289: G116-G128.
- Van De Water L, Varney S et Tomasek JJ (2013) Mechanoregulation of the myofibroblast in wound contraction, scarring, and fibrosis: opportunities for new therapeutic intervention. *Advances in wound care* 2: 122-141.
- Van Doren SR, Marcink TC, Koppiseti RK, Jurkevich A et Fulcher YG (2017) Peripheral membrane associations of matrix metalloproteinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1864: 1964-1973.
- van Dyck LI et Morrow EM (2017) Genetic control of postnatal human brain growth. *Current Opinion in Neurology* 30: 114-124.

- Van Horn MR et Ruthazer ES (2019) Glial regulation of synapse maturation and stabilization in the developing nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 54: 113-119.
- Vanacore R, Ham A-JL, Voehler M, Sanders CR, Conrads TP, Veenstra TD, Sharpless KB, Dawson PE et Hudson BG (2009) A sulfilimine bond identified in collagen IV. *Science* 325: 1230-1234.
- Verma BK, Chatterjee A, Kondaiah P et Gundiah N (2023) Substrate stiffness modulates TGF- β activation and ECM-associated gene expression in fibroblasts. *Bioengineering* 10: 998.
- Vitellaro-Zuccarello L, Bosisio P, Mazzetti S, Monti C et De Biasi S (2007) Differential expression of several molecules of the extracellular matrix in functionally and developmentally distinct regions of rat spinal cord. *Cell Tissue Res* 327: 433-447.
- Vogel BE et Hedgecock EM (2001) Hemicentin, a conserved extracellular member of the immunoglobulin superfamily, organizes epithelial and other cell attachments into oriented line-shaped junctions. *Development* 128: 883-894.
- Walmod P, Pedersen M, Berezin V et Bock E (2007) Cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily in the nervous system. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Neural protein metabolism and function* 35-151.
- Wang B, Koh P, Winbanks C, Coughlan MT, McClelland A, Watson A, Jandeleit-Dahm K, Burns WC, Thomas MC, Cooper ME et Kantharidis P (2011) miR-200a Prevents renal fibrogenesis through repression of TGF-beta2 expression. *Diabetes* 60: 280-287.
- Wang D et Fawcett J (2012) The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell and Tissue Research* 349: 147-160.
- Wang J, Tokarz R et Savage-Dunn C (2002) The expression of TGFbeta signal transducers in the hypodermis regulates body size in *C. elegans*. *Development* 129: 4989-4998.
- Wang L, Liu Z, Shi H et Liu J (2017) Two paralogous tetraspanins TSP-12 and TSP-14 function with the ADAM10 metalloprotease SUP-17 to promote BMP signaling in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Genetics* 13: e1006568.
- Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, Ye J, Yan Z et Denduluri S (2014) Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes & Diseases* 1: 87-105.
- Wang S et Hirschberg R (2003) BMP7 antagonizes TGF-beta -dependent fibrogenesis in mesangial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 284: F1006-1013.

- Wang S, Sun A, Li L, Zhao G, Jia J, Wang K, Ge J et Zou Y (2012) Up-regulation of BMP-2 antagonizes TGF-beta1/ROCK-enhanced cardiac fibrotic signalling through activation of Smurf1/Smad6 complex. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16: 2301-2310.
- Wang X, Harris RE, Bayston LJ et Ashe HL (2008a) Type IV collagens regulate BMP signalling in *Drosophila*. *Nature* 455: 72-77.
- Wang X, Kweon J, Larson S et Chen L (2005) A role for the *C. elegans* L1CAM homologue *lad-1/sax-7* in maintaining tissue attachment. *Developmental Biology* 284: 273-291.
- Wang X, Zhang W, Cheever T, Schwarz V, Opperman K, Hutter H, Koepp D et Chen L (2008b) The *C. elegans* L1CAM homologue LAD-2 functions as a coreceptor in MAB-20/Sema2-mediated axon guidance. *Journal of Cell Biology* 180: 233-246.
- Wang Y, Wang X, Wohland T et Sampath K (2016) Extracellular interactions and ligand degradation shape the nodal morphogen gradient. *Elife* 5: e13879.
- Warren CE, Krizus A et Dennis JW (2001) Complementary expression patterns of six nonessential *Caenorhabditis elegans* core 2/IN-acetylglucosaminyltransferase homologues. *Glycobiology* 11: 979-988.
- Wegner F, Hartig W, Bringmann A, Grosche J, Wohlfarth K, Zuschratter W et Bruckner G (2003) Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for glutamate and the GABA(A) receptor alpha1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. *Experimental Neurology* 184: 705-714.
- Wei X, Potter CJ, Luo L et Shen K (2012) Controlling gene expression with the Q repressible binary expression system in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Methods* 9: 391-395.
- Weisenburger S et Vaziri A (2018) A guide to emerging technologies for large-scale and whole-brain optical imaging of neuronal activity. *Annual Review of Neuroscience* 41: 431-452.
- Wells RG (2013) Tissue mechanics and fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1832: 884-890.
- Wen D, Gao Y, Ho C, Yu L, Zhang Y, Lyu G, Hu D, Li Q et Zhang Y (2022) Focusing on mechanoregulation axis in fibrosis: sensing, transduction and effecting. *Frontiers in Molecular Biosciences* 9: 804680.
- Wen TH, Binder DK, Ethell IM et Razak KA (2018) The perineuronal 'safety'net? Perineuronal net abnormalities in neurological disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11: 270.

- Weng Y, Lieberthal TJ, Zhou VX, Lopez-Ichikawa M, Armas-Phan M, Bond TK, Yoshida MC, Choi WT et Chang TT (2020) Liver epithelial focal adhesion kinase modulates fibrogenesis and hedgehog signaling. *JCI Insight* 5: e141217.
- White JG SE, Thomson JN, Brenner S. (1986) The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans* (The Mind of a Worm). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 314: 1-340.
- 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.
- Wight TN et Potter-Perigo S (2011) The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 301: G950-G955.
- Williams BD et Waterston RH (1994) Genes critical for muscle development and function in *Caenorhabditis elegans* identified through lethal mutations. *Journal of Cell Biology* 124: 475-490.
- Wilson SE, Shiju TM, Sampaio LP et Hilgert GSL (2022) Corneal fibroblast collagen type IV negative feedback modulation of TGF beta: A fibrosis modulating system likely active in other organs. *Matrix Biology* 109: 162-172.
- Witvliet D, Mulcahy B, Mitchell JK, Meirovitch Y, Berger DR, Wu Y, Liu Y, Koh WX, Parvathala R et Holmyard D (2021) Connectomes across development reveal principles of brain maturation. *Nature* 596: 257-261.
- Wlodarczyk J, Mukhina I, Kaczmarek L et Dityatev A (2011) Extracellular matrix molecules, their receptors, and secreted proteases in synaptic plasticity. *Developmental neurobiology* 71: 1040-1053.
- Wong VW, Akaishi S, Longaker MT et Gurtner GC (2011) Pushing back: wound mechanotransduction in repair and regeneration. *Journal of Investigative Dermatology* 131: 2186-2196.
- Woo W-M, Berry EC, Hudson ML, Swale RE, Goncharov A et Chisholm AD (2008) The *C. elegans* F-spondin family protein SPON-1 maintains cell adhesion in neural and non-neural tissues. *Development* 135: 2747-2756.
- Wordinger RJ, Sharma T et Clark AF (2014) The role of TGF-beta2 and bone morphogenetic proteins in the trabecular meshwork and glaucoma. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 30: 154-162.

- Wu Y, Cao Y, Xu K, Zhu Y, Qiao Y, Wu Y, Chen J, Li C, Zeng R et Ge G (2021) Dynamically remodeled hepatic extracellular matrix predicts prognosis of early-stage cirrhosis. *Cell Death & Disease* 12: 163.
- Wynn T (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 214: 199-210.
- Wynn TA et Ramalingam TR (2012) Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature medicine* 18: 1028-1040.
- Wyss-Coray T, Feng L, Masliah E, Ruppe MD, Lee HS, Toggas SM, Rockenstein EM et Mucke L (1995) Increased central nervous system production of extracellular matrix components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1. *The American journal of pathology* 147: 53.
- Xu A, Zhang Z, Ko SH, Fisher AL, Liu Z et Chen L (2019) Microtubule regulators act in the nervous system to modulate fat metabolism and longevity through DAF - 16 in *C. elegans*. *Aging Cell* 18: e12884.
- Xu D, Yuan X, Li Z et Mu R (2024) Integrin activating molecule-talin1 promotes skin fibrosis in systemic sclerosis. *Frontiers in Immunology* 15: 1400819.
- Xue M et Jackson CJ (2015) Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Advances in Wound Care* 4: 119-136.
- Yamada J, Ohgomori T et Jinno S (2015) Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. *The European Journal of Neuroscience* 41: 368-378.
- Yamada KM, Doyle AD et Lu J (2022) Cell-3D matrix interactions: recent advances and opportunities. *Trends in Cell Biology* 32: 883-895.
- Yamamoto K, Murphy G et Troeberg L (2015) Extracellular regulation of metalloproteinases. *Matrix Biology* 44: 255-263.
- Yamamoto KK et Savage-Dunn C (2023) TGF-beta pathways in aging and immunity: lessons from *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Genetics* 14: 1220068.
- Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH et Miyazono K (1995) Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *Journal of Cell Biology* 130: 217-226.

- Yan X, Liu Z et Chen Y (2009) Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 41: 263-272.
- Yang F, Bevilacqua C, Hambura S, Neves A, Gopalan A, Watanabe K, Govendir M, Bernabeu M, Ellenberg J et Diz-Muñoz A (2023) Pulsed stimulated Brillouin microscopy enables high-sensitivity mechanical imaging of live and fragile biological specimens. *Nature Methods* 20: 1971-1979.
- Yang S et Plotnikov SV (2021) Mechanosensitive Regulation of Fibrosis. *Cells* 10: 994.
- 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 YL, Ju HZ, Liu SF, Lee TC, Shih YW, Chuang LY, Guh JY, Yang YY, Liao TN, Hung TJ et Hung MY (2011) BMP-2 suppresses renal interstitial fibrosis by regulating epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cellular Biochemistry* 112: 2558-2565.
- Ye X, Zhang M, Gu H, Liu M, Zhao Y, Shi Y, Wu S, Jiang C, Ye X et Zhu H (2023) Animal models of acute exacerbation of pulmonary fibrosis. *Respiratory Research* 24: 296.
- Ye Z, Wei J, Zhan C et Hou J (2022) Role of transforming growth factor beta in peripheral nerve regeneration: cellular and molecular mechanisms. *Frontiers in Neuroscience* 16: 917587.
- Yemini E, Lin A, Nejatbakhsh A, Varol E, Sun R, Mena GE, Samuel AD, 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.
- Yin J, Madaan U, Park A, Aftab N et Savage-Dunn C (2015) Multiple cis elements and GATA factors regulate a cuticle collagen gene in *Caenorhabditis elegans*. *Genesis* 53: 278-284.
- Yip ZC et Heiman MG (2018) Ordered arrangement of dendrites within a *C. elegans* sensory nerve bundle. *Elife* 7: e35825.
- Yoshida S, Morita K, Mochii M et Ueno N (2001) Hypodermal expression of *Caenorhabditis elegans* TGF-beta type I receptor SMA-6 is essential for the growth and maintenance of body length. *Developmental Biology* 240: 32-45.
- Yoshina S et Mitani S (2015) Loss of *C. elegans* GON-1, an ADAMTS9 homolog, decreases secretion resulting in altered lifespan and dauer formation. *PLOS ONE* 10: e0133966.

- Younai S, Nichter LS, Wellisz T, Reinisch J, Nimni ME et Tuan TL (1994) Modulation of collagen synthesis by transforming growth factor-beta in keloid and hypertrophic scar fibroblasts. *Annals of Plastic Surgery* 33: 148-151.
- Yuan Z, Li Y, Zhang S, Wang X, Dou H, Yu X, Zhang Z, Yang S et Xiao M (2023) Extracellular matrix remodeling in tumor progression and immune escape: from mechanisms to treatments. *Molecular Cancer* 22: 48.
- Yue B (2014) Biology of the extracellular matrix: an overview. *Journal of Glaucoma* 23: S20-S23.
- Yue X, Shan B et Lasky JA (2010) TGF-beta: Titan of Lung Fibrogenesis. *Current Enzyme Inhibition* 6: 2174/10067.
- Yun S-M, Kim S-H et Kim E-H (2019) The molecular mechanism of transforming growth factor- β signaling for intestinal fibrosis: a mini-review. *Frontiers in Pharmacology* 10: 162.
- Yurchenco PD (2011) Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a004911.
- 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.
- Zanninelli G, Vetuschi A, Sferra R, D'Angelo A, Fratticci A, Continenza MA, Chiaramonte M, Gaudio E, Caprilli R et Latella G (2006) Smad3 knock-out mice as a useful model to study intestinal fibrogenesis. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 12: 1211.
- Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F et Kalluri R (2003) BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nature Medicine* 9: 964-968.
- Zhang J, Fan G, Zhao H, Wang Z, Li F, Zhang P, Zhang J, Wang X et Wang W (2017) Targeted inhibition of focal adhesion kinase attenuates cardiac fibrosis and preserves heart function in adverse cardiac remodeling. *Scientific reports* 7: 43146.
- 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 X, Yang W, Chen K, Zheng T, Guo Z, Peng Y et Yang Z (2021) The potential prognostic values of the ADAMTS-like protein family: an integrative pan-cancer analysis. *Annals of Translational Medicine* 9: 1562.

- Zhang X, Yun JS, Han D, Yook JI, Kim HS et Cho ES (2020) TGF-beta pathway in salivary gland fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 9138.
- Zhang X et Zhang Y (2012) DBL-1, a TGF- β , is essential for *Caenorhabditis elegans* aversive olfactory learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 17081-17086.
- Zhang Y, Mao X, Schwend T, Littlechild S et Conrad GW (2013) Resistance of corneal RFUVA-cross-linked collagens and small leucine-rich proteoglycans to degradation by matrix metalloproteinases. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54: 1014-1025.
- Zhao J, Shi W, Wang Y-L, Chen H, Bringas Jr P, Datto MB, Frederick JP, Wang X-F et Warburton D (2002) Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 282: L585-L593.
- Zhao M, Wang L, Wang M, Zhou S, Lu Y, Cui H, Racanelli AC, Zhang L, Ye T, Ding B, et al. (2022a) Targeting fibrosis, mechanisms and clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7: 206.
- Zhao X, Chen J, Sun H, Zhang Y et Zou D (2022b) New insights into fibrosis from the ECM degradation perspective: the macrophage-MMP-ECM interaction. *Cell & Bioscience* 12: 117.
- Zhao XK, Yu L, Cheng ML, Che P, Lu YY, Zhang Q, Mu M, Li H, Zhu LL, Zhu JJ, et al. (2017) Focal adhesion kinase regulates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Scientific Reports* 7: 4032.
- Zhong L, Wang X, Wang S, Yang L, Gao H et Yang C (2013) The anti-fibrotic effect of bone morphogenic protein-7(BMP-7) on liver fibrosis. *International Journal of Medical Sciences* 10: 441-450.
- Zhong X, Drgonova J, Li CY et Uhl GR (2015) Human cell adhesion molecules: annotated functional subtypes and overrepresentation of addiction - associated genes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1349: 83-95.
- Zhou S et Chen L (2011) Neural integrity is maintained by dystrophin in *C. elegans*. *Journal of Cell Biology* 192: 349-363.
- Zhou Y, Ling T et Shi W (2024) Current state of signaling pathways associated with the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research* 25: 245.
- Zou W, Shen A, Dong X, Tugizova M, Xiang YK et Shen K (2016) A multi-protein receptor-ligand complex underlies combinatorial dendrite guidance choices in *C. elegans*. *Elife* 5: e18345.

Zugasti O et Ewbank JJ (2009) Neuroimmune regulation of antimicrobial peptide expression by a noncanonical TGF- β signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* epidermis. *Nature Immunology* 10: 249-256.