

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DU GÈNE *RGA-7* PENDANT L'ÉLONGATION
EMBRYONNAIRE DE CAERNORHABDITIS ELEGANS

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

GERMAIN LACOSTE-CARON

AOÛT 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). 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.»

À ma mère, mes sœurs, mon père, Sarah

REMERCIEMENTS

Je remercie Sarah Jenna de m'avoir chaleureusement accueilli dans son laboratoire et ce malgré un dossier académique peu reluisant. Sa vision ambitieuse m'a permis de vivre dans un environnement de recherche stimulant et en constante évolution. Je tiens également à souligner la grande autonomie que j'ai pu développer grâce à sa confiance envers moi. Je remercie nos collaborateurs : Dr Baillie et son équipe (Simon Fraser, BC), Dr Piekny (Concordia University, Qc) et Baris Tursun (Columbia University Medical Center, NY) pour leur apport technique, matériel ou intellectuel.

J'aimerais remercier ma sœur et ma mère qui ont toujours été là pour moi et m'ont particulièrement soutenu pendant mes péripéties. Ce support m'a permis de maintenir mon élan et de terminer ce que j'ai entrepris.

Enfin, je remercie Les Fonds d'accessibilité à la réussite (FARE) de la fondation de l'UQAM qui m'a partiellement financé durant ma maîtrise.

Merci à tous ceux qui ont permis la publication de mon mémoire et ceux qui ont contribué indirectement ou directement à ma réussite.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES SIGLES ET ACRONYMES.....	xi
CHAPITRE I	
REVUE DE LA LITTÉRATURE ET INTRODUCTION À L'ÉTUDE.....	1
1.1 GTPase	
1.1.1 Propriété des GTPases et leurs régulateurs	1
1.1.2 GTPase Rho	4
1.1.3 Coordination des GTPases et « crosstalk ».....	4
1.2 Les GTPase chez <i>C. elegans</i>	6
1.3 Développement embryonnaire du <i>Caenorhabditis elegans</i>	7
1.3.1 Intercalation dorsale	9
1.3.2 Fermeture ventrale.....	10
1.3.2.1 Les GTPases et la fermeture ventrale.....	11
1.3.3 L'élongation	12
1.3.3.1 Élongation précoce.....	14
1.3.3.2 Élongation tardive	17
1.4 Migration cellulaire et transport vésiculaire.....	17
1.4.1 L'adhésion cellulaire	18
1.4.1.1 Les jonctions serrées	19
1.4.1.2 Les jonctions adhérentes	20
1.4.1.3 Les desmosomes et les hémidesmosomes	20
1.4.1.4 Complexe d'adhésions focales (corps denses)	22
1.4.1.5 Intégrines.....	23
1.4.1.6 Cadhérines.....	24
1.4.2 L'importance d'une régulation dynamique des jonctions.....	25
1.4.3 Membrane cellulaire et mobilité cellulaire	26
1.4.3.1 Incurvation des membranes.....	27

1.4.3.1.1	La composition lipidique des membranes et l'induction de l'incurvation	27
1.4.3.1.2	La composition protéique et l'incurvation membranaire	29
1.4.3.1.3	Cytosquelette et l'incurvation membranaire	29
1.4.3.1.4	Protéines d'échafaudages et la superfamille BAR	29
1.4.3.1.5	Insertion d'hélices α et incurvation de la membrane	30
1.4.4	Incurvation membranaire : recyclage et transport membranaire	30
1.4.4.1	Les protéines F-Bar et le recyclage	31
1.4.5	Le transport vésiculaire et la motilité cellulaire	31
1.4.6	Polarité	33
1.4.6.1	Polarité apicale et basolatérale	34
1.4.6.2	Polarité épithéliale	34
1.4.7	Diacylglycérol	36
1.4.8	Le gène <i>rga-7</i>	37
1.5	Objectifs de l'étude et hypothèses	37
1.5.1	Hypothèses	37
1.5.2	Objectifs	38
1.5.3	Contributions	38
CHAPITRE II		
MATÉRIEL ET MÉTHODES		
2.1	Culture <i>C. elegans</i>	40
2.2	Synchronisation des populations par traitement au NaClO	42
2.3	Croisement des souches de nématode	42
2.4	Congélation des nématodes	42
2.5	Génération et maintien de mâles	43
2.6	Génotypage	43
2.7	Microscopie à 4-dimensions	44
2.8	Extraction de l'ADN plasmidique	45
2.9	Préparation de bactéries électro-compétentes	45
2.10	Électroporation	45

2.11	Purification sur gel	46
2.12	Extraction de l'ARNm	46
2.13	Transcription Reverse et Amplification d'ADNc	47
2.14	Léthalité embryonnaire et larves non-allongées	48
2.15	ARN interférant	48
2.16	Immunomarquage des embryons: Fixation Formaldéhyde.....	49
2.17	Immunomarquage des embryons: Fixation au MeOH	49
2.18	Immunomarquage des embryons: Fixation hybride	50
2.19	Immunomarquage des embryons: Coloration des filaments d'actine.....	50
2.20	Immunomarquage des embryons: Immunodétection	51
2.21	Identification du degré d'homologie de deux séquences protéiques	52
2.22	Prédiction de domaines sur une séquence protéique.....	52
2.23	Statistiques.....	52
2.23.1	Écart type	52
2.23.2	Student T-Test.....	52
2.24	Conception d'ARNi spécifiques à <i>rga-7</i>	53
CHAPITRE III		
RÉSULTATS.....		
3.1	Caractérisation de l'allèle <i>rga-7 (ok1498)</i>	54
3.2	<i>rga-7 (ok1498)</i> exprime un phénotype d'hypercontraction dorsale	54
3.3	<i>rga-7 (ok1498)</i> est impliquée au niveau de l'élongation précoce et tardive.....	56
3.4	<i>rga-7</i> code pour trois transcrits résultant d'une initiation alternative de la transcription.....	57
3.5	Les 3 formes de RGA-7 sont essentielles pour l'élongation de <i>C. elegans</i>	61
3.6	RGA-7 a une activité envers CDC-42, RHO-1 et MIG-2	62
3.6.1	L'activité GAP de RGA-7 <i>in vitro</i>	62
3.6.2	L'activité GAP de RGA-7 <i>in vivo</i>	64
3.7	RGA-7 interagit avec <i>rga-7</i> et <i>pak-1</i>	65
3.8	<i>rga-7</i> et <i>pix-1</i>	67
3.9	Identification de partenaires fonctionnels de <i>rga-7</i>	68

3.10	AJM-1 et RGA-7	69
3.11	La délétion <i>ok1498</i> n'affecte pas la structure ou la localisation des muscles pendant l'élongation	69
3.12	Les animaux <i>rga-7(ok1498)</i> ont des contractions de plus grande amplitude.....	71
3.13	La délétion <i>ok1498</i> n'affecte pas la structure des filaments intermédiaires.....	72
3.14	Étude du profil d'expression de <i>rga-7</i>	73
3.15	Étude du degré d'homologie du domaine GAP et F-Bar entre la protéine RGA-71/RICH1a, RGA-7/RICH1b et RGA-7/PARG1	73
CHAPITRE IV		
	DISCUSSION	75
4.1	Les 3 transcrits de <i>rga-7</i> sont impliqués dans l'élongation précoce et tardive de <i>C. elegans</i>	75
4.2	RGA-7 a une activité GAP spécifique pour CDC-42 <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	77
4.3	RGA-7 est antagoniste à <i>pix-1</i> , <i>pak-1</i> et <i>mrck-1</i> pendant l'élongation embryonnaire.....	78
4.4	Étude du profil d'expression de <i>rga-7</i>	80
4.5	RGA-7 est-il l'orthologue de RICH1 ou de PARG1?	81
4.6	Rôle possible de <i>rga-7</i> dans les mécanismes d'endocytose.....	82
5	CONCLUSIONS	84
6	RÉFÉRENCES	85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
2.1	Liste des souches utilisées ou générées pour cette étude.....	41
2.2	Composition du milieu réactionnel PCR pour le génotypage.....	43
2.3	Programme de la réaction PCR pour le génotypage.....	44
2.4	Composition du milieu réactionnel PCR pour la production d'ADNc.....	47
2.5	Programme pour l'amplification des ORFs de <i>rga-7</i>	48
2.6	Liste des anticorps utilisés.....	51
3.1	Taille des fragments PCR attendues.....	60
3.2	<i>rga-7(ok1498)</i> interagit génétiquement avec <i>pak-1(ARNi)</i>	66
3.3	<i>rga-7</i> possède plusieurs autres interactants possibles tel que prédit par ARNi.....	68
3.4	Degré d'homologie du domaine Rho GAP et F-BAR de RGA-7I, RICH1a, RICH1b et PARG1.....	74

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Cycle de régulation des GTPases Rho.....	2
1.2	Diagramme résumant la fonction des différentes GTPases Rab.....	3
1.3	« crosstalk » des GTPases Rho chez les mammifères.....	6
1.4	Échelle de temps des diverses étapes du développement embryonnaire de <i>C. elegans</i>	8
1.5	Réarrangement (intercalation) des cellules de l'hypoderme dorsal.....	10
1.6	L'hypoderme pendant la fermeture ventrale.....	11
1.7	La polymérisation des filaments d'actine pendant le transport vésiculaire.....	12
1.8	Hypoderme durant l'élongation.....	13
1.9	Répartition des forces de contraction dans les cellules de l'hypoderme dorsal, ventral et latéral pendant l'élongation embryonnaire.....	14
1.10	Les deux voies de signalisation régulant la force de contraction dans l'hypoderme des embryons <i>C. elegans</i>	15
1.11	Les rôles de LET-502, MEL-11, PAK-1 et MRCK-1 pendant l'élongation embryonnaire de <i>C. elegans</i>	16
1.12	Les complexes d'adhésion chez <i>C. elegans</i>	19
1.13	Représentation structurelle des desmosomes chez les mammifères.....	21
1.14	Comparaison des sites d'adhésion focaux mammifères et les corps denses chez <i>C. elegans</i>	22
1.15	Représentation de jonctions serrées chez <i>C. elegans</i>	25
1.16	Mécanismes de modification membranaire affectant le degré d'incurvation.....	28
1.17	Cellule migrant sur un substrat de matrice extracellulaire.....	32
1.18	Deux cellules forment un nouveau contact par l'entremise de Src et PI3K pour permettre la formation d'une polarité.....	35
1.19	Modèle démontrant le changement de conformation induit par la fixation du DAG par un domaine C1 d'une protéine chimérique GAP.....	37
3.1	L'allèle <i>ok1498</i> est associé à un phénotype d'hypercontraction dorsale..	55
3.2	Temps requis pour l'élongation entre le stade comma et 1.75x.....	56

3.3	Temps requis pour l'élongation entre le stade 1.75x et 3x	57
3.4	Le gène <i>rga-7</i> possède 3 transcrits résultant d'une initiation alternative de la transcription.....	58
3.5	Les transcrits de <i>rga-7</i> possède tous le domaine GAP et C1	59
3.6	Les 3 formes protéiques de RGA-7 sont requises pour l'élongation de <i>C. elegans</i>	62
3.7	RGA-7 a une forte activité GAP envers CDC-42 et faible envers MIG-2 et RHO-1	63
3.8	<i>cdc-42</i> et <i>rga-7</i> sont antagonistes pendant l'élongation, mais <i>rga-7</i> n'interagit pas génétiquement avec <i>mig-2</i>	65
3.9	Létalité embryonnaire des souches <i>rga-7(ok1498)</i> , <i>pix(gk416)</i> et <i>rga-7(ok1498); pix(gk416)</i>	67
3.10	La délétion <i>ok1498</i> n'affecte pas la localisation ou la structure des jonctions adhérentes DLG-1/AJM-1	69
3.11	<i>rga-7(ok1498)</i> n'affecte ni la localisation ni la structure des muscles.....	70
3.12	L'amplitude des contractions des animaux <i>rga-7(ok1498)</i> est significativement plus élevée que l'amplitude des contractions des animaux sauvages	71
3.13	<i>rga-7(ok1498)</i> n'affecte ni la localisation ni la structure des filaments intermédiaires	72
4.1	Modèle des voies de signalisation contrôlant l'élongation embryonnaire de <i>C. elegans</i> selon nos résultats et les données de la littérature.....	80

LISTE DES SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique codant
AJM-1	Apical junction molecule
aPKC	Atypical protein kinase C
ARN	acide ribonucléique
ARNi	Acide ribonucléique interférent
ARP2/3	Actin-Related Proteins
Bar	Bin-Amphiphysin-Rvs
C1	Phorbol esters/diacylglycerol binding domain
CDC-42	Cell division control protein 42 homolog
CFB	Circumferential actin filament bundle
CIP4	Cdc42-interacting protein 4
COP I	Coat <i>protein1</i>
DAG	Diacylglycérol
DLG- 1	Discs Large protein
Dpy	DumPY phenotype (plus petit que les animaux sauvages)
EC1	Extracellular cadherin domain
E-cadhérine	Cadhérine épithéliale
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EFN1/4	Éphrine 1 et 4
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
Emb	Phénotype de létalité embryonnaire
ES	Egg salt
EST	Expressed sequence tag
FRET	Förster resonance energy transfer
GAP	GTPase-activating protein
GDI	GDP-dissociation inhibitor

GDP	Guanine bi-phosphate
GEF	Guanine-exchange factor
GFP	Protéine fluorescente verte
GIT	G protein coupled receptor kinase interactor
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanine tri-phosphate
HMP	Haemoglobin-like <i>protein</i>
HMR	Haemoglobin-like <i>receptor</i>
INA-1	Intégrine Alpha (<i>C. elegans</i>)
IP3	Inositol-1-4-5-triphosphate
LB	Milieu de culture Luria-Bertani
Lva	Phenotype d'arrêt larvaire
M9	Milieu minimal M9
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MeI-11	Maternal effect lethal
MeOH	Méthanol
MLC-4	Myosin light chain 4
MRCK-1	Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase
NGM	Nematode Growth Media
Nls	Séquence de localisation nucléaire
Nmy-1	Non-muscular myosine 1
PAK-1	P21-activated kinase
PAR	Partitioning-defective polarity
PARG1	PTPL-associated RhoGap
PAT-2	The proton/amino acid cotransporter 2
PBS	Solution tampon phosphate
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol diphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol triphosphate
PIX-1	PAK interacting exchange factor

PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAN	RAs-related Nuclear protein
RAP	Ras-related proteins
RGA-7	Rho GAP associated protein
RHO	Ras Homologous GTPase
TAE	Tris-acetate-EDTA buffer
TEA	Trans epidermal attachment
TOCA	Transducer of Cdc42 dependent actin assembly
TY	Milieu Tryptone-yeast extract
UNC-73	<i>UNCoordinated</i>
VCA	Verprolin, central acidic
WASP	Wiskott Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP family Verprolin-homologous
ZO	Zonula Occludens protein

RÉSUMÉ

L'élongation embryonnaire contrôle la transformation embryonnaire de *C. elegans* qui passe d'un embryon ovoïde à une larve vermiforme. C'est un modèle idéal pour la dissection de voies de signalisation qui contrôlent la morphogénèse des tissus et l'intégration de ces signaux dans les diverses couches cellulaires. L'élongation peut être divisée en deux parties : l'élongation précoce qui implique la contraction de l'hypoderme, alors que l'élongation tardive implique l'action synergique des muscles et de l'hypoderme. La contraction des filaments d'actines est régulée par le niveau de phosphorylation des chaînes légères de la myosine (*mlc-4*).

Les GTPases Rho sont des protéines de signalisation régulées par l'action de 3 familles protéiques : les « GTPase-activating proteins » (GAPs), les « Guanine nucléotide exchange factors » (GEFs) et les « Guanine nucléotide dissociation inhibitors » (GDI). Les GTPases Rho contrôlent un large éventail de processus biologiques. Il y a trois GTPases Rho qui contrôlent l'élongation de *C. elegans*. Notre laboratoire a identifié une quatrième GTPase contrôlant l'élongation, CDC-42 et son régulateur, RGA-7. CDC-42 a été associée à la polymérisation de filaments d'actines dans les événements de polarisation, de migration et de trafic membranaire (Harris KP. et Ulrich Tepass U., 2010).

Nos résultats suggèrent que le gène *rga-7* coderait pour trois formes protéiques résultant d'une initiation alternative de la transcription et que ces trois protéines seraient impliquées dans le contrôle de l'élongation. La délétion *ok1498* induit un phénotype de létalité embryonnaire ayant une pénétrance variant entre 25 et 30%. Cette létalité est le résultat d'hypercontractions dorsales pendant l'élongation. L'activité catalytique du domaine GAP de *rga-7* a révélée une affinité élevée pour la GTPases CDC-42 et faible pour les GTPases RHO-1 et MIG-2. Des analyses d'épistasies suggèrent que *rga-7* contrôlerait l'activité de *cdc-42* ainsi que de ses effecteurs *wsp-1* et *mrck-1* au cours de l'élongation. Nous émettons l'hypothèse que *rga-7* pourrait contrôler la dynamique du recyclage des jonctions adhérentes (cadhérines) comme son orthologue humain probable PARG1, hypothèse que nous testerons lors d'études subséquentes.

Mots Clés : RGA-7, élongation, CDC-42, endocytose, GTPases, signalisation cellulaire, développement embryonnaire, filaments d'actine, jonctions adhérentes.

CHAPITRE I

REVUE DE LA LITTÉRATURE ET INTRODUCTION À L'ÉTUDE

1.1. GTPASE

1.1.1. PROPRIÉTÉ DES GTPASES ET LEURS RÉGULATEURS

Les GTPases monomériques sont des protéines qui cyclent entre une forme active et inactive. Elles sont considérées comme des commutateurs moléculaires permettant l'intégration de plusieurs voies de signalisation. Sous forme active, les GTPases sont liées à une molécule de GTP et sous forme inactive elles sont liées à une molécule de GDP. Ces protéines portent une modification lipidique à leur extrémité carboxyl leur permettant un ancrage dans les membranes biologiques. Il existe trois classes de protéines qui régulent les GTPases: les GAPs (GTPase-activating protein), les GEFs (Guanine nucléotide-exchange factors) et les GDIs (Guanine nucleotide-dissociation inhibitors) (Fig. 1-1). Les GTPases ont une faible activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP leur permettant de s'auto-inactiver. Cependant, les GAPs catalysent et augmentent cette activité. Les GEFs activent les GTPases en catalysant l'échange du GDP par un GTP et les GDIs séquestrent les GTPases dans le cytosol et les conservent sous forme inactive. Cette séquestration implique l'interaction du domaine lipidique de la GTPase ce qui inhibe son interaction avec les membranes.

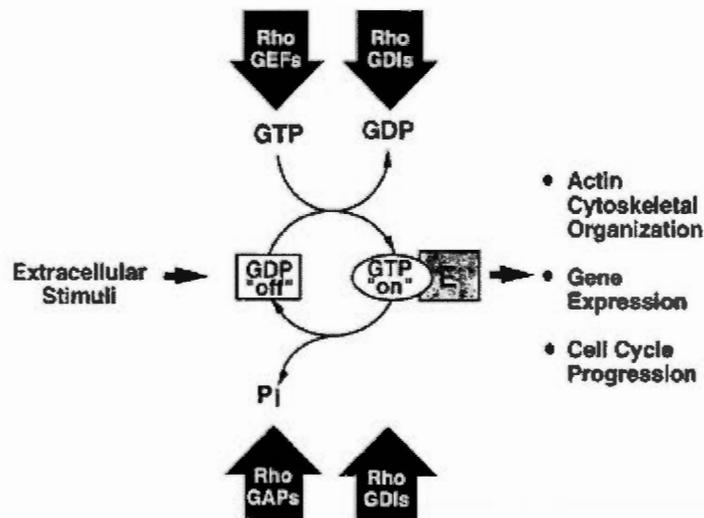


Figure 1-1 : Cycle de régulation des GTPases Rho. Les GTPases Rho cyclent entre les formes actives et inactives par hydrolyse du GTP en GDP. Cette hydrolyse est catalysée par les GAPs (GTPase Activating Protein). Les GEFs (Guanine nucléotide- exchange factor) permettent l'échange du GDP pour un GTP. Les GDIs (Guanine-nucléotide Dissociation Inhibitors) empêchent la localisation membranaire des GTPases Rho en interagissant avec le domaine lipidique (Zohn *et al.*, 1988)

La superfamille des GTPases Ras est divisée en cinq sous familles : Ran, Rab, Arf, Ras et Rho (Fig.1-2). Les GTPases Ran (Ras-related nuclear protein) jouent un rôle important dans le contrôle du transport nucléocytoplasmique. (Ly *et al.*, 2010). Les GTPases Rab sont reconnues pour leur implication au niveau du transport vésiculaire (Fig.1-2) (Brighouse, 2010).

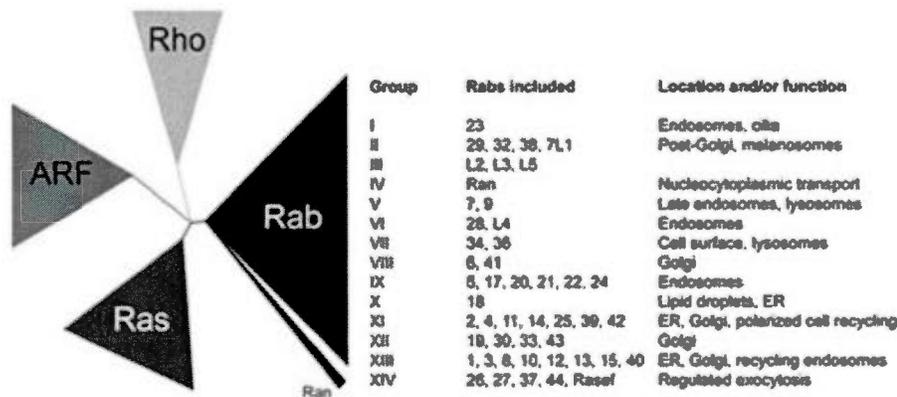


Figure 1-2 : Diagramme résumant la fonction des différentes GTPases Rab. Les GTPases Rab sont divisées en 14 groupes ayant des fonctions ou localisations différentes. Les numéros indiquent les GTPases Rab appartenant à ce groupe (Ex : groupe I, Rab 23). Globalement, les GTPases Rab contrôlent le transport de vésicules entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Elles contrôlent également le tri vésiculaire vers le Golgi ainsi que les endosomes de recyclage (Brighthouse A., 2010).

Les GTPases Arf régulent le bourgeonnement des vésicules et la dynamique du cytosquelette d'actine pendant le transport vésiculaire (Radhakrishna et al, 1999). Les GTPases Ras sont activées, entre autre, en aval du récepteur EGF et activent la cascade de signalisation MAPK contrôlant la prolifération cellulaire. L'implication des Ras dans la prolifération cellulaire et la cancérogénèse a été largement étudiée suite à la découverte d'un mutant Ras constitutivement actif induisant l'immortalisation et la prolifération des cellules (Cox et Der, 2010).

Les Ras HOmologous (Rho) ont été identifiées chez *Alypsia*, un escargot marin (Cox et Der, 2010). Depuis la dernière décennie, les GTPases Rho ont gagné en popularité. Ce gain d'intérêt est expliqué par les fonctions essentielles des GTPases Rho, au niveau de l'organisation du cytosquelette d'actine, de la régulation de l'expression génique, du trafic membranaire et de la prolifération cellulaire incluant l'apoptose (Zohn *et al.*, 1998; Burrige *et al.*, 2004). De plus, cinq GTPases RHO ont été identifiées comme étant des régulateurs de la transformation oncogénique impliquant Ras (Cox et Der, 2010).

1.1.2. GTPASE RHO

La sous famille des GTPases Rho régule plusieurs évènements cellulaires incluant le remodelage du cytosquelette, la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire (Nobes *et al.*, 1995; Takai, 2001). Les GTPases Rho sont particulièrement reconnues pour leur implication dans la dynamique du cytosquelette d'actine. En effet, elles ont été associées à la formation des fibres de stress, des lamellipodes, des filopodes et dans l'assemblage des complexes d'adhésions focaux (Boulter *et al.*, 2011).

Les GTPases Rho effectuent leur action au niveau des membranes cellulaires et sont associées à celles-ci par l'entremise des modifications lipidiques situées à l'extrémité Carboxyl. Ces modifications sont de type palmitoylation, géranylgeranylation et farnésylation (Pechlivanis *et al.*, 2006). Chez les mammifères, 14 GTPases Rho ont été identifiées (RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE/Rnd3, Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, RhoG, Rac1, Rac2, Rac3, Cdc42, TC10 et TTF). La majorité de nos connaissances sur les GTPases Rho découlent des études sur RhoA, Rac1 et Cdc-42 qui possèdent des fonctions différentes (Fig. 1-3). Dans le nématode *C. elegans*, six GTPases Rho ont été identifiées (RHO1, RAC2, CDC42, CED10, MIG-2 et CRP-1) (Burrige *et al.*, 2004). Les GTPases Rho possèdent une très bonne homologie et varient principalement au niveau de leurs sites de liaisons aux effecteurs. Ceci leur permet de moduler des voies de signalisation différentes (Zohn *et al.*, 1998).

1.1.3. COORDINATION DES GTPASES ET « CROSSTALK »

Les GTPases sont impliquées dans plusieurs voies de signalisation différentes au sein d'une même cellule. En effet, la spécificité de signalisation est dictée par les partenaires d'interaction et la localisation subcellulaire de ces complexes protéiques. En général, une multitude de GTPases interviennent dans un même processus, souvent en parallèle, ce qui complexifie davantage la dissection des voies de signalisation (Boulter *et al.*, 2011). Quoiqu'il en soit, les diverses études sur les GTPases Rho se concentrent sur la compréhension des mécanismes biochimiques permettant le contrôle d'un grand nombre de

processus cellulaires divers au sein d'une même cellule (Zohn *et al.*, 1998; Burridge *et al.*, 2004).

Les GTPases de la superfamille des Ras sont activées par les contacts cellulaires dépendant des cadhérines. Les interactions homophiliques entre les E-cadhérines activent plusieurs GTPases incluant Rac1, RhoA et Rap1 (Fukuyama *et al.*, 2005). Donc un seul récepteur peut activer plusieurs GTPases. Cependant, une question cruciale demeure sans réponse : Est-ce que les GTPases sont activées en parallèle ou de façon séquentielle (cascade de signalisation)? Il a été démontré que Rho et Rac peuvent être activées parallèlement, alors que l'adhésion dépendante des nectines active Rap1, Cdc42 et Rac1 de façon séquentielle (Fukuyama *et al.*, 2005). Il est possible que l'activation des différentes GTPases se fasse dans un contexte cellulaire différent pour efficacement intégrer les différents signaux cellulaires impliqués dans le contrôle des fonctions biologiques (Fig.1-3). En effet, les GTPases Rho contrôlent les voies de signalisation qui régulent le cytosquelette d'actine (Lecuit et Sonnenberg, 2011; Brooke *et al.*, 2011). Rac1 et RhoA sont activées en aval des récepteurs couplés aux petites protéines G soit les récepteurs tyrosine kinase ou les intégrines. Il y a deux voies de signalisation impliquant les GTPases de la superfamille des Ras dans la réorganisation du cytosquelette. La première débute par l'activation de Rac1 par Ras suivi de l'activation de RhoA par Rac1. La deuxième implique l'activation de Rac1 et RhoA par Cdc42 (Fukuyama *et al.*, 2005). Ces deux voies de signalisation suggèrent un « crosstalk » important entre les GTPases pour permettre la coordination des mécanismes permettant la réorganisation du cytosquelette. Les approches utilisant les biosenseurs comme les technologies à base de protéines fluorescentes vertes (GFP) et transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) permettent d'obtenir de précieuses informations sur la base moléculaire et l'aspect dynamique du « crosstalk » entre les GTPases (Lecuit et Sonnenberg, 2011; Brooke *et al.*, 2011).

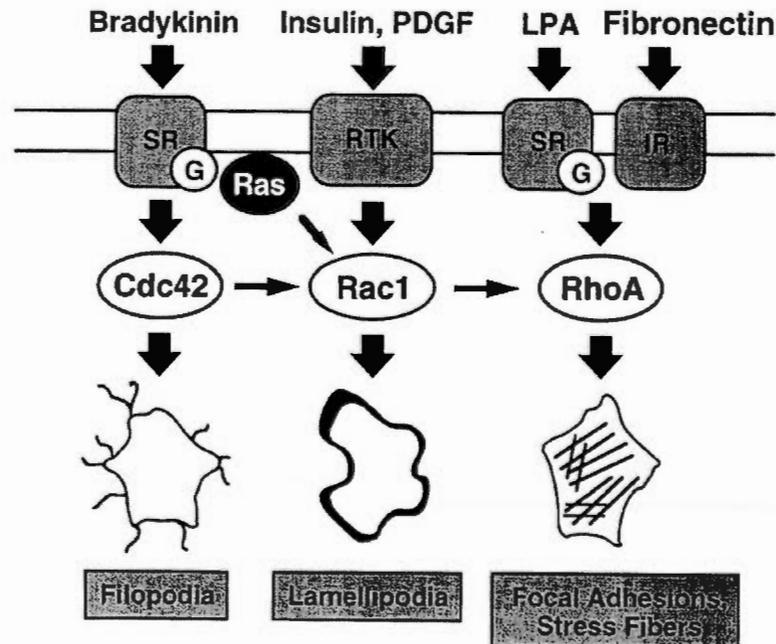


Figure 1-3: « crosstalk » des GTPases Rho chez les mammifères. Les GTPases CDC-42, RAC-1 et RHOA sont activées respectivement par les récepteurs : les récepteurs « scavenger » couplés aux petites protéines G, les récepteurs tyrosine kinase et les récepteurs insulines.

Les GTPases sont activées de façon séquentielle et en parallèle. Cdc42 permet la formation de filopodes. Rac1 permet la formation de lamellipodes et RhoA permet formation et le maintien des sites d'adhésion focaux (Zohn *et al.*, 1998).

1.2. LES GTPASES CHEZ C. ELEGANS

Le nématode *C. elegans* possède 56 GTPases Ras dans son génome. Les GTPases Ras et Rho ont été largement étudiées pendant le développement embryonnaire, mais les autres GTPases demeurent non-caractérisées dans ce contexte. Plus précisément, la famille Ras/Rap/Ral est composée de 11 membres. *let-60*, l'homologue de K-Ras, a été identifié comme étant impliqué dans le développement de la vulve (Beitel *et al.*, 1990; Ferguson and Horvitz, 1985; Ferguson *et al.*, 1987; Han *et al.*, 1990). Les trois GTPases Rap (*rap-1*, *rap-2*

et *rap-3*) sont impliquées dans la morphogénèse de l'hypoderme incluant la formation de jonctions serrées, la sécrétion de la cuticule et le maintien de l'intégrité de l'hypoderme (Berkel *et al.*, 2005).

Chez le nématode *C. elegans*, six GTPases Rho ont été identifiées (*rho1*, *rac-2*, *cdc-42*, *ced-10*, *mig-2* et *crp-1*). Toutes ces GTPases, à l'exception de *crp-1* ont été impliqués à diverses étapes du développement embryonnaire de *C. elegans* (Lundquist, 2006). Une certaine redondance fonctionnelle a été observée entre les GTPases de type Rac (*ced-10*, *rac-2* et *mig-2*) lors de la migration cellulaire alors que *cdc-42* et *rho-1* auraient des rôles distincts (Berkel *et al.*, 2005).

1.3. DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU CAENORHABDITIS ELEGANS

Le développement embryonnaire de *C. elegans* permet la génération des différents types cellulaires et leur organisation en tissus fonctionnels. Cette organisation en tissu nécessite une régulation spatio-temporelle précise et robuste des processus de migration, de modification de la morphologie, d'adhérence et de différenciation cellulaire (Chisholm *et al.*, 2005).

Ce développement peut être divisé en deux étapes : la prolifération cellulaire qui englobe la différenciation cellulaire et la migration cellulaire, alors que la morphogénèse englobe la formation de structures, l'apoptose et la réorganisation des cellules différenciées en tissus fonctionnels (Chisholm *et al.*, 2005).

Une échelle du temps représentant les diverses étapes du développement embryonnaire de *C. elegans* est illustrée dans la figure 1-4. Initialement, il y a prolifération suivi d'une différenciation des cellules précurseurs des divers tissus. Suite à l'apparition des cellules de l'hypoderme, une étape appelée fermeture de la fente ventrale permet d'internaliser les neuroblastes. Cette étape est suivie d'une migration des cellules de l'hypoderme situées au niveau de la partie dorsale vers la zone ventrale de l'embryon. Ces deux étapes du développement permettent de structurer l'hypoderme et ainsi permettent l'élongation qui amène l'embryon à adopter une forme vermiforme. Ce processus morphogénique implique une réduction de la circonférence des embryons forçant une

élongation longitudinale. Finalement, la sécrétion de la cuticule, une enveloppe externe rigide, débute après la complétion de l'élongation, mais avant l'éclosion des œufs. (Chisholm *et al.*, 2005)

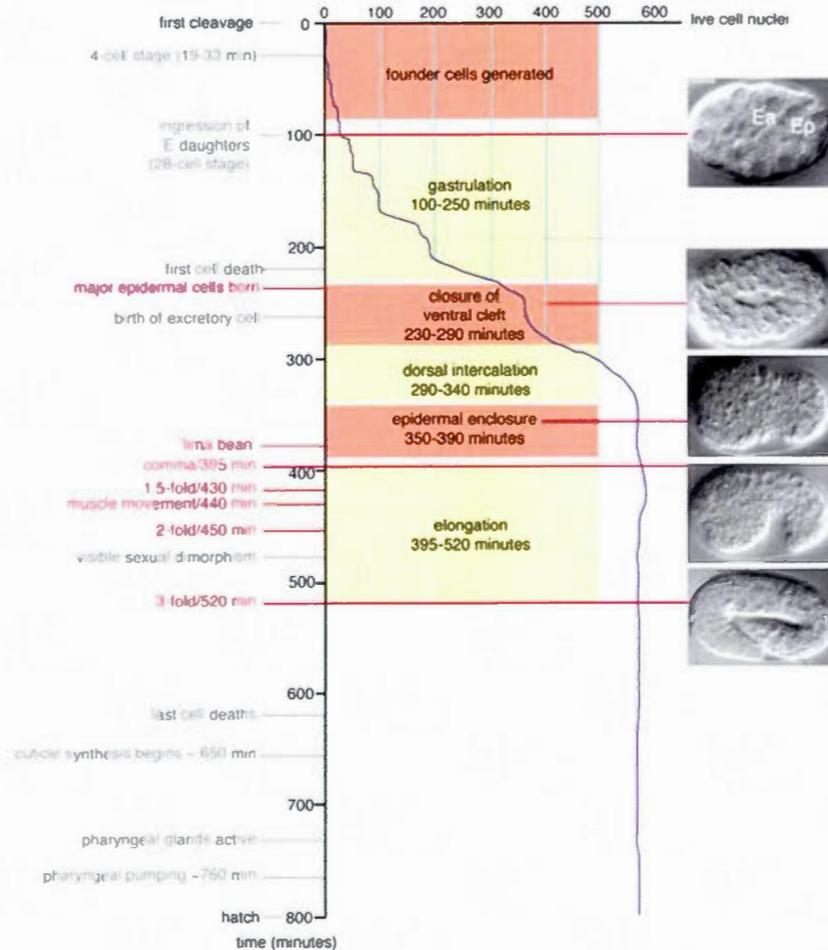


Figure 1-4 : Échelle de temps des diverses étapes du développement embryonnaire de *C. elegans*. Prolifération des cellules (0 à 300 minutes). Fermeture de la fente ventrale (ventral cleft enclosure). Intercalation dorsale (Dorsal intercalation). Fermeture ventrale (epidermal enclosure). Élongation. À la droite : une image du nématode à différentes les étapes du développement embryonnaire (Chisholm *et al.*, 2005).

Au cours de la prolifération cellulaire, les cellules vont subir une différenciation partielle leur permettant d'adopter un destin cellulaire précis. Cette différenciation a largement été étudiée chez le *C. elegans*. Le destin cellulaire dépend de la position et du gradient de plusieurs protéines et facteurs de transcription (Harris and Ulrich Tepass, 2010).

La morphogénèse de l'embryon chez *C. elegans* est principalement contrôlée par le développement de la monocouche de cellules épidermales, l'hypoderme. Cette morphogénèse implique les interactions cellules-cellules dans l'hypoderme et entre l'hypoderme et les muscles, ainsi que l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire. De plus, le développement des muscles connectés à l'hypoderme et au système nerveux est une étape cruciale du développement embryonnaire (Chisholm *et al.*, 2005). La prolifération des cellules hypodermes se produit au niveau dorsal de l'embryon.

1.3.1. INTERCALATION DORSALE

Suite à la différenciation, deux rangées de cellules de l'hypoderme s'organisent les unes par rapport aux autres. Ce processus est nommé intercalation dorsale (Fig. 1-5 A). L'intercalation dorsale consiste en la migration des deux rangées de cellules de l'hypoderme pour former une seule rangée (Chisholm *et al.*, 2005). Des protrusions sont formées et les cellules s'allongent jusqu'à l'atteinte de la couche d'hypoderme latérale opposée (Fig.1-5 B, C et D). Les mécanismes contrôlant l'intercalation dorsale demeurent obscurs cependant les filaments d'actine et les microtubules sont requis (Williams-Masson *et al.*, 1998). On peut donc supposer une implication des GTPases Rho puisque seulement deux gènes ont été associés à l'intercalation dorsale : *gex-2* et *gex-3*, des protéines interagissant avec *gex-1* et les GTPases Rho (Severson *et al.*, 2002).

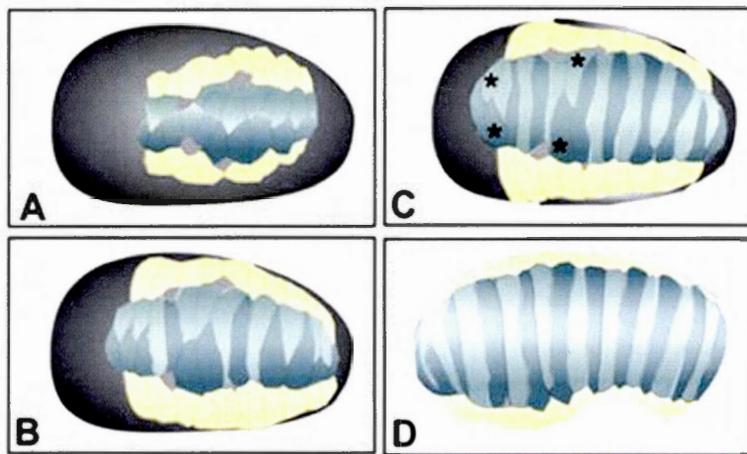


Figure 1-5 : Réarrangement (intercalation) des cellules de l'hypoderme dorsal. (A) Cellules hypodermales en bleu et bleu foncés. (B) Début de la migration des cellules vers le centre (C) Intercalation partielle (D) Intercalation complète (Chisholm *et al.*, 2005).

1.3.2. FERMETURE VENTRALE

La fermeture ventrale débute peu de temps après le début de l'intercalation dorsale. Ce processus complète l'étanchéité de la monocouche de l'hypoderme. La fermeture ventrale est divisée en deux étapes. Initialement, une paire de cellules antérieures ou « cellules guidantes » forment de longues protrusions, les filopodes (Fig.1-6 B) et migrent vers la zone ventrale (Fig. 1-6 A). Suite à cette migration aux extrémités des filopodes, il y a formation de jonctions serrées. Cette paire de cellules dirige la migration des autres cellules situées de façon plus postérieure au cours de la deuxième étape ce qui permet la fermeture complète de la pochette ventrale (Fig.1-6 C et D) (Chisholm *et al.*, 2005). Les protéines impliquées dans ce processus sont EFN1/4 deux récepteurs de l'éphrine, les molécules d'adhésion (cadhérine, caténine, etc) et les protéines permettant le contrôle du cytosquelette incluant la GTPase Rho CED-10 et ses interactants (Chisholm *et al.*, 2005). Ces deux cellules guidantes permettraient d'entraîner les cellules voisines en communiquant les forces mécaniques de la migration via les jonctions adhérentes dépendantes des cadhérines (Chisholm *et al.*, 2005).

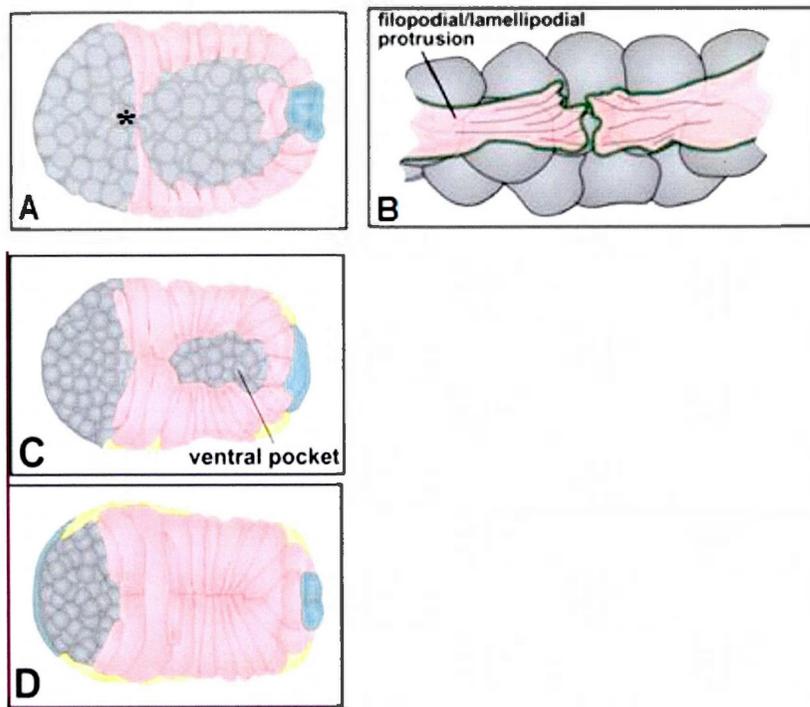


Figure 1-6 : L'hypoderme pendant la fermeture ventrale. (A) Migration de la paire de cellules guidantes (*) (B) Formation de filopodes (C) Représentation de la pochette ventrale, les cellules de l'hypoderme en migration (D) Fermeture complète, formation de jonctions aux nouveaux points de contacts des cellules (Chisholm *et al.*, 2005).

1.3.2.1. LES GTPASES ET LA FERMETURE VENTRALE

La fermeture ventrale est contrôlée par WSP-1, l'homologue de la protéine Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). Cette protéine est un effecteur de la GTPase CDC-42 qui active le complexe Arp2/3 par interaction du domaine VCA (Fig. 1-7). Le complexe Arp2/3 permet la nucléation rapide des filaments d'actine (Pollitt *et al.*, 2009; Fernando *et al.*, 2009; Kurisu *et al.*, 2010). La mutation de *wsp-1* entraîne une faible létalité embryonnaire causée par un échec de la migration des cellules hypodermes (Withee *et al.*, 2004). L'activité de WSP-1 est régulée par la forme active de CDC-42. En effet, la liaison de CDC-42 sur le domaine CRIB de WSP-1 induit un changement de conformation libérant le domaine VCA

qui peut ensuite activer le complexe Arp2/3 et induire la polymérisation des filaments d'actine pour permettre la migration cellulaire. (Fig. 1-7) (Kurusu *et al.*, 2009).

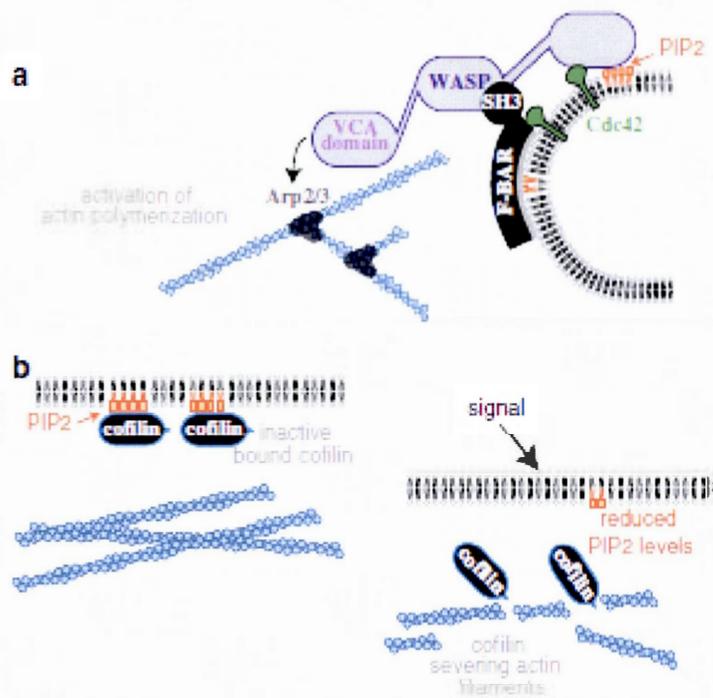


Figure 1-7 : La polymérisation des filaments d'actine pendant le transport vésiculaire. **(A)** PIP2 un lipide de signalisation et CDC-42 GTP recrute la protéine WASP-1 qui régule la polymérisation d'actine par l'entremise de ARP2/3 le complexe de nucléation d'actine. **(B)** Le blocage de PIP2 par la cofiline permettrait un rétrocontrôle rapide (Keren, 2011).

1.3.3. L'ÉLONGATION

L'élongation est l'étape finale du développement embryonnaire de *C. elegans* qui permet aux embryons ovoïdes d'adopter une forme vermiforme. Les embryons subissent une réduction de leur circonférence de trois fois et subissent une élongation longitudinale de 4 fois (Fig. 1-8). Les forces permettant l'élongation proviennent des cellules hypodermales par l'entremise des filaments d'actines circonférentiels (CFB) attachés aux jonctions adhérentes cadhérines qui sont situées aux pôles apicaux des cellules (Fig.1-9). Ces filaments d'actines

sont couplés à l'appareil de contraction actine-myosine qui permet leur déplacement les uns par rapport aux autres, et donc le rapprochement des jonctions (Fig. 1-8) (Chisholm *et al.*, 2005).

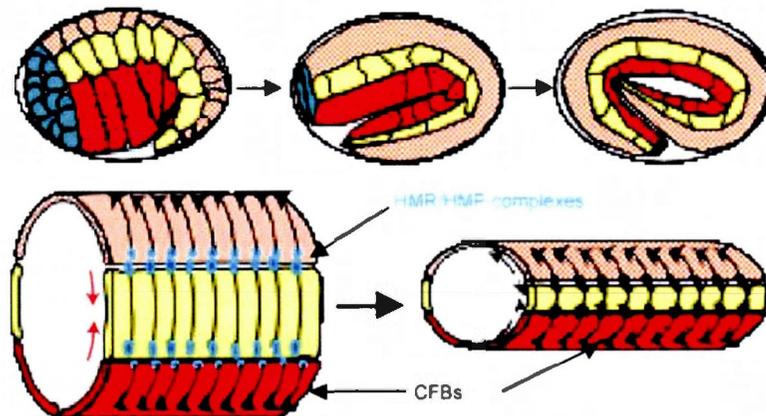


Figure 1-8 : Hypoderme durant l'élongation. L'hypoderme latéral (en jaune) subit une contraction pendant que les cellules de l'hypoderme dorsal et ventral (rose et rouge) sont dans un état relâché. La force de contraction de l'hypoderme latéral est générée par les filaments d'actines circonférentiels couplés aux myosines (Image tiré du laboratoire Sarah Jenna).

Cette contraction est soumise à une régulation stricte. Les CFBs s'organisent rapidement au niveau de la membrane apicale des cellules de l'hypoderme qui sont de trois types: ventral, dorsal et latéral (Fig.1-8). De plus, les microtubules s'organisent au même moment que les filaments d'actines et sont également essentiels à l'élongation. (Costa *et al.*, 1997 ; Costa *et al.*, 1998 ; Priess *et al.*, 1986; Williams-Masson *et al.*, 1997). Cette organisation des filaments d'actines ne persiste pas après l'élongation (Costa *et al.*, 1997; Williams-Masson *et al.*, 1997). Le processus d'élongation est divisé en deux parties : l'élongation précoce et l'élongation tardive.

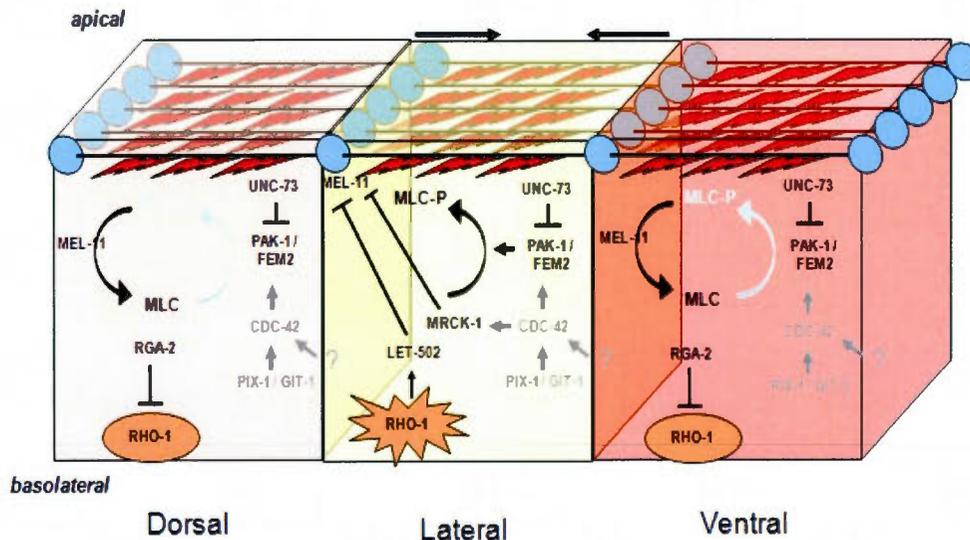


Figure 1-9 : Répartition des forces de contraction dans les cellules de l'hypoderme dorsal, ventral et latéral pendant l'élongation embryonnaire. Les cellules latérales ont deux voies de signalisation active permettant la contraction de l'appareil actine-myosine via la phosphorylation de MLC-4 : la voie de RHO-1/LET-502 et la voie de PAK-1/MEL-11, un effecteur probable de CDC-42. Dans les cellules dorsales et ventrales, la voie de RHO-1 est inhibée par l'action de la GAP RGA-2. L'hypoderme dorsal et ventral seraient dans un état plus relâchés. Les forces de contraction de l'appareil actine-myosine sont transmises par les jonctions adhérentes cadhérines dépendantes (Image tiré du laboratoire Sarah Jenna).

1.3.3.1. ÉLONGATION PRÉCOCE

Cette étape de l'élongation englobe le développement entre le stade « virgule » et le stade « deux fois ». Elle consiste en la réduction de la circonférence au niveau de l'hypoderme latéral grâce à la force de contraction générée par la machinerie actine-myosine.

La force de contraction est contrôlée par l'action de deux GTPases : RHO-1 et MIG-2. RHO-1 active LET-502 qui est une kinase régulatrice des chaînes légères de myosine MLC-4, et MIG-2 régule le niveau d'activation de la phosphatase spécifique de MLC-4,

MEL-11 (Fig. 1-10) (Shelton *et al.*, 1999; Lundquist *et al.*, 2006). Ces deux voies de signalisation forment un équilibre dictant la force de contraction générée par les CFBs (Fig.1-10). Cette architecture des voies de signalisation permet une force de contraction différente pour chaque section de l'hypoderme. En effet, l'hypoderme latéral des embryons a une force de contraction élevée, alors que l'hypoderme ventral et dorsal sont sous forme relâché (Chisholm, 2005).

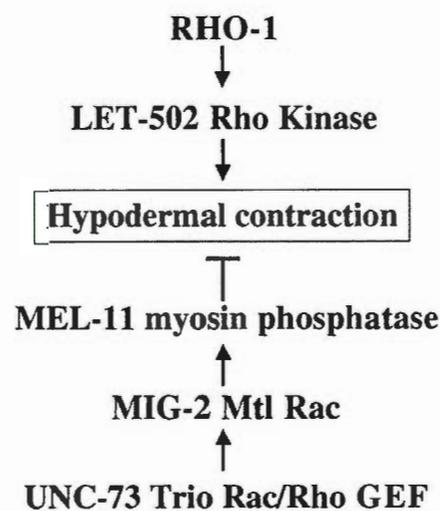


Figure 1-10 : Les deux voies de signalisation régulant la force de contraction dans l'hypoderme des embryons *C. elegans* (Lundquist *et al.*, 2006). Voie activatrice de RHO-1/LET-502 et voie inhibitrice MIG-2/MEL-11.

Le double mutant null *mel-11* et *let-502* s'allonge normalement, ce qui suggère qu'une voie de signalisation parallèle à RHO-1 et MIG-2 contrôle l'élongation précoce. (Chisholm, 2005). Cette voie parallèle inclut la kinase PAK-1 (p21-activated kinase) et la phosphatase FEM-2. FEM-2 est une phosphatase qui est impliquée dans la détermination du sexe (Piekny, et al, 2000). PAK-1 est une kinase sérine/thréonine centrale pouvant directement phosphoryler MLC-4 (Fig.1-11). De plus, MRCK-1 a été identifiée comme une kinase de MEL-11 enrichie dans l'hypoderme latéral (Gally *et al.*, 2009). Cependant, les interactions génétiques indiquent qu'il y aurait une autre voie de signalisation contrôlant la

contraction myosine-dépendante (Gally *et al.*, 2009). Chez les mammifères, PAK-1 est un effecteur de CDC-42 et RAC1 et il interagit également avec PIX-1 (Ong *et al.*, 2011). NMY-1 et NMY-2, deux myosines à chaîne lourde non-musculaires, sont régulées par l'action de MLC-4 (Piekny *et al.*, 2003) qui est elle-même régulée par 3 voies de signalisation : la voie de PAK-1, la voie LET-502 et la voie parallèle inconnue (Piekny, *et al.*, 2000 et 2003; Costa *et al.*, 1997 ; Costa *et al.*, 1998 ; Priess *et al.*, 1986; Williams-Masson *et al.*, 1997). Le laboratoire du Dr Jenna a récemment montré que PIX-1 contrôlerait l'élongation précoce en parallèle de LET-502 et MEL-11 (Harel *et al.*, En préparation).

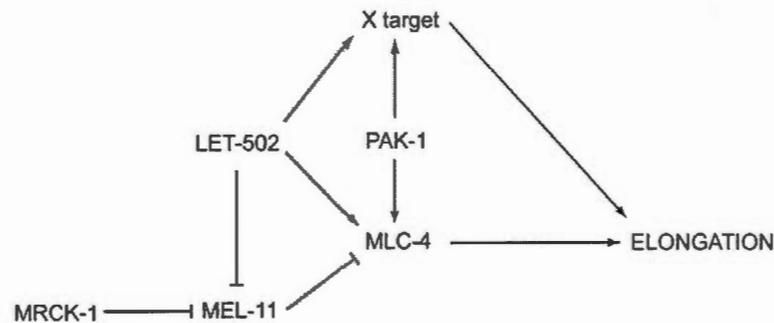


Figure 1-11 : Les rôles de LET-502, MEL-11, PAK-1 et MRCK-1 pendant l'élongation embryonnaire de *C. elegans* (Gally *et al.*, 2009). MEL-11 réduit le niveau de phosphorylation de MLC-4 et est inhibé par l'action kinase de LET-502 et MRCK-1. LET-502 et PAK-1 phosphorylent directement MLC-4.

La coordination des forces de contractions nécessite l'interaction des CFBs avec les jonctions adhérentes (Chisholm, 2005). En effet, la mutation des gènes formant le cœur des complexes cadhérines-caténines (*hmp-1*, *hmp-2* et *hmr-1*) induit le phénotype Hmr et Hmp (Hammerhead et Humpback). Les embryons Hmp et Hmr sont mal allongés et ce défaut morphologique est associé au détachement du cytosquelette d'actine des complexes d'adhérence cadhérines (Costa *et al.*, 1998; Pettitt *et al.*, 2003).

1.3.3.2. ÉLONGATION TARDIVE

L'élongation tardive intègre les contractions musculaires et la contraction de l'hypoderme latéral pour compléter l'élongation des embryons. Les muscles situés sous les cellules de l'hypoderme latéral au stade « virgule » migrent latéralement pour se positionner sous les cellules de l'hypoderme ventral et dorsal. Au stade 1,75X, ils ont établi des connexions solides avec ces cellules par l'entremise des hémidesmosomes ou structures d'attachement Trans-épidermales (TEA). Les hémidesmosomes servent de point d'ancrage aux filaments intermédiaires qui traversent les cellules de l'hypoderme et s'attachent à des structures communiquant avec la cuticule à la membrane apicale de l'hypoderme (Gally *et al.*, 2009). Ces structures composées de filaments intermédiaires ne sont pas seulement des structures d'attachement, mais aussi des structures senseurs des forces mécaniques résultant de la contraction des muscles et leur transduction en signal chimique contrôlant celle des cellules de l'hypoderme (Zhang *et al.*, 2011). La transmission de ces signaux cellulaires se fait par l'entremise de la GTPase CED-10, la kinase PAK-1 et le complexe GIT-1/PIX-1 (Zhang *et al.*, 2011). Dans cette voie de signalisation, PAK-1 contrôlerait la transduction du signal mécanique provenant des muscles/TEAs en signal chimique par phosphorylation des filaments intermédiaires des TEAs (Zhang *et al.*, 2011). La réorganisation des TEAs est altérée lorsqu'il n'y a pas de tension musculaire (Zhang *et al.*, 2011). Les muscles seraient donc impliqués dans la transduction des forces mécaniques de l'hypoderme vers la cuticule par l'entremise des TEAs soumis à une tension musculaire (Chisholm, 2005; Zhang *et al.*, 2011).

1.4. MIGRATION CELLULAIRE ET TRANSPORT VÉSICULAIRE

La migration cellulaire peut se faire collectivement dans un tissu ou individuellement. Le premier cas implique le maintien des jonctions adhérentes. Toute migration nécessite la formation de filopodes, la génération de lamellipodes, la formation et le désassemblage des complexes d'adhésions avec la matrice extracellulaire, une réorganisation massive du cytosquelette d'actine, ainsi qu'une réorganisation du Golgi et du centre d'organisation des microtubules (Casanova, 2002; Doherty, 2008; Grande-Garcia, 2007). Les forces nécessaires à la formation des protrusions sont générées par les filaments

d'actine et sont régulées par plusieurs GTPases Rho, ainsi que par le complexe de nucléation Arp2/3 (Olson *et al.*, 2009). Le trafic vésiculaire est reconnu pour être largement impliqué à divers niveaux de la migration cellulaire. Ce processus consiste en l'internalisation de protéines ou composantes de la membrane plasmique dans des vésicules. Les vésicules sont ensuite dirigées vers les lysosomes pour dégradation ou sont recyclées directement ou indirectement aux membranes via les endosomes de recyclage. Il est accepté que la machinerie de recyclage permettrait d'amener les composantes des complexes d'adhésion recyclés vers les protrusions pour y former de nouveaux complexes (Fletcher et Rappoport, 2009).

1.4.1. L'ADHÉSION CELLULAIRE

Les adhésions cellule-cellule et cellule-substrat sont importantes pour une multitude de processus physiologiques incluant les changements de morphologie cellulaire pour la formation des tissus, la guérison des plaies et la migration cellulaire (Braga, 2002). Ces interactions peuvent être divisées en cinq types chez *C.elegans*: les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les jonctions DLG-1/AJM-1, les corps denses et les hémidesmosomes (Fig. 1-12).

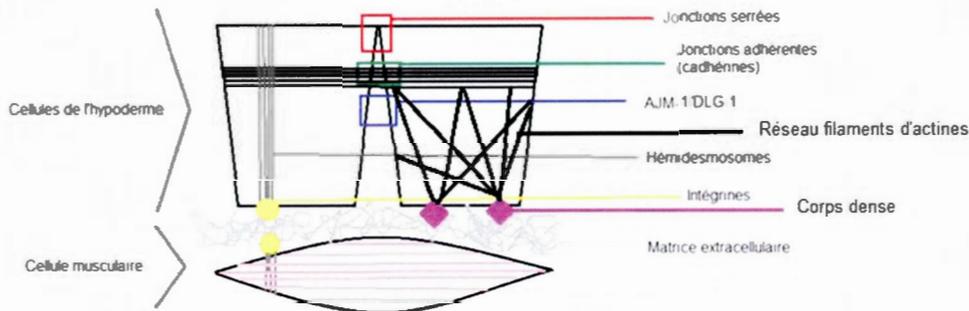


Figure 1-12 : Les complexes d'adhésion chez *C. elegans*. Les jonctions serrées, les jonctions adhérentes cadhérine dépendante, jonctions DAC (Dlg-1/Ajm-1 Complexe), les hémidesmosomes et les corps denses sont les complexes d'adhésion retrouvés chez *C. elegans*. Les jonctions adhérentes (adhésion cadhérine) et les corps denses (adhésion intégrine) sont reliés au cytosquelette d'actine. Les hémidesmosomes (adhésion intégrine) sont couplés aux filaments intermédiaires et à la matrice extracellulaire. Ces complexes sont retrouvés dans les muscles et sont perpendiculaires aux fibres musculaires pour permettre la transmission des forces mécaniques musculaires pendant l'élongation.

1.4.1.1. LES JONCTIONS SERRÉES

Les jonctions serrées sont des structures qui permettent l'étanchéité des épithéliums. Ces jonctions se situent entre la membrane apicale et la membrane latérale des cellules (Fig. 1-12). Elles sont composées de plusieurs protéines d'adhésions différentes telles que les protéines ZO chez les mammifères. Ces protéines permettent de lier les jonctions serrées au cytosquelette d'actine (Braga, 2002; Yap *et al.*, 1997). Les protéines permettant la liaison extracellulaire sont les claudines, les occludines, les tricellulines et les protéines JAM. Chez *C. elegans*, les jonctions serrées sont intégrées dans les jonctions adhérentes. En effet, ZOO-1 est la seule protéine de la famille ZO qui permet la jonction des filaments d'actines avec les jonctions adhérentes. De plus, VAB-9 (claudine) est également requise aux jonctions adhérentes pour permettre le recrutement de ZOO-1 (Lockwood *et al.*, 2008). En contraste aux mammifères, la protéine ZOO-1 n'est pas requise pour maintenir l'étanchéité des épithéliums chez *C. elegans* (Lockwood *et al.*, 2008).

1.4.1.2. LES JONCTIONS ADHÉRENTES

Les jonctions adhérentes sont des structures d'adhésions apicales dépendantes des cadhérines. La stabilité de l'adhésion via les cadhérines dépend du calcium ainsi que de l'interaction de plusieurs autres protéines qui forment un complexe interagissant avec les filaments d'actines (Labouesse, 2006; Braga, 2002; Yap *et al.*, 1997). Ces jonctions sont reliées à la ceinture d'actines via les caténines (Fig. 1-12). Cette interaction avec le cytosquelette permet la transmission des forces mécaniques au sein d'un tissu. Effectivement, les jonctions adhérentes permettent de lier les cellules entre elles et ainsi de connecter leurs cytosquelettes (Zaidel-Bar *et al.*, 2010; Lynch and Hardin, 2010).

Le nématode possède un deuxième type de jonctions adhérentes qui n'est pas retrouvé chez les mammifères. Ce deuxième type est composé de protéines AJM-1 et DLG-1 et est localisé juste sous les complexes cadhérines (Fig. 1-12). Cette jonction remplacerait les jonctions serrées retrouvées chez les mammifères (Zhang et Labouesse, 2010; Zhang *et al.*, 2011).

1.4.1.3. LES DESMOSOMES ET LES HÉMIDESMOSOMES

Les desmosomes (hémidesmosomes) sont des structures adhésives ou hyperadhésives qui relient le cytosquelette de filaments intermédiaires avec la membrane plasmique ainsi qu'avec la matrice extracellulaire. En effet, les desmosomes sont des jonctions basolatérales qui adoptent deux états d'adhésivité différents. En présence de faible concentration de Ca^{2+} , ils sont dans un état d'adhésion faible et en présence de haute concentration de Ca^{2+} , ils sont dans un état d'adhésion fort. De façon intéressante, les desmosomes perdent cette dépendance au Ca^{2+} suite à la maturation des tissus, ce qui indique qu'ils sont dynamiques pendant le développement et deviennent statiques dans les tissus différenciés. (Kelly, 1966; Staehelin, 1974; Wallis *et al.*, 2000; Garrod *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2007; Holthofer *et al.*, 2007) Les desmosomes sont composés de diverses protéines qui peuvent être séparées en deux groupes: intracellulaire et intercellulaire. La partie intracellulaire, chez les mammifères, est composée de plakophilines et desmoplakines qui forment le complexe liant les filaments

intermédiaires et la partie extracellulaire est composée de desmogléines et de desmocollines (Fig. 1-13) (Brooke, 2011). Ces structures diffèrent des jonctions adhérentes et serrées par la résistance au stress mécanique qui leur est conférée par la concentration en Ca^{2+} . Cette adhésion augmente avec l'augmentation du niveau de stress mécanique.

Finalement, outre leurs fonctions au niveau de l'adhésion, les desmosomes seraient impliqués dans la morphogénèse des tissus, principalement l'épiderme. En effet, cette fonction est associée à la transmission des forces musculaires pendant l'élongation et à une signalisation cellulaire contrôlée par les hémidesmosomes (Zhang et Labouesse, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Garrod *et al.*, 2008; Brooke, Nitou et Kelsell, 2011.)

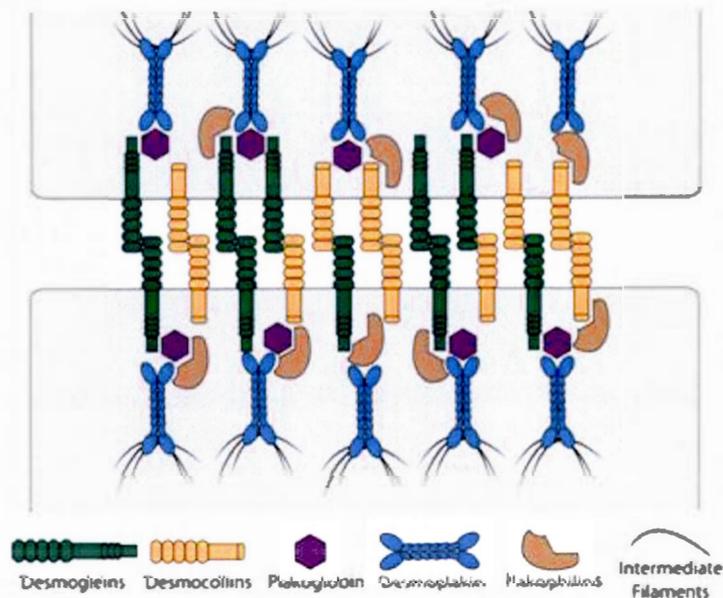


Figure 1-13 : Représentation structurelle des desmosomes chez les mammifères. Deux protéines de liaisons : la desmogléine et la desmocolline. Trois protéines reliant le complexe d'adhésion et les filaments intermédiaires : la desmoplakine, la plakophiline et la plakoglobine (Brooke, 2011).

1.4.1.4. COMPLEXES D'ADHÉSION FOCALE (CORPS DENSES)

Chez *C. elegans*, les complexes d'adhésion focaux sont nommés corps denses et sont très similaires en composition aux complexes d'adhésions focaux mammifères. En effet, les complexes d'adhésions focaux sont composés d'intégrines, de perlecane, de vinculine, d'actinine α et de taline chez les mammifères (Fig.1-14). Dans le cas des corps denses, ce sont des orthologues des diverses protéines formant les complexes d'adhésions focaux qui forment ces structures (Moerman et Williams, 2006). Ces structures sont connectées aux filaments d'actines et permettent la transduction des forces mécaniques induites par la contraction de l'appareil actine-myosine de l'hypoderme (Hresko, Williams et Waterston, 1994; Williams et Waterston, 1994).

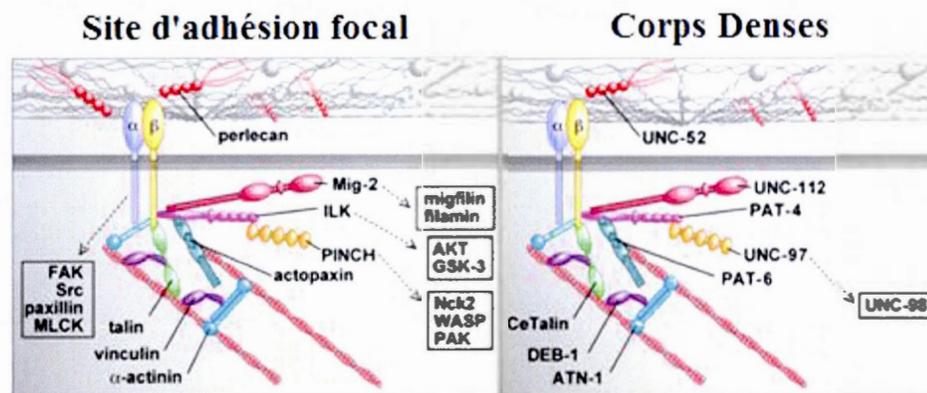


Figure 1-14 : Comparaison des sites d'adhésions focaux mammifères et les corps denses chez *C. elegans*. Un modèle des sites d'adhésions focales mammifères est représenté sous le panneau site d'adhésion focale et un modèle des sites d'adhésions focales chez *C. elegans* est représenté sous le panneau Corps Dense. Les complexes protéiques retrouvés chez *C. elegans* suggèrent une structure similaire à ceux des mammifères (tiré de Moerman et Williams, 2006).

1.4.1.5. INTÉGRINES

Les intégrines sont des protéines transmembranaires permettant l'adhésion des cellules avec la matrice extracellulaire. Elles forment les complexes d'adhésions focaux (corps denses) et les hémidesmosomes.

Chez les mammifères, la famille des intégrines est composée de 24 membres. La portion extracellulaire des deux sous-unités α et β forment une tête pouvant lier plusieurs composantes de la matrice extracellulaire incluant le collagène, la fibronectine, la vitronectine et la laminine. Ces interactions avec la matrice extracellulaire sont d'une grande importance pour le maintien de l'intégrité tissulaire. En effet, outre leur fonction d'ancrage, les intégrines permettent la motilité cellulaire et forment des plateformes de signalisation impliquées dans la survie cellulaire, la prolifération et la différenciation cellulaire. La queue intracellulaire des intégrines ne possède pas d'activité enzymatique, mais permet de connecter le cytosquelette d'actine aux points d'ancrage via plusieurs protéines regroupées en complexes (Danen, 2009).

C'est par le recrutement de protéines et la formation de complexes protéiques que les intégrines peuvent effectuer leurs fonctions de signalisation. En effet, des enzymes telles que des phosphatases, des kinases, des kinases lipidiques, des GTPases ainsi que leurs effecteurs et régulateurs sont recrutés aux sites d'adhésions pour contrôler la migration cellulaire. La GTPase Rap-1 est impliquée dans l'activation et l'assemblage des jonctions dépendantes des intégrines (Bos *et al.*, 2001).

Chez *C. elegans*, il y a deux sous-unités intégrines α : INA-1 et PAT-2 et une seule sous-unité β , PAT-3. Les macrocomplexes protéiques formés au niveau de la queue intracellulaire des intégrines permettent de lier les sites d'adhésions aux filaments d'actines (Fig. 1-14). Ces complexes sont nommés corps denses chez le nématode et ils permettent la transduction des forces de contraction provenant de l'appareil de contraction actine-myosine. Il a été démontré que la perte de fonction des sous-unités PAT-2 et PAT-3 cause un arrêt de l'élongation au stade « deux fois » et présente le phénotype Pat (Hresko, Williams et Waterston, 1994; Williams et Waterston, 1994).

1.4.1.6. CADHÉRINES

Les cadhérines sont des protéines transmembranaires permettant l'adhésion cellule-cellule. Ces protéines appartiennent à une grande famille de récepteurs dépendants du Ca^{2+} pour la formation de jonctions adhérentes stables. Chez les mammifères, la E-cadhérine est la cadhérine exprimée dans les épidermes et elle est la plus étudiée, puisque le maintien des jonctions adhérentes permet une signalisation anti-prolifération. Dans le développement du cancer, la perte de ces jonctions est un facteur de dédifférenciation et de prolifération menant à la formation de tumeurs (Balzer et Konstantopoulos, 2011)

Les cadhérines dites classiques possèdent toutes un domaine HAV (répétition de EC1) qui assure une liaison homophile trans-cadhérine. Cependant, quelques liaisons hétérophiliques des cadhérines classiques ont été rapportées (Shimoyama, 2000; Zhang *et al.*, 2009). Chez le nématode, il y a 13 cadhérines. Le rôle de ces cadhérines demeure peu défini et seul la cadhérine classique, *hmr-1*, est bien caractérisée. *hmr-1* possède deux isoformes : une exprimée dans le système nerveux (HMR-1B) et l'autre étant plus exprimée dans l'hypoderme (HMR-1A). Comme chez les mammifères, *hmr-1* possède une répétition de plusieurs domaines EC1 suivie d'un site de liaison à un ion calcium qui confère la rigidité de ces protéines et permet l'adhésion (Fig. 1-15) (Pettitt, 2005).

La liaison entre le cytosquelette et les cadhérines est assurée par les caténines α et β (*hmp-1* et *hmp-2* chez *C. elegans*). Les caténines lient les cadhérines aux filaments d'actine. L'implication de la caténine p120 (*jac-1*) n'est pas essentielle pour les fonctions cadhérine-dépendantes, mais semble contribuer positivement à ces fonctions (Costa *et al.*, 1998; Pettitt *et al.*, 2003).

Une découverte surprenante fut le fait que les nématodes ne requièrent pas les cadhérines pour maintenir l'intégrité de l'hypoderme (Costa *et al.*, 1998). En effet, ceci fait contraste aux défauts majeurs observés chez les drosophiles et les mammifères (Tepass *et al.*, 1996). Cela suggère que le nématode possède un mécanisme différent ou supplémentaire par rapport aux mammifères pour maintenir l'intégrité de l'épithélium. L'adhésion chez *C. elegans* est considérée comme minimaliste et ne contient que les composantes essentielles (Lynch and Hardin, 2010).

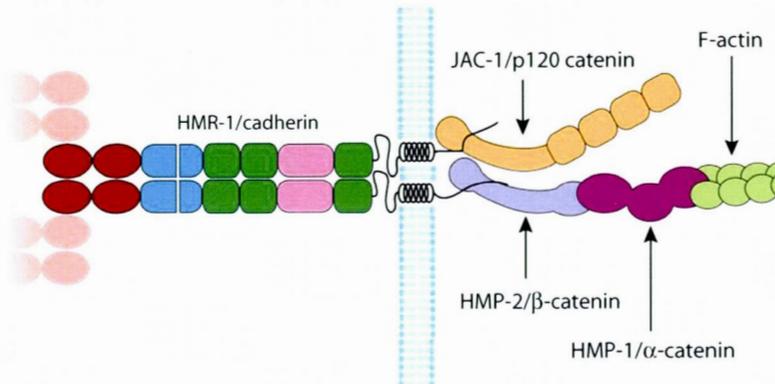


Figure 1-15 : Représentation de jonctions serrées chez *C. elegans* (Pettitt, 2005). Les cadhérines sont au cœur des jonctions serrées. La cadhérine (HMR-1) est relié aux filaments d'actine grâce au complexe HMP-2/HMP-1. Les cadhérines peuvent lier la caténine p120.

1.4.2. L'IMPORTANCE D'UNE RÉGULATION DYNAMIQUE DES JONCTIONS

La formation de jonctions dépendantes des cadhérines facilite la formation des autres types de jonctions. Trois mécanismes ont été proposés. Premièrement, le rapprochement des membranes induit par les jonctions cadhérines peut faciliter la formation des autres jonctions. Deuxièmement, les jonctions cadhérines donnent des informations de positionnement permettant le positionnement des autres jonctions. Troisièmement, les jonctions cadhérines activent les voies de signalisation induisant les autres types de jonctions. (Yap *et al.*, 2007)

Les structures d'adhésion ont récemment été reconnues comme étant des macrocomplexes protéiques formant des plateformes de signalisation. Auparavant, ces structures étaient perçues comme des structures d'adhésion statiques permettant le maintien des tissus. À cette fonction de structure, s'ajoute l'activation de multiples voies de signalisations impliquant les GTPases. Les plus étudiées sont les Rho GTPases qui ont été démontrées comme étant des joueurs importants dans la régulation du cytosquelette en réponse à la formation de jonctions et au stress mécanique (Leckband *et al.*, 2011). La dynamique du recyclage des jonctions semble être un facteur déterminant pour la formation

et le maintien des contacts cellulaires. Chez les mammifères la GTPase Arf-6 est impliquée dans le trafic membranaire et perturbe l'adhésion dépendante des cadhérines en augmentant la dynamique du recyclage de ces protéines (Palacios *et al.*, 2001). Les GTPases Rho sont activées par la formation des jonctions, mais ont aussi été décrites comme modulant la formation des jonctions (Tomar et Schlaepfer, 2009).

1.4.3. MEMBRANE CELLULAIRE ET MOBILITÉ CELLULAIRE

La motilité cellulaire requiert une coordination de plusieurs processus et la membrane cellulaire est l'élément central de cette coordination. Outre sa fonction de barrière séparant les environnements extracellulaire et intracellulaire, elle sert comme plateforme dynamique pour localiser et interagir avec les différentes protéines impliquées dans le transport vésiculaire, l'adhésion, la signalisation, la génération et la régulation des forces de contraction. La tension membranaire est un nouveau paramètre des membranes faisant émergence en tant que régulateur des événements de migration. En effet, les membranes peuvent subir une augmentation de tension entre 2-4% avant la rupture (Morris, Homann, 2001). Un autre paramètre biophysique à considérer est le degré d'incurvation locale de la membrane. Ce degré d'incurvation affecte la localisation de plusieurs lipides de signalisation et de protéines senseurs d'incurvations (McMahon et Gallop, 2005; Zimmerberg et Kozlov, 2006; Liu *et al.*, 2009). De plus, la polarisation des cellules est reconnue comme étant essentielle pour la migration dirigée des cellules notamment dans le développement embryonnaire. La distribution non-uniforme des lipides tels que PIP2 et PIP3 permettent une régulation spatiale et temporelle précise des éléments impliqués. En effet, ces lipides sont aisément modifiés par l'action de diverses kinases lipidiques telles que PI3K et PTEN (Kolsch *et al.* 2008). Plusieurs facteurs de nucléation des filaments d'actines ont été rapportés comme étant activés suite à la liaison avec ces lipides de signalisations (Kolsch *et al.*, 2008; Saarikangas *et al.*, 2010).

1.4.3.1. INCURVATION DES MEMBRANES

L'incurvation de la membrane plasmique et son élasticité sont entre autres dictées par sa composition lipidique et protéique. L'implication des protéines d'échafaudage contenant des domaines F-Bar est importante pour l'induction de l'incurvation. Ce domaine F-Bar est un domaine rigide en forme de banane qui interagit avec les membranes par des interactions électrostatiques et hydrophobes induisant ainsi la formation de domaines membranaires incurvés (Frost *et al.*, 2008; Gallop *et al.*, 2006; Masuda *et al.*, 2006).

Il y a cinq mécanismes induisant l'incurvation des membranes : la modification active de la composition lipidique, la régulation de la composition protéique, l'action du cytosquelette, les protéines d'échafaudage et l'insertion d'hélices α (McMahon et Gallop, 2005).

1.4.3.1.1. LA COMPOSITION LIPIDIQUE DES MEMBRANES ET L'INDUCTION DE L'INCURVATION

La composition lipidique affecte la morphologie membranaire. Les lipides ont la capacité de diffuser dans la membrane suivant une loi plus complexe que celle des mouvements browniens. Les propriétés des chaînes acyls et des diverses têtes polaires peuvent favoriser une incurvation précise (positive ou négative) (Fig. 1-16 a). De plus, l'action d'enzymes pouvant modifier les têtes polaires ou l'action de flippases permet de créer une composition lipidique membranaire asymétrique (Kooijman *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2003; Shemesh *et al.*, 2003). Ces modifications lipidiques peuvent avoir une importance dans le recrutement de protéines d'échafaudage ou de signalisation. En effet, le meilleur exemple est le lipide PIP2 qui recrute plusieurs joueurs clés de l'internalisation par la voie des clathrines (Gaidarov and Keen, 1999; Jackson *et al.*, 2010). Les processus d'endocytose et d'exocytose modifient aussi la composition lipidique de la membrane.

Il a été démontré qu'une fraction lipidique concentrée en un lipide donné pouvait modifier la forme des lysosomes obtenus *in vitro*. En effet, une agrégation des lipides selon

leurs propriétés physico-chimiques induit la formation de vésicules dans les liposomes géants (Kooijman *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2003; Shemesh *et al.*, 2003).

Le nombre de lipides présents sur le feuillet externe par rapport au nombre de lipides sur le feuillet interne peut également dicter le degré d'incurvation d'une membrane. Par exemple, un liposome de 50 nm de diamètre possède 56% plus de lipides sur le feuillet externe que le feuillet interne. La formation de vésicules aura nécessairement un impact sur le rapport lipides externes/lipides internes. De plus, si on considère la cellule en entier, l'endocytose et l'exocytose augmentera ou diminuera le nombre total de lipides dans la membrane altérant ainsi la forme et la tension membranaire (Kooijman *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2003; Shemesh *et al.*, 2003).

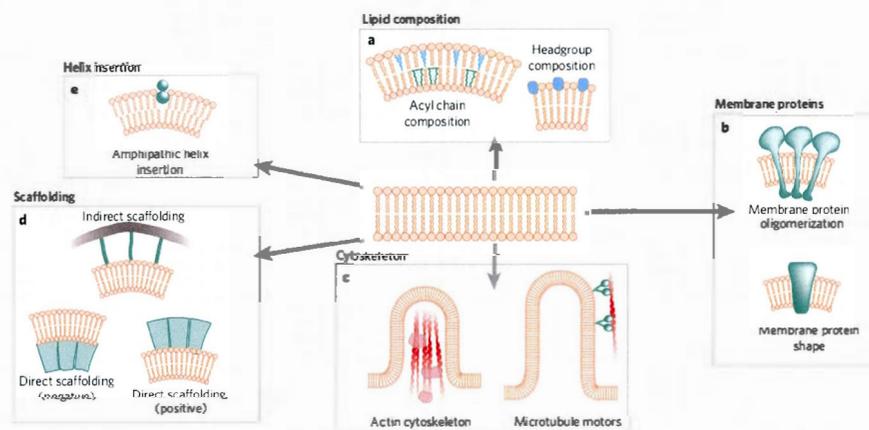


Figure 1-16 : Mécanismes de modification membranaire affectant le degré d'incurvation. **(a)** La composition lipidique affecte la structure membranaire selon la nature des têtes polaires et/ou des chaînes d'acides gras **(b)** Les protéines membranaires régulent la forme de la membrane par leurs structures tridimensionnelles **(c)** Le cytosquelette peut appliquer une force sur la membrane **(d)** Les protéines d'échafaudage affectent la structure membranaire en favorisant une structure précise **(e)** L'insertion active d'hélice α permet de modifier de façon réversible la structure membranaire (McMahon et Gallop, 2005).

1.4.3.1.2. LA COMPOSITION PROTÉIQUE ET L'INCURVATION MEMBRANAIRE

Une protéine transmembranaire ayant une forme conique affectera la forme de la membrane. Plusieurs exemples existent dans la littérature, entre autres, les récepteurs de l'acétylcholine sont souvent concentrés via l'attachement de protéines d'attachement ce qui induit un grand effet sur l'incurvation membranaire locale (Peter *et al.*, 2004; Matilla *et al.*, 2007) (Fig. 1-16 B).

1.4.3.1.3. CYTOSQUELETTE ET L'INCURVATION MEMBRANAIRE

Le cytosquelette est un facteur clé dans la détermination morphologique d'une membrane. En effet, les zones de grands remodelages membranaires incluent les filopodes, les lamellipodes et autres protrusions membranaires. Le cytosquelette se remodèle en fonction de la tension locale. (Bettache *et al.*, 2003) Le cytosquelette permet également le maintien de la tension membranaire et serait le joueur central dans la régulation de cette tension, ainsi que d'autres facteurs clés comme le trafic membranaire et l'adhésion cellule-cellule (Fig. 1-16 C).

1.4.3.1.4. PROTÉINES DE LA SUPERFAMILLE BAR

Il existe plusieurs familles de protéines permettant la régulation des formes membranaires par formation de complexes protéiques. Une de ces familles est la superfamille de protéine BAR. Il y a également les protéines de manteau telles que la clathrine, COPI et COPII qui sont des protéines d'exosquelettes permettant l'incurvation de la membrane par interaction directe avec celle-ci. Nous nous concentrerons ici sur la superfamille BAR. Cette superfamille est divisée en trois catégories selon le degré d'incurvation du domaine BAR. Les familles N-Bar et F-Bar induisent la formation d'incurvations positives (Peter *et al.*, 2004) alors que la famille I-Bar induit des incurvations négatives. (Matilla *et al.*, 2007). Cette induction est expliquée par la forme concave des domaines BARs résultant de la dimérisation (Fig. 1-16 d).

1.4.3.1.5. INSERTION D'HÉLICES α ET INCURVATION DE LA MEMBRANE

Finalement, le dernier mécanisme induisant un changement de morphologie des membranes est l'insertion d'une hélice α amphipathique. Ce type d'hélice possède d'un côté des résidus polaires et de l'autre des résidus hydrophobes. De plus, ces hélices sont souvent désorganisées et sont stabilisées suite à leur insertions dans une membrane où les résidus hydrophobes sont dans la membrane et les résidus polaires sont dans le cytosol (Fig. 1-16 e). Les protéines Arf possèdent une hélice aliphatique en N-terminal qui se replie suite à la liaison de Arf avec un GTP (activation). Les protéines Arfs sont impliquées dans le bourgeonnement des vésicules (Orcl *et al.*, 1993; Seaman *et al.*, 1996; Puertollano *et al.*, 2001) (Fig. 1-16 E).

1.4.4. INCURVATION MEMBRANAIRE : RECYCLAGE ET TRANSPORT MEMBRANAIRE

L'étude de la formation des invaginations durant les processus d'endocytose par la voie des clathrines a permis l'identification de plusieurs protéines déformant la membrane pour promouvoir la formation de vésicules.

Des exemples intéressants sont les protéines epsines qui insèrent une hélice dans la membrane et forment l'invagination initiale qui est suivie d'une solidification par l'interaction de protéines avec la membrane recourbée (McMahon et Gallop, 2005; Richnau *et al.*, 2004).

Un deuxième exemple intéressant est celui de la nexine-1, une protéine contenant un domaine BAR et deux domaines de liaison lipidique spécifique. Les domaines lipidiques seraient positionnés de part et d'autre de la partie membranaire à internaliser. Suite à cette liaison, le changement de conformation de la protéine induirait la formation d'une invagination, auquel le domaine BAR pourrait se lier et ainsi la stabiliser (McMahon et Gallop, 2005).

1.4.4.1. LES PROTÉINES F-BAR ET LE RECYCLAGE

De façon intéressante, la famille de protéines F-Bar TOCA active la protéine N-Wasp pour induire la polymérisation de filaments d'actine pendant le recyclage de jonctions adhérentes par endocytose (Takano *et al.*, 2008). Ce qui suggère que les protéines F-Bar réguleraient l'activité de certaines protéines de signalisation en réponse au degré d'incurvation des membranes. TOCA est une famille de protéines F-Bar qui est impliquée dans l'endocytose via la voie des clathrines. Plus précisément, la famille TOCA contrôle la dynamique du recyclage des jonctions E-cadhérine chez les drosophiles (Leibfried *et al.*, 2008). Cette fonction nécessite une interaction directe avec CDC-42 et le complexe de polarité PAR6/aPKC (Leibfried *et al.*, 2008). Cependant, les détails moléculaires de cette fonction ne sont pas identifiés. De plus, TOCA-1 a été identifiée comme étant importante pour la dynamique du cytosquelette d'actine dépendant de WAVE-1 et N-WASP. Les protéines TOCA possèdent un domaine F-Bar N-terminal, un domaine de liaison à CDC-42, un domaine HR1 et un domaine SH3 C-terminal. Le domaine SH3 permet la liaison de WSP-1 tel que démontré par précipitation d'affinité (Giuliani *et al.*, 2009). Il a été démontré que TOCA-1 augmentait l'accumulation d'AJM-1 lorsqu'elle est dysfonctionnelle (mutation null) et qu'elle était localisée aux jonctions adhérentes. Chez la drosophile, TOCA-1 permet la connexion du complexe de polarité Par6/aPKC avec WASP et la dynamine. (Leibfried *et al.*, 2008; Georgiou *et al.*, 2008). TOCA ainsi que certaines protéines de la famille F-Bar jouent donc un rôle crucial dans les phénomènes d'endocytose et de régulation du cytosquelette d'actine.

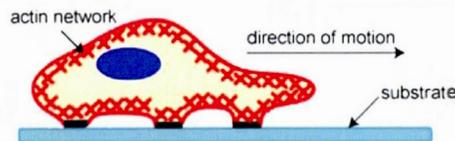
1.4.5. LE TRANSPORT VÉSICULAIRE ET LA MOTILITÉ CELLULAIRE

Le transport vésiculaire est une composante importante dans une multitude de processus biologique de plus grande ampleur. Comme mentionné précédemment, la motilité cellulaire est étroitement reliée avec l'endocytose, plus précisément le recyclage des points d'attachements. Effectivement, le déplacement d'une cellule se fait par la formation de lamellipodes suivie de la formation d'un nouveau point d'ancrage (corps denses) (Fig 1-17). Ensuite, les anciens points d'ancrages localisés à l'arrière de la cellule sont détachés par

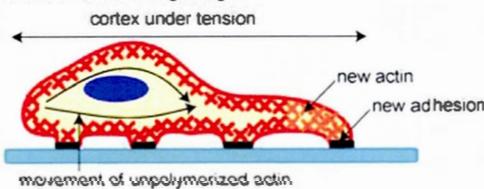
internalisation des diverses composantes, dont les intégrines. Suite à ce détachement, il y a contraction de la cellule pour déplacer la cellule vers l'avant. Cette contraction est possible grâce au cytosquelette d'actine couplé aux myosines (Le Clainche and Carlier, 2007; Fletcher and Rappoport, 2010).

Il est important de saisir que les intégrines internalisées sont transportées vers les lamellipodes en formation pour permettre les nouveaux points d'attachement, d'où l'expression de recyclage. L'inhibition du transport vésiculaire réduit la vitesse de migration dans plusieurs types cellulaires dont les fibroblastes (Fletcher et Rappoport, 2010).

1) Protrusion of the Leading Edge



2) Adhesion at the Leading Edge



Deadhesion at the Trailing Edge



3) Movement of the Cell Body

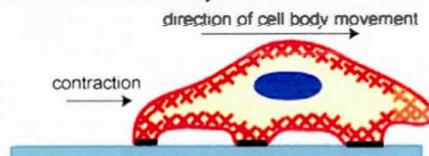


Figure 1-17 : Cellule migrant sur un substrat de matrice extracellulaire. **(1)** Formation de protrusions dans la direction du mouvement. **(2)** Synthèse de filaments d'actines et formation de nouveaux contacts. La tension enclenche le détachement des adhésions situées derrière le mouvement. **(3)** La contraction permet le mouvement du corps cellulaire et le cycle recommence à l'étape 1 (Le Clainche et Carlier, 2007).

1.4.6. POLARITÉ

La polarité fait référence à un gradient inégal de charge membranaire dans une même cellule. Cette notion est particulièrement évidente dans le contexte de la première division cellulaire du développement embryonnaire qui donne naissance à deux cellules ayant un destin cellulaire différent. De plus, les cellules épithéliales utilisent cette polarité, entre autres, pour diriger le transport vésiculaire vers la membrane apicale ou basolatérale (Cowan et Hyman, 2007).

La polarité cellulaire est établie par le rôle de plusieurs protéines, notamment les protéines PAR qui interagissent avec le cytosquelette. De plus, les jonctions serrées et adhérentes sont cruciales pour former les axes de polarité qui permettent aux cellules de reconnaître leur position par rapport aux autres cellules dans un tissu (Wallace *et al.*, 2010).

Les protéines PAR sont des protéines clés dans l'établissement de la polarité embryonnaire. En effet, elles signalent à plusieurs effecteurs incluant les régulateurs du cytosquelette d'actine et de microtubules, les composantes des jonctions cellules-cellules et des composantes de la membrane cellulaire. Cette fonction de signalisation permet un remodelage polarisé du cytosquelette (Gönczy et Rose, 2005). Les protéines PAR sont hautement dynamiques et permettent un changement rapide de l'état de polarité en réponse à un signal du milieu externe (Wallace *et al.*, 2010). Finalement, les protéines PAR interagissent avec d'autres protéines PAR dans des voies de signalisation incluant plusieurs mécanismes de rétroaction positifs et négatifs (Gönczy et Rose, 2005).

Les mécanismes de polarité cellulaire ont été étudiés intensivement en prenant pour modèle la première division des embryons de *C. elegans*. Cette division asymétrique se base sur la position du centrosome et du point d'entrée du noyau du spermatozoïde dans l'oocyte pour établir la polarité de la première division (Wallace *et al.*, 2010). Les contractions asymétriques du réseau actine-myosine permettent une distribution asymétrique des protéines PAR. En effet, les concentrations locales de chaque protéine PAR s'ajustent au sein de la cellule et la polarité s'établit (Wallace *et al.*, 2010; Cowan et Hyman., 2007). Grâce à cette polarité, des concentrations de protéines différentes sont réparties entre les domaines PAR.

Ce gradient de protéines permet la formation de deux cellules filles différentes à partir d'une division cellulaire (mitose). Dans l'hypoderme, la polarité de la membrane dicte la localisation de plusieurs protéines membranaires incluant le complexe d'adhésion DLG-1/AJM-1 (Keren, 2011).

1.4.6.1. POLARITÉ APICALE ET BASOLATÉRALE

CDC-42 est une GTPase associée aux membranes cellulaires et à l'organisation du cytosquelette d'actine (Johnson, 1999; Kay et Hunter, 2001). De plus, son rôle identifié initialement fut le contrôle de la polarité cellulaire apicale. La polarité cellulaire est essentielle pour le transport vésiculaire, le développement, la motilité et la division asymétrique des cellules. Elle joue également un rôle dans le réarrangement du cytosquelette et la régulation de la kinase inductrice de transcription (Foltz *et al.*, 1998). La fonction de CDC-42 est régulée en fonction du temps et de sa localisation. Cette localisation subcellulaire dépend de la modification lipidique sur le site de prénylation (Chen *et al.*, 1993, 1996). L'adressage des vésicules vers la membrane apicale par CDC-42 se fait par le recrutement de PAR-6 à la membrane apicale (Wallace *et al.*, 2010). La GTPase CDC-42 est également impliquée dans la formation de cette polarité par son rôle dans le transport vésiculaire via WSP-1, une protéine permettant la synthèse de nouveaux filaments d'actine. Cette fonction impliquerait également les protéines F-Bar (Wells *et al.*, 2006).

1.4.6.2. POLARITÉ ÉPITHÉLIALE

Dans un contexte multicellulaire, l'établissement de la polarité suite à une migration se fait par la formation séquentielle de jonctions adhérentes aux extrémités des protrusions de la membrane basolatérale vers la membrane apicale (Fig. 1-18). Suite à la migration cellulaire dépendante du cytosquelette d'actine, les cellules vont former un contact (Fig. 1-18). Chez les mammifères, ce contact sera stabilisé par les jonctions à base de cadhérines qui permettront une signalisation cellulaire par l'entremise de SRC et PI3K. Cette signalisation permettra de diriger le trafic vésiculaire vers les nouveaux contacts et d'augmenter le nombre

de jonctions cadhérines (Fig 1-18). La ceinture circonférentielle d'actine est formée et la signalisation Rho GTPase permet la régulation des diverses protéines impliquées dans le maintien de la polarité (Fig 1-18) (Wallace *et al.*, 2010; Cowan et Hyman , 2007).

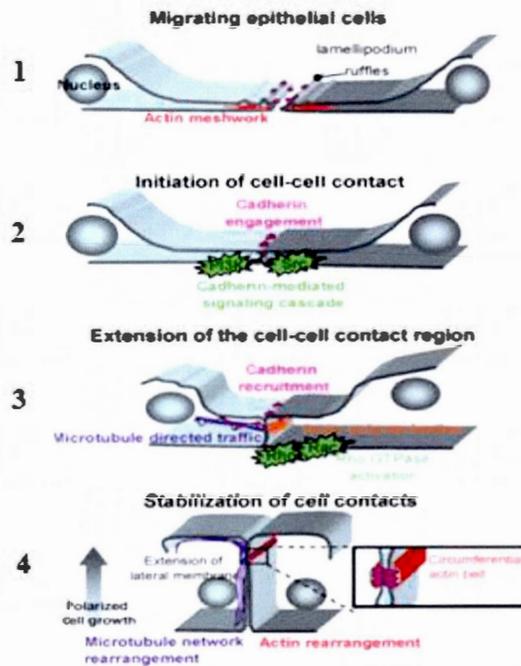


Figure 1-18 : Acquisition d'une morphologie polarisée par des cellules épithéliales. **1)** Cellules épithéliales en migration (lammelipodes) **2)** Contact cellule-cellule initiale qui active Src et PI3K pour permettre la formation d'une polarité. **3)** Recrutement de cadhérines additionnelles et réorganisation du cytosquelette (actine et microtubule). **4)** Stabilisation des cellules et formation de la ceinture circonférentielle d'actine permet la formation d'une polarité cellulaire. (Wallace, Durgan, Jin et Hall, 2010)

1.4.7. DIACYLGLYCÉROL

Le diacylglycérol (DAG) est un messager lipidique secondaire qui agit en liant les protéines ayant un domaine « protein kinase C homology-1 » (C1) (Canagarajah *et al.*, 2004). Le DAG est un messager important chez les métazoaires (Kikkawa *et al.*, 1989; Nishizuka, 1988, 1992, 1995). En effet, il est un médiateur central de la signalisation hormonale couplée aux récepteurs à petites protéines G en plus d'être impliqué dans la transduction d'une multitude de stimuli extra- et intracellulaires (Kikkawa *et al.*, 1989; Mellor and Parker, 1998; Newton and Johnson, 1998; Nishizuka, 1988, 1992, 1995; Ron and Kazanietz, 1999). Ces fonctions de transduction de signaux se font par liaison directe avec des protéines chimériques C1. La liaison de ces protéines avec le DAG induit un changement de conformation important qui les activent (Canagarajah *et al.*, 2004). Les protéines de la famille chimérique sont des protéines GAP activées par la liaison au DAG ou au phorbol ester (Fig.1-19) (Ahmed *et al.*, 1990, 1993; Areces *et al.*, 1994; Caloca *et al.*, 1997, 1999; Hall C. *et al.*, 1990; Leung *et al.*, 1994). Les chimériques ont 2 épissages alternatifs et possèdent un domaine C1 central suivi d'un domaine GAP en C-terminal. Ce domaine GAP possède une bonne homologie avec les domaines GAP interagissant avec Rho, Rac et Cdc42 (Caloca *et al.*, 2003) ce qui suggère un modèle où les chimériques régulent l'activité des GTPases aux membranes en réponse au DAG (Fig. 1-19). Il est intéressant de noter que des protéines GEF spécifiques à Rap1 et Ras sont activées par le DAG (Ebinu *et al.*, 1998; Tognon *et al.*, 1998).

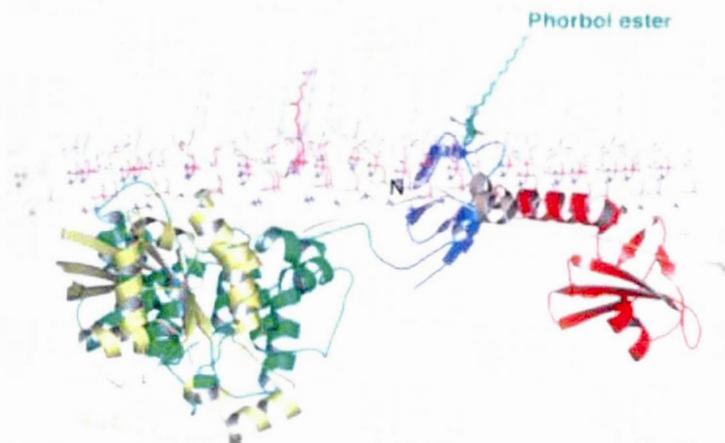


Figure 1-19 : Modèle démontrant le changement de conformation induit par l'interaction d'une protéine chimérique GAP avec un ester de phorbol. Le groupement géranylgeranyl permet l'ancrage de Rac à la membrane et la protéine chimérique s'ancree à la membrane par le domaine C1 qui se lie au phorbol ester induisant un changement de conformation pour activer le domaine GAP (Canagarajah *et al.*, 2004).

1.4.8. LE GÈNE *RGA-7*

À mon arrivé dans le laboratoire, le gène *rga-7* avait déjà été associé à l'élongation embryonnaire. En effet, le phénotype de 30% de létalité embryonnaire avait été quantifié et partiellement caractérisé par microscopie à 4D. De plus, l'activité GAP vis-à-vis de CDC-42, RHO-1 et MIG-2 avait été caractérisée *in vitro*.

1.5. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

1.5.1. HYPOTHÈSES

Tel qu'indiqué dans la section élongation, il existe une voie parallèle à LET-502/MEL-11 qui contrôle l'élongation. Dans le laboratoire, cette voie avait été partiellement identifiée (Harel *et al.*, en préparation). Elle inclurait la GTPases CDC-42 qui permet la transmission du signal via la kinase PAK-1 (Ong *et al.*, 2011). Suivant ce modèle, PIX-1

permettrait l'activation de CDC-42 au cours de l'élongation précoce et tardive. Les résultats obtenus par le laboratoire récemment suggèrent qu'au moins quatre des six GTPases Rho réguleraient les étapes d'élongation. Or, à ce jour seulement deux GEFs et UNC-73, PIX-1 et une GAP RGA-2, ont été identifiées comme participant à ce processus. Un nouveau gène codant pour une protéine GAP et contrôlant l'élongation a été identifié dans notre laboratoire : *rga-7*. L'activité GAP de RGA-7 est dirigée envers les GTPases RHO-1, CDC-42 et MIG-2. La GTPase RHO-1 est reconnu pour son rôle de régulation du niveau de contractions de l'appareil actine-myosine pendant l'élongation embryonnaire. De plus, un phénotype de létalité embryonnaire est associé à la mutation null du gène *rga-7*. On suppose donc que cette protéine a un rôle dans l'élongation.

1.5.2. OBJECTIFS

L'objectif de mon travail de maîtrise était de caractériser la fonction de *rga-7* au cours de l'élongation.

L'étude avait pour objectifs :

- 1- La caractérisation du phénotype associé à la délétion *ok1498* du gène *rga-7*
- 2- Identifier la GTPase cible de *rga-7 in vivo*
- 3- Identifier la localisation subcellulaire de *rga-7* par génération d'animaux transgéniques
- 4- Identifier les partenaires fonctionnels de *rga-7*

1.5.3. CONTRIBUTIONS

Les résultats générés ont permis la caractérisation détaillée du phénotype des animaux *rga-7(ok1498)*. De plus, la spécificité du domaine GAP de *rga-7 in vivo* nous permet d'inclure la GTPases CDC-42 dans les voies de signalisation contrôlant l'élongation embryonnaire de *C. elegans*. Nous avons identifié plusieurs interactants possibles de *rga-7* par ARNi et par croisement. Parmi ces interactants, le gène *pix-1*, *cdc-42* et *wsp-1* ont tous

les trois permis de secourir le phénotype associé à *rga-7*. Ceci suggèrerait que *pix-1*, *cdc-42* et *wsp-1* fonctionneraient en aval de *rga-7* dans une voie de signalisation controlant l'elongation. L'étude de cette voies de signalisation permettra une meilleure compréhension du rôle de CDC-42 et ses régulateurs au cours de l'elongation precoce et tardive du nématode. Notre étude permet donc d'identifier un nouveau système pour étudier les fonctions de cette voie de signalisation dans la morphogenèse des cellules épithéliales *in vivo*.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. CULTURE *C. ELEGANS*

Le milieu Nematode Growth Media (NGM) (1mM CaCl₂, 1mM MgSO₄, 1mM KPO₄ pH 6, Cholestérol 50µg/L, Agar 15g/L, Bacto-Peptone 2.5g/L et NaCl 3g/L) (Brenner, 1972) a été utilisé pour maintenir les souches. Les milieux sontensemencés avec *E.coli* OP50 comme source de nourriture. Les nématodes sont maintenus en croissance à 20°C et la souche de référence utilisée est N₂ Bristol. Le tableau 2-1 contient la liste des allèles et souches utilisées et générées pour l'étude.

Tableau 2-1 : Liste des souches utilisées ou générées pour cette étude.

Souches	Génotype	Source
N2	<i>Wt</i>	CGC*
VC992	<i>rga-7(ok1498)</i>	CGC
VC863	<i>pix-1(gk416)</i>	CGC
RB689	<i>pak-1(ok448)</i>	CGC
HR1237	<i>mel-1(it26); unc-4(e120); let-502(sb118)</i>	CGC
HR1157	<i>let-502(sb118)</i>	CGC
BC8553	<i>pix-1::mCherry; dpy-5(e907)</i>	Sharon Harel, 2009
SU93	<i>Jcls1(ajm-1::GFP; unc-29(+); rol-6(su1006))</i>	CGC
NR222	<i>rde-1(ne219); kzls9(pKK1260(p-lin-26::nls::GFP)+(pKK1253(p-lin-26::rde-1)+pRF6(rol-6(su1006)))</i>	CGC
NR350	<i>rde-1(ne219); kzls20(pDMH715(hlh-1p::rde-1)+pTG95(sur-5p::nls::GFP))</i>	CGC
ML1735	<i>mcls50 [lin-26p::vab-10(actin-binding domain)::GFP + myo-2p::GFP + pBluescript]</i>	Gally et Labouesse 2009
Rga-7 ;Pix-1	<i>rga-7(ok1498) ; pix-1(gk416)</i>	G. Lacoste-Caron
Rga-7 ;Dpy-5	<i>rga-7(ok1498) ; dpy-5(e907)</i>	G. Lacoste-Caron
Ajm-1 ::GFP ; Rga-7	<i>rga-7(ok1498) ; Jcls1(ajm-1::GFP; unc-29(+); rol-6(su1006))</i>	G. Lacoste-Caron

* *Caenorhabditis elegans* Genomic Center (University of Minnesota)

2.2. SYNCHRONISATION DES POPULATIONS PAR TRAITEMENT À L'HYPOCHLORITE DE SODIUM

Une population contenant des adultes est récupérée avec 1ml de milieu M9 (47mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 22mM KH_2PO_4 , 85mM NaCl et 1mM $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) et centrifugée 3 minutes à 3500xg. Le surnageant est remplacé par 1ml de solution de synchronisation (Hypochlorite de Sodium 0.8%, NaOH 0.5M) qui dissout les vers (les œufs non pondus sont protégés par la carcasse adulte) et le tout est incubé 3 minutes 30 secondes en inversant à toutes les minutes avant d'être centrifugé pendant 3 minutes à 3500xg. Le culot est lavé 3 fois avec 1ml de M9 et est resuspendu dans 700 μl de M9. Les œufs sont ensuite incubés à 20°C pendant 16h sur un agitateur sans source de nourriture.

2.3. CROISEMENT DES SOUCHES DE NÉMATODE

Deux hermaphrodites au stade L3 sont incubés avec 5 mâles sur une plaque NGM de 6cm (diamètre)ensemencée avec 50 μl de culture *E.coli OP50* (saturée) dans un milieu TY (Extrait de levure 5g/L, peptone 8g/L et NaCl 2.5g/L .

2.4. CONGÉLATION DES NÉMATODES

Les vers sont récupérés de 3 plaques privées de nourriture avec 1ml de M9 pour ensuite être concentrée dans un volume de 250 μl par centrifugation à 3500xg pendant 3 minutes. Un volume de 250 μl de solution de congélation 2x est ajoutée (NaCl 200mM, H_2KPO_4 pH6 100mM, MgSO_4 0.3mM et glycérol 60%). Les tubes sont incubés 5 minutes sur glace avant d'être congelés à -80°C.

2.5. GÉNÉRATION ET MAINTIEN DE MÂLES

Dix hermaphrodites au stade L3 sont transférés sur une plaque NGM 6cm et les plaques sont incubées 5h à 37°C avant d'être transférées à 20°C. 72h plus tard, les mâles sont transférés sur une autre plaque. Pour maintenir les mâles, 2 hermaphrodites sont incubés avec 5 mâles sur une plaque et pour accroître la population de mâles, 5 hermaphrodites L3 sont incubés avec dix mâles.

2.6. GÉNOTYPAGE

Pour faire le génotypage, 10 vers L3 adultes sont piqués dans 10µl de solution de lyse (Tris-HCl pH9 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 2mM et Triton X 100 0.1%, Protéinase K 100µg/ml) et incubés 60 minutes à 65°C et 15 minutes à 95°C. 3µl de lysat sont utilisés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La recette est dans le tableau 2-2 et le programme est détaillé dans le tableau 2-3.

Tableau 2-2 : Composition du milieu réactionnel PCR pour le génotypage

Produit et concentration initiale	Volume pour 1 réaction (µl)
10x PCR Buffer	2
MgCl ₂ 50mM	0.6
Mélange dNTPs 10mM	0.4
Mélange d'amorces 20mM	0.4
ADN produit	1
ddH ₂ O	15.1
TAQ polymérase 5U/µl	0.5

Tableau 2-3: Programme de la réaction PCR pour le génotypage.

Température (°C)	Temps	Cycles
95	5 minutes	1x
95	45 secondes	30x
60	45 secondes	
72	1min/kb	
72	7 minutes	1x
4	Indéfini	1x

Les produits de PCR sont analysés par migration sur gel d'agarose 1% dans du TAE 1x (Tris-acide acétique pH8.5 40mM et Na₂EDTA 2mM) à 110V pendant 25-35 minutes (BioRad, Mini-Sub® Cell GT) et l'ADN est coloré avec le colorant GelRed™nucleic Acid Gel Stain 10 000x (Biotium, CA).

2.7. MICROSCOPIE À 4-DIMENSION

Pour observer le développement embryonnaire, une population adulte est récupérée avec 1 ml de M9 et concentrée de 2x à 4x. La suspension (300µl) est déposée sur un verre de montre. Les vers sont disséqués au niveau de la gonade avec 2 aiguilles BD 30g1/2. Les œufs sont récupérés avec une pipette pasteur dont l'ouverture a été réduite à la flamme et déposés sur un coussin de 3% agarose/M9 sur une lame de microscope. Le coussin d'agarose est ensuite couvert avec une lamelle et scellé avec de la gomme arabique. Le développement est observé avec le microscope Leica DM5500 sous éclairage « Differential Interference Contrast » (DIC) avec un objectif à immersion à huile 63X et un oculaire 10X. Trente-cinq tranches de « Z-stacks » sont prises toutes les 2 minutes pendant 12h à température pièce (23°C). Le temps d'élongation précoce est mesuré entre le stade virgule et 1.75x et l'élongation tardive entre le stade 1.75x et 3x. Les films sont visualisés avec le programme LAS-AF6000 et un minimum de 25 embryons ont été filmés pour chaque génotype.

2.8. EXTRACTION DE L'ADN PLASMIDIQUE

Les extractions d'ADN plasmidique ont été réalisées avec les kits QIAprep Midiprep et QIAprep Miniprep (microcentrifuge) (Qiagen) en suivant le protocole du manufacturier.

2.9. PRÉPARATION DE BACTERIES ELECTRO-COMPETENTES

Une plaque LB estensemencée et incubée 12h à 37°C avec la souche bactérienne *SW1106* ou *DH5 α* . Une colonie est réinnoculée dans une préculture LB de 5ml et incubée à 37°C, 220rpm pendant 12h. 200ml de milieu LB sontensemencés avec 2ml de préculture et incubés à 37°C, 220 rpm jusqu'à une densité optique à 600nm de 0.5-0.8. La culture est refroidie sur glace 15 minutes et centrifugée 15 minutes à 3750 rpm à 4°C. Pour être resuspendue dans 10ml d'H₂O froid. La culture est centrifugée à 10000xg pendant 20 secondes à 4°C et lavée 1 fois avec 10ml d'eau et 2 fois avec 1ml de glycérol 12.5% froid. Les bactéries sont resuspendues dans 500 μ l de glycérol 12.5% et aliquotées (100 μ l) pour être entreposées à -80°C.

2.10. ÉLECTROPORATION

Cent μ l de bactéries compétentes décongelées sur glace sont mélangées avec 20ng à 100ng de l'ADN (Fosmide WRM0634dC04) à électroporer. Les bactéries sont incubées 5 minutes sur glace dans une cuvette d'électroporation (BioRad, Gene Pulser Cuvette™, 0.2cm) et sont électroporées en utilisant le programme EC02 (BioRad, MicroPulser™). La cuvette est lavée 2 fois avec 1ml de LB et les bactéries électroporées sont incubées 2h à 37°C. Des plaques LB avec l'antibiotique de sélection sontensemencées et incubées 24h à 37°C. Trois précultures avec antibiotique partant de trois colonies différentes sont inoculées et incubées à 37°C pendant 12h avec 220rpm d'agitation. Un volume de 0,5ml de chaque préculture est mélangé avec 0,5ml de LB- 40% glycérol et congelé à -80°C.

2.11. PURIFICATION SUR GEL

La purification des fragments d'ADN a été réalisée avec le kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, ON) en suivant le protocole du manufacturier. L'ADN est migré sur gel d'agarose 1% et les bandes sont excisées pour être purifiées.

2.12. EXTRACTION DE L'ARNM

Une population L3 synchronisée est récupérée d'une plaque NGM de 10cm avec 1ml de M9 et centrifugée 3 minutes à 3500xg pour être resuspendue dans 1ml de Trizol (Invitrogen, Burlington, ON) après 2 lavages au M9. Les vers resuspendus dans le Trizol sont incubés 15 minutes à -80°C. Les tubes sont décongelés à température pièce et le contenu broyés avec un mortier (Kontes Glass Co, Duall®22) jusqu'à dissolution des carcasses. Transférer le Trizol dans un tube de 1.5ml et y ajouter 0.2ml de chloroforme ACS/ml de Trizol. Les tubes sont inversés 3 fois et incubés 5 minutes à température pièce avant d'être centrifugés 15 minutes à 12 000xg à 4°C. Le surnageant est récupéré et l'ARN est précipité 10 minutes à température pièce avec 0.5ml d'isopropanol/ml de Trizol avant d'être centrifugés 10 minutes à 12 000xg à 4°C. Le culot d'ARN est resuspendu avec 1ml d'éthanol 75% et vortexé avant d'être centrifugé 5 minutes à 7500xg à 4°C. Le culot d'ARN est séché 5 minutes à l'air avant d'être resuspendu dans 50µl d'eau traitée au Diethylpyrocarbonate (DEPC) (chauffée 5min à 55°C pour dissoudre l'ARN). L'ARN est congelé à -20°C et analysé avec un gel d'agarose 1% (RNase free). L'intensité des 2 bandes 18S et 26S sont comparés pour estimer la dégradation de l'ARNm et la concentration. La pureté est estimée par mesure d'absorbance à 260nm et 280nm avec l'appareil nanodrop 2000 (Thermo Scientific, France).

2.13. TRANSCRIPTION INVERSE

La PCR Reverse Transcriptase permet la synthèse de l'ADNc des transcrits *rga-7*. Le kit Superscript II (Invitrogen, Burlington, ON) a été utilisé selon les directives du manufacturier mis-à-part quelques modifications d'optimisation.

L'amorce Reverse (0.1µM) et les nucléotides libres (dNTPs) (1mM) sont mélangés avec 1 µg d'ARNm total préparé à partir de vers de tous les stades dans un volume final de 12µl. Le tout est incubé dans un thermocycleur à 65°C pendant 5 minutes. Le tube est placé sur glace immédiatement et 8 µl du mélange « synthèse d'ADNc » (Buffer 1x, DTT 12.5mM, RNase OUT™ dilué 1/8, Reverse transcriptase Invitrogen 0.5U) (Invitrogen, Burlington, ON) est ajouté. Ce mélange est incubé à 58°C pendant 60 minutes. La réaction est arrêtée en incubant 5 minutes à 85°C. Un volume de 2, 4 ou 6 µl est utilisé pour la PCR. L'ADNc est ensuite amplifié en utilisant trois paires d'amorces spécifiques à chaque transcrit. La polymérase haute fidélité (0.5U/µl) (Invitrogen, Burlington, ON) a été utilisée. L'ADNc est ensuite nettoyé avec le kit QiaQuick PCR Purification (Qiagen, Mississauga, ON) et cloné par recombinaison Gateway dans le vecteur pDONR201 avec la BP clonase (Invitrogen, Burlington, ON). La recette est dans le tableau 2-4 et le programme est détaillé dans le tableau 2-5.

Tableau 2-4 : Composition du milieu réactionnel PCR pour la production d'ADNc

Produit et concentration initiale	Volume pour 1 réaction (µl)
Tampon PCR Hi-Fi 10x	5
MgSO4 50mM	2
Mélange dNTPs 10mM	1
Mélange d'amorces 20mM	1
ADNc produit	5
ddH ₂ O	35.5
TAQ polymérase Hi-Fi 2.5U/µl (Invitrogen, Burlington, ON)	0.5

Tableau 2-5 : Programme pour l'amplification des ORFs de *rga-7*

Température (°C)	Temps (minutes)	Cycles
95	5	1x
95	0.75	30x
60	0.75	
68	3	
68	7	1x
4	Indéfini	1x

2.14. LÉTHALITÉ EMBRYONNAIRE ET LARVES NON-ALLONGÉES

La quantification de la létalité embryonnaire (Emb) et des larves non-allongées (Lva). 20 vers synchronisés au stade L1 sont déposés sur une plaque NGM de 12 puitsensemencés avec *E.Coli* - *OP50* et sont incubés pendant 3 jours à 20°C. Les vers adultes sont récupérés avec 1ml de M9 et les œufs sont comptés dans chaque puits. 24h plus tard, les œufs morts qui n'ont pas éclos sont comptés. Le rapport (œufs morts/œufs totaux)*100 permet de calculer le pourcentage de létalité embryonnaire. Ensuite, les plaques sont incubées à 20°C pendant un 24h additionnel et les larves non-allongées (Lva) peuvent alors être comptées (Le rapport larves non-allongées/œufs totaux permet de calculer le phénotype Lva).

2.15. ARN INTERFÉRENT

Des plaques de 24 puits de NGM Tetracycline [6µg/ml], Ampiciline [100µg/ml] et IPTG [6mM] sontensemencées avec 20µl de préculture (37°C, 12h, 220rpm) 5ml LB-Tetracycline [15µg/ml] + Ampiciline [100µg/ml] des souches *E.Coli* *HT115* exprimant un vecteur PL4440 contenant les séquences codantes pour les gènes suivants : *egfp*, *rga-7s*, *rga-7m*, *rga-7l*, *rga-7GAP*, *wsp-1*, *mrck-1*, *pak-1*, *cdc-42*, *rho-1*, *rac-2*, *mig-2*, *ced-10*, *crp-1*. Les plaques 24 puits sont incubées à 37°C, 16h. 10 vers synchronisés à l'hypochlorite de sodium au stade L1 sont déposés dans chaque puits et incubés à 20°C jusqu'à la ponte. Les adultes

sont récupérés avec 1ml de M9 pour chaque puits et la létalité embryonnaire et les arrêts larvaires sont quantifiés.

2.16. IMMUNOMARQUAGE DES EMBRYONS: FIXATION AU FORMALDÉHYDE

Une grande plaque NGM de vers adultes est synchronisée (voir 2.2). Les œufs sont resuspendus dans 1ml de milieu de culture (Goat serum 5%, Egg Salt 1x (NaCl 118mM, KCl 40mM, CaCl₂ 3.5mM, MgCl₂ 3.5mM) et Hepes 5mM). La cuticule des œufs a été fragilisée en les aspirant dans une seringue de 1ml équipée avec une aiguille BD 21g et les rejetant par une aiguille plus fine BD 30g (répété 3 fois). Les œufs ont été culotés par centrifugation à 3500xg pendant 3 minutes et lavés 3 fois avec 1ml d'ES1x/Hepes (Egg Salt 1x (NaCl 118mM, KCl 40mM, CaCl₂ 3.5mM, MgCl₂ 3.5mM) et Hepes 5mM). Les œufs ont été culotés puis digérés avec 100µl de chitinase 1mg/ml (Sigma-Aldrich Canada, ON) 15 minutes à température pièce. La solution Fix1 (Egg Salt 1x (NaCl 118mM, KCl 40mM, CaCl₂ 3.5mM, MgCl₂ 3.5mM), Hepes 5mM, EGTA 11.75mM, lysolectine 117µg/ml et paraformaldéhyde 2.95%) est ajoutée et le tout est incubé 2 minutes à température pièce. 1ml de solution Fix2 (Egg Salt 1x (NaCl 118mM, KCl 40mM, CaCl₂ 3.5mM, MgCl₂ 3.5mM), Hepes 5mM, EGTA 10mM et paraformaldéhyde 2.55%) est ajoutée et le tout est incubé 15 minutes à température pièce. Les œufs fixés sont culotés et lavés 3 fois avec 1ml de milieu de culture 1x. Les embryons fixés peuvent être utilisés immédiatement pour l'immunodétection ou entreposés quelques heures à 4°C.

2.17. IMMUNOMARQUAGE DES EMBRYONS: FIXATION AU MEOH

Une grande plaque NGM de vers adultes est synchronisée (voir 2.2). Les œufs sont centrifugés, resuspendus dans 1ml de MeOH 100% refroidi (-20°C) et incubés 4 minutes à -20°C. Les œufs sont centrifugés, resuspendus dans 1ml d'acétone 100% refroidi (-20°C) et incubés 4 minutes à -20°C. Les œufs sont centrifugés, resuspendus dans 1ml d'acétone/H₂O 90% refroidi (4°C) et incubés 4 minutes à 4°C. Les œufs sont centrifugés, resuspendus dans 1ml d'acétone/H₂O 60% refroidi (4°C) et incubés 4 minutes à 4°C. Les œufs sont centrifugés, resuspendus dans 1ml d'acétone/(Egg Salt 1x, Hepes 5mM) 30% refroidi (4°C) et

incubés 4 minutes à 4°C. Les œufs sont centrifugés, resuspendus dans 1ml d'acétone/(Egg Salt 1x, Hepes 5mM) 60% refroidi (4°C) et incubés 4 minutes à 4°C. Les œufs sont centrifugés et lavés 3 fois avec 1ml de milieu de culture 1x. Les embryons fixés peuvent être utilisés immédiatement pour l'immunodétection ou entreposés quelques heures à 4°C.

2.18. IMMUNOMARQUAGE DES EMBRYONS: FIXATION HYBRIDE FORMALDÉHYDE ET MEOH

Une grande plaque NGM de vers adultes est synchronisée (voir 2.2). Les œufs sont centrifugés et resuspendus dans 1ml de 4% paraformaldéhyde dans un tampon phosphate (150mM KH_2PO_4 , NaOH 7.5mM). Les œufs sont incubés 10 minutes à température pièce. Ils sont lavés 3 fois avec 1ml de solution tampon phosphate 1x (PBS) (NaCl 150mM et K_2PO_4 30mM) et perméabilisés 10 minutes à -20°C dans 1ml de méthanol 100% prérefroidi à -20°C. Les œufs sont lavés 3 fois avec 1ml de PBS+0.5% tween20. Les embryons fixés sont utilisés immédiatement pour l'immunodétection.

2.19. IMMUNOMARQUAGE DES EMBRYONS: COLORATION DES FILAMENTS D'ACTINES

Les œufs fixés sont centrifugés 1 minute à 3500xg et resuspendre dans 300µl de phalloïdine (Biotium, CA): PBS 1x. Les œufs sont incubés 30 minutes dans le noir à température pièce. Les œufs sont lavés 3 fois avec 1ml de milieu de culture 1x (Goat serum 5%, Egg Salt 1x (NaCl 118mM, KCl 40mM, CaCl_2 3.5mM, MgCl_2 3.5mM) et Hepes 5mM) et 1 fois avec 1ml d' H_2O . Le surnageant est retiré et le culot est resuspendu dans 40µl de mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich Canada, ON). Deux gouttes de 20µl sont déposées sur une lame et chaque goutte est recouverte avec une lamelle. La lamelle est séchée pendant une nuit et conservée à -20°C par la suite.

2.20. IMMUNOMARQUAGE DES EMBRYONS: IMMUNODÉTECTION

Les anticorps primaires sont dilués 1/10 avec du milieu de culture 1x (Goat serum 5%, Egg Salt 1x (NaCl 118mM, KCl 40mM, CaCl₂ 3.5mM, MgCl₂ 3.5mM) et Hepes 5mM). Les œufs sont centrifugés à 3500xg pendant 2 minutes et sont incubés une nuit à 4°C dans 100µl d'anticorps dilués. Les œufs sont lavés 3 fois avec 1ml de milieu de culture 1x (Goat serum 5%, Egg Salt 1x (NaCl 118mM, KCl 40mM, CaCl₂ 3.5mM, MgCl₂ 3.5mM) et Hepes 5mM). Les œufs sont incubés 1 heure avec 100µl d'anticorps secondaire dilués 1/500 (PBS 1x) à température pièce. Les œufs sont centrifugés et lavés 3 fois avec 1ml de milieu de culture 1x (Goat serum 5%, Egg Salt 1x (NaCl 118mM, KCl 40mM, CaCl₂ 3.5mM, MgCl₂ 3.5mM) et Hepes 5mM) et 1 fois avec 1ml d'H₂O. Le surnageant est retiré et resuspendu dans 40µl de mowiol. Deux gouttes de 20µl sont déposées sur une lame et chaque goutte est recouverte avec une lamelle. La lamelle est séchée pendant une nuit et conservée à -20°C par la suite (Voir le tableau 2-6 pour la liste d'anticorps utilisés).

Tableau 2-6 : Liste des anticorps utilisés. Les anticorps monoclonaux primaires proviennent de la compagnie « The Developmental Studies Hybridoma Bank » (DSHB) (U.of Iowa, IA). Tous les anticorps primaires sont dilués 1/100 avec du milieu de culture 1x et les anticorps secondaires sont dilués 1/500 avec du PBS 1x (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.).

Nom de l'anticorps	Cible	Méthode de fixation
MH4	Filaments intermédiaires des muscles	Hybride
5-14-S ET 5-6-S	Chaînes lourdes des myosines	Hybride
Phalloïdin	Filaments d'actines	paraformaldéhyde

2.21. IDENTIFICATION DU DEGRÉ D'HOMOLOGIE DE DEUX SÉQUENCES PROTÉIQUES

Les séquences protéiques ont été obtenues à partir de l'outil NCBI, puis comparées par une analyse BLAST-P-align, selon la conservation des résidus. On obtient en premier lieu un pourcentage d'identité correspondant aux acides aminés identiques et un pourcentage « positif » correspondant aux acides aminés ayant des propriétés physico-chimique similaires.

2.22. PRÉDICTION DE DOMAINES SUR UNE SÉQUENCE PROTÉIQUE

Les séquences protéiques sont entrées dans les 2 outils bioinformatiques : <http://smart.embl-heidelberg.de/> et <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Pour le prédicteur Smart, il suffit d'entrer la séquence protéique, de cliquer « sequence SMART » et attendre le résultat. Pour le Blast-p, on doit sélectionner « protein blast », la séquence est copiée dans le prédicteur et on clique sur « BLAST » pour lancer la prédiction. Dans les deux cas, les paramètres standards ont été utilisés.

2.23. STATISTIQUE

2.23.1. ÉCART TYPE

L'écart type est la mesure de la variance au sein d'une population. On utilise la fonction « ECARTYPE » dans le programme Excel 2007. On sélectionne la serie de données sous l'onglet Nombre1 et l'écart type est calculé.

2.23.2. STUDENT T-TEST

Le Student T-Test permet de mesure la significativité des différences observées entre deux populations ou séries de données. On obtient une valeur *p-value*. Les *p-values* sont

calculé en utilisant la fonction « TEST.STUDENT » dans le programme Excel 2007. Dans l'onglet matrice 1, la série de données référence est sélectionnée (animaux sauvage, traitement ARNi *egfp*, etc). La matrice 2 est la serie de données à analyser. L'option unilatérale et le type 2 sont choisis. Par exemple, les phénotypes de létalité embryonnaire et d'arrêt larvaire obtenues par ARNi sont comparés par rapport à la condition contrôle (ARNi *egfp*).

2.24. CONCEPTION DES ARNI SPÉCIFIQUES AUX TRANSCRITS DE RGA-7

Les ARN totaux sont extraits au Trizol tel que décrit (2.12). Les ADNc sont produits tel que décrit (2.13) avec une amorce spécifique à la séquence C- terminal des ARNm est utilisée. Les formes *rga-7 l,m,s* ont tous au moins un exon spécifique : les exons 1 à 3 pour *rga-7l*, l'exon 4 pour *rga-7m* et l'exon 12 pour *rga-7s*. La séquence de ces exons est amplifiée par PCR et clonée dans un vecteur PL4440 par ligation. Cette partie a été faite par Emmanuel Martin.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1. CARACTÉRISATION DE L'ALLÈLE RGA-7(OK1498)

Tous les mutants des régulateurs des Rho GTPases ont été obtenus du *Caenorhabditis elegans* Genomic Center (CGC, U. Minnesota) financé par le « NIH National Center for Research Resources (NCRR) ». La génération et distribution des souches mutantes variées permet une utilisation efficace et une valorisation du nématode comme modèle biologique. Nous avons ensuite identifié le phénotype de ces mutants. La souche *rga-7(ok1498)* a été choisie parce qu'elle présente un phénotype de létalité embryonnaire.

Le mutant *rga-7 (ok1498)* a été backcrossé trois fois avec la souche sauvage, et son phénotype a été caractérisé. L'allèle *ok1498* provenant du *Caenorhabditis elegans* genomic center (CGC, U.Minnesota) possède une délétion de 581bp sur l'ADN génomique (ADNg) qui englobe les exons codant pour le domaine GAP créant ainsi un codon STOP prématuré (Fig. 3-5).

Cette mutation cause 25-30% (n= 5506) de létalité embryonnaire (Emb) (Table 3-2). Les larves et animaux adultes issus de l'éclosion du 70-75% des embryons viables sont d'apparence sauvage.

3.2. RGA-7(OK1498) EXPRIME UN PHÉNOTYPE D'HYPERCONTRACTION DORSALE

La microscopie à 4 dimensions nous a permis de caractériser le phénotype des animaux *rga-7(ok1498)* (le nombre d'embryons observés est de n = 69).

- 98.5% des embryons expriment au moins un des trois phénotypes différents (Fig. 3-1)
- 24.6% des animaux ont un défaut d'hypercontraction précoce débutant au stade comma (Fig. 3-1B). Cette hypercontraction est plus sévère dans la partie postérieure.

- 14.5% des embryons avec hypercontractions précoces meurent par rupture entre le stade 1.2 et 1.5x. Cette rupture se produit dans les embryons ayant une morphologie anormale suite à la fermeture ventrale (Fig. 3-1C).

- 66.7% des embryons ont des hypercontractions tardives. Les défauts tardifs sont caractérisés par une hypercontraction dorsale d'une expressivité variable (Fig. 3-1). La queue de certains embryons se replie dorsalement au lieu de ventralement à partir du stade 1.75x .

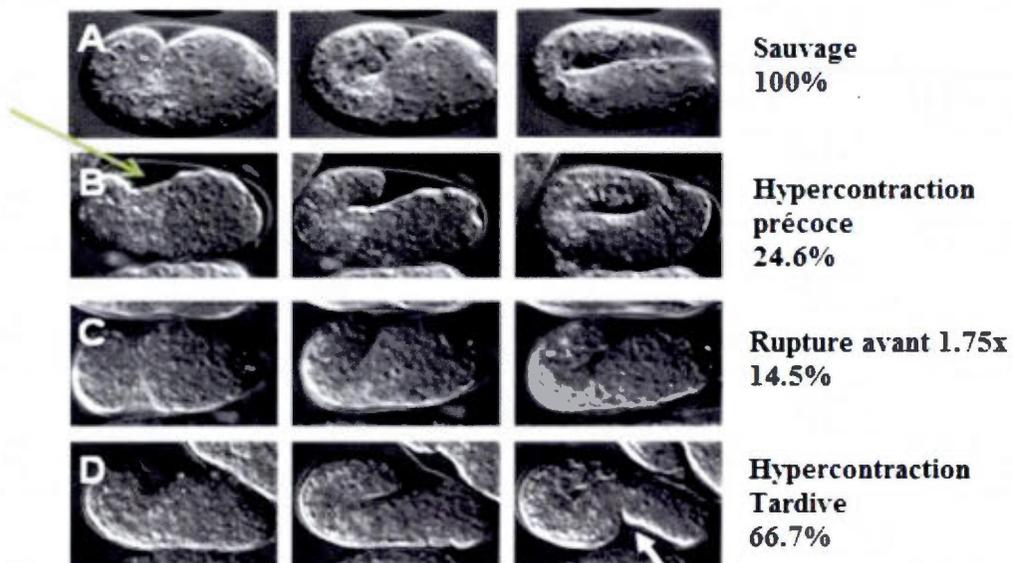


Figure 3-1: L'allèle *ok1498* est associée à un phénotype d'hypercontraction dorsale. Les œufs mutants ou sauvages sont filmés au microscope à 4 dimensions pendant l'élongation. **(A)** développement normale des animaux sauvages (souche *N2*) **(B)** Hypercontraction précoce affectant 24.6% des embryons. Cette hypercontraction est caractérisée par une invagination excessive (flèche verte) durant l'étape comma et se poursuit par une hypercontraction généralisée de l'hypoderme. **(C)** Rupture précoce affectant 14.5% des embryons. Cette rupture prend 2 formes : soit il y a éclatement de l'embryon, soit la rupture est localisée provoquant ainsi le relâchement du contenu cellulaire principalement à l'extrémité antérieure de l'embryon. **(D)** Hypercontraction dorsale affectant 67% des embryons. Ce phénotype est caractérisé par des contractions spontanées induisant la

formation d'une invagination au niveau dorsal (flèche blanche). Cependant, la majorité des embryons termine l'élongation en larve viable d'apparence *wt*.

3.3. RGA-7(OK1498) EST IMPLIQUÉE AU NIVEAU DE L'ÉLONGATION PRÉCOCE ET TARDIVE

Le temps requis pour compléter les 2 étapes d'élongation a été mesuré dans les films de microscopie à 4 dimensions. Le temps requis est supérieur pour les animaux *rga-7(ok1498)* que pour les animaux sauvages. Cette différence est significative pour l'élongation précoce (Fig. 3-2, T-Test p -value= 0,0016) et pour l'élongation tardive (Fig. 3-3 G; T-Test p -value= 0.00011).

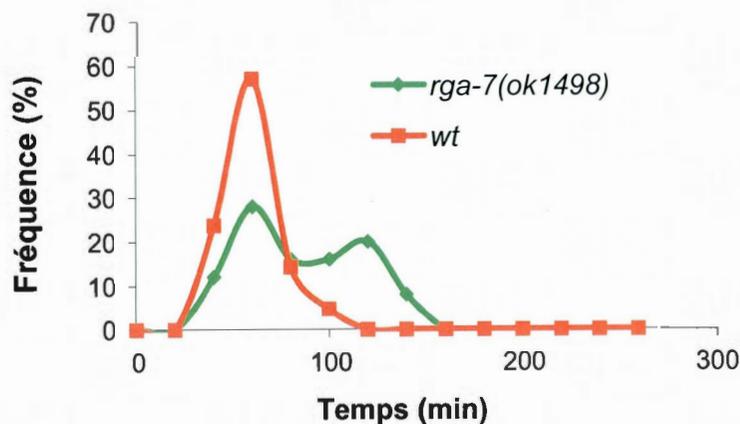


Figure 3-2: Temps requis pour compléter l'élongation entre le stade comma et 1.75x. Les œufs en élongation sont filmés par microscopie à quatre dimensions sous un éclairage DIC et un grossissement de 630X. La souche *rga-7(ok1498)* possède un temps d'élongation significativement supérieur à celui de la souche *N2 (wt)* pour une proportion d'environ 40% des œufs

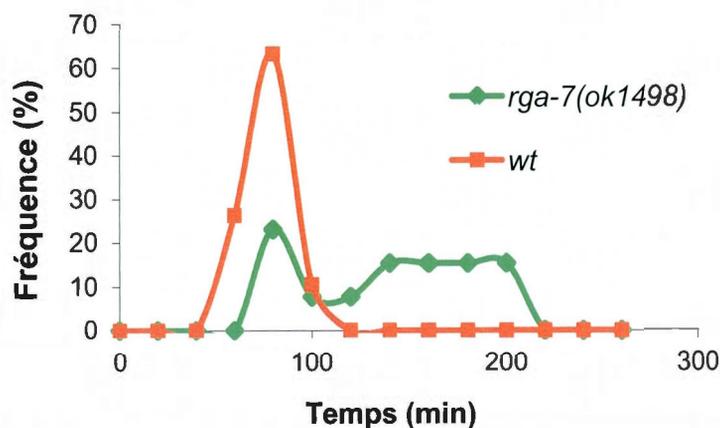


Figure 3-3: Temps requis pour compléter l'élongation entre le stade 1.75x et 3x. Les œufs en élongation sont filmés par microscopie à quatre dimensions sous un éclairage DIC et un grossissement de 630X (objectif à immersion 63x). La souche *rga-7(ok1498)* possède un temps d'élongation significativement supérieur à celui de la souche *N2 (wt)* pour une proportion d'environ 40% des œufs.

3.4. RGA-7 CODE POUR TROIS TRANSCRITS RÉSULTANT D'UNE INITIATION ALTERNATIVE DE LA TRANSCRIPTION

La structure génétique du gène *zk669.1* était associée à la transcription de deux protéines selon Wormbase WS212. Pour valider ce modèle, les « expressed sequence tags » (EST) disponibles ont été alignés avec l'ADN génomique de *rga-7*. Cet alignement a identifié un nouveau transcrite contenant les trois exons en amont de la structure prédite par Wormbase. Le nouveau modèle comporte l'expression de trois transcrits : *rga-7l*, *rga-7m* et *rga-7s* provenant d'une initiation alternative de la transcription dans les exons 1, 4 et 12 (Fig 3-5). Ce modèle a été confirmé par l'utilisation d'amorce spécifique aux exons sur l'ADNc et en contrôle sur l'ADNg. La comparaison de la taille des produits PCR sur l'ADNc avec la taille des fragments attendus (Tableau 3-1) selon le modèle (Fig 3-4) nous permet de le confirmer. Pour l'exon 2 et 5 (E2-E5), on obtient un produit de 300pb ce qui s'accorde avec

l'absence de l'exon 4 pour le transcrit *rga-7l*. Le fragment E11-E14 migre à 400pb, ce qui confirme l'absence de l'exon 12 dans les formes *rga-7l* et *rga-7m*. La taille du produit PCR sur l'ADNg avec les amorces E12-E14 est de 781bp (Tableau 1). Les amorces E12-E14 ont permis l'amplification d'un fragment spécifique à *rga-7s*, ainsi que 3 bandes (800bp, 700bp et 500bp) sur l'ADNc. Nous supposons que les 2 bandes à 700bp et 500bp correspondent à un ARNm avec l'intron 12-13 ou l'intron 13-14 et la bande à 800bp correspond à un ARNm avec les 2 introns (Fig 3-4). Ces bandes correspondraient à des ARN pre-messager en cours d'épissage et auraient été amplifiées puisque la forme courte semble très faiblement exprimés et donc l'ARNm peu abondant (produit à 370bp). De façon intéressante, *rga-7* possède un grand intron dans lequel on pourrait retrouver les éléments promoteurs pour l'expression de la forme *rga-7s*.

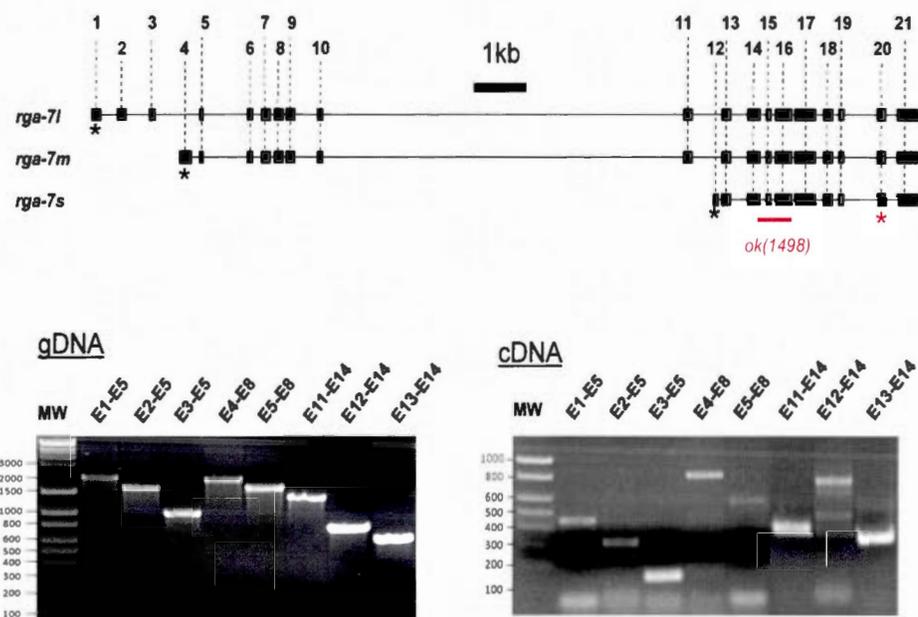


Figure 3-4: Le gène *rga-7* possède 3 transcrits résultant d'une initiation alternative de la transcription. Ce modèle établi selon l'alignement des ESTs est confirmé par des PCR utilisant des amorces spécifiques aux exons sur l'ADNc et l'ADNg. Les 2 versions longues ne possèdent pas l'exon 12 et la version courte ne possède pas les exons 1 à 11. Finalement,

la forme moyenne (*rga-7m*) ne possède pas l'exon 4. La position de la délétion *ok1498* est illustrée en rouge.

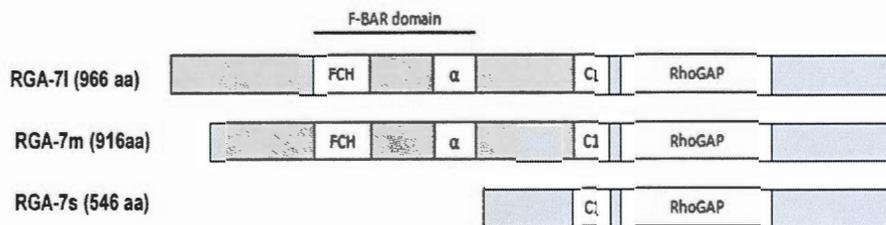


Figure 3-5 : Les transcrits de *rga-7* possèdent tous le domaine GAP et C1. Des prédictions de domaine consensus sur les séquences protéiques découlant du modèle confirmé (Fig.3-4). Les prédictions sont réalisées avec le logiciel Smart2 et confirmées par Blast-p. Les deux versions longues de RGA-7 possèdent un domaine F-Bar qui permet la liaison préférentielle des membranes courbées. Le domaine C1 permet de se fixer au diacyl-glycérol, un lipide messager membranaire.

Tableau 3-1 : Taille des fragments PCR attendues. Des paires d'amorces spécifiques aux exons des 3 transcrits prédits sont utilisées pour amplifier des fragments à partir de l'ADN codant total ou de l'ADNg. Le but est de confirmer le modèle établi selon Wormbase WS212 et nos alignements de séquences ESTs (Fig. 3-4). Un trait (-) indique l'absence d'un produit PCR attendu.

Paires d'amorces spécifiques aux exons (E)	ADNg (bp)	ADNc (bp) <i>rga-7l</i>	ADNc (bp) <i>rga-7m</i>	ADNc (bp) <i>rga-7s</i>
E1-E5	2126	432 sans l'E4 658 avec l'E4	658 avec l'E1 à E3	-
E2-E5	1661	297 sans l'E4 524 avec l'E4	- sans l'E1 à E3 524 avec l'E1 à E3	-
E3-E5	1019	146 sans l'E4 373 avec l'E4	- sans l'E1 à E3 373 avec l'E1 à E3	-
E4-E8	2005	772 avec l'E4	772	-
E5-E8	1637	556	556	-
E11-E14	1352	386 sans l'E9 488 avec l'E9	386 sans l'E9 488 avec l'E9	488
E12-E14	781	- sans l'E9 379 avec l'E9	- sans l'E9 379 avec l'E9	379
E13-E14	633	333	333	333

3.5. LES TROIS FORMES DE RGA-7 SONT ESSENTIELLES POUR L'ÉLONGATION DE C. ELEGANS

Pour identifier les formes de RGA-7 impliquées dans le contrôle de l'élongation, des vers *rga-7(ok1498)* et *N2* au stade L1 synchronisés ont été soumis à un traitement d'ARN interférant par alimentation solide. La pénétrance des phénotypes est variable d'une journée à l'autre selon l'efficacité de traitement ARNi. Les résultats sont le cumul d'au moins trois expériences indépendantes (Fig 3-6). La pénétrance relative d'une condition sur l'autre montrée dans ces résultats est représentative des 3 à 5 expériences indépendantes effectuées.

Les trois transcrits de *rga-7* sont impliqués dans l'élongation. Des expériences d'ARNi par alimentation solide chez les vers sauvages et mutant *rga-7(ok1498)* ont été réalisées. Les ARNi spécifiques pour chaque forme du gène *rga-7* (*rga-7l*, *rga-7m*, *rga-7s* et *rga-7 GAP*) ont permis d'augmenter significativement la létalité embryonnaire des vers sauvages respectivement 7.1%, n= 5585; 3.4%, n=7786; 4.5%,n=6862 et 10.4% n=11733 (Fig. 3-6) Ces observations nous permettent d'affirmer que les trois formes de *rga-7* sont impliquées dans l'élongation et que le mutant *rga-7(ok1498)* est un mutant *null*, puisque la létalité embryonnaire n'est pas augmentée par la réduction de l'expression de *rga-7* total (GAP).

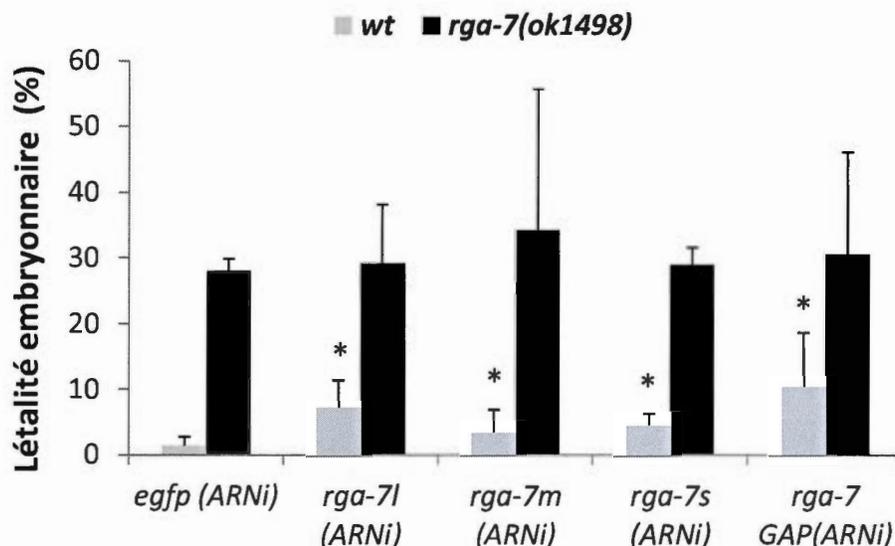


Figure 3-6: Les 3 formes protéiques de RGA-7 sont requises pour l'élargissement de *C. elegans*. Les souches sont synchronisées par traitement à l'hypochlorite de sodium et les larves L1 sont incubées en présence d'ARNi (alimentation solide) jusqu'à la ponte. Ensuite les vers sont retirés et les œufs sont comptés. 24h plus tard, les œufs morts sont comptés. Les ARNi contre les 3 formes de *rga-7* provoquent une létalité embryonnaire significativement plus élevée que le contrôle *egfp*(ARNi). *rga-7 GAP* (ARNi) n'induit pas de létalité supplémentaire dans la souche *rga-7(ok1498)* ce qui nous indique que cette souche est un mutant *null*. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (voir 2.23.1)(* : T-Test par rapport au *egfp*(ARNi); $p\text{-value} < 0.05$).

3.6. RGA-7 A UNE ACTIVITÉ ENVERS CDC-42, RHO-1 ET MIG-2

3.6.1. L'ACTIVITÉ GAP DE RGA-7 IN VITRO

Deux GTPases Rhos sont connues pour réguler positivement l'élargissement (contraction), RHO-1 et CDC-42 (Lundquist, 2006). Le phénotype d'hypercontraction associé à *rga-7(ok1498)* suggère qu'il régule l'activité d'une de ces deux GTPases. Pour vérifier cette hypothèse, on a testé la spécificité du domaine GAP de RGA-7 *in vitro*. Pour ce

faire, le domaine GAP de RGA-7 a été amplifié par PCR et cloné dans le vecteur d'expression bactérienne pTRCHisA. Les protéines recombinantes ont été exprimées en cellules BL21 et purifiées sur billes de nickel agarose. Le domaine GAP de RGA-7 purifié de bactéries recombinantes a été incubé pendant 5 minutes à température pièce avec des GTPases chargées avec du GTP γ 32P. L'hydrolyse du GTP est mesurée par disparition de la radioactivité après filtration. La quantité de domaines GAP requis pour augmenter de 2x l'hydrolyse du GTP est calculée (Fig. 3-7). On démontre que RGA-7 a une forte activité GAP envers CDC-42 et une activité faible envers RHO-1 et MIG-2. Aucune activité n'a pu être détectée pour les autres GTPases. Cette expérience a été effectuée avant mon arrivée dans le laboratoire.

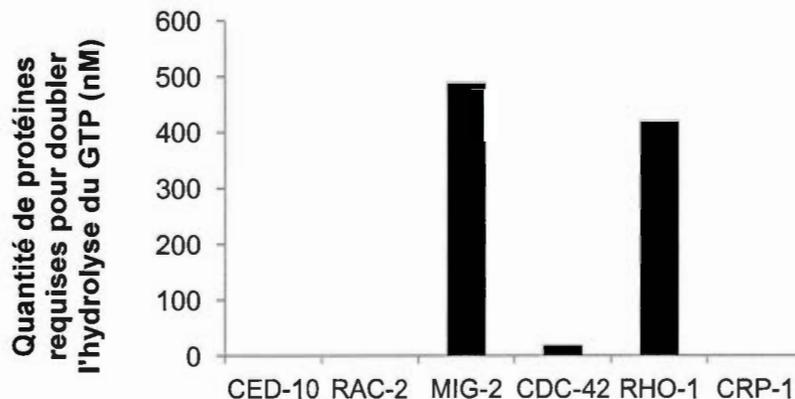


Figure 3-7: RGA-7 a une forte activité GAP envers CDC-42 et faible envers MIG-2 et RHO-1. Des concentrations de domaines GAP (RGA-7) recombinants allant de 0 à 1000nM sont incubées à 37°C avec 5mM de GTPases chargées au GTP γ 32P pendant 0 ou 5 minutes. Après filtration, la disparition de la radioactivité sur la membrane est quantifiée. L'activité catalytique du domaine GAP de RGA-7 est calculée selon la quantité de domaine GAP RGA-7 en nM nécessaire pour doubler l'activité d'hydrolyse intrinsèque des GTPases. RGA-7 possède donc une très forte activité GAP envers CDC-42 tel que démontré par la faible quantité de domaines GAP requis. Les concentrations de GAP requise pour doubler l'activité d'hydrolyse des GTPase pour CED-10, RAC-2 et CRP-1 est supérieure à 1000 et n'est donc pas indiquée sur ce graphique.

3.6.2. L'ACTIVITÉ GAP DE RGA-7 IN VIVO

Pour évaluer l'activité GAP *in vivo* de *rga-7*, on a incubé les vers sauvages ou mutants *rga-7(ok1498)* avec des ARNi contre les six GTPases Rho de *C. elegans*. Comme prévu, *cdc-42(ARNi)* a été associé à une forte létalité embryonnaire (65%, n=1979) chez les vers sauvages (Fig. 3-8), ce qui s'accorde avec des résultats déjà publiés (Kay et Hunter, 2001). Chez les animaux *rga-7(ok1498);cdc-42(ARNi)*, la létalité embryonnaire obtenue (56.9%, n=789) est significativement plus basse que la létalité embryonnaire attendue (75%) dans le cas où, les deux gènes n'auraient aucune interaction génétique. *rga-7* et *cdc-42* ont des fonctions antagonistes pendant l'élongation embryonnaire de *C. elegans*. Cependant, *rho-1(ARNi)* mène à la stérilité complète des animaux, ce qui ne nous a pas permis d'exclure RHO-1 en tant que GTPase cible de RGA-7. *mig-2(ARNi);rga-7(ok1498)* présente 27% Emb (n=2199), alors que *mig-2(ARNi)* induit 6% Emb (n=5456) suggérant ainsi que MIG-2 ne serait pas la cible de RGA-7 *in vivo*. Cette observation est consistante avec le rôle de *mig-2* dans la signalisation de l'élongation. En effet, l'inhibition de l'activité GAP envers *mig-2* produirait un phénotype d'hypocontraction plutôt que le phénotype d'hypercontraction observé chez les animaux *rga-7(ok1498)*. (Piekný *et al.*, 2000)

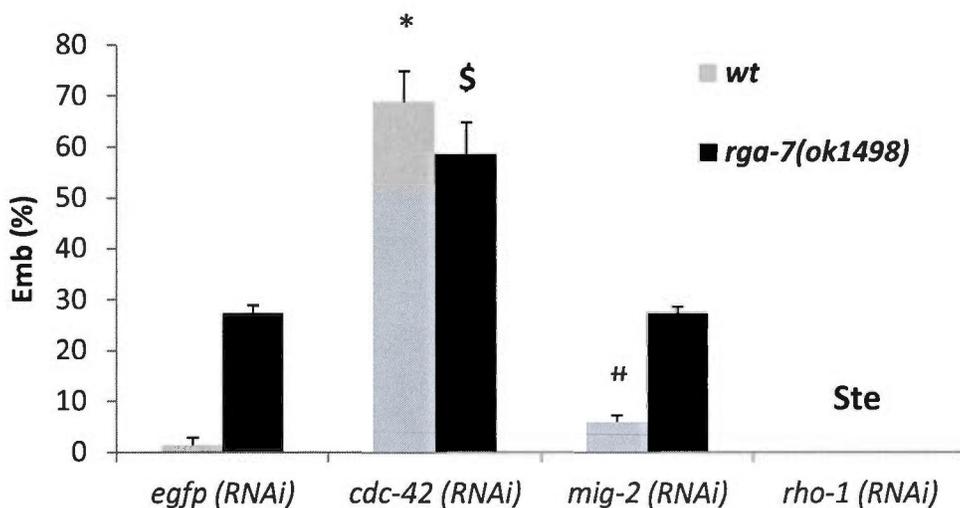


Figure 3-8: *cdc-42* et *rga-7* sont antagonistes pendant l'élongation, mais *rga-7* n'interagit pas génétiquement avec *mig-2*. Les larves L1 synchronisées sont incubées en présence d'ARNi jusqu'à la ponte. *rga-7(ok1498);cdc-42(ARNi)* possède une létalité inférieure (59% vs 66%) à *cdc-42(ARNi)* et significativement inférieure à la létalité attendue si les deux gènes n'interagissaient pas génétiquement (66%+11%(27% du 34% restant)=75%). *rho-1(ARNi)* cause 100% Ste et ne peut donc pas être exclu comme GTPase cible de la protéine RGA-7. Puisque la mutation *rga-7(ok1498)* réduit la létalité embryonnaire des animaux *cdc-42(ARNi)* et que RGA-7 est un régulateur négatif des GTPases Rho (GAP), on conclut qu'ils ont une interaction antagoniste pendant l'élongation embryonnaire. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type entre chaque expérience (voir 2.23.1) (* : T-Test par rapport aux animaux *egfp(RNAi)* $p\text{-value}= 8.26 \times 10^{-11}$; \$: T-Test par rapport au résultat attendu $p\text{-value}= 6.93 \times 10^{-8}$; #: T-Test par rapport aux animaux *egfp(RNAi)* $p\text{-value}=0.0056$)

3.7. RGA-7 INTERAGIT AVEC PAK-1

PAK-1 est une kinase impliquée dans l'élongation embryonnaire du *C. elegans*. La réduction du niveau d'expression de *pak-1* par ARN interférant induit une létalité embryonnaire de 3% (n=3400) chez les vers sauvages (Tableau 3-2). Chez les mutants *rga-*

7(ok1498), la réduction de l'expression de *pak-1(ARNi)* indique une interaction génétique entre ces deux gènes. En effet, la létalité embryonnaire des embryons *rga-7(ok1498); pak-1(ARNi)* est de 17% ce qui représente une diminution par rapport à *rga-7(ok1498)* (28% Emb). De façon intéressante, les larves *rga-7(ok1498);pak-1(ARNi)* présente un défaut morphologique de l'hypoderme dans 30% (n=1056) des cas. Ce phénotype n'a pas été caractérisé en profondeur, mais la morphologie de l'hypoderme est affectée suffisamment pour produire des larves plus petites (Stade 2x). Il est intéressant de se demander si cette interaction est synergique ou antagoniste. En effet, le phénotype Emb diminue à 17%, mais un nouveau phénotype émerge et affecte 30% des embryons.

Tableau 3-2 : *rga-7(ok1498)* interagit génétiquement avec *pak-1(ARNi)*. La létalité embryonnaire et le nouveau défaut morphologique sont quantifiés sur les souches mutantes *rga-7(ok1498)* et sauvage *N2* (nombre d'expérience ≥ 3 . Chaque expérience a été réalisée en triplicat). Les écarts types sont indiqués dans le tableau.

Souche	Nombre d'œufs comptés	Létalité embryonnaire (Emb) (%)	Larves arrêtées (Lva) avec défauts morphologiques (Bmd) (%)
<i>pak-1(ARNi)</i>	3400	3.2 \pm 0.46	0.9 \pm 0.17
<i>rga-7(ok1498); pak-1(ARNi)</i>	1056	17.1 \pm 9.6	30.4 \pm 4.15
<i>egfp (ARNi) ; rga-7(ok1498)</i>	1880	28.1 \pm 1.7	0
<i>egfp (ARNi)</i>	3392	1.4 \pm 1.3	0

3.8. RGA-7 ET PIX-1

PIX-1 est une protéine GEF agissant sur CDC-42 pendant l'élongation embryonnaire. *rga-7* et *pix-1* ont des fonctions antagonistes pendant l'élongation. En effet, le mutant null *pix-1(gk416)* présente une létalité embryonnaire de 3.5% (n=584) et un arrêt larvaire de 17% et *rga-7(ok1498)* présente une létalité embryonnaire de 25% et un arrêt larvaire nul. On s'attend donc à obtenir 28.5% (25%+3.5%) de létalité embryonnaire et 17% (0%+17%) d'arrêt larvaire pour le double mutant si ces deux gènes n'interagissent pas génétiquement. Le croisement entre ces deux souches a été réalisé, tel que décrit dans le matériel et méthode. La souche double-homozygote *rga-7(ok1498); pix-1(gk416)* présente une létalité embryonnaire de 3.7% et un arrêt larvaire nul (n=812) (Fig. 3-9). Cette réduction importante des deux phénotypes observés nous indique une fonction antagoniste entre les deux gènes.

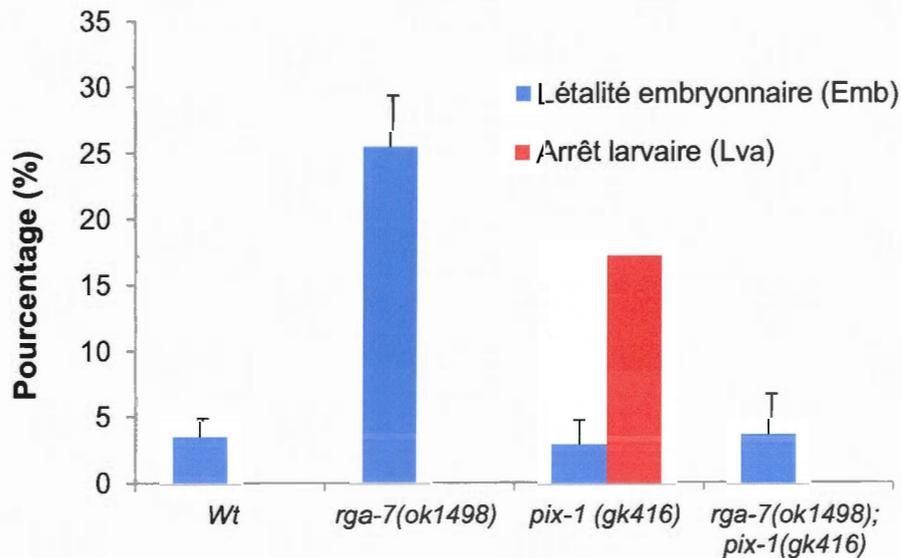


Figure 3-9: Létalité embryonnaire des souches *rga-7(ok1498)*, *pix(gk416)* et *rga-7(ok1498); pix(gk416)*. Des vers adultes sont transférés sur une plaque NGM jusqu'à la ponte des œufs. Après être retirés du milieu, les œufs pondus sont comptés. 24 heures plus tard les œufs morts sont comptés et 48 heures plus tard les larves arrêtées sont comptées. Les résultats sont le cumul d'au moins 3 expériences avec un minimum de trois comptages indépendants par expérience. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (voir 2.23.1).

3.9. IDENTIFICATION DE PARTENAIRES FONCTIONNELS DE RGA-7

Un test par ARNi nous a permis d'identifier deux autres interactants possibles. Cette expérience consiste en un traitement ARNi par alimentation solide des souches *rga-7(ok1498)* et *N2* du stade L1 jusqu'à la ponte des œufs. Les divers gènes inclus dans le test sont : *wsp-1*, *mrck-1*, *rac-2*, *ced-10*, *crp-1*. Les principaux résultats suggèrent une interaction génétique de *rga-7* avec *mrck-1* et *wsp-1* (Tableau 3-3).

Tableau 3-3 : *rga-7* possède plusieurs autres interactants possibles tel que suggéré par ARNi. La létalité embryonnaire est quantifiée sur deux souches : *rga-7(ok1498)* et *N2*. Les expériences ont été réalisées 1 ou 2 fois. Ces résultats suggèrent une interaction possible de *rga-7* avec *mrck-1* et *wsp-1*. Il est intéressant de noter que *rga-7(ok1498);wsp-1(ARNi)* a une létalité embryonnaire faible, suggérant un sauvetage du phénotype associé à la délétion *ok1498*.

ARNc cible	<i>N2</i>		<i>rga-7(ok1498)</i>	
	Létalité embryonnaire (Emb) (%)	Nombre de vers	Létalité embryonnaire (Emb) (%)	Nombre de vers
<i>egfp</i>	1.4	4176	27.4	2222
<i>wsp-1</i>	1.5	949	1.6	819
<i>mrck-1</i>	1.1	522	17.5	823
<i>rac-2</i>	5.8	642	23.2	669
<i>ced-10</i>	5.4	806	22.7	647
<i>crp-1</i>	4.9	637	25.6	441

3.10. AJM-1 ET RGA-7

Un croisement avec des mâles *rga-7(ok1498)* et hermaphrodite *ajm-1::gfp* nous a permis d'obtenir la souche *rga-7(ok1498);ajm-1::gfp*. AJM-1 forme les jonctions DAC avec Dlg-1. Des adultes sont disséqués et les œufs sont observés au microscope sous éclairage DIC et fluorescence verte. Dans la souche *ajm-1::GFP*, on voit bien les jonctions adhérentes (Fig. 3-10). L'organisation des jonctions ne semble pas altérée dans les mutants *rga-7(ok1498)* (Fig. 3-10). Ceci suggère que RGA-7 n'est pas essentiel à la formation ni au maintien des jonctions adhérentes.

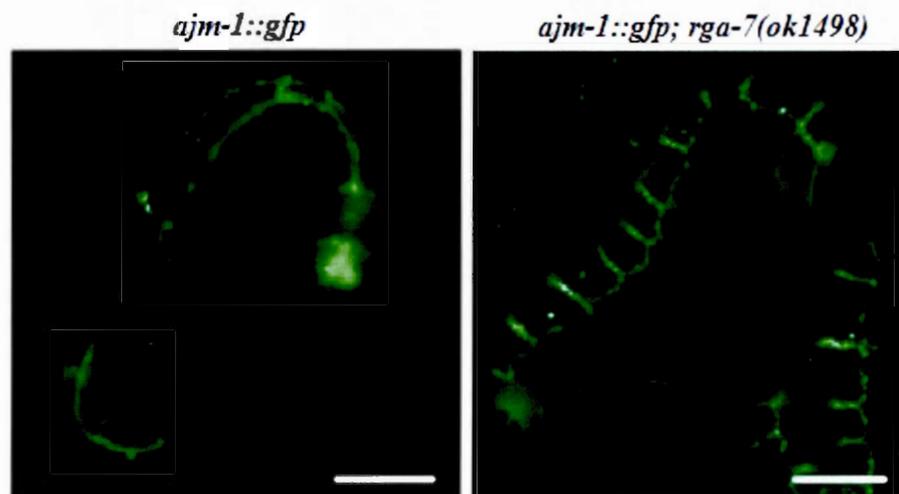


Figure 3-10: La délétion *ok1498* n'affecte pas la localisation ou la structure des jonctions adhérentes DLG-1/AJM-1. Les mutants *rga-7(ok1498);ajm-1::gfp* sont observés au microscope à fluorescence (filtre GFP). Les embryons mutants sont comparés au contrôle *ajm-1::GFP*. Les bandes blanches représentent 10 μm .

3.11. LA DÉLÉTION OK1498 N'AFPECTE PAS LA STRUCTURE OU LA LOCALISATION DES MUSCLES PENDANT L'ÉLONGATION

Pour mieux comprendre la base moléculaire du phénotype observé dans les mutants *rga-7(ok1498)*, nous avons vérifié si RGA-7 contrôlait la migration ou la morphologie des muscles. Pour ce faire, nous avons fait une série de marquages par immunofluorescence sur

des embryons de vers sauvages et mutants et comparé la structure et localisation des muscles. Les anticorps choisis sont des anticorps marquant spécifiquement les chaînes lourdes de myosines musculaires (tableau 2-6). Aucune différence de structure ni de localisation des cadrans musculaires n'a été observée entre les animaux sauvages et mutants au deux différents stades de l'élongation embryonnaire 1.5 plis et 3 plis (1.5-fold et 3-fold respectivement; Fig. 3-11). Ce résultat nous indique que la fonction de RGA-7 n'est pas nécessaire pour la structure ou la localisation des muscles.

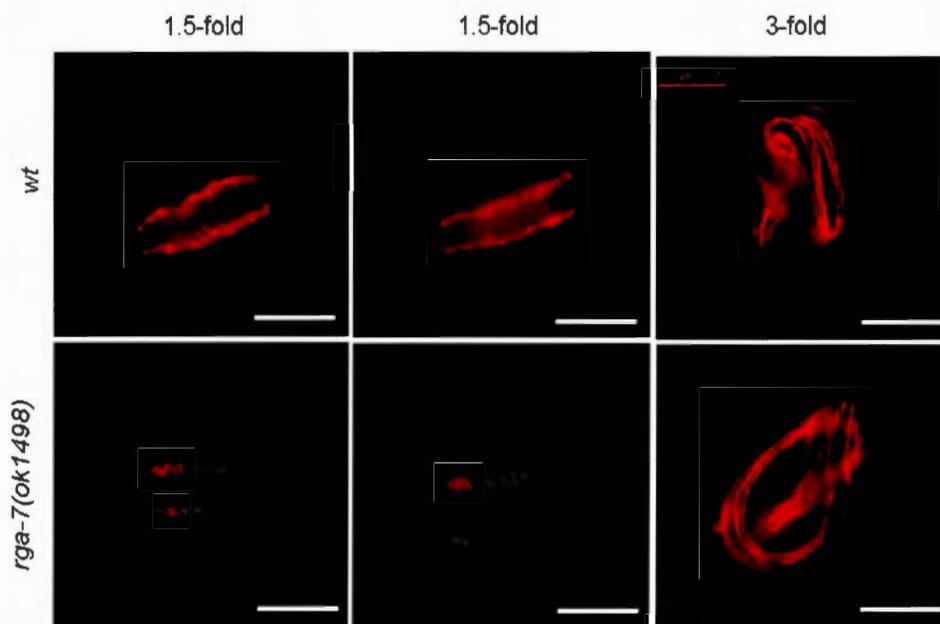


Figure 3-11: *rga-7(ok1498)* affecte ni la localisation ni la structure des muscles. Immunomarquage des chaînes lourdes de myosines (muscles) par les anticorps 5-6-s et 5-14-s (chaque anticorps est dilués 1/100 dans le milieu de culture 1x). Les œufs en élongation sont perméabilisés et fixés selon la méthode hybride (voir matériel et méthode). Les marquages sont observés au microscope à fluorescence (Las-AF5500). Les bandes blanches représentent 25 μ m.

3.12. LES ANIMAUX RGA-7(OK1498) ONT DES CONTRACTIONS DE PLUS GRANDE AMPLITUDE QUE LES ANIMAUX SAUVAGES

L'amplitude de contraction des muscles a été mesurée pour identifier si les défauts d'hypercontractions sont le résultat de contractions musculaires défectueuses.

Les contractions ont été mesurées entre le stade 1.75x et 2x pour les animaux *wt* et *rga-7(ok1498)*. L'amplitude des contractions est significativement plus élevée chez les animaux *rga-7(ok1498)* que chez les animaux sauvages. (Fig. 3-12; T-Test $p\text{-value} = 2,06 \times 10^{-7}$) Cette observation confirme que les muscles sont fonctionnels et connectés à l'hypoderme.

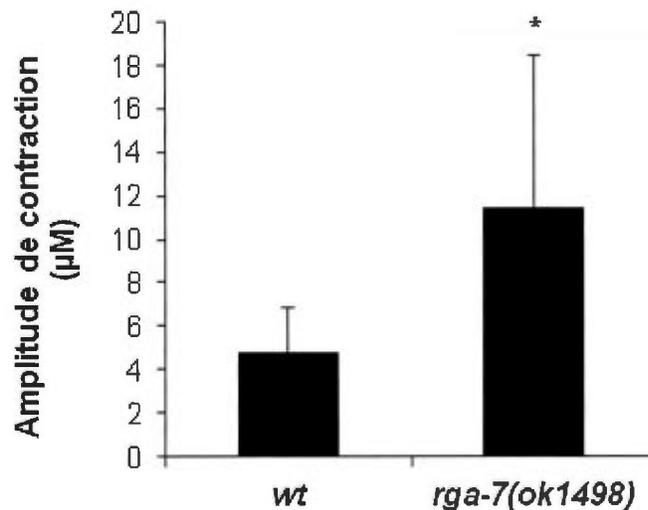


Figure 3-12 : L'amplitude des contractions des animaux *rga-7(ok1498)* est significativement plus élevée que l'amplitude des contractions des animaux sauvages. L'amplitude des contractions a été mesurée en analysant les films d'élongation. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type (voir 2.23.1)($n=49$ pour *rga-7(ok1498)* et $n=32$ *wt*)(* : T-Test par rapport au *wt*; $p\text{-value} = 2,06 \times 10^{-7}$).

3.13. LA DÉLÉTION *OK1498* N'AFPECTE PAS LA STRUCTURE DES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

En un deuxième temps, nous avons cherché à savoir si *rga-7* contrôlait l'assemblage et le maintien des jonctions entre les muscles et l'hypoderme. Pour ce faire, nous avons analysé la morphologie des structure d'attachement trans-épidermal (TEA) grâce à une immunodétection des filaments intermédiaires avec l'anticorps MH4 (Tableau 2-6) recrutés au niveau de l'attachement des muscles et situés dans les cellules de l'hypoderme. Aucune différence n'a été observée dans la structure ou la localisation des filaments intermédiaires, nous indiquant que les hémidesmosomes sont présents et fonctionnels (Fig. 3-13). Ce résultat permet de confirmer que la plus grande amplitude des contractions observées chez les animaux *rga-7 (ok1498)* n'est pas due à un problème de jonction entre les muscles et l'hypoderme.

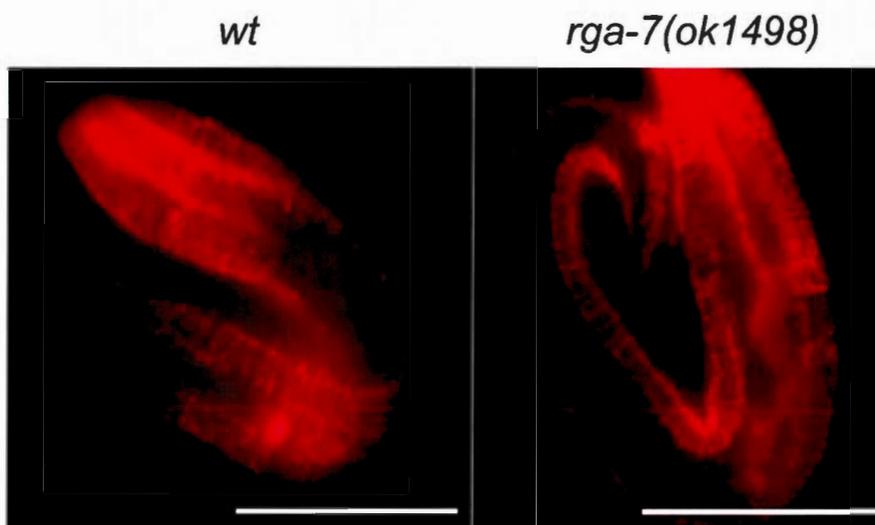


Figure 3-13: *rga-7(ok1498)* n'affecte ni la localisation ni la structure des filaments intermédiaires. Immuno-marquage des filaments intermédiaires (muscles) par l'anticorps MH4. Les œufs en élévation sont perméabilisés et fixés selon la méthode hybride (voir matériel et méthode). Les marquages sont observés au microscope à fluorescence (Las-AF5500). Une photo est prise aux stades virgule, 1.5x, 2x et 3x. Deux exemples représentatifs au stade 3x sont illustrés ci-dessus. La bande blanche représente 25µm.

3.14. ÉTUDE DU PROFIL D'EXPRESSION DE RGA-7

L'identification du profil d'expression protéique consiste à déterminer la localisation cellulaire d'une protéine. Les vers transgéniques exprimant la fusion d'une protéine fluorescente avec la protéine d'intérêt est un outil très puissant. En effet, on peut déterminer la localisation cellulaire par microscopie dans un organisme vivant. De plus, les vers transgéniques peuvent être utilisés dans les expériences d'immunodétection pour identifier des partenaires d'interactions par colocalisation. Cependant, la production de vers transgéniques *rga-7::mCherry* n'a pas pu être réalisée. La technique utilisée est celle décrite par (Tursun *et al.*, 2009). Elle repose sur la modification par recombinaison homologue d'un fosmide contenant le locus de *rga-7* (zk669.1). Une première sélection reposant sur le galactokinase, nous permet d'isoler les bactéries ayant incorporé la cassette mCherry contenant le gène galactokinase. Par la suite, une deuxième recombinaison nous permet d'exciser le gène de la galactokinase. La deuxième sélection se fait sur gélose Maconkey (galactose) (BD *Difco*TM) et sur milieu minimal désoxygalactose. Le désoxygalactose est toxique pour les bactéries lorsqu'il est dégradé par la galactokinase. Les étapes de sélection ont bien fonctionné. Cependant, une PCR flanquant la zone d'insertion nous a permis d'affirmer que la cassette était localisée au mauvais endroit sur le fosmide.

3.15. ÉTUDE DU DEGRÉ D'HOMOLOGIE DU DOMAINE GAP ET F-BAR ENTRE LA PROTÉINE RGA-7L /RICH1A, RGA-7/RICH1B ET RGA-7 /PARG1

RGA-7 possède deux orthologues humain potentiels : RICH1 et PARG1. L'identification de l'orthologue humain permet d'obtenir des informations sur la fonction, ainsi que sur les interactants de l'orthologue humain qui pourrait être conservés chez les némtodes. Les degrés d'homologie des séquences protéiques de RGA-7, RICH1 et PARG1 ont été obtenus en utilisant les outils bioinformatiques NCBI, NCBI-BLAST-p et SMART 2 tel que décrit dans la section matériel et méthode (2.21). RICH1 possède un domaine BAR et un domaine Rho GAP. PARG1 possède un domaine F-Bar suivi d'un domaine C1 précédant le domaine Rho GAP, tout comme RGA-7l. RICH1 possède une meilleure homologie au niveau du domaine GAP (58%), mais n'a aucun alignement significatif avec le domaine F-

Bar. PARG1 a une homologie de 51% pour le domaine GAP et de 52% pour le domaine F-Bar (Tableau 3-4).

Tableau 3-4: Degré d'homologie des domaines Rho GAP et F-BAR de RGA-7I avec RICH1a, RICH1b et PARG1.

	Pourcentage d'identité du domaine GAP (%)	Pourcentage « résidus positifs » du domaine GAP (%)	Pourcentage d'identité du domaine F-Bar (%)	Pourcentage « résidus positifs » du domaine F-Bar (%)
RICH1a	31	58	Pas d'alignement significatif	
RICH1b	31	58	Pas d'alignement significatif	
PARG1	32	51	28	52

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1. LES 3 TRANSCRITS DE RGA-7 SONT IMPLIQUÉS DANS L'ÉLONGATION PRÉCOCE ET TARDIVE DE *C. ELEGANS*

Un nouveau régulateur des GTPases Rho pendant l'élongation embryonnaire de *C. elegans* a été identifié. Le gène *rga-7* code pour trois protéines (RGA-7l, RGA-7m, RGA-7s) possédant différents domaines. Ces trois protéines contiennent un domaine GAP qui est spécifique envers CDC-42 et possiblement RHO-1 *in vitro* et *in vivo*.

La mutation null du gène *rga-7* entraîne un phénotype de létalité embryonnaire ayant une pénétrance variant entre 25 et 30%. Ce phénotype est principalement caractérisé par une hypercontraction pendant l'élongation précoce au niveau de la partie antérieure des embryons et pendant l'élongation tardive au niveau dorsal qui affecte respectivement 24.6 et 66.7% des embryons. De plus, une faible proportion des embryons meurt suite à une rupture de l'hypoderme juste avant l'élongation tardive. Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle *rga-7* serait impliqué au niveau de l'élongation. L'augmentation du temps requis pour compléter l'élongation précoce et tardive chez les animaux *rga-7(ok1498)* fournit une évidence supplémentaire confirmant l'implication de *rga-7* à ces deux étapes de l'élongation.

Cette augmentation du temps requis pour l'élongation ne serait pas associée aux muscles, puisqu'il a été démontré qu'ils étaient fonctionnels chez les animaux *rga-7(ok1498)*. En effet, les muscles ont des contractions de plus grandes amplitudes. De plus nous avons observé qu'ils étaient correctement positionnés et qu'ils étaient correctement connectés aux cellules de l'hypoderme ventral et dorsal.

Les trois formes protéiques de RGA-7 seraient impliquées dans l'élongation comme démontré par ARNi (Fig 3-6). Les trois transcrits possèdent le domaine GAP et le domaine C1 qui permet la liaison au diacylglycérol, un lipide messager membranaire (Fig 3-5). Les versions longues et moyenne possèdent un domaine F-Bar (Fig 3-5). Les domaines F-Bar tubulent les vésicules *in vitro* et *in vivo*. De plus, ces domaines requièrent une homodimérisation pour adopter la forme concave de banane permettant la liaison à des

membranes recourbées et/ou l'induction d'un recourbement de la membrane (Tsujita *et al.*, 2006). L'existence du domaine C1 de *rga-7* suggère une régulation de la fonction de RGA-7 par l'interaction avec le diacylglycérol (DAG). La juxtaposition des domaines C1 et GAP est retrouvée dans les protéines chimériques qui sont activées par le changement de conformation induit par l'interaction C1/DAG. Ceci permet également le contrôle de la localisation subcellulaire des chimériques (Canagarajah *et al.*, 2004).

Il est intéressant de noter que le gène *plc-1* qui code pour la phospholipase C-epsilon, une enzyme permettant la conversion du phosphatidylinositol 4,5biphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5trisphosphate (IP3) et DAG, a été démontrée comme étant impliquée dans le contrôle de la morphogénèse épithéliale pendant l'élongation tardive de *C. elegans* (Canagarajah *et al.*, 2004; Vázquez-Manrique *et al.*, 2008). L'analyse de l'interaction génétique de *rga-7* avec *plc-1* nous permettra de mieux comprendre la fonction moléculaire de *rga-7* durant l'élongation et les mécanismes permettant sa potentielle régulation par le DAG.

La rupture d'embryons due à une hypercontraction pendant l'élongation a été observée chez les mutants *mel-11* et *rga-2*, une protéine GAP spécifique à RHO-1. Ces deux protéines sont des régulateurs négatifs de la machinerie de phosphorylation des chaînes légères de myosine (Diogon *et al.*, 2007). Nos résultats suggèrent donc que la perte de fonction de *rga-7* induirait une hyperphosphorylation des chaînes légères de myosines comme les mutants de *mel-11* et *rga-2* (Diogon *et al.*, 2007). Cependant, le phénotype d'hypercontraction dorsale n'est pas observé dans ces 2 mutants, ce qui suggère que *rga-7* ne fonctionnerait pas dans la même voie de signalisation. RGA-7 pourrait être impliquée dans le contrôle de la polarité ventrale et dorsale, ou dans le contrôle différentiel de la contraction de l'appareil actine myosine dans ces deux types de cellules puisque les animaux *rga-7(ok1498)* contractent plus fortement au niveau dorsal que ventral. De façon intéressante, un phénotype similaire d'hypercontraction dorsale a été rapporté pour un allèle hypomorphe du gène *hmp-1* codant pour l' α -caténine (Pettitt *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 1998). On pourrait extrapoler une fonction de *rga-7* dans l'assemblage ou le maintien des jonctions adhérentes. Une tentative pour observer une malformation de ces structures a été infructueuse, le mutant *rga-7* exprimant le transgène *ajm-1::GFP* ne présentait pas de différences observables par rapport

aux animaux sauvages. Des différences plus subtiles, telle qu'une modification de la dynamique de recyclage de ces structures ne seraient pas facilement observables par la méthode employée. Des techniques de « fluorescence recovery after photobleaching » (FRAP) seront utilisées dans le futur pour tester cette hypothèse.

4.2. RGA-7 A UNE ACTIVITÉ GAP SPÉCIFIQUE POUR CDC-42 IN VIVO ET IN VITRO

Nos résultats suggèrent que le domaine GAP de *rga-7* régulerait l'activité de CDC-42 *in vitro* et *in vivo*. Nous ne pouvons cependant pas exclure que ce domaine puisse aussi réguler RHO-1, puisque *rga-7* présente une activité GAP mesurable contre cette GTPase *in vitro*. De plus, les expériences permettant de mesurer l'activité GAP de *rga-7* sur RHO-1 par ARNi n'ont pas été concluantes puisque les animaux *rho-1(ARNi)* étaient complètement stériles comme rapporté précédemment (Boutler *et al.*, 2011).

Pour contourner cet obstacle, nous allons croiser des animaux ayant une mutation thermosensible de *let-502*, la kinase effectrice de RHO-1 pendant l'élongation (Piekny *et al.*, 2000), avec les mutants *rga-7(ok1498)*. En observant le phénotype des doubles mutants nous pourrions conclure si RGA-7 régule l'activité de RHO-1 *in vivo* pendant l'élongation.

CDC-42 est reconnu pour son implication dans l'établissement de la polarité apicale en interagissant avec PAR-3 (Harris et Trepas, 2010). De plus, CDC-42 contrôle la polymérisation des filaments d'actine et le trafic des membranes en interagissant avec WASP (Fernando *et al.*, 2009; Fricke *et al.*, 2009). Cet effecteur permet l'activation du complexe ARP2/3 qui permet la formation de branches d'actine pendant l'endocytose (Kurisu *et al.*, 2010). Une expérience de criblage par ARNi nous a permis de soutenir que l'activité GAP de *rga-7* était dirigée vers CDC-42 *in vivo*. De façon surprenante, la totalité du phénotype de *rga-7(ok1498)* a été supprimée par la réduction de l'expression de l'effecteur de CDC-42, *wsp-1*. Ceci supporte notre hypothèse selon laquelle *rga-7* serait un régulateur négatif de CDC-42 pendant l'élongation.

4.3. RGA-7 EST ANTAGONISTE À PIX-1, PAK-1 ET MRCK-1 PENDANT L'ÉLONGATION EMBRYONNAIRE

Le double mutant *rga-7(ok1498);pix-1(gk416)* présente un phénotype de létalité embryonnaire et d'arrêt larvaire très inférieur (voir quasiment nul) aux phénotypes de ces deux mutants pris séparément. (Fig. 3-10). Cette observation démontre un fort antagonisme entre *rga-7* et *pix-1*.

Le complexe PIX-1/GIT-1/PAK-1 est impliqué dans le contrôle de la morphologie et la migration cellulaire chez les vertébrés. Cette fonction s'effectue en contrôlant le trafic membranaire, la dynamique d'adhésion et la régulation de la contraction actine-myosine dépendante. De plus, la kinase PAK-1 colocalise avec CDC-42 aux membranes durant l'élongation (Chen *et al.*, 1996). PAK-1 est un effecteur des GTPases Rac et MRCK-1 est un effecteur de CDC-42 chez les mammifères (Ong *et al.*, 2011). PAK-1 et MRCK-1 seraient des effecteurs de CDC-42 puisqu'ils ont une forte homologie avec les protéines MRCK-1 et PAK-1 mammifères (Gally *et al.*, 2009). Il a été démontré chez le nématode que PIX-1, PAK-1 et GIT-1 sont enrichies au niveau basal des hémidesmosomes et présentes sur la membrane apicale des cellules de l'hypoderme (Zhang et Labouesse, 2010). De plus, PAK-1 phosphoryle IFA-3, une protéine des filaments intermédiaires (Zhang et Labouesse, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Il est cru qu'en réponse à une tension élevée, CED-10 activerait PAK-1 pour induire un état d'hyperadhésivité des hémidesmosomes et induire le recrutement de VAB-10A aux hémidesmosomes (Zhao *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005; Gally *et al.*, 2009). De plus, PIX-1 en complexe peut directement activer PAK-1 (Zhang et Labouesse, 2010; Zhang *et al.*, 2011). En considérant cet apport d'information, nous pourrions émettre l'hypothèse que RGA-7 serait impliquée dans la régulation de l'activité de CDC-42 au niveau des hémidesmosomes, puisque les animaux *rga-7(ok1498);pix-1(gk416)* ont une létalité embryonnaire presque nulle (3.5%). Ceci pourrait expliquer les problèmes d'élongation tardive, mais pas précoce. Nous ne pouvons pas exclure la possibilité que PIX-1, RGA-7 et CDC-42 puissent être localisés ailleurs dans les cellules de l'hypoderme et avoir une autre fonction. En fait, une autre fonction suggérée par les résultats récents de notre laboratoire serait que *pix-1* régulerait *cdc-42*, *ced-10* ou *rac-2* pour contrôler le niveau de

phosphorylation des chaînes légères de myosines, situées au pôle apical des cellules de l'hypoderme, et ce lors de l'élongation précoce (avant la participation des muscles) et tardive (Harel *et al.*, en preparation)

Nous avons identifié un faible antagonisme entre *rga-7* et *mrck-1*. Bien que significatif, cet antagonisme est faible et devra être confirmé par d'autres expériences d'ARNi puisque le mutant disponible de MRCK-1 présente un phénotype de létalité embryonnaire à une étape plus précoce que l'élongation. Des études effectuées chez les mammifères suggèrent que MRCK-1 serait un effecteur de CDC-42 (Zhang *et al.*, 2005; Gally *et al.*, 2009) (Fig. 4-1) expliquant ainsi l'antagonisme avec *rga-7*. En effet, la mutation *rga-7(ok1498)* le régulateur négatif de CDC-42 provoquerait une suractivation des protéines CDC-42 de *C. elegans* dans les cellules de l'hypoderme. Cette suractivation aura pour conséquence de suractiver MRCK-1 (Fig. 4-1) et ainsi réduire l'activité phosphatase de MEL-11 pour finalement provoquer une hypercontraction de l'appareil contractile actine-myosine pendant l'élongation (Fig. 4-1). En réduisant le niveau de MRCK-1 suractivé par ARNi, nous réduisons donc l'hypercontraction et la létalité embryonnaire associées à la mutation *rga-7(ok1498)*. Finalement, bien que l'homologie de MRCK-1 avec son orthologue humain suggère une régulation de son activité par CDC-42, il n'y a aucun résultat dans la littérature qui confirme cette hypothèse chez *C. elegans*.

Nos résultats suggèrent un modèle où *rga-7* serait positionnée en amont de *pak-1* et régulerait le niveau d'activation de CDC-42. Le complexe PIX-1/GIT-1/PAK-1 active CDC-42. De plus, le complexe PIX-1/GIT-1/PAK-1 peut directement activer PAK-1 (Lucanic et Cheng, 2008). LET-502 phosphoryle MLC-4, LET-502 est activé par RHO-1 et inhibe MEL-11 par phosphorylation (Piekny *et al.*, 2000 et 2003).

Outre sa fonction dans la régulation de l'appareil de contraction actine-myosine, RGA-7 serait également impliquée dans le contrôle de la polymérisation de l'actine et/ou du trafic membranaire. En effet, *rga-7* interagit négativement avec *wsp-1* qui est un effecteur de cdc-42 connu pour son rôle de ces deux mécanismes chez les mammifères et le *C. elegans* (Giuliani *et al.*, 2009). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse selon laquelle RGA-7 jouerait

un rôle dans l'internalisation des composantes des jonctions pendant l'élongation embryonnaire de *C. elegans*.

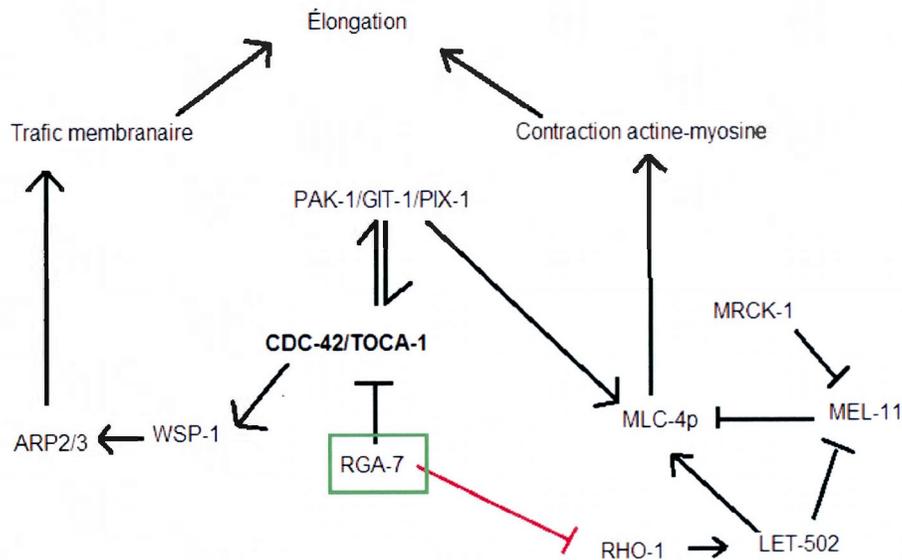


Figure 4-1 : Modèle des voies de signalisation contrôlant l'élongation embryonnaire de *C. elegans* selon nos résultats et les données de la littérature. RGA-7 inactive CDC-42 et possiblement RHO-1 pendant l'élongation. C'est un régulateur négatif de la contraction et du trafic membranaire.

4.4. ÉTUDE DU PROFIL D'EXPRESSION DE RGA-7

Pour étudier le profil d'expression et la localisation de *rga-7*, nous avons eu recours à une stratégie de transgénèse décrite par Tursun *et al.*, 2009. Cette stratégie permettait de surmonter un obstacle non-négligeable à propos du gène *rga-7*. En effet, ce gène couvre plus de 14kb d'ADN génomique et possède un intron interne de 7kb. Avec une taille comme celle-là, la majorité des techniques de transgénèse ne sont pas efficaces, puisque toutes les séquences de régulation de transcription ne se retrouvent pas concentrées en amont de l'ATG initiateur. La méthode de Tursun repose sur l'utilisation d'un fosmide, un plasmide de 40kb

contenant la forme endogène de *rga-7*. Ensuite, une cassette contenant une protéine fluorescente (mCherry) est amplifiée avec des amorces flanquées de séquences homologues à la portion C-terminal du gène *rga-7*. Ce qui nous permettrait d'insérer la cassette par recombinaison homologue en C-terminal du gène, donc marquer toutes les formes de *rga-7*. La sélection des recombinants se basait sur la présence du gène galactokinase qui permet la conversion du galactose en lactose. Par la suite, une deuxième recombinaison homologue permet l'excision du gène galactokinase. Cependant, cette technique n'a pas été fructueuse pour le gène *rga-7*. En effet, après beaucoup d'optimisation, l'expérience s'est avérée être un échec, puisque la cassette a bel et bien été recombinée dans le fosmide, mais pas au bon endroit. Le séquençage de la portion génomique entourant la cassette mCherry nous a révélé qu'elle était localisée dans la structure du vecteur (fosmide).

Pour surmonter à cet obstacle, nous avons décidé d'avoir recours au clonage d'ADNc dans un vecteur. Cette technique nous permettra de purifier l'ARNm des transcrits *rga-7* et de les amplifier avant de les cloner dans un vecteur d'expression spécifique à l'hypoderme latéral, dorsal et ventral. Ceci nous apportera une information supplémentaire par rapport à la localisation cellulaire. En effet, si l'expression de *rga-7* au niveau de l'hypoderme dorsal est suffisante pour supprimer le phénotype du mutant nul de *rga-7*, nous en concluons que la fonction de *rga-7* est essentielle dans les cellules ciblées par le transgène.

4.5. RGA-7 EST-IL L'ORTHOLOGUE DE RICH1 OU DE PARG1?

De façon intéressante, la protéine mammifère Rho GAP et N-Bar, *rich1* a été démontrée pour interagir avec CIP4, une protéine impliquée dans le trafic membranaire, dans la nucléation et la polymérisation des filaments d'actines chez *D. melanogaster* (Richnau et Aspenström, 2001; Fricke et al, 2009). Le domaine GAP de RICH1 a été démontré comme agissant sur les GTPases CDC-42 et RAC-1 chez les mammifères *in vitro* (Richnau et Aspenström, 2001). De plus, *rich1* a été proposé comme agissant au niveau du maintien de l'intégrité des jonctions serrées par la régulation de CDC-42 (Wells *et al.*, 2006; Richnau et Aspenström, 2001). Bien qu'il soit attrayant d'étiqueter RGA-7 en tant qu'orthologue de RICH1, les séquences primaires des domaines BAR de ces deux protéines sont très

différentes (aucune homologie identifiée par les outils BLAST-p du NCBI) alors que leur domaine GAP présente une forte homologie (58%). La divergence des domaines BAR peut avoir un impact non négligeable sur le rôle et la localisation de ces deux protéines et donc sur leur fonction.

Une autre protéine mammifère F-Bar et Rho GAP, PARG1 a été démontrée comme étant un effecteur de RAP-2::GTP et que le domaine F-Bar permettait cette interaction. De plus, le domaine F-Bar de PARG1 présente une forte homologie de séquence avec celui de RGA-7 (52%) (Myagmar *et al.*, 2005; Saras *et al.*, 1997). La protéine PARG1 est très similaire à RGA-7 au niveau de la structure protéique. En effet, PARG1 possède un domaine F-Bar (52%) suivi d'un domaine C1 et du domaine Rho GAP (51%). Le domaine GAP de PARG1 agit sur RHO-1, RAC-1 et CDC-42 *in vitro*, mais PARG1 a une préférence envers RHO-1 (Saras *et al.*, 1997). PARG1 pourrait donc être l'orthologue mammifère de *rga-7*, puisque ces deux protéines ont les mêmes domaines protéiques. Ces deux GAP semblent avoir des activités spécifiques vis-à-vis CDC-42 et RHO-1/RHO-A quoique PARG1 ait plus d'affinité pour RHO-1 alors que RGA-7 en aurait plus pour CDC-42.

4.6. RÔLE POSSIBLE DE RGA-7 DANS LES MÉCANISMES D'ENDOCYTOSE

Les protéines ceTOCA-1 et ceTOCA-2 sont deux protéines F-Bar retrouvées chez *C. elegans*. Ces protéines contrôlent le recyclage dynamique de la protéine AJM-1, une composante des jonctions adhérentes chez *C. elegans* (Fricke *et al.*, 2005; Georgiou *et al.*, 2009). Cette fonction implique une interaction avec WSP-1 et WVE-1, deux effecteurs de GTPases de CDC-42 et Rac respectivement, par l'entremise du domaine SH3 de ceTOCA-1 (Giuliani *et al.*, 2009). Cependant, la protéine ceTOCA-1 ne possède pas de domaine GAP et ne peut pas réguler l'activité de CDC-42. La protéine RGA-7I possède le domaine F-Bar et un domaine GAP spécifique à CDC-42.

Il devient intéressant de spéculer que ceTOCA-1 localisé aux membranes d'endocytose permettrait le recrutement de WSP-1, alors que RGA-7 inactiverait CDC-42::GTP lié à WSP-1, tout cela dans le contexte de recyclage dynamique des composantes des jonctions adhérentes pendant la morphogénèse des tissus. Suivant cette hypothèse, le

mutant de *rga-7* devrait montrer certains défauts d'assemblage ou de recyclage des jonctions adhérentes, ou tout au moins supprimer ceux observés dans les mutants TOCA-1/2.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Nous avons identifié et caractérisé le phénotype associé à la délétion *rga-7(ok1498)*. Nous avons identifié les différents transcrits et leurs domaines. Nous avons confirmé que le phénotype de *rga-7(ok1498)* n'était pas attribuable à des défauts de positionnement, de structure musculaire ou de connections des muscles et de l'hypoderme. Nous avons identifié la GTPase cible de RGA-7 *in vivo* et *in vitro*, CDC-42 sans pour autant exclure la possible régulation de RHO-1. Nous avons identifié trois gènes génétiquement antagonistes permettant de secourir le phénotype de *rga-7(ok1498)*, *pix-1*, *wsp-1* et à un moindre niveau *mrck-1*. Nous avons identifié l'orthologue mammifères (PARG1) de *rga-7* le plus probable par une étude *in sillico*.

Le phénotype de *rga-7(ok1498)* est supprimé par la réduction de l'expression de *wsp-1* par ARNi (Tableau 3-2). Ce résultat est très intéressant et nous permet d'établir un modèle hypothétique selon lequel *rga-7* inactiverait CDC-42, lorsqu'il contrôle l'activité de *wsp-1* pendant le recyclage des composantes des jonctions adhérentes. En effet, il est bien connu que les GTPases ont des niveaux d'activation locale différente en fonction des régulateurs les entourant (Boulter *et al.*, 2011). Cette fonction serait en accord avec le phénotype associé à la délétion nul *ok1498*. Effectivement, les forces de contraction de l'appareil contractile actine-myosine pendant l'élongation précoce et les contractions musculaires pendant l'élongation tardive soumettent les jonctions adhérentes à de fortes pressions mécaniques (Giuliani *et al.*, 2009). Tel que démontré chez les mammifères, une pression mécanique appliquée sur les cellules épithéliales induit un remodelage des jonctions adhérentes (Yonemura *et al.*, 2010). Nous supposons que la dynamique du recyclage de composantes des jonctions adhérentes est contrôlé par *cdc-42*, *toca-1*, *wsp-1*, *wve-1* et *rga-7* contribue au contrôle de la morphogénèse pendant l'élongation précoce et tardive.

RÉFÉRENCES

- Ahmed S., Kozma R., Monfries C., Hall C., Lim H.H., Smith P., 1990. Human brain N-chimaerin cDNA encodes a novel domain, and RhoGAP domain were located in the electron density phorbol ester receptor. *Biochem. J.* 272, 767–773.
- Ahmed S., Lee, J., Kozma R., Best A., Monfries C., and Lim L., 1993. A novel functional target for tumor-promoting phorbol esters and lysophosphatidic acid—the P21rac-Gtpase activating protein N-chimaerin. *J. Biol. Chem.* 268, 10709–10712.
- Areces L.B., Kazanietz M.G., Blumberg P.M., 1994. Close similarity of baculovirus-expressed N-chimaerin and protein-kinase C-alpha as phorbol ester receptors. *J. Biol. Chem.* 269, 19553–19558
- Balzer EM., Konstantopoulos K., 2011. Intercellular adhesion: mechanisms for growth and metastasis of epithelial cancers. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.*
- Beitel G.J., Clark S.G., and Horvitz H.R., 1990. *Caenorhabditis elegans ras* gene *let-60* acts as a switch in the pathway of vulval induction. *Nature* 348, 503–509.
- Berkel W.P., Verheijen M.H., Cuppen E., Asahina M., de Rooij J., Jansen G., Plasterk R.H., Bos J.L., and Zwartkruis F.J., 2005. Requirement of the *Caenorhabditis elegans* RapGEF *pxf-1* and *rap-1* for Epithelial Integrity. *Mol. Biol. Cell* 16, 106–116.
- Bettache N. *et al.*, 2003. Mechanical constraint imposed on plasma membrane through transverse phospholipid imbalance induces reversible actin polymerization via phosphoinositide 3-kinase activation. *J. Cell Sci.* 116, 2277–2284.
- Bos J., de Rooij J., Reedquist K., 2001. Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:369-377.
- Boudin H. *et al.*, 2000. Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron* 28, 485–497.
- Boulter E., Estrach S., Garcia-Mata R. et Féral C., 2011. Off the beaten paths: alternative and crosstalk regulation of Rho GTPases. The FASEB Journal article fj.11-192252
- Brighouse A. , 2010. Rab protein evolution and the history of the eukaryotic endomembrane system. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:3449–3465 DOI 10.1007/s00018-010-0436-1

- Braga V., 2002. Cell-cell adhesion and signalling *Current Opinion in Cell Biology* 14:546-556
- Brooke M., Nitoiu D. and Kelsell D., 2011. Cell-cell connectivity: desmosomes and disease. *J Pathol* DOI: 10.1002/path.3027
- Brown W. J., Chambers K. & Doody A., 2003. Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* 4, 214-221
- Burridge K. and Wennerberg K., 2004. Rho and Rac Take Center Stage Review. *Cell*, Vol. 116, 167-179
- Caloca M.J., Fernandez N., Lewin N.E., Ching D.X., Modali R., Blumberg P.M., Kazanietz M.G., 1997. β 2-chimaerin is a high affinity receptor for the phorbol ester tumor promoters. *J. Biol. Chem.* 272, 26488-26496.
- Caloca M.J., Garcia-Bermejo M.L., Blumberg P.M., Lewin N.E., Kremmer E., Mischak H., Wang S.M., Nacro K., Bienfait B., Marquez V.E., Kazanietz M.G., 1999. β 2-chimaerin is a novel target for diacylglycerol: Binding properties and changes in subcellular localization mediated by ligand binding to its C1 domain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 11854-11859.
- Caloca M.J., Wang H.B., Kazanietz M.G., 2003. Characterization of the Rac-GAP (Rac-GTPase-activating protein) activity of β 2-chimaerin, a 'non-protein kinaseC' phorbol ester receptor. *Biochem.J.* 375, 313-321
- Canagarajah B., Coluccio Leskow F., Yew Seng Ho J., Mischak H., Saidi F., Kazanietz MG., Hurley JH., 2004. Structural Mechanism for Lipid Activation of the Rac-Specific GAP, β 2-Chimaerin. *Cell*, Vol. 119, 407-418
- Casanova J.E., 2002. Epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking V. Confluence of membrane trafficking and motility in epithelial cell models. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283
- Chen W., Lim H. H., Lim L., 1993. The *CDC42* homologue from *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 268:13280-13285.
- Chen W., Chen S., Yap S.F., Lim L., 1996. The *Caenorhabditis elegans* p21-activated kinase (CePAK) colocalizes with CeRac1 and CDC42Ce at hypodermal cell boundaries during embryo elongation. *J. Biol. Chem.* 271: 26362-26368.

Chisholm A.D., and Hardin J., 2005. Epidermal morphogenesis, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.35.1

Costa M., Draper B.W., and Priess J.R., 1997. The role of actin filaments in patterning the *Caenorhabditis elegans* cuticle. *Dev. Biol.* 184, 373–384

Costa M., Raich W., Agbunag C., Leung B., Hardin J., and Priess J.R., 1998. A Putative Catenin-Cadherin System Mediates Morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* Embryo. *J. Cell Biol.* 141, 297–308.

Cowan CR. And Hyman AA., 2007. Acto-myosin reorganization and PAR polarity in *C. elegans*. *Development* 134, 1035-1043 doi:10.1242/dev.000513

Cox A.D., Der C.J., 2010. The saga continues. *Small Gtpases* (1): 2–27.

Danen E., 2009. Integrin Proteomes Reveal a New Guide for Cell Motility. *Science Signaling* 2 (89), pe58.

Diogon M., Wissler F., Quintin S., Nagamatsu Y., Sookhareea S., Landmann F., Hutter H., Vitale N., Labouesse M., 2007. The RhoGAP RGA-2 and LET-502/ROCK achieve a balance of actomyosin-dependent forces in *C. elegans* epidermis to control morphogenesis. *Development.* 134(13):2469-79

Doherty G.J. and McMahon H.T., 2008. Mediation, modulation, and consequences of membrane–cytoskeleton interactions. *Annu. Rev. Biophys.* 37, 65–95

Ebinu J.O., Bottorff D.A., Chan E.Y.W., Stang S.L., Dunn R.J., Stone J.C., 1998. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing lipids and protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280, 1082–1086

Eckler S., Kuehn R. & Gautam M., 2005. Deletion of N-terminal rapsyn domains disrupts clustering and has dominant negative effects on clustering of full-length rapsyn. *Neuroscience* 131, 661–670.

Etienne-Manneville S., 2011. Control of polarized cell morphology and motility by adherens junctions *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22 850– 857.

Farquhar MG, Palade GE., 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963; 17: 375–412.

Ferguson E.L. and Horvitz H.R., 1985. Identification and characterization of 22 genes that affect the vulval cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 110, 17–72.

Ferguson E.L., Sternberg P.W. and Horvitz H.R., 1987. A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 326, 259–267.

Fernando H., Kynaston G. and Jiang W., 2009. WASP and WAVE proteins: Vital intrinsic regulators of cell motility and their role in cancer. *International Journal of Molecular Medicine* 23: 141-148 141

Fletcher S.J. and Rappoport JZ., 2009. The role of vesicle trafficking in epithelial cell motility *Biochem Soc Trans* ;37(Pt 5):1072-6.

Fletcher SJ., Rappoport JZ., 2010. Moving forward: polarised trafficking in cell migration. *Trends Cell Biol* 20:71–78

Foltz I. N., Gerl J. S., Wieler R.E., Luckach M., Salmon R.A., Schrader J.W., 1998. Human mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MKK7) is a highly conserved c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) activated by environmental stresses and physiological stimuli. *J. Biol. Chem.* 273:9344–9351.

Frank SR., Hansen SH., 2008. The PIX-GIT complex: a G protein signaling cassette in control of cell shape. *Semin Cell Dev Biol* 19: 234-244.

Fricke R., Gohl C., Dharmalingam E., Grevelhörster A., Zahedi B., Harden N., Kessels M., Qualmann B., Bogdan S., 2009. Drosophila Cip4/Toca-1 integrates membrane trafficking and actin dynamics through WASP and SCAR/WAVE. *Curr Biol*.19(17):1429-37

Frost A., Perera R., Roux A., Spasov K., Destaing O., Egelman EH., De Camilli P., Unger VM., 2008. Structural Basis of Membrane Invagination by F-BAR Domains. *Cell* 132:807–817

Fukuyama T., Ogita H., Kawakatsu T., Fukuhara T., Yamada T., Sato T., Shimizu K., Nakamura T., Matsuda M., Takai Y., 2005. Involvement of the c-Src–Crk–C3G–Rap1 signaling in the nectin-induced activation of Cdc42 and formation of adherens junctions. *J Biol Chem* , 280:815-825.

Gaidarov I., Keen JH., 1999. Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol.* 146:755–764.

Gallop JL., Jao CC., Kent HM., Butler PJG., Evans PR., Langen R., McMahon HT., 2006. Mechanism of endophilin N-BAR domain mediated membrane curvature. *EMBO J* 25:2898–2910

Gally C., Wissler F., Zahreddine H., Quintin S., Landmann F., Labouesse M., 2009. Myosin II regulation during *C. elegans* embryonic elongation: LET-502/ROCK, MRCK-1 and PAK-1, three kinases with different roles. *Development.* 136(18):3109–19.

Garrod D.R., Berika M.Y., Bardsley W.F., Holmes D., Tabernero L., 2005. Hyperadhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure, *J. Cell Sci.* 118 5743–5754.

Georgiou M., Marinari E., Burden J., Baum B., 2008. Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr Biol* 18: 1631–1638.

Giuliani C., Troglio F., Bai Z., Patel FB., Zucconi A., 2009. Requirements for F-BAR Proteins TOCA-1 and TOCA-2 in Actin Dynamics and Membrane Trafficking during *Caenorhabditis elegans* Oocyte Growth and Embryonic Epidermal Morphogenesis. *PLoS Genet* 5(10): e1000675. doi:10.1371/journal.pgen.1000675

Giuliani C., Troglio F., Bai Z., Falshruti B. Patel FB., Zucconi A., Malabarba MG., Disanza A., Theresia B. Stradal TB., Cassata G., Confalonieri S., Hardin JD., Soto MC., Grant BD., Scita G., 2010. Requirements for F-BAR Proteins TOCA-1 and TOCA-2 in Actin Dynamics and membrane Trafficking during *Caenorhabditis elegans* Oocyte Growth and Embryonic Epidermal Morphogenesis. *Traffic* 2010; 11: 1272–1279

Gönczy, P. and Rose, L.S., 2005 Asymmetric cell division and axis formation in the embryo, *WormBook*, ed. The *C. elegans*. Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.30.1,

Grande-Garcia A., Echarri A., de Rooij, J., Alderson N.B., Waterman-Storer C.M., Valdivielso J.M. and del Pozo M.A., 2007. Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J. Cell Biol.* 177, 683–694

Hall C., Monfries C., Smith P., Lim H.H., Kozma R., Ahmed S., Vanniasingham V., Leung T., and Lim L., 1990. Novel human-brain Cdna-encoding a 34,000 Mr protein

N-chimaerin, related to both the regulatory domain of protein kinase-C and Bcr, the product of the breakpoint cluster region gene. *J. Mol. Biol.* 211, 11–16.

Hall A, 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509

Han M., Aroian R.V. and Sternberg P.W., 1990. The *let-60* locus controls the switch between vulval and nonvulval cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 126, 899–913.

Han M. and Sternberg P.W., 1990. *let-60*, a gene that specifies cell fates during *C. elegans* vulval induction, encodes a ras protein. *Cell* 63, 921–931.

Harel S., Jacquelin C., Neault M., Corrimaya M., Jonhsen B., Baillie D. and Jenna S., En preparation. *pix-1* and *pak-1* control *Caenorhabditis elegans* early and late embryonic elongation in parallel to *mel-11* and *let-502*

Harris KP. and Ulrich Tepass U., 2010. Cdc42 and Vesicle Trafficking in Polarized Cells. *Traffic*; 11: 1272–1279

Holthofer B, Windoffer R and Troyanovsky S., 2007. Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol* 2007; 264: 65–163.

Hresko M.C., Williams B.D. and Waterston R.H., 1994. Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 124, 491–506

Jackson LP., Kelly BT., McCoy AJ., Gaffry T., James LC., Collins BM., Höning S., Evans PR., Owen DJ., 2010. A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell.* 141:1220–1229.

Johnson DI., 1999. Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63(1):54-105.

Kay AJ, Hunter CP., 2001. CDC-42 regulates PAR protein localization and function to control cellular and embryonic polarity in *C. elegans*. *Curr Biol.*;11(7):474-81.

Kelly DE., 1966. Fine structure of desmosomes, hemidesmosomes, and an adepidermal globular layer in developing newt epidermis. *J Cell Biol* 1966; 28: 51–72.

Keren K., 2011. Cell motility: the integrating role of the plasma membrane. *Eur Biophys J* 40:1013–1027

- Kikkawa U., Kishimoto A., Nishizuka Y., 1989. The kinase-C family—Heterogeneity and its implications. *Annu. Rev. Bio- chem.* 58, 31–44.
- Kimura T.E., Merritt A.J., Garrod D.R., 2007. Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive, *J. Invest. Dermatol.* 127 775–781. 25.
- Kolsch V., Charest PG. and Firtel RA., 2008. The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling. *J Cell Sci* 121:551–559
- Kooijman E. *et al.*, 2005. Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry* 44, 2097–2102
- Kurusu S. and Takenawa T., 2010. WASP and WAVE family proteins: Friends or foes in cancer invasion? *Cancer Sci* vol. 101 | no. 10 | 2093–2104
- Labouesse, M., 2006. Epithelial junctions and attachments. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.56.1,
- Leckband D., le Duc, Q., Wang N. and de Rooij J., 2011. Mechanotransduction at cadherin-mediated adhesions. *Current Opinion in Cell Biology*, 23:523–530
- Le Clainche C. and Carlier M-F., 2007. Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration *Physiol Rev* 88: 489–513, doi:10.1152/physrev.00021.
- Lecuit T., Sonnenberg A., 2011. Editorial overview. *Current Opinion in Cell Biology* 23:505–507
- Leibfried A., Fricke R., Morgan MJ., Bogdan S., Bellaiche Y., 2008. Drosophila Cip4 and WASp Define a Branch of the Cdc42-Par6-aPKC Pathway Regulating E-Cadherin Endocytosis. *Curr Biol* 18: 1639–1648.
- Leung T., How B.E., Manser E., and Lim L., 1994. Cerebellar β 2-chimaerin, a Gtpase-activating protein for P21 Ras-related Rac is specifically expressed in granule cells and has a unique N-terminal Sh2 domain. *J. Biol. Chem.* 269, 12888–12892.
- Liu J., Sun Y., Drubin DG., Oster GF., 2009. The mechanochemistry of endocytosis. *PLoS Biol* 7:e1000204
- Lucanic M., Cheng HJ., 2008. A RAC/CDC-42-independent GIT/PIX/PAK signaling pathway mediates cell migration in *C. elegans*. *PLoS Genet* 4: e1000269.

- Lundquist, E. A., 2006. Small GTPases, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.67.1
- Ly TK., Wang J., Pereira R., Rojas KS., Peng X., Feng Q., Cerione RA., Wilson KF., 2010. Activation of the Ran GTPase is subject to growth factor regulation and can give rise to cellular transformation. *J Biol Chem.* 285(8):5815-26.
- Lynch A. and Hardin J., 2010. The assembly and maintenance of epithelial junctions in *C. Elegans*. *Front Biosci.* ; 14: 1414–1432
- Manser E., Loo TH., Koh CG., Zhao ZS., Chen XQ., 1998. PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* 1: 183-192.
- Masuda M., Takeda S., Sone M., Ohki T., Mori H., Kamioka Y., Mochizuki N., 2006. Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *EMBO J* 25:2889–2897
- Mattila PK., Pykäläinen A., Saarikangas J., Paavilainen VO., Vihinen H., Jokitalo E., Lappalainen P., 2007. Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI (4,5) P2-rich membranes by an inverse BAR domain–like mechanism. *J Cell Biol* 176:953
- McMahon HT., Gallop JL., 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438:590–596
- Mellor H., Parker P.J., 1998. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332, 281–292.
- Moerman D. G. and Williams B. D., 2006. Sarcomere assembly in *C. elegans* muscle, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook1.81.1,
- Morris CE, Homann U., 2001. Cell surface area regulation and membrane tension. *J Membr Biol* 179:79–102
- Myagmar B-E., Umikawa M., Asato T., Taira K., Oshiro M., Hino A., Takei K., Uezato H., Kariya K., 2005. PARG1, a protein-tyrosine phosphatase-associated RhoGAP, as a putative Rap2 effector. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329 1046–1052
- Newton A.C., Johnson J.J., 1998. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting mod-ules. *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 155–172.

Nishizuka Y., 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase-C and its implications for cellular-regulation. *Nature* 334, 661–665.

Nishizuka Y., 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein-kinase-C. *Science* 258, 607–614.

Nishizuka Y., 1995. Protein kinases.5. Protein-kinase-C and lipid signaling for sustained cellular-responses. *FASEB J.* 9, 484–496.

Nobes CD, Hall A., 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* Apr 7;81(1):53-62

Olson M. and Sahai E., 2009. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* 26:273–287 DOI 10.1007/s10585-008-9174-2

Ong CC., Jubb AM., Zhou W., Haverty PM., Harris AL., Belvin M., Friedman L.S., Koeppen H., Hoeflich KP., 2011. p21-activated kinase 1: PAK'ed with potential *Oncotarget*, Vol.2, No 6

Orcl L., Palmer D.J., Amherdt M. & Rothman J.E., 1993. Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatamer and ARF proteins from the cytosol. *Nature* 364, 732–734.

Palacios F, Price L, Schweitzer J, Collard JG and D'Souza-Schorey C, 2001. An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *EMBO J*, 20:4973-4986.

Pechlivanis M., Kuhlmann J., 2006. Hydrophobic modifications of Ras proteins by isoprenoid groups and fatty acids—More than just membrane anchoring. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764 1914–1931

Peter BJ., Kent HM., Mills IG., Vallis Y., Butler PJG., Evans PR., McMahon HT., 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303:495

Pettitt J., Cox E.A., Broadbent I.D., Flett A., and Hardin J. (2003). The *Caenorhabditis elegans* p120 catenin homologue, JAC-1, modulates cadherin-catenin function during epidermal morphogenesis. *J. Cell Biol.* 162, 15–22.

Pettitt J., 2005. The cadherin superfamily, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.50.1

Piekny A.J., Wissmann A. and Mains P.E., 2000. Embryonic morphogenesis in *Caenorhabditis elegans* integrates the activity of LET-502 Rho-binding kinase, MEL-11 myosin phosphatase, DAF-2 insulin receptor and FEM-2 PP2c phosphatase. *Genetics*, Dec;156(4):1671-89)

Piekny A.J., Johnson J.L., Cham G.D., and Mains P.E., 2003. The *Caenorhabditis elegans* nonmuscle myosin genes *nmy-1* and *nmy-2* function as redundant components of the *let-502*/α-binding kinase and *mel-11*/myosin phosphatase pathway during embryonic morphogenesis. *Development* 130, 5695–5704.

Pollitt A. and Insall R., 2009. WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly. *Journal of Cell Science* 122, 2575-2578 doi:10.1242/jcs.023879

Priess J.R., and Hirsh D.I., 1986. *Caenorhabditis elegans* morphogenesis: the role of the cytoskeleton in elongation of the embryo. *Dev. Biol.* 117, 156–173.

Puertollano R., Randazzo P. A., Presley J F., Hartnell L.M., Bonifacino J.S., 2001. The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN. *Cell* 105, 93–102.

Radhakrishna H., Al-Awar O., Khachikian Z., Donaldson J.G., 1999. ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *Journal of Cell Science* 112, 855-866

Richnau N., Aspenström P., 2001. Rich, a rho GTPase-activating protein domain containing protein involved in signaling by Cdc42 and Rac1. *J Biol Chem.*276(37):35060-70.

Richnau N., Fransson A., Farsad K. & Aspenstrom P., 2004. RICH-1 has a BIN/Amphiphysin/Rvsp domain responsible for binding to membrane lipids and tubulation of liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 1034–1042

Ridley A.J., 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* 16:522–529

Ron D., Kazanietz M.G., 1999. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.*

Saarikangas J., Zhao H., Lappalainen P., (2010). Regulation of the Actin Cytoskeleton-Plasma Membrane Interplay by Phosphoinositides *Physiol Rev* vol. 90 no. 1 259-289

Saras J., Franzen P., Aspenström P., Hellman U., Gonez LJ., Heldin C-H., 1997. A Novel GTPase-activating Protein for Rho Interacts with a PDZ Domain of the Protein-tyrosine Phosphatase PTPL1. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 272, No. 39, pp. 24333–24338

Seaman M. N., Sowerby P. J. & Robinson M. S., 1996. Cytosolic and membrane-associated proteins involved in the recruitment of AP-1 adaptors onto the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* 271, 25446–25451.

Severson A.F., Baillie D.L., and Bowerman B., 2002. A Formin Homology protein and a profilin are required for cytokinesis and Arp2/3-independent assembly of cortical microfilaments in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 12, 2066–2075.

Shelton C.A., Carter J.C., Ellis G.C., and Bowerman B., 1999. The nonmuscle myosin regulatory light chain gene *mlc-4* is required for cytokinesis, anterior-posterior polarity, and body morphology during *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *J. Cell Biol.* 146, 439–451.

Shemesh T., Luini A., Malhotra V., Burger K. N. & Kozlov M. M., 2003. Prefission constriction of Golgi tubular carriers driven by local lipid metabolism: a theoretical model. *Biophys. J.* 85, 3813–3827

Shimoyama Y., Tsujimoto G., Kitajima M. and Natori M., 2000. Identification of three human type-II classic cadherins and frequent heterophilic interactions between different subclasses of type-II classic cadherins. *Biochem J*;349:159–67.

Shusaku Kurisu and Tadaomi Takenawa., 2009. The WASP and WAVE family proteins. *Genome Biology*, 10:226

Spencer A.G., Orita S., Malone C.J., and Han M., 2001. A RHO GTPase-mediated pathway is required during P cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13132–13137.

Staehein LA., 1974. Structure and function of intercellular junctions. *Int Rev Cytol* 1974; 39: 191–283.

Steven R., Kubiseski T.J., Zheng H., Kulkarni S., Mancillas J., Ruiz Morales A., Hogue C.W., Pawson T. and Culotti J., 1998. UNC-73 activates the Rac GTPase and is required for cell and growth cone migrations in *C.elegans*. *Cell* 92, 785–795.

- Takai Y., Sasaki T., Matozaki T., 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208.
- Takano K., Toyooka K., Suetsugu S., 2008. EFC/F-BAR proteins and the N-WASP–WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO J* 27:2817–2828
- Tepass U., Gruszynski-DeFeo E., Haag T.A., Omatyar L., Torok T. and Hartenstein V., 1996. *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes Dev.* 10, 672–685.
- Tognon C.E., Kirk H.E., Passmore L.A., Whitehead I.P., Der C.J., Nassar N., Hoffman G.R., Manor D., Clardy J.C., Cerione R.A., Kay R.J., 1998. Regulation of RasGRP via a phorbol ester. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6995–7008.
- Tomar and Schlaepfer, 2009. Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Curr Opin Cell Biol.* ; 21(5): 676–683.
- Tsujita K., Suetsugu S., Sasaki N., Furutani M., Oikawa T., Takenawa T., 2006. Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J Cell Biol.* Jan 16;172(2):269-79.
- Tursun B., Cochella L., Carrera I., Hobert O., 2009. A toolkit and robust pipeline for the generation of fosmid-based reporter genes in *C.elegans*. *PLoS one* 4 (3) e4625.
- Vázquez-Manrique RP., Nagy AI., Legg JC., Bales OA., Ly S., Baylis HA., 2008. Phospholipase C-epsilon regulates epidermal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 4(3):e1000043.
- Wallace SW., Durgan J., Jin D., Hall A., 2010. Cdc42 regulates apical junction formation in human bronchial epithelial cells through PAK4 and Par6B. *Mol Biol Cell.* (17):2996-3006. Epub 2010 Jul 14.
- Wallis S., Lloyd S., Wise I., Ireland G., Fleming T.P., Garrod D., 2000. The alpha isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells, *Mol. Biol. Cell* 11 1077–1192.
- Wells CD., Fawcett JP., Traweger A., Yamanaka Y., Goudreault M., Elder K., Kulkarni S., Gish G., Virag C., Lim C., Colwill K., Starostine A., Metalnikov P.,

Pawson T., 2006. A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell*. 125(3):535-48.

Williams B.D. and Waterston R.H., 1994. Genes critical for muscle development and function in *Caenorhabditis elegans* identified through lethal mutations. *J. Cell Biol.* 124, 475–490.

Williams-Masson E.M., Malik A.N., and Hardin J., 1997. An actin-mediated two-step mechanism is required for ventral enclosure of the *C. elegans* hypodermis. *Development* 124, 2889–2901.

Williams-Masson E.M., Heid P.J., Lavin C.A., and Hardin J., 1998. The cellular mechanism of epithelial rearrangement during morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* dorsal hypodermis. *Dev. Biol.* 204, 263–276.

Wissmann A., Ingles J., McGhee J.D., and Mains P.E., 1997. *Caenorhabditis elegans* LET-502 is related to α -binding kinases and human myotonic dystrophy kinase and interacts genetically with a homolog of the regulatory subunit of smooth muscle myosin phosphatase to affect cell shape. *Genes Dev.* 11, 409–422

Wissmann A., Ingles J., and Mains P.E., 1999. The *Caenorhabditis elegans mel-11* myosin phosphatase regulatory subunit affects tissue contraction in the somatic gonad and the embryonic epidermis and genetically interacts with the Rac signaling pathway. *Dev. Biol.* 209, 111–127

Withee J., Galligan B., Hawkins N., and Garriga G., 2004. *Caenorhabditis elegans* WASP and Ena/VASP proteins play compensatory roles in morphogenesis and neuronal cell migration. *Genetics* 167, 1165–1176.

Wu Y.C., Cheng T.W., Lee M.C. and Weng N.Y., 2002. Distinct rac activation pathways control *Caenorhabditis elegans* cell migration and axon outgrowth. *Dev. Biol.* 250, 145–155.

Yap AS, Briehner WM, Gumbiner BM., 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:119-146.

Yonemura S., Wada Y., Watanabe T., Nagafuchi A., Shibata M., 2010. alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat Cell Biol.* (6):533-42

Zaidel-Bar R., Joyce MJ., Lynch AM., Witte K., Audhya A., Hardin J., 2010. The F-BAR domain of SRGP-1 facilitates cell-cell adhesion during *C. elegans* morphogenesis. *J Cell Biol.*;191(4):761-9.

Zhao ZS., Manser E., Loo T.H. & Lim L., 2000. Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6354–6363

Zhang Y., Sivasankar S., Nelson WJ. and Chu S., 2009. Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci USA*;106:109–14.

Zhang H. and Labouesse M., 2010. The Making of Hemidesmosome Structures In Vivo Developmental Dynamics 239:1465–1476, 2010

Zhang H., Landmann F., Zahreddine H., Rodriguez D., Koch M. & Labouesse M., 2011. A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis. *Nature* vol 471 p99

Zhang H., Webb D.J., Asmussen H., Niu S. & Horwitz A.F., 2005. A GIT1/PIX/Rac/PAK signalling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J. Neurosci.* 25, 3379–3388

Zimmerberg J., Kozlov MM., 2006. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:9–19

Zohn I., Campbell S., Khosravi-Far R., Rossman K. and Der C., 1998. Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene* 17, 1415 ± 1438